

DISSERTATION

Pharmakologische Wiederherstellung funktionell eingeschränkter Melanocortin-4-Rezeptoren (MC4R)

Pharmacological rescue of functionally impaired Melanocortin-4-receptors (MC4R)

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Josephine Höpfner

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. Peter Kühnen

Datum der Promotion: 28.02.2025

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vi
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung	4
1.1 Prävalenz, Entwicklung und Folgen von Adipositas	4
1.2 Probleme durch Adipositas im Kindesalter	5
1.3 Entstehung von Adipositas	6
1.4 Die wichtige Rolle des MC4R in der zentralen Hunger- und Sättigungsregulation.....	6
1.5 Nonsense Mutationen als Ursache genetischer Erkrankungen und Ziel neuartiger Therapieansätze.....	8
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2 Methodik	13
2.1 Plasmide und Liganden	13
2.2 Zellkultur	15
2.3 Transfektion	15
2.4 Kolorimetrische Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von G418.....	16
2.5 Fluoreszenzmikroskopie	16
2.6 Bestimmung der Oberflächen- und Gesamt-MC4R-Expression.....	17
2.7 Evaluation des G _s -Signalwegs mit Hilfe des GloSensor™-Assays.....	17
2.8 Rückschlüsse auf die G _{q/11} -Aktivierung mittels Reporteragen-Assay	18
2.9 Statistische Analyse der Ergebnisse	19
3 Ergebnisse	20
3.1 Dosisabhängige Reduktion der Viabilität von HEK-293-Zellen durch G418-Applikation.....	20

3.2	Nachweis des Überlesens von Stopp-Mutationen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	22
3.3	G418-induzierte Wiederherstellung der Zelloberflächen- und Gesamt-MC4R-Expression.....	22
3.4	Stimulation der intrazellulären G _s -Signalisierung von MC4R-Varianten durch G418 Behandlung.....	25
3.5	Erhöhung der PLC-Basalaktivität von MC4R-Varianten durch G418	27
4	Diskussion.....	30
4.1	Einbettung und Zielsetzung der Arbeit.....	30
4.1.1	Therapie genetischer Erkrankungen	30
4.1.2	Überlesen von Stopp-Mutationen durch Aminoglykoside <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	31
4.1.3	Überlesen von Stopp-Mutationen im MC4R.....	33
4.2	Zusammenfassung und Evaluation der Ergebnisse	34
4.2.1	Abhängigkeit der MC4R-Oberflächenexpression von der Position des Stopp-Codons	34
4.2.2	Die Rolle von Nonsense-mediated Decay	35
4.2.3	Eine Wiederherstellung der Signalisierung durch G418 war nicht erfolgreich	36
4.2.4	Eigenschaften der Zellreihen COS7 und HEK-293 als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse.....	38
4.2.5	Einfluss des eingesetzten Readthrough-Agens G418	38
4.2.6	Vergleich der untersuchten MC4R-Varianten	39
4.3	Limitationen der Arbeit und Ausblick	41
5	Schlussfolgerungen	43
	Literaturverzeichnis	44
	Eidesstattliche Versicherung.....	54
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	55
	Druckexemplar der Publikation	56

Lebenslauf.....	73
Komplette Publikationsliste	75
Danksagung	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Untersuchte MC4R nonsense Mutationen mit den jeweiligen Stopp-Codons.....	10
Tabelle 2. Auflistung der neu designten Primer. Dargestellt sind Name und Sequenz der für das HiBiT-Assay designten Oligonukleotide.....	12
Tabelle 3. Beispiele für Studien über Translational Readthrough durch Aminoglykoside.....	30

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 5 - 19 Jahren in der WHO Region Europa, nach Geschlecht (1975 - 2016).....	3
Abbildung 2. Schematische Darstellung der zentralen Hunger- und Sättigungsregulation.....	5
Abbildung 3. Schematische Darstellung des MC4R mit Markierung der bekannten nonsense Mutationen, die einen Funktionsverlust bewirken... ..	7
Abbildung 4. Schematische Darstellung des MC4R mit Markierung der in diesem Projekt genauer untersuchten nonsense Mutationen.....	9
Abbildung 5. Schematische Darstellung des pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vektors....	12
Abbildung 6. Abnahme des Überlebens von HEK-293-Zellen nach 48 h abhängig von der applizierten G418 Konzentration.....	19
Abbildung 7. Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der MC4R-Lokalisierung ohne (a) und mit (b) G418-Behandlung.....	21
Abbildung 8. MC4R Expression des WT und der verschiedenen MC4R-Varianten ohne und mit G418 Behandlung.....	22
Abbildung 9. G _s -Signalisierung der MC4R-Varianten nach Stimulation durch alpha-MSH und SM mit und ohne G418-Behandlung.....	24
Abbildung 10. Aktivierung des G _{q/11} -Signalwegs durch MC4R-WT und MC4R-Varianten mit und ohne G418-Behandlung.....	26

Abkürzungsverzeichnis

AgRP	Agouti-related-Peptide
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	Area under the curve
AVPR2	Vasopressin-Rezeptor 2
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
[cAMP]_i	Konzentration des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphats
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COS	CV-1 in Origin with SV40 gene
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	European Medicines Agency
EU	Europäische Union
FCS	fetales Kälberserum
G418	Geneticin
GEDA	Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell“
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GWAS	genomweite Assoziationsstudie
HEK-293	human-embryonic-kidney 293
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
KiGGS	Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland
LEP	Leptin
LEPR	Leptinrezeptor
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MEM	Minimum Essential Medium
MRAP2	Melanocortin 2 receptor accessory protein 2

mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NCD	non-communicable disease
Ncl.	Nucleus
NEAA	nicht-essenzielle Aminosäuren
NPY	Neuropeptid Y
PCSK1	Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PTC	premature termination codon
rlu	relative Lichteinheit
SM	Setmelanotide
SV40	Simian-Virus 40
TMD	Transmembrandomäne
TR	translational readthrough
V2R	Vasopressin 2 Rezeptor
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
YFP	yellow fluorescent protein

Zusammenfassung

Einleitung: Die seit Jahrzehnten ansteigende Adipositasprävalenz in der Bevölkerung stellt ein ernstes Gesundheitsproblem dar. Manifestiert sich Adipositas bereits im Kindesalter, führt dies häufig zu multiplen Folgeerkrankungen und einer drastischen Einschränkung der Lebensqualität. Bei bis zu 5 % aller Patient:innen liegen Mutationen im *Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)* vor, der eine zentrale Rolle in der hypothalamischen Hunger- und Sättigungsregulation spielt. U.a. kann es durch vorzeitige Stopp-Mutationen (PTCs) im *MC4R* zu einem nahezu kompletten Funktionsausfall kommen, jedoch existieren hierfür derzeit noch keine Therapieoption. Ein Ansatz zur Therapie PTC-vermittelter Erkrankungen ist das Unterdrücken der PTCs durch den Einsatz von Aminoglykosidantibiotika, sog. Translational Readthrough. Ziel ist eine Wiederherstellung der jeweiligen Proteinexpression und -funktion. Für nonsense mutierte *MC4R*-Varianten zeigten bisherige Studien in non-humanen Zellen vielversprechende Ergebnisse. In dieser Arbeit wurden erstmals in einem humanen System Versuche zur pharmakologischen Wiederherstellung von *MC4R*-Varianten durchgeführt. Neben einer Charakterisierung der Rezeptorexpression und einer Messung des G_s -Signalwegs wurde insbesondere auch Wert auf die Untersuchung des $G_{q/11}$ -Signalwegs gelegt. Seit einigen Jahren ist eine Kopplung des *MC4R* an diesen Weg bekannt, es wurden allerdings bis dato keine Untersuchungen bei *MC4R*-Stopp-Mutationen durchgeführt.

Methoden: Alle Versuche wurden in HEK-293 Zellen durchgeführt. Vor den funktionellen Assays wurde die optimale Geneticin (G418)-Konzentration in nicht-transfizierten Zellen ermittelt. Anschließend erfolgte die Charakterisierung der *MC4R*-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie und Ermittlung der Oberflächen- und Gesamtexpression mit und ohne G418. Rückschlüsse auf die G_s -Signalisierung und den Einfluss von G418 konnten durch Messung der cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit alpha-MSH und Setmelanotide gemessen werden, die $G_{q/11}$ -Aktivierung wurde mittels Reporteragen-Assay bestimmt.

Ergebnisse: Die G418-Behandlung führte nur zu minimalen Verbesserungen der Rezeptorexpression oder -funktion. Im Vergleich zum *MC4R*-Wildtyp waren die *MC4R*-Expression und -Funktion stark reduziert. Interessanterweise wurde eine signifikante Zunahme der Basalaktivität im $G_{q/11}$ -Signalweg durch G418 bei den *MC4R*-Varianten festgestellt.

Fazit: In der vorliegenden Arbeit war keine überzeugende Wiederherstellung der Funktion *MC4R*-Varianten durch G418-Behandlung möglich. Eine Therapie mit Aminoglykosiden scheint daher keine vielversprechende neue Therapieoption für Adipositas hervorgerufen durch *MC4R*-Stopp-Mutationen zu sein. Trotzdem sollte der Ansatz weiter untersucht werden. Hierbei sollte der Fokus auf ausgewählte Mutationen gelegt werden und diese in einem neuen Modell und mit anderen Readthrough-Substanzen getestet werden.

Abstract

Introduction: For several decades the prevalence of obesity in the population has steadily increased, which poses a serious health problem. When obesity manifests in childhood, it often leads to multiple comorbidities and a drastic reduction in quality of life. In up to 5 % of all patients, mutations in the *Melanocortin-4 receptor (MC4R)* are present, which plays a central role in hypothalamic hunger and satiety regulation. Premature stop mutations (PTCs) in the *MC4R* can result in a nearly complete loss of function, but currently no therapeutic options are available for this condition. One approach to treat PTC-mediated diseases is the suppression of PTCs through the use of aminoglycoside antibiotics, known as translational readthrough. The goal is to restore protein expression and function. Previous studies in non-human cells have shown promising results for *MC4R* stop mutations. This study represents the first attempt to pharmacologically restore nonsense mutated *MC4R* variants in a human system. In addition to characterising receptor expression and measuring the G_s signalling pathway, particular emphasis was placed on investigating the $G_{q/11}$ pathway. Although coupling of *MC4R* to this pathway has been known for some years now, no studies have been conducted on nonsense mutated *MC4R* variants until now.

Methods: All experiments were conducted in HEK-293 cells. Prior to functional assays, the optimal Geneticin (G418) concentration was determined in non-transfected cells. Subsequently, *MC4R* expression was characterised using fluorescence microscopy, and surface and total expression were determined with and without G418. Insights into G_s signalling and the influence of G418 were obtained by measuring cAMP accumulation after stimulation with alpha-MSH and setmelanotide, and $G_{q/11}$ activation was determined using a reporter gene assay.

Results: G418 treatment only resulted in minimal improvements of receptor expression or function. Compared to the MC4R wild-type, expression and function of the MC4R-stop-variants were significantly reduced regardless of G418-application. Interestingly, G418 was found to significantly increase basal activity of the MC4R-stop-mutations in the $G_{q/11}$ signalling pathway.

Conclusion: In this study, no convincing restoration of the function of MC4R-variants through G418 treatment was possible. Therefore, at this point aminoglycoside therapy does not appear to be a promising new treatment option for obesity caused by *MC4R* stop mutations. Nevertheless, the approach should be further investigated, focusing on selected mutations and testing them in a new model with different readthrough-inducing substances.

1 Einleitung

Übergewicht und Adipositas sind ernst zu nehmende Probleme, die immer mehr Menschen in Deutschland und weltweit betreffen. Entwickelt sich das Übergewicht bereits im Kindesalter, bleibt es häufig bis ins Erwachsenenalter bestehen und führt zu multiplen Folgeerkrankungen (1). Der Erforschung neuartiger Ansätze zur Therapie von Adipositas bei Kindern und Jugendlichen kommt daher eine immer größer werdende Bedeutung zu. In dieser Arbeit wurden Grundlagenuntersuchungen zu einem neuartigen Therapieansatz für bestimmte Formen von monogenetischer Adipositas durchgeführt.

1.1 Prävalenz, Entwicklung und Folgen von Adipositas

Nicht-übertragbare Erkrankungen (Non-communicable Diseases; NCDs) sind heutzutage die häufigste Todesursache. In der Region Europa sind sie laut World Health Organization (WHO) verantwortlich für 90 % der Todesfälle und 85 % der Lebensjahre, in denen die Gesundheit durch Krankheit eingeschränkt ist (Years lived with disability). Einer der Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von NCDs ist Adipositas, die als komplexe multifaktorielle Erkrankung mit abnormaler Vermehrung des Körperfetts definiert ist (2). Laut Definition der WHO besteht bei Erwachsenen ab einem Body Mass Index (BMI) von 25 kg/m² Übergewicht. Bei einem BMI von 30 kg/m² und mehr spricht man hingegen von Adipositas. Bei Kindern erfolgt die Einteilung abhängig von Alter und Geschlecht (3, 4). Adipositas-assoziierte NCDs sind u.a. Diabetes mellitus Typ 2, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, verschiedene Krebserkrankungen und chronische Atemwegserkrankungen wie das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom (2, 5, 6).

Weltweit sind fast 700 Millionen Menschen von Adipositas betroffen (7). Dabei scheint die Prävalenz insbesondere in den reicheren Industriestaaten hoch zu sein: in den WHO Regionen Amerika und Europa ist die Prävalenz von Adipositas bei Erwachsenen weltweit gesehen am höchsten (2). Laut Angaben der Studie „Gesundheit in Deutschland aktuell“ (GEDA) von 2019/2020 sind in Deutschland 53,5 % der Erwachsenen übergewichtig. Die Adipositasprävalenz liegt bei 20 % und nimmt seit Beginn der 1990er Jahre stetig zu (8).

1.2 Probleme durch Adipositas im Kindesalter

Auch bei Kindern steigt der Anteil an Übergewicht und Adipositas stetig an (Abb. 1). Im Zeitraum von 1975 bis 2016 hat sich die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern im Alter von 5 - 19 Jahren weltweit mehr als vervierfacht und ist so von 4 % auf 18 % gestiegen. Dies bedeutet, dass 2016 über 340 Millionen Kinder zwischen 5 und 19 Jahren übergewichtig oder adipös waren (3). Nutzt man das Referenzsystem der WHO,

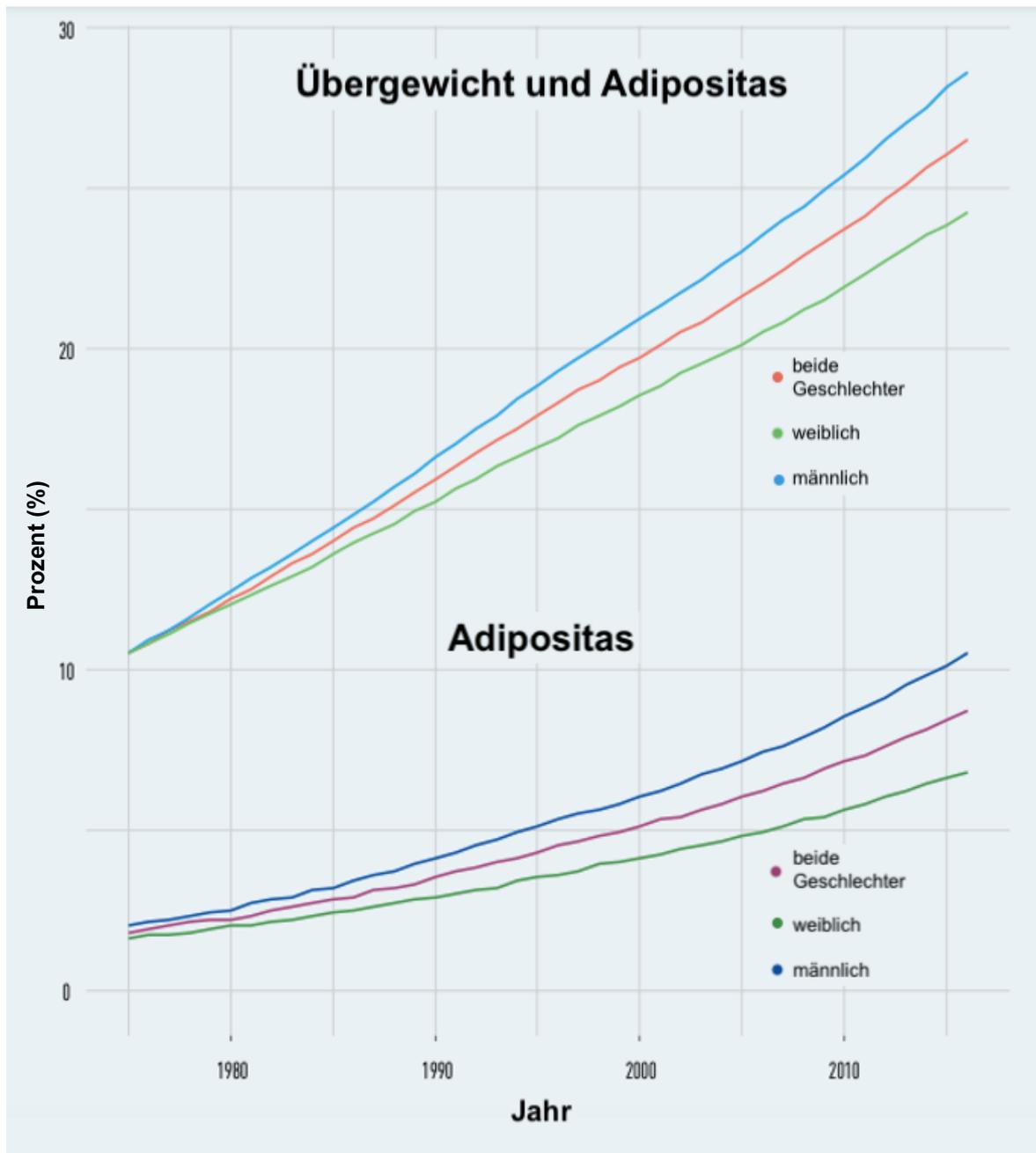


Abb. 1. Prävalenz von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen im Alter von 5 - 19 Jahren in der WHO Region Europa, nach Geschlecht (1975 - 2016). (Quelle: modifiziert nach World Health Organization Regional Office for Europe, 2022)

ist in Deutschland laut Studie zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland (KiGGS) Welle 2 (2014 - 2017) mehr als jedes vierte Kind (26,3 %) im Alter von 5 bis 17 Jahren übergewichtig. Bei 8,8 % liegt sogar eine Adipositas vor (9).

Bereits im Kindesalter kann Übergewicht gesundheitliche Beeinträchtigungen wie Fettstoffwechselstörungen, Insulinresistenz oder Beschwerden des Bewegungsapparats bewirken, die bis ins Erwachsenenalter negative gesundheitliche Folgen haben (4, 10). Ebenso kann Adipositas bei Kindern und Jugendlichen zu psychosozialen Belastungen durch Mobbing in der Schule und zu einem negativem Selbstwertgefühl oder Depressionen führen (11, 12). Insgesamt konnten bei übergewichtigen Kinder und Jugendlichen Einschränkungen der Lebensqualität in verschiedensten Lebensbereichen (Körper, Psyche, Selbstwertgefühl, Freunde und Schule) im Gegensatz zu normalgewichtigen Kindern festgestellt werden (13).

1.3 Entstehung von Adipositas

Adipositas ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung, bei der neben einem bewegungsarmen Lebensstil und einem Überangebot an energiereichen Lebensmitteln auch genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung spielen. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten bereits mehrere hundert genetische Varianten bestimmt werden, die stark mit Adipositas assoziiert sind (2). Ebenso zeigten Zwillingsstudien den starken Einfluss von Genetik auf das Körpergewicht (14). Es gibt darüber hinaus Adipositas-Formen, die durch Variation eines einzelnen Gens entstehen, sog. monogene Adipositas. Betroffen sind hierbei oft Gene, die eine Rolle in der zentralen Regulation von Hunger und Sättigung spielen und Teil des Leptin-Melanocortin-Signalwegs sind.

1.4 Die wichtige Rolle des MC4R in der zentralen Hunger- und Sättigungsregulation

Das Hormon Leptin (LEP) wird im Fettgewebe gebildet und kann über Bindung an den Leptinrezeptor (LEPR) auf Neuronen im Nucleus (Ncl.) arcuatus des Hypothalamus wirken, die Proopiomelanocortin (POMC) exprimieren (Abb. 2). Mit Hilfe des Enzyms Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 1 (PCSK1) kann POMC zu alpha- und beta-Melanocyten-stimulierendem Hormon (MSH) prozessiert werden, den endogenen Liganden des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R). Die MC4R-Aktivierung löst ein Sättigungsgefühl aus und erhöht den Energieverbrauch (15). Eine Stimulation des LEPR kann sich neben

den POMC-exprimierenden Neuronen ebenso auf Neuronenpopulationen auswirken, die die Gene Agouti-related-Peptide (AgRP) und Neuropeptide Y (NPY) exprimieren. AgRP und NPY sind ebenfalls an der Regulation des MC4R beteiligt und lösen ein starkes Hungergefühl aus (16).

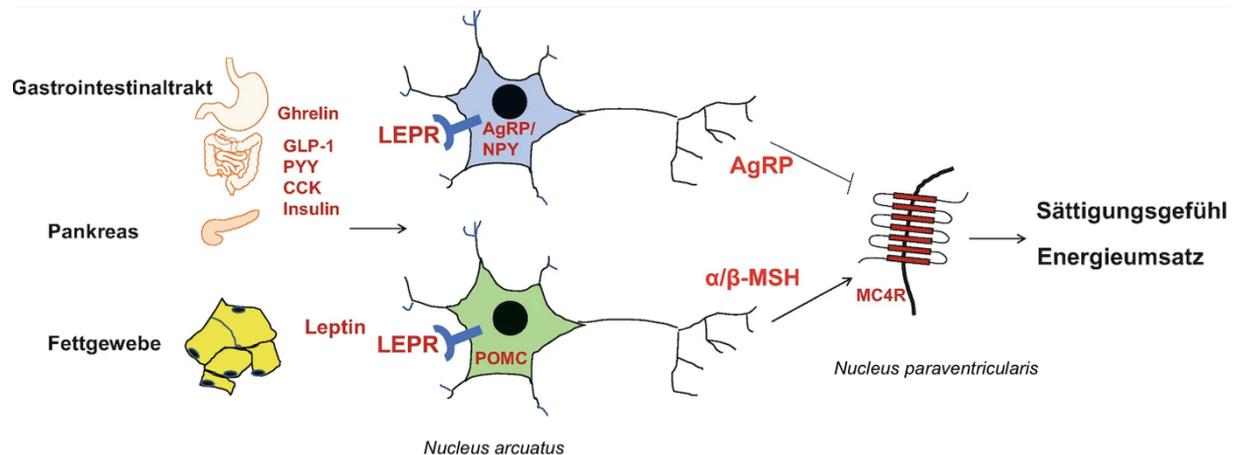


Abb. 2. Schematische Darstellung der zentralen Hunger- und Sättigungsregulation. (Quelle: modifiziert nach Kühnen, 2022)

Bei bis zu 5 % adipöser Patient:innen konnte ein Defekt des MC4R festgestellt werden. Dabei sind heterozygote *MC4R* Varianten ein relevanter genetischer Risikofaktor (17, 18). Die neben dem *MC4R*-Gen am häufigsten zu monogenen Adipositas führenden Gene sind *LEP*, *LEPR*, *POMC* und *PCSK1* (19). Über 20 weitere Gene sind bekannt, die bei Mutation zu starker Adipositas führen können (20).

Der MC4R ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) und besitzt sieben Transmembrandomänen (TMD), die durch je drei extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär. Der MC4R ist einer von fünf beschriebenen Melanocortin-Rezeptoren und wird primär im Gehirn exprimiert, insbesondere im Ncl. paraventricularis des Hypothalamus (21).

Als GPCR kann der MC4R verschiedene intrazelluläre Signalwege und damit second messenger Systeme aktivieren. Seit Langem ist eine Adenylylcyclase-stimulierende Signalisierung über den G_s -Weg bekannt, wodurch es zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP)-Spiegels und nachfolgend zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) kommt. In den letzten Jahren konnte aber auch gezeigt werden, dass der MC4R auch über weitere Kaskaden signalisiert, z.B. durch Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs. Auch eine Kopplung zu $G_{q/11}$ konnte gezeigt werden, durch die

Phospholipase C (PLC) aktiviert wird. Neben der seit langem bekannten G_s -Aktivierung könnten diese Signalwege auch verantwortlich für die Appetit-hemmende Wirkungen des MC4R sein (22).

Kommt es zu loss-of-function-Mutationen im *MC4R*, äußern sich diese klinisch durch Hyperphagie und hochgradige Adipositas, da das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -abgabe nicht gehalten werden kann (18, 23, 24). Das starke Übergewicht manifestiert sich bereits im frühen Kindesalter. Außerdem scheint ein MC4R-Funktionsverlust mitunter zu einer überdurchschnittlichen Körpergröße zu führen (25). In der Mehrzahl der Fälle gibt es jedoch neben dem starken Übergewicht keine weiteren phänotypischen Auffälligkeiten. Ebenso sind Serumlipid- und Leptinkonzentrationen sowie freie Kortisolspiegel im Urin meist unauffällig (26).

Bis heute sind über 300 verschiedene *MC4R* Mutationen beschrieben (27, 28), von denen etwa 25 % einen kompletten Funktionsverlust bewirken (29).

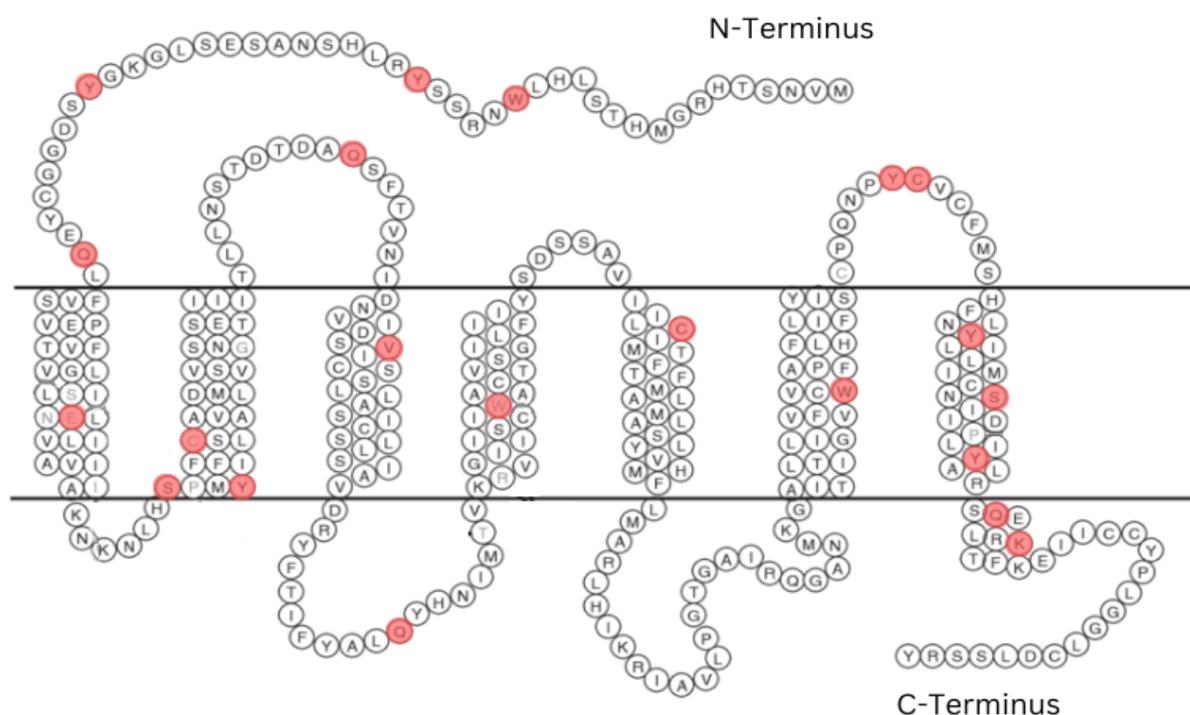
1.5 Nonsense Mutationen als Ursache genetischer Erkrankungen und Ziel neuartiger Therapieansätze

Etwa 11 % aller genetischen Erkrankungen beruhen auf nonsense Mutationen (30), z.B. Muskeldystrophie Typ Duchenne, Mukoviszidose oder Hämophilie (31). Durch eine Punktmutation wird ein frühzeitiges Stopp-Codon (premature termination codon; PTC) in die Gensequenz eingebaut und es kommt zu einem verfrühten Abbruch der Translation und Bildung eines funktionslosen Proteins. Auch für das *MC4R* Gen wurden bereits über 20 verschiedene nonsense Mutationen beschrieben, die allesamt zu einem kompletten Funktionsverlust des Rezeptors führen (Abb. 3). Die PTCs kommen hierbei je nach Mutation in unterschiedlichen Abschnitten des Rezeptors vor (28, 29, 32) (s. Abb. 3). Die in Europa am häufigsten festgestellte nonsense Mutation des *MC4R* ist die Y35X Mutation (33), die im N-Terminus des Proteins lokalisiert ist.

Während für andere Formen von monogener Adipositas wie POMC- und LEPR-Mangel in den letzten Jahren erfolgreiche Therapien zugelassen werden konnten (34), gibt es für Patient:innen mit *MC4R* nonsense Mutationen derzeit keine etablierte Behandlung. Ein Ansatz zur Behandlung von Erkrankungen, die auf nonsense Mutationen beruhen, ist das translationale Überlesen (translational readthrough; TR). Durch den Einsatz bestimmter Wirkstoffe sollen die nonsense Mutationen während der Translation mit Absicht falsch

abgelesen werden, um damit die Synthese eines vollständigen und weitgehen funktiona-
len Proteins zu ermöglichen.

Das Prinzip von TR wurde erstmals 1964 beschrieben (35) und wird seitdem als potenti-
elle Therapieform für verschiedene Erkrankungen erforscht und besitzt auch klinische
Relevanz. So ist zum Beispiel das Medikament Translarna seit 2014 von der European
Medicines Agency (EMA) für die Behandlung von Muskeldystrophie Typ Duchenne in-
folge einer nonsense Mutation im Dystrophin Gen bei Patient:innen ab zwei Jahren zu-
gelassen, die noch gehfähig sind (36). Auch für verschiedene andere Erkrankungen wie
Mukoviszidose (10 % der Patient:innen haben eine Klasse-I-Mutation des Gens *Cystic
Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)* mit PTC (37)) und X-chromo-
somal vererbten nephrogenen Diabetes insipidus (19 nonsense Mutationen im Gen *Va-
sopressin-Rezeptor 2 (AVPR2)* sind bekannt (38)) wurde TR als vielversprechender The-
rapieansatz bereits untersucht (39, 40).



Zur Induktion des TR werden häufig Aminoglykosidantibiotika eingesetzt (41). Hierbei kommen vorzugsweise die Aminoglykoside Geneticin (G418) und Gentamicin häufig zur Anwendung (42). Sie entfalten ihre Wirkung am Ribosomen und induzieren durch Beeinflussung der Codon-Anticodon-Erkennung Fehler bei der Translation. Im Falle von PTCs ist dieser Effekt gewünscht, da so das PTC überlesen wird und die Translation durch Einbau einer zufälligen Aminosäure (AS) weitergeführt werden kann.

Auch für nonsense Mutationen im *MC4R* könnte TR einen vielversprechenden Therapieansatz darstellen. Erste Untersuchungen hinsichtlich TR bei *MC4R*-Stopp-Mutationen wurden bereits erfolgreich in nicht-humanen CV-1 in Origin with SV40 gene (COS) 7 Zellen durchgeführt. Die Behandlung mit G418 zeigt bei den vier ausgewählten Varianten (W16X, Y35X, E61X und Q307X) vielversprechende Ergebnisse. So konnte ein vermehrter Einbau funktioneller Melanocortin 4 Rezeptoren mit G_s-Protein Signalisierung gezeigt werden, die zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration ([cAMP]_i) in den nicht-humanen, MC4R-transfizierten COS7-Zellen führte (33).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Infolge der weltweit ansteigenden Adipositasprävalenz und der dadurch gesteigerten Morbidität und Mortalität der Bevölkerung ist es von großer Bedeutung, erfolgreiche Therapien zur Bekämpfung von Adipositas zu finden und so die große Belastung auf das Gesundheitssystem zu verringern.

Ein wichtiger Angriffspunkt für neue Therapieansätze stellt der MC4R dar, der eine Schlüsselrolle in der zentralen Hunger- und Sättigungsregulation spielt. Jedoch gibt es bis heute keine effektive Therapie für Patient:innen mit *MC4R*-Stopp-Mutationen.

Brumm et al. konnten bereits aussichtsreiche Ergebnisse einer funktionellen Wiederherstellung der G_s-Signalisierung von nonsense mutierten *MC4R*-Varianten durch TR in COS7-Zellen zeigen. Ob die vielversprechenden Ergebnisse an den nicht-humanen Zellen jedoch auch eine Bedeutung an humanen Zellmodellen aufweisen oder übertragbar sind, kann bislang nicht abgeschätzt werden. Diesbezüglich fehlen Daten in der Literatur. Außerdem wurde in den funktionellen Assays ausschließlich der G_s-Signalweg untersucht. Seit einigen Jahren ist jedoch die Wichtigkeit des G_{q/11}-Signalweges für die Gewichtsregulation bekannt (22, 43).

Um zu evaluieren, ob die Ergebnisse auf ein humanes Zellmodell übertragbar sind, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Untersuchungen an human-embryonic-kidney-

293 (HEK-293) Zellen durchgeführt (44). Neben der Beurteilung der Proteinexpression und des G_s -Signalwegs wurde großer Wert daraufgelegt, zum ersten Mal auch der $G_{q/11}$ -Signalweg sowie dessen Beeinflussung durch G418-Applikation zu untersuchen.

HEK-293 Zellen sind ein häufig verwendetes Zellmodell zur Untersuchung von GPCRs, da sie sich durch eine hohe Expression von GPCRs auszeichnen (45). Ein weiterer, insbesondere für den MC4R spezifischer Vorteil von HEK-293-Zellen ist die Expression von über 60 neuronalen Genen (46, 47). Dadurch besitzen HEK-293 Zellen einige Eigenschaften, die neuronalen Zellen sehr ähneln. Da der MC4R hauptsächlich im Ncl. paraventricularis des Hypothalamus exprimiert wird, spielte diese Eigenschaft der HEK-293-Zellen eine wichtige Rolle bei der Wahl eines sowohl humanen als auch physiologischen Zellmodells.

Insgesamt soll diese Arbeit ein besseres und breiteres Verständnis hinsichtlich der Möglichkeiten einer funktionellen Wiederherstellung der Signaltransduktion von nonsense-mutierten MC4R-Varianten in einem physiologischeren Modell ermöglichen, um so neue

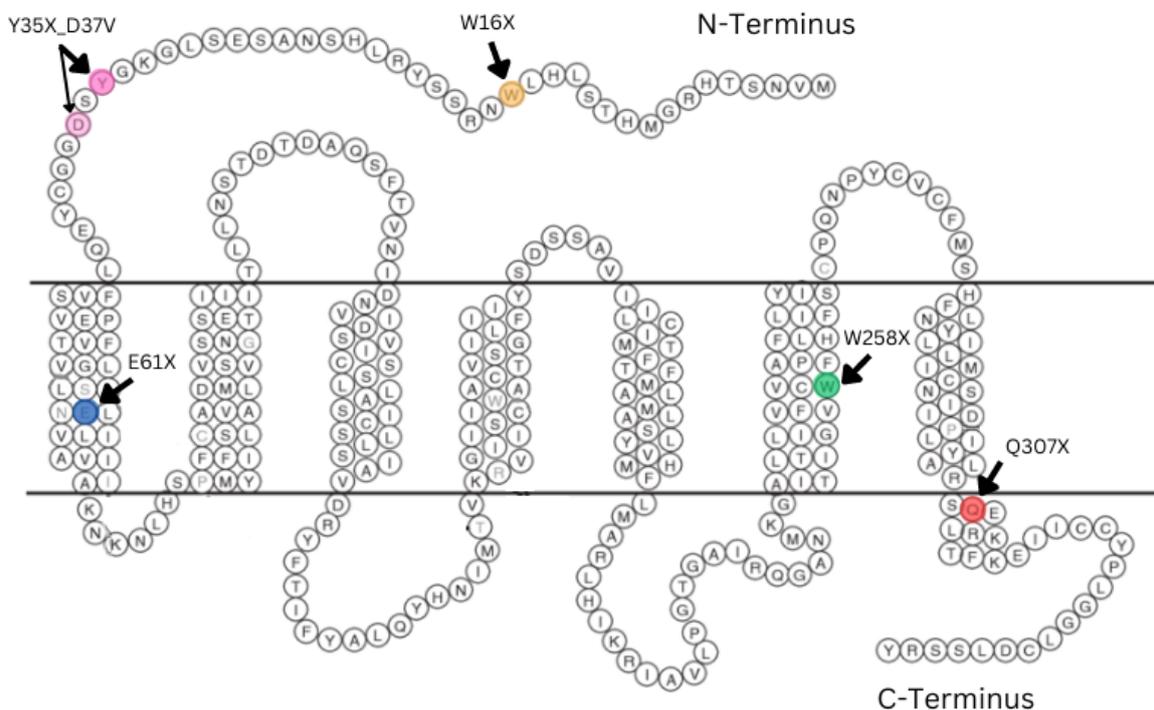


Abb. 4. Schematische Darstellung des MC4R mit Markierung der in diesem Projekt genauer untersuchten nonsense Mutationen. (Quelle: modifiziert nach Wang et al., 2014)

Erkenntnisse über mögliche Therapieansätze für Patient:innen mit Adipositas durch MC4R-Stopp-Mutationen zu finden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von TR an fünf MC4R-Stopp-Mutationen untersucht, die in unterschiedlichen Bereichen des MC4R vorkommen (Abb. 4) (44). Durch die Wahl dieser fünf Varianten konnte somit auch evaluiert werden, welche Bedeutung die Position des PTCs innerhalb des Rezeptors für eine erfolgreiche Induktion des TR spielt. Zudem unterscheiden sich die ausgewählten Mutationen durch die Sequenz ihres jeweiligen PTCs. Es gibt 3 verschiedene Stopp-Codons (TGA, TAG, TAA) und jedes ist mindestens einmal in den fünf Mutationen vertreten (Tab. 1). Dies bietet die Möglichkeit, zusätzlich Aussagen über die Auswirkung der Art des Stopp-Codons auf den Erfolg des TR zu treffen.

Tab. 1. Untersuchte MC4R nonsense Mutationen mit den jeweiligen Stopp-Codons. (eigene Darstellung)

	W16X	Y35X_D37V	E61X	W258X	Q307X
WT Sequenz	CAC-CTC- TGG -AAC- CGC	AAA-GGC- TAC -TCT- GAT	TTG-TTG- GAG -AAT- ATC	GTC-TGC- TGG -GCC- CCA	CGG-AGT- CAA -CAA- CTG
nonsense- mutierte Se- quenz	CAC-CTC- TGA -AAC- CGC	AAA-GGC- TAA -TCT- GTT	TTG-TTG- TAG -AAT- ATC	GTC-TGC- TGA -GCC- CCA	CGG-AGT- TAA -GAA- CTG
Farbcodierung des Stop-Co- dons	opal	ockerfarben	bernstein- farben	opal	ockerfarben
Erstbeschrei- bung der Mu- tation in der Literatur	Marti et al, 2003 (48)	Hinney et al, 1999 (49)	Brumm et al, 2008 (50)	Brumm et al, 2008 (50)	Reinehr et al, 2007 (51)

2 Methodik

Zur Untersuchung der Veränderung von Expression und funktionellen Eigenschaften von nonsense mutierten MC4R-Varianten durch TR wurden mehrere *in vitro* Assays in HEK-293 Zellen durchgeführt. Hierbei wurde das Aminoglykosidantibiotikum Geneticin (G418) zur Induktion des TR eingesetzt.

2.1 Plasmide und Liganden

Für die Untersuchung der Oberflächen- und Gesamtexpression (HiBiT-Assay) wurden der MC4R-Wildtyp (WT) und die *MC4R*-Stopp-Mutationen in den pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) kloniert (Abb. 5). Um nachfolgend die Mutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese einzufügen, wurden passende Primer (Tab. 2) entworfen und es erfolgten eine Mutagenese-PCR sowie darauffolgend ein Verdau mit dem Restriktionsenzym DpnI. Für die anschließend durchgeführte Transformation wurden kompetente *Escherichia coli* DH5 α Zellen eingesetzt, die routinemäßig für

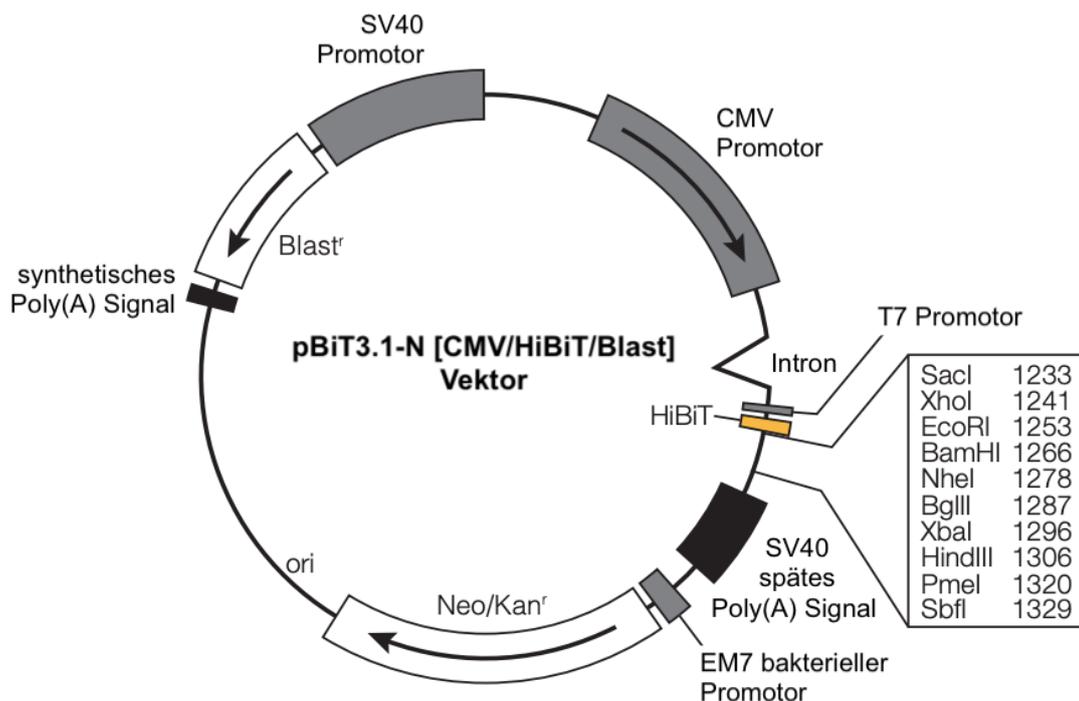


Abb 5. Schematische Darstellung des pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vektors. Die verschiedenen Bestandteile des Vektors sind beschriftet, u.a. der SV40 Promotor und der HiBiT-Peptid-Tag. (Quelle: modifiziert nach Promega Corporation, 2017)

Tab. 2. Auflistung der neu designten Primer. Dargestellt sind Name und Sequenz der für das HiBiT-Assay designten Oligonukleotide. (eigene Darstellung)

Name	Sequenz (5'-3')
MC4R_W16X_F	GCACACTTCTCTGCACCTCTGAAACCGCAGCAGTTA-CAGACTG
MC4R_W16X_R	CAGTCTGTAAGTCTGCTGCGGTTTCA-GAGGTGCCAGAGAAGTGTGC
MC4R_Y35X_F	CCTTGGAAAAGGCTAATCTGATGGAGGGTGC
MC4R_Y35X_R	GCACCCTCCATCAGATTAGCCTTTTCCAAGG
MC4R_E61X_F	CTGGGTGTCATCAGCTTGTTGTAGAATATCTTAGTGATT-GTGG
MC4R_E61X_R	CCACAATCACTAAGATATTCTACAACAAGCTGATGACAC-CCAG
MC4R_W258X_F	CGTCTTTGTTGTCTGCTGAGCCCCATTCTTCCTCCAC
MC4R_W258X_R	GTGGAGGAAGAATGGGGCTCAGCAGACAACAAAGACG
MC4R_Q307X_F	CCTCTGATTTATGCACTCCGGAGTTAAGAAGTCTGAG-GAAAACCTTCAA
MC4R_Q307X_R	CTTTGAAGGTTTTCTCAGTTCTTAACTCCG-GAGTGCATAAATCAGAG

Klonierungen eingesetzt werden und für ihre besonders hohe Transformationseffizienz bekannt sind (52, 53). Die Bakterien wurden auf Kanamycin-haltigen Agarplatten ausplattiert, da der pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vektor eine Kanamycin-Resistenz aufweist und so eine korrekte Isolierung der Klone möglich war (54). Mittels Plasmidpräparation mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System (Promega, Mannheim, Deutschland) wurde nach Angaben des Herstellers die Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus den Zellen extrahiert. Nachfolgend wurden eine Sanger-Sequenzierung zur Verifizierung der Mutagenese durchgeführt. Zur Bestätigung des Vorhandenseins der jeweiligen Mutation wurde ein Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) eingesetzt. MC4R-Stopp-Mutationen im Expressionsvektor pcDps lagen bereits vor, sodass hier transformierte *Escherichia coli* DH5α Zellen direkt ausplattiert werden konnten. Nach

einer Plasmidpräparation wurde auch hier eine Sanger-Sequenzierung und ein anschließendes BLAST durchgeführt, um die korrekte DNA-Sequenz sicherzustellen. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die MC4R-Varianten zusätzlich am C-Terminus mit yellow fluorescent protein (YFP) getaggt (44).

Der Ligand alpha-MSH wurde von der Firma Merck (Taufkirchen, Deutschland) gekauft. Der Ligand Setmelanotide (SM) wurde freundlicherweise von Dr. P. Scheerer (Inst. f. Medizinische Physik und Biophysik, Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt.

2.2 Zellkultur

HEK-293 Zellen (CRL-1573TM) wurden von American Type Culture Collection (ATCC) erworben und in Minimum Essential Medium (MEM; Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert, welches zusätzlich mit 5 % fetalem Kälberserum (FCS; Gibco, Carlsbad, CA, USA) und 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA; Biochrom, Berlin, Deutschland) versetzt war. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) aufbewahrt und regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontamination getestet. Für die Assays zu Viabilität, Oberflächen- und Totalexpression sowie G_s- und G_{q/11}-Signalisierung wurden die HEK-293 Zellen jeweils in 96-Well-Platten mit 1.5*10⁴ Zellen pro Well ausgesät und für 24 h inkubiert. Für die Assays zu Viabilität und G_{q/11}-Signalisierung wurden durchsichtige 96-Well-Platten mit Poly-L-Lysin-Beschichtung (Gibco, Waltham, MA, USA) genutzt, für die HiBiT- und GloSensorTM-Assays jeweils Poly-L-Lysin-beschichtete weiße 96-Well-Platten (Corning, Costar, NY, USA). Zur Messung der MC4R-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden durchsichtige 6-Well-Platten genutzt, wobei in jedes Well ein im Durchmesser 24 mm großes Deckgläschen (#1.5) aus Glas gesetzt wurde. Pro Well wurden 1.5*10⁵ Zellen ausgesät (44).

2.3 Transfektion

Für alle Assays (ausgenommen Fluoreszenzmikroskopie-Assays) erfolgte 24 h nach Aussaat der HEK-293 Zellen eine transiente Transfektion mit dem MC4R-WT und den Plasmiden mit MC4R-Stopp-Mutationen. Als Transfektionsreagenz wurde Metafectene (Biontex, München, Deutschland) eingesetzt, welches auf Liposomen basiert und sich durch eine geringe Zytotoxizität auszeichnet (55). Bei den GloSensorTM-Assays wurde zusätzlich das Plasmid pGloSensorTM-22F cAMP (Promega, Mannheim, Deutschland)

hinzugegeben. Für die Reporter-Gen-Assays wurde zusätzlich Reporter-DNA (pGL4.3(luc2P/NFAT/Hygro)) hinzugefügt. Bei den Fluoreszenzmikroskopie-Assays wurde das non-liposomale Transfektionsreagenz FuGENE® HD (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers eingesetzt (56). Im Falle einer Applikation von G418 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) erfolgte diese zum Zeitpunkt der Transfektion.

2.4 Kolorimetrische Bestimmung der Zellviabilität in Abhängigkeit von G418

Zur Messung des Zellüberlebens je nach eingesetzter G418-Konzentration wurde das Assay CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt (57). Ziel des Assays war die Bestimmung einer geeigneten G418-Konzentration für die nachfolgenden funktionalen Assays. Durch eine kolorimetrische Messung kann die Menge lebendiger Zellen pro Well bestimmt werden. Untransfizierte HEK-293 Zellen wurden mit aufsteigenden G418-Konzentrationen im Bereich von 50 - 1000 µg/mL für 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden nach Angaben des Herstellers je 10 µl CellTiter 96® AQueous One Solution pro Well hinzugefügt und die Zellen für weitere 1,5 h bei 37 °C inkubiert (58). Nach der Inkubationszeit wurde mit dem Anthos Microplate Reader 2001 (Biochrom, Berlin, Deutschland) die Absorption bei 490 nm gemessen. Als Kontrolle wurden Messungen an unbehandelten HEK-293 Zellen (Negativkontrolle) sowie an HEK-293 Zellen mit 5 µg/mL Puromycin (Positivkontrolle) durchgeführt.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die HEK-293 Zellen wurden mit den YFP-getaggten MC4R-Varianten transfiziert und in Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA, USA), ggf. mit G418-Zusatz, 48 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit je 1 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pro Well gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Fixierung mittels Paraformaldehyd (PFA). Hierzu wurde jeweils 1 mL 4 % PFA pro Well hinzugefügt. Es folgte die Anfärbung der Zellen mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und eine weitere Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Zellen nochmals drei Mal mit je 1 mL PBS pro Well gewaschen. Mittels des Eindeckmediums RotiMount FluorCare (Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Zellen auf Objektträgern konserviert. Für die Durchführung der Mikroskopie wurden ein konfokales Laser-Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) genutzt, welches über einen

Weißlicht-Laser und Hybriddetektoren verfügt. Die Anregung von YFP erfolgte bei 514 nm. Mit der Software ImageJ (v 1.53; National Institutes of Health, MD, USA) wurden die Bilder ausgewertet.

2.6 Bestimmung der Oberflächen- und Gesamt-MC4R-Expression

Mittels des Nano-Glo® HiBiT Detection Systems (Promega, Mannheim, Deutschland) (43) wurden die Oberflächen- und Gesamtexpression der verschiedenen *MC4R*-Varianten anhand von Lumineszenzentwicklung gemessen. Der für diesen Assay verwendete Vektor pBiT3.1-N enthält einen N-terminalen HiBiT-Peptid-Tag aus elf AS (54). Nach Zugabe des Substrats kann dieses an den HiBiT-Peptid-Tag binden, wodurch ein Lumineszenz-generierender Komplex entsteht (59, 60). Die Assays wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt: 48 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf 50 µL Opti-MEM ohne Phenolrot pro Well. Zusätzlich dazugegeben wurden jeweils 50 µL pro Well von entweder HiBiT extracellular Substrat zur Messung der Oberflächenexpression oder HiBiT lytic Substrat zur Messung der Gesamtexpression (jeweils Promega, Mannheim, Deutschland). Die Platten wurden für 3 Minuten orbital geschüttelt, anschließend folgte eine Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Messung der Lumineszenzentwicklung wurde der Berthold Microplate Reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) eingesetzt. Zur Hintergrundkontrolle wurde die Lumineszenz von HEK-293 Zellen bestimmt, die mit dem Leervektor pcDNA3 transfiziert wurden (44).

2.7 Evaluation des G_s-Signalwegs mit Hilfe des GloSensor™-Assays

Der GloSensor™-Assay ermöglicht eine einfache Aktivitätsmessung der G_s-Signalisierung durch Bestimmung der Veränderung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Echtzeit (61). Der Assay beruht auf dem Prinzip eines Biosensors. Er nutzt eine Firefly-Luciferase, die so modifiziert wurde, dass sie cAMP-Bindungsdomänen enthält. Bei Bindung von cAMP an die Luciferase findet eine Konformationsänderung statt, die eine Lumineszenzentwicklung auslöst (62). HEK-293 Zellen wurden mit MC4R-WT oder den nonsense mutierten MC4R-Varianten transfiziert und für 48 h inkubiert bei 37 °C. Im Falle einer G418-Behandlung erfolgte die Inkubation in einem Medium mit 125 µg/mL G418, bei den restlichen Zellen mit MEM (Gibco, Waltham, MA, USA). Nach der Inkubation erfolgte eine Äquilibrierung mittels einer Mischung aus 88 % CO₂-unabhängigem Medium

(Gibco, Waltham, MA, USA), 10 % FCS und 2 % GloSensor™ cAMP-Reagenz. Mittels des Berthold Microplate Readers (Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) wurde quantitativ die Lumineszenzentwicklung gemessen und in relativen Lichteinheiten (rlu) angegeben. Nach 10-minütiger Bestimmung der cAMP-Basalkonzentration folgte die Stimulation mit 1 μM alpha-MSH oder 1 μM SM. Die cAMP-Konzentration wurde über einen Zeitraum von insgesamt 42 min alle 2 min gemessen. Zur besseren Darstellung der cAMP-Anflutung nach Stimulation wurde neben einem Graph mit Angabe der totalen cAMP-Messwerte auch die Fläche unter dem Graphen (Area under the Curve; AUC) mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 9.3.1 (San Diego, CA, USA) berechnet (44).

2.8 Rückschlüsse auf die $G_{q/11}$ -Aktivierung mittels Reporter-Gen-Assay

Um die Signalaktivität des $G_{q/11}$ -Wegs zu charakterisieren, wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt, die auf dem Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) responsive element (RE) beruhen und die PLC-Aktivität messen. Bei einer Aktivierung der $G_{q/11}$ -Signalkaskade kommt es über mehrere Zwischenschritte zum Anstieg der PLC und nachfolgend auch des intrazellulären Calciums. Dieses kann wiederum das NFAT-RE aktivieren, welches ein Luciferase-Gen reguliert. Findet $G_{q/11}$ -Signalisierung statt, ist dies im Reporter-Gen-Assay durch eine Lumineszenzentwicklung zu messen. Es erfolgte eine Co-Transfektion gleicher Mengen von *MC4R*-Variante und NFAT-Reporterplasmid. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wurden die Liganden alpha-MSH oder SM zu den Zellen gegeben und es folgte eine weitere Inkubation für 6 h. Die Reaktion wurde durch Verwerfen des Mediums abgebrochen. Die Zellen wurden durch Einsatz eines Puffers (Passive Lysis Buffer; PLB; Promega, Fitchburg, WI, USA) lysiert und anschließend bei -80 °C für 10 min eingefroren. Nachdem die Zellen wieder vollständig aufgetaut waren, wurden jeweils 10 μL des Lysats auf eine weiße 96-Well-Platte transferiert. Mit einem Microplate Reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) wurden automatisch je 40 μL eines Firefly-Luciferase-Substrats (Promega, Mannheim, Deutschland) pro Well injiziert und die Lumineszenzentwicklung in rlu gemessen (44).

2.9 Statistische Analyse der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse sowie zur Berechnung der AUC wurde das Programm GraphPad Prism 9.3.1 (San Diego, CA, USA) eingesetzt. Als statistische Tests wurden eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) mittels Dunnett-Test und eine zweifache Varianzanalyse (two-way ANOVA) mittels Tukey-Test durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn der p-Wert ≤ 0.05 war. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Beim GloSensorTM-Assay wurden zugunsten einer besseren Übersicht teilweise die Mittelwerte ohne Standardfehler dargestellt.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob durch translationales Überlesen (Readthrough) die Funktion von MC4R-Varianten wiederhergestellt werden kann, die vorzeitige Stopp-Codons (premature termination codon; PTC) beinhalten. Als Wirkstoff zur Induktion für das Readthrough wurde das Aminoglykosid Geneticin (G418) ausgewählt.

Zunächst wurde die MC4R Expression abhängig von der G418-Konzentration mittels Fluoreszenzmikroskopie und die Oberflächen-Expressions mittels HiBiT-Assay ermittelt und im Anschluss die funktionellen Eigenschaften der MC4R-Varianten evaluiert. Hierfür wurden die Signalisierungseigenschaften für sowohl den G_s - als auch den $G_{q/11}$ -Signalweg vor und nach G418-Behandlung gemessen. Die Stimulation der MC4R-Varianten erfolgte mittels des endogenen Liganden alpha-MSH und des synthetischen Analogons SM.

3.1 Dosisabhängige Reduktion der Viabilität von HEK-293-Zellen durch G418-Applikation

Vor der Durchführung funktioneller Assays war es wichtig, eine geeignete Konzentration an G418 zu bestimmen. Hierbei galt es zwei wichtige Faktoren zu beachten: obwohl bei einer höheren G418-Konzentration auch eine erhöhte Readthrough-Aktivität zu erwarten ist, besteht bei höheren Konzentrationen gleichzeitig eine stärkere Zytotoxizität. Ein gutes Überleben der Zellen ist jedoch ein integraler Bestandteil eines sicheren Therapieansatzes. In der Literatur finden sich für die Anwendung bei unterschiedlichen Zellmodellen G418-Konzentrationen in einem Bereich von 75 bis 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (33, 63-65).

Angelehnt an den der Literatur entnommenen Konzentrationsbereich wurden in diesem Zellviabilitätsassay Konzentrationen zwischen 50 und 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 verwendet. Als Zellmodell dienten nicht-transfizierte HEK-293-Zellen, die für 48 h mit steigenden G418-Konzentrationen inkubiert wurden. Im Anschluss wurde mittels kolorimetrischer Messung das Überleben der G418-behandelten Zellen bestimmt und mit den unbehandelten HEK-293-Zellen verglichen.

Insgesamt konnte durch die Behandlung mit G418 eine dosisabhängige Abnahme der Überlebensrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen von bis zu 45 % festgestellt werden.

Bereits bei der niedrigsten G418-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ verringerte sich die Zellviabilität G418-behandelter Zellen. Ein signifikantes Abnehmen der Viabilität wurde ab einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ detektiert. Hier lag das Überleben im Vergleich zu den unbehandelten Zellen im Mittel bei nur noch $76,0 \pm 3,5 \%$ (Abb. 6) (44).

Um ausreichende Zellviabilität nach Inkubation mit G418 zu gewährleisten, wurde in den nachfolgenden Experimenten eine G418-Konzentration von 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Dies entsprach der höchsten G418-Konzentration, bei der es noch zu keinem signifikanten Absterben der Zellen kam. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle überlebten hierbei

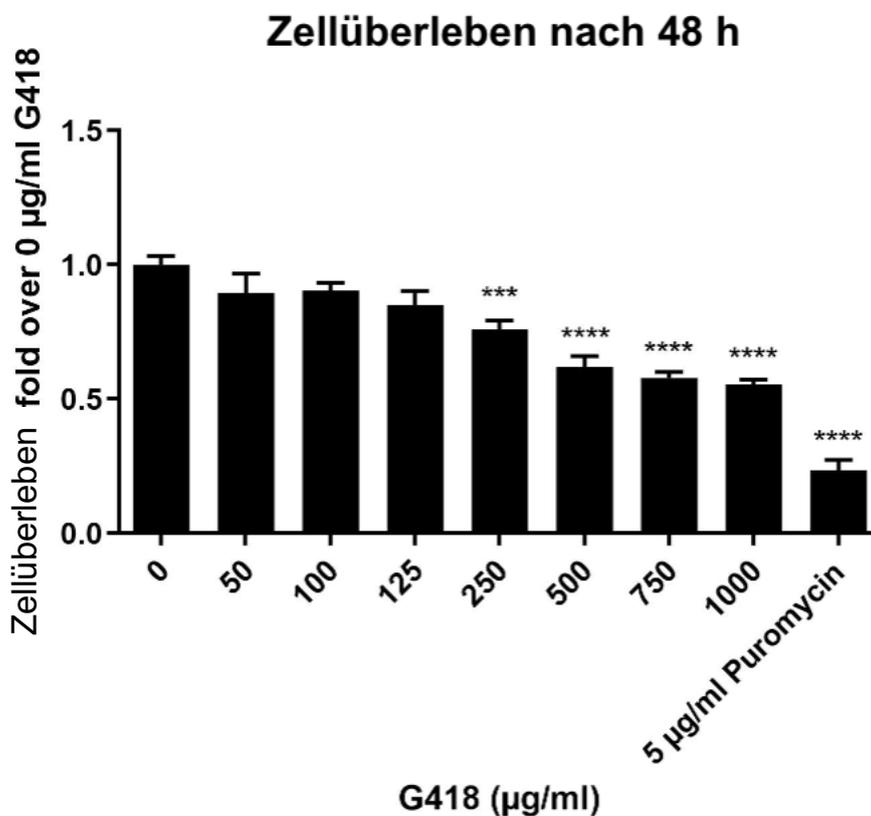


Abb. 6. Abnahme des Überlebens von HEK-293-Zellen nach 48 h abhängig von der applizierten G418 Konzentration. Als Referenz dient der Messwert von unbehandelten HEK-293-Zellen (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418), der Wert wurde auf 1 festgelegt. Bei ansteigender G418-Konzentration lässt sich ein zunehmender Effekt auf das Überleben der Zellen feststellen. Ab einer Konzentration von 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ besteht eine signifikante Verringerung des Zellüberlebens. Als Positivkontrolle wurde Puromycin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) eingesetzt. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Dunnetts Test berechnet (*** p -Wert = 0.0001–0.001; **** p -Wert < 0.0001). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen, jeweils in Triplikaten durchgeführt. (Quelle: modifiziert nach Höpfner et al, 2022)

85,1 ± 5,1% der Zellen. Die in dieser Arbeit eingesetzte G418-Konzentration von 125 µg/mL liegt im Bereich der in der Literatur verwendeten G418-Konzentrationen.

Als Positivkontrolle für den Verlust der Zellviabilität wurde zusätzlich das Aminoglykosid Puromycin gewählt. Dieses zeigt bekanntermaßen in vergleichsweise geringen Konzentrationen schon hohe zytotoxische Wirkungen (66, 67). Dementsprechend fiel das Überleben der Zellen bereits bei der geringen Konzentration von 5 µg/mL auf unter 25 % verglichen mit den unbehandelten Zellen ab.

3.2 Nachweis des Überlesens von Stopp-Mutationen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Kontrolle, dass durch den Einsatz von G418 ein Überlesen der Stopp-Mutationen stattfindet, wurde die Rezeptor-Expression mittels Fluoreszenz gemessen. Hierzu wurden der MC4R-WT und die *MC4R*-Varianten mit YFP am C-Terminus markiert. Wieder erfolgte der Vergleich von G418-behandelten mit unbehandelten Zellen.

Beim MC4R-WT konnte unabhängig von der G418-Applikation ein deutliches Fluoreszenz-Signal beobachtet werden. Dieses befand sich sowohl intrazellulär als auch an der Zelloberfläche (Abb. 7) (44).

Im Gegensatz dazu konnte bei den *MC4R*-Varianten ohne Aminoglykosidbehandlung kein bzw. nur ein minimales Signal detektiert werden. Nach 48 Stunden Inkubation mit G418 zeigte sich eine Verstärkung des Fluoreszenz-Signals. Dies weist darauf hin, dass das Überlesen generell funktioniert hat. Im Vergleich zum WT war das Signal jedoch nach wie vor deutlich geringer ausgeprägt. Während bei WT ein flächiges Fluoreszenzsignal gesehen werden konnte, stellte es sich bei den nonsense-Varianten eher punktuell dar (44). Exemplarisch sind die Ergebnisse der Mutationen W16X und Q307X in Abb. 7 dargestellt. Die jeweiligen PTCs befinden sich in unterschiedlichen Regionen des *MC4R* und eignen sich daher, um stellvertretend für die anderen Mutationen präsentiert zu werden.

3.3 G418-induzierte Wiederherstellung der Zelloberflächen- und Gesamt-MC4R-Expression

Zur weiteren Charakterisierung der MC4R-Expression diente der HiBiT-Assay, mit welchem die Oberflächen- und Gesamtexpression von MC4R-WT und MC4R-Varianten weiter untersucht werden konnte. Der MC4R-WT und die verschiedenen Mutationen wurden hierfür am N-Terminus mit einem HiBiT-Tag versehen.

Sowohl die Oberflächen- als auch die Totalexpression der MC4R-Variante erfolgte in Abhängigkeit von der Position der Mutation innerhalb des Rezeptors. Je weiter entfernt vom N-Terminus die Mutation auftrat, desto stärker war die im HiBiT-Assay detektierte Expression (Abb. 8) (44).

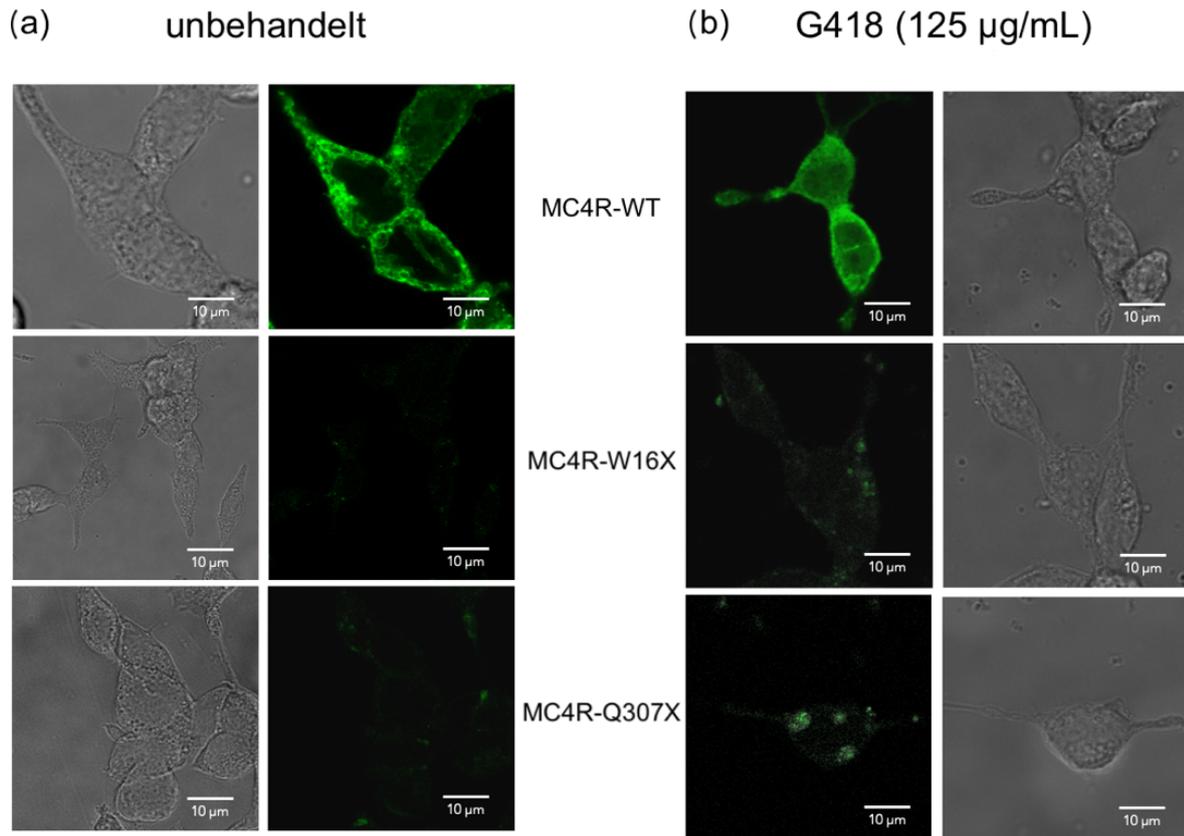


Abb. 7. Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der MC4R-Lokalisierung ohne (a) und mit (b) G418-Behandlung. Die jeweils linke Spalte zeigt Phasenkontrastaufnahmen, rechts sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Der MC4R-WT und die -Varianten wurden vorab mit YFP markiert. Die Kontrasteinstellungen sind jeweils identisch.

Beim WT (obere Reihe) ist sowohl in Abwesenheit (a) als auch in Anwesenheit (b) von G418 eine starke Expression an Zelloberfläche und im Zellinneren zu erkennen. Bei den MC4R-Varianten W16X (mittlere Reihe) und Q307X (untere Reihe) ist ohne G418-Behandlung nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal erkennbar. Durch die G418-Behandlung wird das Fluoreszenzsignal stärker, jedoch ist es weiterhin deutlich geringer ausgeprägt als beim WT. (Quelle: modifiziert nach Höpfner et al, 2022)

Dementsprechend waren bei der W16X-Variante die Oberflächenexpression und Gesamtexpression am geringsten, da hier die Mutation bereits im N-Terminus des Rezeptors liegt. Ähnlich verhielt sich Y35X_D37V, deren Mutation nur wenige AS entfernt und ebenfalls im N-Terminus zu finden ist.

Bei der E61X-Variante tritt das PTC erst etwas später in der Sequenz auf und befindet sich in der ersten TMD. Im Vergleich zur W16X- und Y35X_D37V-Variante konnte eine höhere Expression festgestellt werden, jedoch war diese immer noch bedeutend geringer als beim WT.

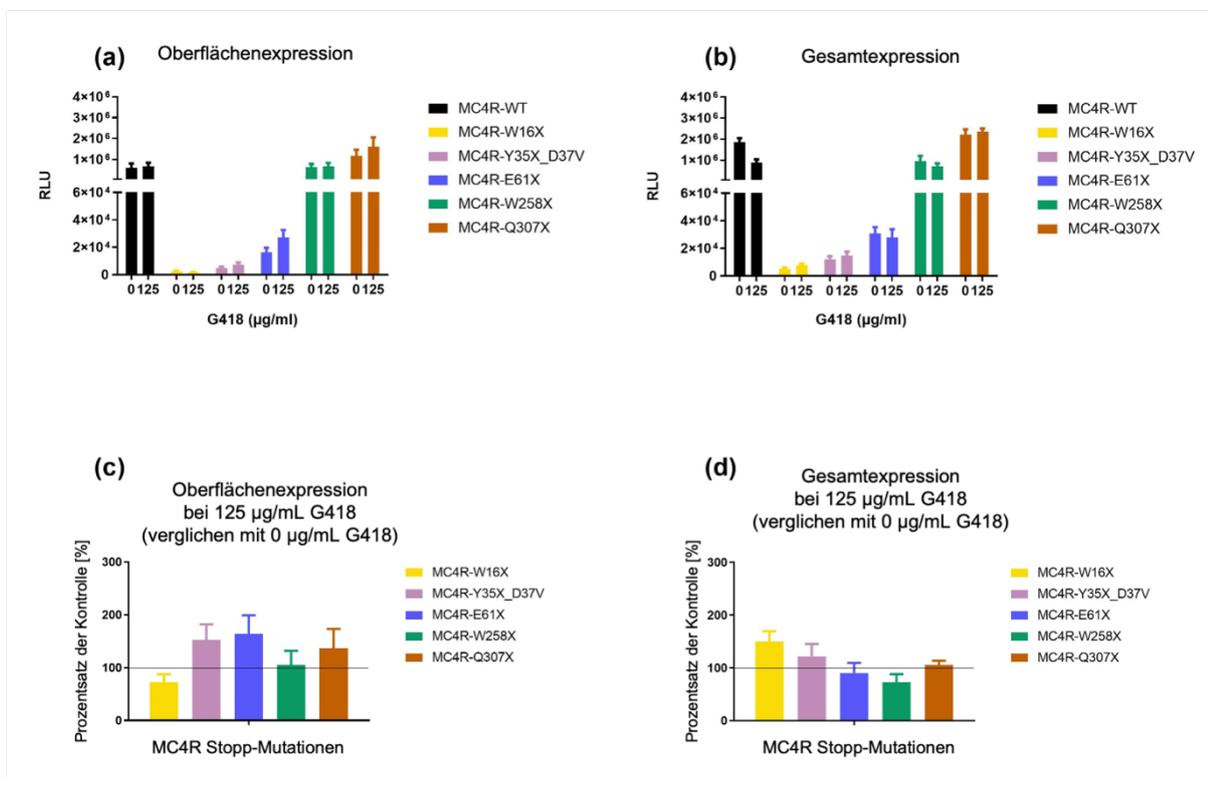


Abb. 8. MC4R Expression des WT und der verschiedenen MC4R-Varianten ohne und mit G418 Behandlung. Für den Assay wurden die MC4R-Varianten am N-Terminus mit einem HiBiT-Tag versehen. In der oberen Reihe sind die Oberflächenexpression (a) und Gesamtexpression (b) jeweils in An- und Abwesenheit von G418 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Oberflächen- und Gesamtexpression stark von der Position der Stopp-Mutation innerhalb des Rezeptors abhängen. Je weiter die Mutation 3' Ende des Gens auftritt, desto höher ist die Expression. In der unteren Reihe ist der prozentuale Unterschied der Expression nach G418-Behandlung verglichen mit der Expression bei unbehandelten Zuständen (Kontrolle) dargestellt. E61X zeigt die stärkste Zunahme hinsichtlich der Oberflächenexpression durch die G418-Behandlung. Die Gesamtexpression ist bei W16X am stärksten angestiegen. Die Werte stammen von vier unabhängig und in Triplikaten durchgeführten Experimenten. (Quelle: modifiziert nach Höpfner et al, 2022)

Die Mutationen W258X und Q307X treten jeweils an einer weiter 3' gelegenen Stelle im Rezeptor auf. So findet sich bei der W258X in TMD 6 Segment das PTC, bei der Q307X im Helix 8 Segment. Sowohl für die Oberflächenexpression als auch die totale Rezeptorexpression waren die Werte dem WT sehr ähnlich (44).

In einem nächsten Schritt wurde der Effekt einer Inkubation mit G418 auf die Expression und Expressionsmuster der *MC4R*-Varianten überprüft. Bei allen Mutationen außer der W16X konnte durch G418-Behandlung eine vermehrte Oberflächenexpression detektiert werden. Am stärksten war die G418-induzierte Expressionszunahme im Vergleich zu den nicht-G418-behandelten Messungen bei der E61X-Variante ausgeprägt. Verglichen mit den Messungen ohne G418-Behandlung konnte eine Steigerung der Oberflächenexpression auf 164,25 % gemessen werden. Bei den Messungen zur Totalexpression zeigte sich die größte Änderung bei W16X. Die Totalexpression stieg hier auf 149,61 %. Insgesamt konnte jedoch kein statistisch signifikanter Effekt festgestellt werden, weder bei den Messungen zur Oberflächenexpression noch zur Totalexpression (44).

3.4 Stimulation der intrazellulären G_s-Signalisierung von *MC4R*-Varianten durch G418 Behandlung

Um die Auswirkungen einer Aminoglykosidbehandlung auf die G_s-Signalisierung zu bestimmen, wurden GloSensor™-Assays durchgeführt. Hierbei wurden der *MC4R*-WT und die verschiedenen *MC4R*-Varianten sowohl mit dem endogenen Liganden alpha-MSH als auch mit dem synthetischen Liganden SM stimuliert. Ziel war es herauszufinden, welche Auswirkungen eine Behandlung mit G418 auf die G_s-Signalisierung der *MC4R*-Varianten hat und wie die Signalisierung im Vergleich zum WT ausfällt.

Beim WT führte eine Stimulation sowohl mit dem endogenen Liganden alpha-MSH als auch mit dem synthetischen Liganden SM zu einem prompten und anhaltenden Anstieg von [cAMP]_i (44). Nach Stimulation mit alpha-MSH wurde ein mehr als siebenfacher Anstieg [cAMP]_i gegenüber der Basalaktivität im unstimulierten Zustand ermittelt. Nach Stimulation mit SM wurde eine ca. 14-fache Erhöhung von [cAMP]_i festgestellt, die damit annähernd doppelt so stark ausfiel wie die des endogenen Liganden alpha-MSH. Die Behandlung mit G418 führte es zu einer ähnlichen [cAMP]_i-Induktion wie bei den unbehandelten Zellen (s. Abb. 9).

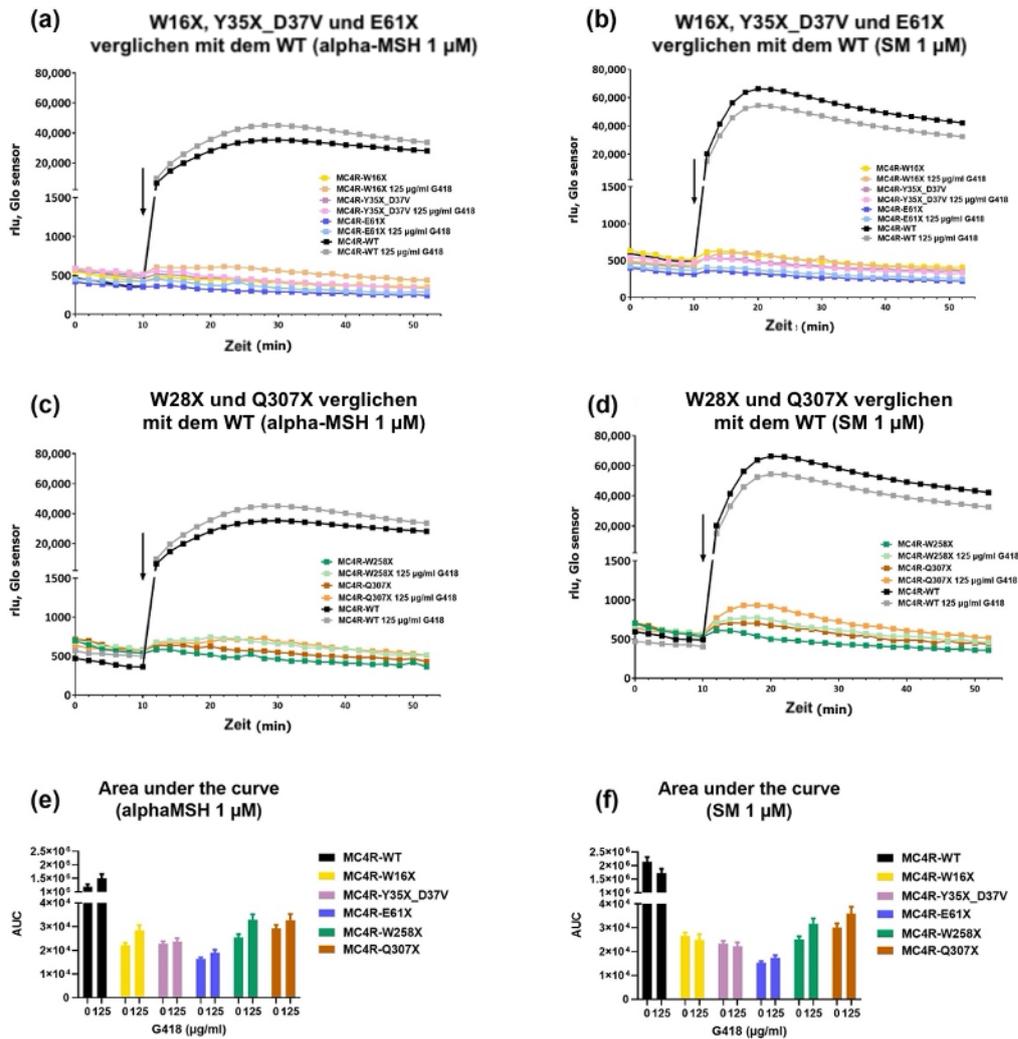


Abb. 9. G_s-Signalisierung der MC4R-Varianten nach Stimulation durch alpha-MSH und SM mit und ohne G418-Behandlung. Nach Messung der Basalaktivität der MC4R-Varianten wurden die Zellen mit alpha-MSH bzw. SM stimuliert und der cAMP-Anstieg in Echtzeit durch Lumineszenzentwicklung (rlu) gemessen. Beim WT kam es unabhängig von der G418-Behandlung und vom verwendeten Rezeptoragonisten zu einem prompten und anhaltenden Anstieg von cAMP. Während bei W16X, Y35X_D37V und E61X unabhängig von der G418-Behandlung nur eine geringe Veränderung der cAMP-Akkumulation festgestellt werden konnte, war der Anstieg bei W258X und Q307X vergleichsweise stärker, insbesondere bei Einsatz von SM. In (e, f) ist die Veränderung der Fläche unter der Kurve (AUC) durch Vorbehandlung mit G418 dargestellt. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Versuchen, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden. (Quelle: modifiziert nach Höpfner et al, 2022)

Bei den MC4R-Varianten W16X, Y35X_D37V und E61X war unter Kontrollbedingungen kein nennenswerter Anstieg der G_s-Signalaktivität nach Stimulation mit alpha-MSH und SM zu messen. Dies war sowohl bei Einsatz von alpha-MSH als auch von SM der Fall. Auch nach Behandlung mit G418 konnte kein signifikanter [cAMP_i]-Anstieg beobachtet

werden (44). So lag die Basalaktivität der W16X-Variante unter Kontrollbedingungen bei durchschnittlich 474 relativen Lichteinheiten (rlu). Der Höchstwert nach Stimulation mit alpha-MSH lag bei 479 rlu. Bei den G418-behandelten Zellen war die Basalaktivität von W16X geringfügig höher (545 rlu) und erreichte auch nach Stimulation mit alpha-MSH nur einen minimalen Anstieg auf höchstens 616 rlu.

Bei den Varianten W258X und Q307X war ohne G418-Applikation ebenso kein cAMP-Anstieg nach Stimulation messbar. Jedoch konnte durch die Aminoglykosidbehandlung ein geringfügiger Anstieg des cAMP-Spiegels induziert werden, der bei Stimulation mit dem synthetischen Liganden SM stärker ausfiel als unter Verwendung mit dem endogenen Liganden alpha-MSH (44). Der für die W258X gemessene Höchstwert nach Stimulation mit SM und G418-Behandlung lag ~155 rlu über dem Basalwert, bei Q307X ~320 rlu über dem Basalwert. Allerdings hielt der Anstieg im Gegensatz zum WT nicht über den gesamten Messzeitraum an, sondern fiel vor Beendigung der Messungen wieder auf das basale Level ab. Zur Quantifizierung des [cAMP]_i-Anstiegs wurde die AUC berechnet. Hierbei zeigte sich, dass eine G418-Behandlung bei den beiden Varianten W258X und Q307X zwar zu einem geringen, aber statistisch nicht signifikanten Anstieg der [cAMP]_i-Konzentration führte. Verglichen mit dem WT konnte bei beiden Varianten nur eine sehr geringe Induktion festgestellt werden. Bei Stimulation mit alpha-MSH konnte verglichen mit dem WT ein Wert von 2,18% für W258X und 2,20 % für Q307X gemessen werden. Bei Stimulation mit SM beliefen die Werte sich auf 1,85 % des WT für W258X und 2,10 % für Q307X.

Insgesamt konnte durch die Behandlung mit G418 bei den *MC4R*-Varianten keine signifikante Verstärkung der G_s-Signalisierung identifiziert werden (44).

3.5 Erhöhung der PLC-Basalaktivität von *MC4R*-Varianten durch G418

Neben der Kopplung des *MC4R* an den G_s-Signalweg ist auch eine Kopplung an G_{q/11}-Proteine bekannt, die zur Aktivierung Phospholipase C (PLC) -abhängiger second messenger führen. Die Aktivität der PLC konnte mittels nuclear factor of activated T-cells (NFAT)-Assays evaluiert werden und so Rückschlüsse auf die Aktivierung des G_{q/11}-Signalwegs getroffen werden.

Beim WT kam es nach Stimulation mit alpha-MSH und SM jeweils zu einer starken Zunahme der PLC-Aktivität. Die Induktion erfolgte unabhängig von G418, da die Behand-

lung mit G418 keine signifikant modulierende Wirkung auf die PLC-Aktivität zeigte. Allerdings konnte ein leichter, jedoch nicht signifikanter, Anstieg der Basalaktivität festgestellt werden (44).

Bei den *MC4R*-Varianten konnte nach Stimulation mit alpha-MSH und SM hingegen keine signifikant erhöhte PLC-Aktivität und damit keine $G_{q/11}$ -Aktivierung festgestellt werden. Auch hier hatte die Behandlung mit G418 keinen modulierenden Einfluss. Interessanterweise zeigten jedoch alle Mutationen nach G418-Behandlung einen signifikanten Anstieg ihrer Basalaktivität (Abb. 10) (44).

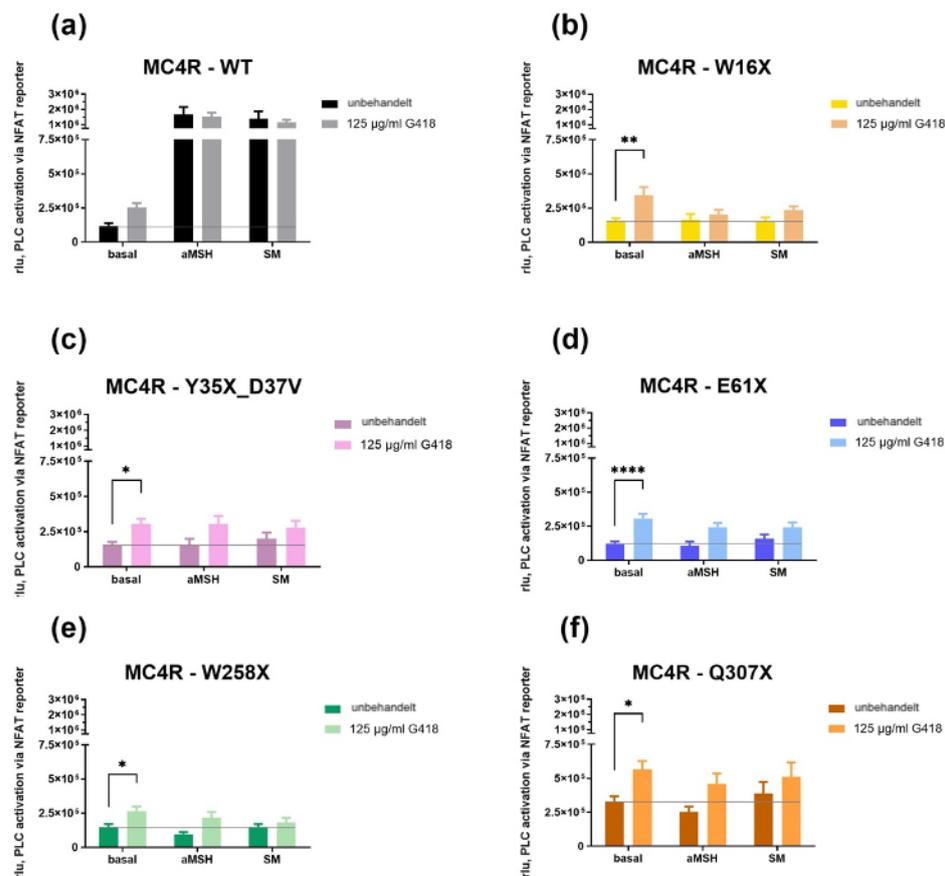


Abb. 10. Aktivierung des $G_{q/11}$ -Signalwegs durch *MC4R*-WT und *MC4R*-Varianten mit und ohne G418-Behandlung. Beim WT (a) zeigt sich unabhängig von der G418 Behandlung eine starke Induktion der PLC Aktivität bei Stimulation mit alpha-MSH oder SM. Im Gegensatz dazu konnte bei keiner der Mutationen eine nennenswert gesteigerte Signalisierung nach der Stimulation festgestellt werden. Dies war sowohl bei Einsatz von alpha-MSH als auch SM der Fall, auch die G418 Behandlung führte zu keinem starken Unterschied. Auffällig war hingegen, dass bei allen Mutationen durch die G418-Behandlung die Basalaktivität des Rezeptors signifikant anstieg. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Tukey Test berechnet (* p-Wert = 0.01–0.05; ** p-Wert = 0.001–0.01; **** p-Wert < 0.0001). Die Daten stammen aus vier bis acht unabhängig und jeweils in Triplicaten durchgeführten Versuchen. (Quelle: modifiziert nach Höpfner et al, 2022)

Insgesamt konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass in HEK-293-Zellen ein Überlesen der *MC4R*-Stopp-Mutationen durch G418 zwar grundsätzlich möglich ist, jedoch nur in einem geringen Ausmaß stattfindet (44). Eine ausreichende Wiederherstellung von Rezeptorexpression und -funktion war mit diesem Ansatz nicht möglich und die Wahrscheinlichkeit, dass dies in einem physiologischeren Zellmodell funktionieren wird, ist eher gering.

4 Diskussion

4.1 Einbettung und Zielsetzung der Arbeit

Die zentrale Hunger- und Sättigungsregulation wird maßgeblich durch den Leptin-Melanocortin-Weg reguliert. Teil dieses Signalwegs ist der MC4R (s. Abb. 2). Kommt es durch eine Mutation im *MC4R* zu einem Funktionsverlust, führt dies bei den Betroffenen zu starkem Übergewicht. Dieses manifestiert sich bereits im frühen Kindesalter und verursacht sowohl somatische als auch psychosoziale Problemen, die häufig bis ins Erwachsenenalter andauern (1). Insgesamt werden bei ca. 5 % aller Patient:innen mit Übergewicht Mutationen im *MC4R* festgestellt. Damit sind *MC4R*-Varianten ein wichtiger genetischer Risikofaktor (17). Im Jahr 2020 konnte erstmals ein Medikament zur Behandlung einiger Formen von monogener Adipositas zugelassen werden: Setmelanotide (SM; IMCIVREE™, Rhythm Pharmaceuticals) ist ein MC4R-Agonist mit Zulassung für die Behandlung von POMC-, PCSK1- und LEPR-Mangel (34). Diese Erkrankungen gehören allesamt zur Gruppe der monogener Adipositas. Jedoch gibt es weitere Formen, für die es derzeit keine erfolgreiche Therapie gibt, u.a. MC4R-Mangel durch nonsense Mutationen im *MC4R*.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Wiederherstellung der Rezeptorexpression und funktionellen Eigenschaften von nonsense mutierten *MC4R*-Varianten durch Translational Readthrough (TR) möglich ist (44). Dafür wurden HEK-293 Zellen mit fünf verschiedenen MC4R-Stopp-Mutationen transfiziert und mit dem Aminoglykosid G418 behandelt, welches bekannt für seine gute Induktion von TR ist (42).

4.1.1 Therapie genetischer Erkrankungen

Mehr als 4000 Gene konnten mit monogenen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Jedoch stellt die Therapie genetischer Erkrankungen immer noch ein großes Problem dar. Häufig ist lediglich eine symptomatische Therapie möglich, jedoch keine Heilung (68). So sind in der Europäischen Union (EU) nur 13 Gentherapeutika zugelassen, die eine kurative Behandlung ermöglichen (69). Auch wenn die Entwicklung und Zulassung dieser Medikamente revolutionär für die Therapie genetischer Erkrankungen war, so birgt die Gentherapie - wie jede Therapie - jedoch auch viele Nebenwirkungen und Risiken. Zum Beispiel wurde das Medikament Voretigen Neparvovec (Luxturna®, Novartis Euro-

pharm Limited) 2018 in der EU zur Behandlung bestimmter Formen von Retinitis pigmentosa zugelassen (69). Retinitis pigmentosa beschreibt eine Gruppe von Netzhauterkrankungen, die unbehandelt zur Erblindung führen. Häufige Nebenwirkungen der Therapie mit Luxturna® umfassen u.a. Einrisse, Ablösungen und Blutungen der Netzhaut, Beschädigungen der Makula oder Aderhautblutungen (70). Als wichtige potentielle Risiken der Therapie werden außerdem Tumorgenität und Immunreaktionen genannt (71). Hinzu kommen die sehr hohen Kosten und damit schlechte breite Verfügbarkeit einer Gentherapie. Eine Behandlung mit Luxturna® z.B. kostet ca. 700 000 €, wobei dies lediglich den reinen Medikamentenkosten entspricht (72).

Es besteht daher dringender Bedarf an weiteren Methoden, mit denen genetische Erkrankungen potentiell therapiert werden können. Hierbei sind besonders ein gutes Nebenwirkungsprofil und eine hohe Verfügbarkeit von Interesse. Ein wichtiger Ansatz ist das Unterdrücken von nonsense Mutationen, die bei ca. 11 % aller genetischer Erkrankungen ursächlich für die Krankheit sind (30). Beispiele sind bestimmte Formen von Mukoviszidose, Spinaler Muskelatrophie, Retinitis pigmentosa, verschiedenen hereditären Hauterkrankungen (sog. Genodermatosen) oder auch familiären Krebserkrankungen wie familiäre adenomatöse Polyposis (73, 74). Durch eine effektive Therapie von vorzeitigen Stopp-Mutationen könnte einer großen Anzahl an Patient:innen mit verschiedensten Krankheiten geholfen werden.

Der derzeit am weitesten verbreitete Therapieansatz ist das Unterdrücken von nonsense Mutationen durch TR. Dieses Prinzip setzt auf der Ebene der Translation an und führt zu einem Überlesen der nonsense Mutationen, sodass die Synthese eines vollständigen Proteins möglich ist. Teilweise findet dieses Prinzip bereits klinische Anwendung: Für bestimmte Formen von Muskeldystrophie Typ Duchenne ist durch die EMA seit 2014 das Medikament Ataluren (Translarna™, PTC Therapeutics International Limited) als Orphan Drug zugelassen, das durch das Prinzip des TR wirkt (36).

4.1.2 Überlesen von Stopp-Mutationen durch Aminoglykoside *in vitro* und *in vivo*

Das Überlesen von Stopp-Mutationen ist ein Prozess, der in geringem Maße immer stattfindet (sog. endogenes Readthrough) (42). Durch Einsatz verschiedener Substanzen kann das Überlesen jedoch gezielt induziert werden. Am besten charakterisiert ist hierbei der Effekt von Aminoglykosidantibiotika, die daher viel eingesetzt werden (75).

In vitro Versuche mit Aminoglykosiden wurden in zahlreichen Modellen durchgeführt.

Einige Beispiele für die dabei untersuchten Erkrankungen sind Mukoviszidose, Muskeldystrophie Typ Duchenne, pulmonale Hypertonie und weitere (Tab. 3) (76-81).

Tab. 3. Beispiele für Studien über Translational Readthrough durch Aminoglykoside für unterschiedliche Erkrankungen *in vitro* und *in vivo*. (eigene Darstellung)

Erkrankung	System	eingesetztes Aminoglykosid	Autor
Brugada-Syndrom und plötzlicher Herztod	<i>in vitro</i>	G418, Gentamicin	Teng et al., 2009
Faktor VII-Mangel	<i>in vitro</i>	G418, Gentamicin, Netilmicin	Pinotti et al., 2006
	<i>in vivo</i> (klinische Studie)	Gentamicin	Pinotti et al., 2006
Hypotrichosis simplex	<i>in vivo</i> (klinische Studie)	Gentamicin	Peled et al., 2020
Mukoviszidose	<i>in vitro</i>	G418, Gentamicin, Tobramicin	Howard & Frizzell et al., 1996
	<i>in vitro</i>	G418	Rowe et al., 2007
	<i>in vivo</i> (klinische Studie)	Gentamicin	Wilschanksi et al., 2003
Muskeldystrophie Typ Duchenne	<i>in vitro</i>	G418, Gentamicin, Paromomycin	Howard et al., 2000
	<i>in vivo</i> (Maus)	Gentamicin	Loufrani et al., 2004
	<i>in vivo</i> (Maus)	Gentamicin	Dunant et al., 2003
nephrogener Diabetes insipidus	<i>in vivo</i> (Maus)	G418	Sanguhl et al., 2004
pulmonale Hypertonie	<i>in vitro</i>	Gentamicin	Hamid et al., 2010
Rett-Syndrom	<i>in vitro</i>	G418	Merritt et al., 2020
	<i>in vivo</i> (Maus)	G418	

Insgesamt konnte bei allen aufgeführten Arbeiten ein Überlesen der Stopp-Mutationen durch den Einsatz von Aminoglykosiden festgestellt werden. Ebenso wurden Untersuchungen an unterschiedlichen *in vivo* Modellen durchgeführt. *In vivo* fielen die Ergebnisse

nicht so eindeutig aus wie *in vitro*: In einigen Arbeiten war eine Expression vollständiger Proteine und eine teilweise Wiederherstellung der Funktion im Mausmodell möglich (40, 82), in anderen Studien konnte durch Aminoglykosidapplikation hingegen keine Verbesserung der funktionellen Eigenschaften festgestellt werden (83). Zudem wurden bereits einige klinische Studien durchgeführt, z.B. an Patient:innen mit Mukoviszidose, Hypotrichosis simplex oder Faktor VII-Mangel (84-86). Ähnlich wie bei den *in vivo* Arbeiten in Tiermodellen waren die klinischen Studien unterschiedlich erfolgreich. Bei Patient:innen mit Faktor VII-Mangel konnten nur minimale Effekte durch eine Gentamicin-Applikation beobachtet werden, für verschiedene Genodermatosen wie u.a. die Hypotrichosis simplex wird es hingegen als neuartige Therapieoption vorgeschlagen (85-87).

Insgesamt scheint es nicht möglich zu sein, allgemeine Aussagen über die Anwendbarkeit von Aminoglykosiden hinsichtlich einer erfolgreichen Induktion von TR zu tätigen. Die Reaktion auf die Aminoglykosidbehandlung ist unterschiedlich und jeweils einzigartig für jedes untersuchte Gen und Protein, sodass der Erfolg also durch verschiedene Faktoren beeinflusst zu werden scheint. Demnach ist es unerlässlich, für die einzelnen Erkrankungen und Modelle jeweils eigene und neue Versuche durchzuführen.

4.1.3 Überlesen von Stopp-Mutationen im *MC4R*

Auch für Adipositas, die durch *MC4R*-Stopp-Mutationen ausgelöst wird, könnte TR einen spannenden neuartigen Therapieansatz darstellen. Für den *MC4R* existieren bis jetzt lediglich Daten von Versuchen in nicht-humanen COS7-Zellen. Diese waren vielversprechend und eine gewisse Wiederherstellung der Rezeptorfunktion konnte detektiert werden (33). Daher war es von großem Interesse, erstmals in einem humanen *MC4R*-Modell das Prinzip von TR bei nonsense Mutationen zu untersuchen und zu überprüfen, ob eine Reproduktion der Daten in diesem Modell möglich ist.

Als Zellsystem wurden in dieser Arbeit HEK-293 Zellen ausgewählt, die mit dem *MC4R*-WT und den verschiedenen Stopp-Mutationen transfiziert wurden (44).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit erstmals die Auswirkung von Aminoglykosiden auf den $G_{q/11}$ -Weg untersucht. Brumm et al. fokussierten sich hinsichtlich der funktionellen Untersuchung lediglich auf den G_s -Signalweg, weil dieser damals als der einzig wichtige Signalweg des *MC4R* bekannt war. Seit der Veröffentlichung dieser Daten konnte allerdings in mehreren Arbeiten die Aktivierung des $G_{q/11}$ -Signalwegs durch den *MC4R* und dessen wichtige Funktion in der Hunger- und Sättigungsregulation aufgezeigt werden (22, 43,

88). Im Gegensatz zum G_s -Signalweg, bei dem cAMP als second messenger wirkt, signalisiert der $G_{q/11}$ -Weg über eine Aktivierung der PLC und eine intrazelluläre Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}). Daher wurden für dieses Projekt verschiedene funktionelle Assays durchgeführt, um beide Signalwege sowie die Auswirkung von G418 evaluieren zu können. Zur Stimulation wurden sowohl der endogene Ligand alpha-MSH als auch der synthetische Ligand SM eingesetzt (44).

4.2 Zusammenfassung und Evaluation der Ergebnisse

Nachdem eine geeignete G418-Konzentration von 125 $\mu\text{g/mL}$ mit Hilfe eines Zellviabilitätsassays für die nachfolgenden Versuche ausgewählt werden konnte, erfolgte zuerst eine Charakterisierung der Rezeptorexpression durch zwei verschiedene Assays. Anschließend wurden funktionelle Assays für Evaluation des G_s - und $G_{q/11}$ -Signalwegs durchgeführt.

4.2.1 Abhängigkeit der MC4R-Oberflächenexpression von der Position des Stoppcodons

Zur Beschreibung der Rezeptorexpression wurden Fluoreszenzmikroskopie von MC4R nonsense Mutationen, die C-terminal mit YFP-getaggt waren, und ein Assay zum Nachweis der Oberflächen- und Gesamtexpression angewendet. Bei Einsatz des konfokalen Fluoreszenzmikroskops konnte bei den unbehandelten MC4R-Varianten kaum ein Fluoreszenzsignal gesehen werden. Dies deutet darauf hin, dass so gut wie kein MC4R exprimiert wird. Nach G418-Behandlung konnte ein stärkeres Fluoreszenzsignal detektiert werden, was für eine höhere Rezeptorexpression spricht. Verglichen mit dem WT war jedoch auch das Signal nach G418-Behandlung schwächer (s. Abb. 7) (44). Diese Ergebnisse entsprachen den Erwartungen. Die geringere Expression der MC4R-Varianten verglichen mit dem MC4R-WT kann dadurch erklärt werden, dass beim Prozess des TR eine zufällige AS in die Peptidkette eingebaut wird. Je nachdem welche AS dies ist, kann so die Faltung und damit gesamte Struktur des Proteins verändert werden. Auch eine komplette Degradierung des Proteins kann durch eine solche Faltung getriggert werden. Dies kann wiederum z.B. den Einbau des Rezeptors in die Zellmembran beeinflussen. Beim Nachweis von Oberflächen- und Gesamtexpression zeigten sich jedoch andere Ergebnisse: die Oberflächenexpression der einzelnen MC4R-Varianten schien stark von der Position des PTCs innerhalb des Rezeptors abzuhängen. Die MC4R-Varianten mit

PTCs im N-Terminus (W16X und Y35X_D37V) zeigten die niedrigste Oberflächenexpression, während sie bei W258X und Q307X WT-ähnlich ausfiel (s. Abb. 8). Diese Ergebnisse traten sowohl bei den G418-behandelten als auch den unbehandelten Zellen auf (44). Ausgehend von den Ergebnissen dieses Assays kann angenommen werden, dass es trotz PTC zu einer Oberflächenexpression der MC4R-Varianten kommt - insbesondere, wenn die nonsense Mutation erst weiter 3`in der Gensequenz auftritt.

4.2.2 Die Rolle von Nonsense-mediated Decay

Die unterschiedliche Oberflächenexpression der einzelnen *MC4R*-Varianten ist dadurch zu erklären, dass der MC4R keinen Stopp-Codon-vermittelten Abbau (Nonsense-mediated Decay; NMD) induziert. NMD ist ein Kontrollmechanismus in eukaryotischen Zellen, der beschädigte oder nicht-funktionale messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) abbaut und bei Detektion eines PTCs ausgelöst wird (89). So soll die Expression von verkürzten und fehlerhaften Proteinen verhindert werden, die dem Organismus potenziell schaden könnten (90). Dieser Mechanismus spielt demnach eine wichtige Rolle bei Erkrankungen, die auf PTCs beruhen, z.B. Mukoviszidose und Muskeldystrophie Typ Duchenne (91). Bei Säugetieren ist der Prozess des NMD abhängig von den Verbindungen zwischen zwei Exons, die nach dem Prozess des posttranslationalen Splicings entstehen.

Da der MC4R jedoch nur ein einziges Exon besitzt, kann keine Exon-Exon-Verbindung ausgebildet werden, die diesen Vorgang triggert. Demnach kann auch der Prozess des NMD bei nonsense-mutierten *MC4R*-Varianten nicht eingeleitet werden (92). Für die Messung von Oberflächen- und Gesamt-MC4R-Expression wurden die *MC4R*-Varianten N-terminal markiert. Daher erhält man auch dann ein Signal, wenn ein fehlerhafter und unvollständiger Rezeptor in die Membran eingebaut ist. Bei der Q307X-Variante fehlt ohne ein Überlesen des PTC zwar der gesamte C-Terminus, jedoch hat dies anscheinend keine Auswirkung auf den N-terminalen HiBiT-Tag und den Einbau in die Zellmembran. Im Gegensatz dazu tritt bei den Mutationen W16X und Y35X_D37V die Mutation bereits im N-Terminus auf und eine Expression an der Zelloberfläche ist nahezu unmöglich. Bei der Fluoreszenzmikroskopie hingegen befindet sich der YFP-Tag am C-Terminus. Ein Fluoreszenzsignal kann in diesem Assay erst detektiert werden, wenn ein Überlesen stattgefunden hat und ein vollständiges Protein synthetisiert wurde.

Diese Eigenschaft des MC4R macht ihn besonders im Vergleich zu vielen anderen GPCRs und hat auch eine Auswirkung auf die Wirkung von TR. So wurde z.B. ein wichtiger Einfluss von NMD auf den Einsatz von TR bei Mukoviszidose festgestellt. Transkripte des *CFTR*-Gens, die ein PTC enthalten, werden normalerweise durch NMD degradiert. Dies führt dazu, dass weniger mutierte mRNA vorliegt, bei der überhaupt eine Translation und so auch das Überlesen des PTCs stattfinden kann. Dadurch wird insgesamt nur eine geringere Menge an Protein gebildet und exprimiert, als es ohne NMD der Fall wäre. Durch eine zusätzliche Applikation von NMD-inhibierenden Substanzen konnten höhere Level der Proteinexpression erreicht werden (93). Auch in weiteren Modellen für Mukoviszidose sowie für andere Erkrankungen wurde konkludiert, dass durch die Kombination von TR-induzierenden und NMD-inhibierenden Substanzen eine bessere Proteinexpression und/oder -funktion erreicht werden konnte (94, 95). Eine NMD-Inhibition birgt jedoch auch Risiken, da NMD auch in weitere Prozesse involviert ist, die die Integrität der Zelle sichern sollen. Eine Unterdrückung kann demnach verschiedene Pathologien wie neurologische Störungen, Erkrankungen des Immunsystems oder Krebs auslösen (96). Die Tatsache, dass der MC4R unberührt von NMD ist, stellt daher wahrscheinlich einen Vorteil dar: viel mRNA liegt vor, bei der TR stattfinden kann, und zusätzlich besteht kein Risiko, weitere Pathologien oder Erkrankungen durch eine Unterdrückung von NMD auszulösen.

4.2.3 Eine Wiederherstellung der Signalisierung durch G418 war nicht erfolgreich

Im Anschluss an die G418-induzierte Erhöhung der MC4R-Expression wurden die funktionellen Eigenschaften der MC4R-Stopp-Mutationen evaluiert. Dafür wurden sowohl der G_s - als auch der $G_{q/11}$ -Signalweg untersucht.

Eine Replikation der Daten von Brumm et al. hinsichtlich des G_s -Signalwegs war in den HEK-Zellen nicht möglich. Während der MC4R-WT wie zu erwarten einen prompten und langanhaltenden Anstieg des $[cAMP]_i$ zeigte, war eine Stimulation der MC4R-Varianten weder ohne noch mit G418-Applikation erfolgreich. Lediglich bei den Varianten W258X und Q307X war ein geringer und kurzzeitiger cAMP-Anstieg zu messen, der jedoch nur 1,85 - 2,20 % des WT entsprach (s. Abb. 9) (44).

Auch bei der Charakterisierung der $G_{q/11}$ -Signaleigenschaften wurde keine nennenswerte Wiederherstellung der Funktion durch G418-Behandlung festgestellt. Interessanterweise

konnte jedoch für alle MC4R-Varianten eine signifikante Steigerung der Basalaktivität gemessen werden (s. Abb. 10) (44). Die Basalaktivität eines GPCR beschreibt die Aktivität des Rezeptors unabhängig von seinen Liganden, d.h. auch in Abwesenheit seiner Liganden können GPCRs in gewissen Maße mit G-Proteinen interagieren und diese aktivieren (97). Die Entstehung und Bedeutung der gesteigerten Basalaktivität der MC4R-Varianten durch G418 in Hinblick auf den $G_{q/11}$ -Signalweg sind bisher jedoch unklar. Daher ist es schwierig, Aussagen über die Relevanz sowohl *in vitro* als auch ggf. *in vivo* zu tätigen. Generell kann eine Steigerung der MC4R-Basalaktivität u.a. durch Separierung von MC4R-Homodimeren erreicht werden. Diese Effekte wurden sowohl für den G_s - als auch den $G_{q/11}$ -Signalweg beschrieben und könnten in Zukunft eine Rolle bei der Entwicklung neuer Adipositasbehandlungen spielen (61, 98). Demnach könnte es von Interesse sein, den Mechanismus hinter den hier erhobenen Messwerten weiter zu erforschen, um auch die Bedeutung besser einschätzen zu können.

Interessant ist der Vergleich mit Arbeiten, die weitere nonsense mutierte GPCRs analysieren. Schulz et al. untersuchten *in vitro* den Einfluss von TR durch G418 auf Stoppmutationen im *AVPR2*. Dieses Gen kodiert für den Vasopressin 2 Rezeptor (V2R), bei dessen Ausfall es zu nephrogenem Diabetes insipidus kommt. Als Zellmodell dienten COS7-Zellen und zur Charakterisierung der Funktion wurden cAMP-Akkumulationsassays durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine teilweise Wiederherstellung der Rezeptorfunktion (99). Diese Arbeit zeigt viele Parallelen zur Arbeit von Brumm et al. und man könnte überlegen, ob in einem anderen Zellmodell wie z.B. den in dieser Arbeit verwendeten HEK-293-Zellen ähnliche Ergebnisse für den V2R wie in der vorliegenden Arbeit zu erwarten wären. Anders als beim MC4R wurde in einer nachfolgenden Arbeit jedoch kein humanes *in vitro* Modell untersucht, sondern es wurden weitere non-humane *in vitro* sowie *in vivo* Versuche im Mausmodell durchgeführt (40). Die Behandlung mit G418 verbesserte die cAMP-Antwort *in vitro* und die klinische Symptomatik der Mäuse. Auch wenn wie oben erwähnt eine direkte Übertragung von einem System auf ein anderes nicht unbedingt möglich ist, so stellt sich doch die Frage, ob sich in einem Mausmodell weitere Parallelen zwischen den funktionellen Ergebnissen im MC4R und dem V2R finden könnten.

4.2.4 Eigenschaften der Zellreihen COS7 und HEK-293 als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse

Insgesamt war keine ausgeprägte Wiederherstellung der Expression und funktionellen Eigenschaften der *MC4R*-Varianten durch G418-Applikation in HEK-293-Zellen zu beobachten (44). Auch die Replikation der in COS7-Zellen erzielten Ergebnisse war im humanen Modell nicht möglich. Ursächlich hierfür könnten zelltypspezifische Unterschiede zwischen den Zellmodellen COS7 und HEK-293 sein. COS7-Zellen sind morphologisch gesehen Fibroblasten, HEK-293-Zellen hingegen Epithelzellen (100, 101). Allein dieser Unterschied sorgt für abweichende Eigenschaften der Zellreihen, z.B. bezüglich der Expression verschiedener Proteine. Unter Anderem könnte das Melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. MRAP2 ist ein kleines Protein mit nur einer TMD, welches die Bindung von Liganden an den MC4R und dessen Signalisierung entscheidend modulieren kann (102). Während HEK-293-Zellen MRAP2 exprimieren, ist dies bei COS7-Zellen nicht der Fall (103, 104). Die Diskrepanz der funktionellen Ergebnisse könnte demnach zumindest teilweise durch die unterschiedliche Expression von MRAP2 in beiden Zellmodellen erklärt werden. Weiterhin interessant ist, dass die MRAP2-Expression in HEK-293-Zellen nur sehr gering ist (103). Wenn durch die marginale Anwesenheit von MRAP2 bereits so starke Unterschiede entstehen, wären womöglich weitere Veränderungen *in vivo* zu erwarten, falls sich eine noch höhere MRAP2-Konzentration findet. Weiterhin kann auch das verwendete Expressionsplasmid einen Einfluss gehabt haben: es enthält Promotor und Replikationsursprung des Simian-Virus 40 (SV40) und ist ideal geeignet für die COS7-Zelllinie (101). Bei den HEK-293-Zellen hingegen wird bei Einsatz des gleichen Vektors nur eine geringere Expression erreicht. Diese Expressionsstärke ähnelt dem physiologischen Zustand im Hypothalamus mehr und war in diesem Projekt gewollt, jedoch sind aus diesem Grund trotz Einsatz des gleichen Vektors unterschiedliche Ergebnisse zu erwarten.

4.2.5 Einfluss des eingesetzten Readthrough-Agens G418

Zur Induktion des TR wurde das Aminoglykosid G418 eingesetzt. G418 zeichnet sich durch seine vergleichsweise hohe Induktion bezüglich des Überlesens von Stopp-Mutationen aus, auch im Vergleich mit anderen Aminoglykosiden (105). Vor der Durchführung der Assays zur Expression und Funktion des MC4R wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt, um eine geeignete G418-Konzentration für die nachfolgenden Assays zu finden.

Hierbei wurde Wert auf ein gutes Überleben der Zellen gelegt, da eine gute Verträglichkeit eine Grundvoraussetzung bei der Entwicklung neuer potenzieller Therapien ist. Auch wenn bei höheren Konzentrationen ein stärkerer Readthrough-Effekt zu erwarten wäre, könnte ein solches Vorgehen lediglich ein Proof-of-Principle ermöglichen. Ein Einsatz als Therapeutikum hingegen ist bei zu hoher Zytotoxizität nicht vertretbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde einheitlich in allen Experimenten eine G418 Konzentration von 125 µg/mL eingesetzt und eine Inkubationszeit von 48 h eingehalten (44). Es ist zu überlegen, ob eine Verlängerung der Inkubationszeit bei gleichbleibender G418-Konzentration oder eine Verkürzung der Inkubationszeit bei gleichzeitiger Erhöhung der G418-Konzentration zu einer effektiveren Wiederherstellung der funktionellen Eigenschaften führen könnte. Für das Überlesen der MC4R-Stopp-Mutationen in den COS7-Zellen wurden für die einzelnen Versuche unterschiedliche G418-Konzentrationen (75 - 150 µg/mL) und Inkubationszeiten (24 - 48 h) ausgewählt (33). Neben den Unterschieden der beiden Zellreihen könnte auch dies ein Grund für die abweichenden Ergebnisse sein.

4.2.6 Vergleich der untersuchten *MC4R*-Varianten

In dieser Arbeit wurden fünf unterschiedliche nonsense mutierte MC4R-Varianten (s. Abb. 4) untersucht und miteinander verglichen. Die Stopp-Mutanten unterscheiden sich untereinander durch verschiedene Charakteristika wie die jeweilige Sequenz des PTCs sowie die das PTC umgebenden Nukleotide (s. Tab. 1). Es ist bekannt, dass die PTC-umgebenden Nukleotide einen Einfluss auf den Erfolg von TR haben (33).

Laut Hamada et al. ist TR durch G418 bei den Stopp-Codons TAG und TGA effizienter als bei TAA (106). Für die W16X-Variante, die das Stopp-Codon TGA enthält, konnte im HiBiT-Assay der stärkste Anstieg der Gesamtproteinexpression nach G418-Behandlung gemessen werden. Bei der Bestimmung der Oberflächenexpression zeigte E61X den größten Anstieg. Diese trägt das TAG-Codon. Ebenso war bei der W16X und der E61X der stärkste Anstieg der Basalaktivität im $G_{q/11}$ -Signalweg zu verzeichnen. Insgesamt bestanden jedoch keine bedeutenden Unterschiede im Vergleich zu den zwei Stopp-Mutanten mit TAA-Codon, der Y35X_D37V und der Q307X. Auch konnte der höchste [cAMP]_i-Anstieg bei der Q307X festgestellt werden, was der Annahme widerspricht.

Weiterhin scheint die Nukleotid-Umgebung des PTCs von Bedeutung zu sein. So können bestimmte Nukleotide in der Nähe eines PTCs sogar ohne pharmakologische Stimulation ein Readthrough auslösen (sog. endogenes Readthrough) (42). Das Überlesen eines

PTCs scheint insbesondere gut zu funktionieren, wenn das direkt auf das PTC folgende Nukleotid entweder Cytosin oder Adenosin ist (33). Dies trifft wieder auf die Mutationen W16X und E61X zu. Wie bereits erwähnt, konnten diese beiden Mutationen den höchsten Anstieg der Proteinexpression verzeichnen und zeigten auch eine Steigerung der basalen $G_{q/11}$ -Aktivität. Trotz geringer Unterschiede untereinander waren im Vergleich zum WT die Messwerte aller fünf Varianten ähnlich, unabhängig von der Art des Stopp-Codons oder der Nukleotid-Umgebung. Insgesamt scheinen diese Charakteristika zumindest in diesem Fall keinen starken Einfluss auszuüben.

Auch die AS, die während des TR zufällig eingefügt wird, kann von Bedeutung sein. Insgesamt gibt es 21 proteinogene AS, zählt man neben den standardmäßigen 20 AS auch noch Selenocystein dazu. Sie werden in verschiedenen Gruppen eingeteilt, wobei diese Klassifizierung beruht auf der Polarität und Ladung der Seitenkette der jeweiligen AS beruht (107). Da nicht beeinflusst werden kann, welche AS zufällig eingefügt wird, kann es sein, dass eine AS einer anderen Gruppe eingefügt wird und diese ggf. die Struktur des gesamten Proteins verändert. Auch wenn ein vollständiges Protein synthetisiert wird, kann dieses dadurch funktionslos sein. Interessanterweise gibt es jedoch einige Positionen innerhalb des MC4R, die mehr oder weniger konserviert sind als andere. Ist eine Position weniger konserviert, kann man darauf schließen, dass die Position weniger wichtig für die Funktion ist. Betrachtet man z.B. den N-Terminus des MC4R, so ist dieser innerhalb unterschiedlicher Spezies vergleichsweise wenig konserviert (108). Man kann also davon ausgehen, dass das Einfügen einer zufälligen AS im N-Terminus eine relativ geringe Auswirkung auf den gesamten MC4R hat als an anderen Positionen. Die zwei Mutationen W16X und X35X_D37V treten im N-Terminus auf und sollten daher vergleichsweise wenig anfällig sein. Jedoch konnten in unseren Versuchen keine klar abgrenzbaren Unterschiede im Vergleich zu den anderen drei Mutationen festgestellt werden. Außerdem muss der Einfluss der zufällig eingefügten AS auf die Rezeptordimerisierung bedacht werden. Normalerweise kann der MC4R sowohl Homo- als auch Heterodimere mit anderen GPCRs bilden, wodurch die Rezeptorsignalisierung moduliert wird (61). Es ist denkbar, dass eine Konformationsänderung des Rezeptors durch Einfügen einer anderen AS sich auch auf die Fähigkeit der Dimerisierung auswirkt.

4.3 Limitationen der Arbeit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig in einem humanen Modell das Prinzip von TR bei MC4R-Stopp-Mutationen zu testen. Als Zellmodell wurden HEK-293-Zellen verwendet. Diese sind ein Standardzellsystem in der GPCR-Forschung und exprimieren zudem über 60 neuronale Gene, wodurch sie einige Neuronen-Charakteristika haben (46, 47). *In vivo* wird der MC4R hauptsächlich von Neuronen des Ncl. paraventricularis im Hypothalamus exprimiert. Durch die Wahl von HEK-293-Zellen als Modell war zwar eine Annäherung an den physiologischen *in vivo* Zustand möglich, jedoch ist es wahrscheinlich, dass die gleichen Versuche in anderen Zellreihen auch zu anderen Ergebnissen führen. Demnach wären Untersuchungen in anderen Zellmodellen interessant, die die physiologischen Umgebungsbedingungen des MC4R noch besser abbilden. Hier könnten u.a. neuronale Zellmodelle eingesetzt werden. So existieren z.B. verschiedene immortalisierte hypothalamische Zellreihen, die spezifische Neuronenpopulationen des Hypothalamus repräsentieren und sich so für die Erforschung der zentralen Energieregulation eignen (109). Jedoch stammen diese Zellreihen wieder aus nicht-humanen Organismen, wodurch dieser wichtige Aspekt verloren ginge. Noch besser wäre der Einsatz von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC). Diese ermöglichen die Entwicklung verschiedenster zellulärer Krankheitsmodelle und eignen sich als Testsysteme in der Medikamentenentwicklung (110). Für einige Zellpopulationen und Erkrankungen des zentralen Nervensystems konnten bereits erfolgreich Zellmodelle mit Hilfe von hiPSC erstellt werden (111-113). Sollte es möglich sein, mittels hiPSC auch ein Modell des Hypothalamus, genauer gesagt des Ncl. paraventricularis, zu erstellen, würde dies einen großen Fortschritt hinsichtlich der *in vitro* Forschung des MC4R bedeuten. Insgesamt muss bei Verwendung eines Zellmodells immer jedoch beachtet werden, dass trotz bestmöglicher Annäherung an die realen Bedingungen keine direkte Übertragung auf das *in vivo* System möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Aminoglykosid G418 zur Induktion von TR eingesetzt. Auch wenn extra ein Zellviabilitätsassay zur Suche einer passenden G418-Konzentration durchgeführt wurde, darf der allgemeine zytotoxische Effekt der Aminoglykoside nicht vergessen werden, insbesondere wenn sie im Rahmen einer längerfristigen Therapie eingesetzt werden sollen. Trotz Verwendung relativ niedriger G418-Konzentrationen ist es nicht auszuschließen, dass bei langfristiger Applikation unerwünschte Medikamentenwirkungen auftreten. Bei Aminoglykosiden sind dies insbesondere Oto- und Ne-

phrotoxizität. So kann es durch den systemischen Einsatz zu irreversiblen Innenohrschädigungen, akutem Nierenversagen und insgesamt erhöhter Morbidität kommen (114, 115). Auch die Bildung von Antibiotikaresistenzen durch verschiedene Bakterien ist denkbar.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich *in vitro* Versuche durchgeführt. Im Vergleich zu einem *in vivo* Modell konnten hierdurch einige Aspekte nicht erfasst werden, die in einem komplexeren System zu bedenken sind. So ist ein wichtiger Faktor, wie gut das eingesetzte Readthrough-Agens die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überqueren kann. Aufgrund ihrer Größe und hydrophilen Eigenschaften ist die Penetration der BHS durch Aminoglykoside nur in geringem Maße möglich (116). Um eine ausreichende Konzentration im Liquor zu erreichen, wäre demnach eine direkte intrathekale Applikation notwendig. Dies ist zwar möglich und wurde bei Kinder für verschiedene ZNS-Erkrankungen wie z.B. Meningitis bereits eingesetzt (117), eignet sich für repetitive Applikationen jedoch eher nicht. Bei einer weiteren Erforschung von TR bei *MC4R*-Stopp-Mutationen könnte es von Interesse sein, weitere TR-induzierende Substanzen zu testen, die eine geringere Zytotoxizität sowie bessere Voraussetzungen für ein Überqueren der BHS aufweisen. Z.B. wurden verschiedene G418-Derivate entwickelt, die bei Versuchen in HEK-293-Zellen bedeutend geringer zytotoxisch waren als G418 (118). Auch gibt es weitere Non-Aminoglykosid-Substanzen, die TR induzieren, wie z.B. Ataluren oder das Nukleosidanalogen Clitocine (119). Sowohl Ataluren als auch Clitocine sind small molecules (120), wodurch eine gute BHS-Gängigkeit wahrscheinlicher ist. Möglicherweise würden diese Substanzen sich daher eher für eine langfristige systemische Therapie eignen als G418. Für diese Pharmaka müsste jeweils getestet werden, inwiefern ein Überlesen der PTCs im *MC4R* möglich ist und ob bessere funktionelle Ergebnisse als mit G418 zu erzielen sind. Dabei könnte man sich vorerst auf einzelne Mutationen konzentrieren und diese noch ausgiebiger testen. Hierbei sollte insbesondere auch die Umgebung des PTCs beachtet werden. Aufgrund der Art des Stopp-Codons, des nachfolgenden Nukleotids und der Position innerhalb der Rezeptors sollte die Mutation W16X gut empfänglich für TR sein. Daher könnte diese Mutation im Fokus nachfolgender Erforschungen stehen, bevor Untersuchungen an anderen Mutationen durchgeführt werden.

5 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Wiederherstellung der Rezeptorexpression und -funktion von nonsense mutierten *MC4R*-Varianten durch eine Behandlung mit dem Aminoglykosid G418 in einem humanen *in vitro* System möglich ist. Jedoch zeigte sich, dass durch die G418-Applikation weder die Rezeptorexpression noch die Signalisierung im G_s - oder $G_{q/11}$ -Weg signifikant anstieg. Interessanterweise konnte allerdings eine Steigerung der basalen Aktivität im $G_{q/11}$ -Weg beobachtet werden. Die Bedeutung dieser Messergebnisse ist derzeit unklar und verdeutlicht, dass trotz intensiver Forschung über den MC4R noch immer offene Fragen bestehen, die untersucht werden sollten.

Die Literatur zeigt, dass der Erfolg von TR von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, u.a. vom verwendeten Modell, dem eingesetzten Readthrough-Agens oder der Art der vorzeitigen Stopp-Codons. Obwohl in dieser Arbeit keine überzeugende Steigerung der Signalisierung möglich war, könnten demnach bei Einsatz eines anderen Modells oder Readthrough-Agens möglicherweise andere, vielversprechendere Ergebnisse erzielt werden.

Nudelman et al. postulieren, dass schon eine geringfügig gesteigerte Synthese vollständiger Proteine durch TR signifikante Auswirkungen auf die Funktion und den Phänotyp haben kann, insbesondere wenn davor so gut wie kein funktionsfähiges Protein vorhanden war (118). Demnach kann es sinnvoll sein, diesen Ansatz des TR bei nonsense mutierten *MC4R*-Varianten weiter zu untersuchen, insbesondere mit Rücksicht auf den Einsatz möglichst nebenwirkungsarmer Substanzen und Fokus auf ausgewählten *MC4R*-Stopp-Mutationen.

Literaturverzeichnis

1. Sahoo K, Sahoo B, Choudhury AK, Sofi NY, Kumar R, Bhadoria AS. Childhood obesity: causes and consequences. *J Family Med Prim Care*. 2015;4(2):187-92.
2. World Health Organization Regional Office for Europe. WHO EUROPEAN REGIONAL OBESITY REPORT 2022. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/353747/9789289057738-eng.pdf>. Zugriff am 11.08.2023.
3. World Health Organization. Obesity and Overweight. 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Zugriff am 21.08.2023.
4. Robert Koch-Institut (RKI) (2020) *AdiMon-Themenblatt: Adipositas bei Kindern und Jugendlichen* (Stand: 29. Juni 2020). www.rki.de/adimon. Zugriff am 14.08.2023.
5. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14(6):482-7.
6. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*. 2019;15(5):288-98.
7. Theilade S, Christensen MB, Vilsbøll T, Knop FK. An overview of obesity mechanisms in humans: Endocrine regulation of food intake, eating behaviour and common determinants of body weight. *Diabetes Obes Metab*. 2021;23 Suppl 1:17-35.
8. Schienkiewitz A, Kuhnert R, Blume M, Mensink GBM. Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen in Deutschland - Ergebnisse der Studie GEDA 2019/2020-EHIS. *Journal of Health Monitoring*. 2022(3):23--31.
9. Schienkiewitz A, Damerow S, Schaffrath Rosario A. Prävalenz von Untergewicht, Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland – Einordnung der Ergebnisse aus KiGGS Welle 2 nach internationalen Referenzsystemen. *Journal of Health Monitoring*. 2018;3(3):60--74.
10. Thielemann F, Günther KP. Orthopädische Komorbidität. In: Wabitsch M, Hebebrand J, Kiess W, Reinehr T, Wiegand S, editors. *Adipositas bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen und Klinik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022. p. 319-27.
11. Puhl RM, Lessard LM. Weight Stigma in Youth: Prevalence, Consequences, and Considerations for Clinical Practice. *Curr Obes Rep*. 2020;9(4):402-11.
12. Puhl RM, King KM. Weight discrimination and bullying. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27(2):117-27.
13. Krause L, Ellert U, Kroll LE, Lampert T. Gesundheitsbezogene Lebensqualität von übergewichtigen und adipösen Jugendlichen. Robert Koch-Institut, Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung; 2014.

14. Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1996;20(6):501-6.
15. Kühnen P. Zentrale Regulation von Hunger, Sättigung und Energieverbrauch. In: Wabitsch M, Hebebrand J, Kiess W, Reinehr T, Wiegand S, editors. *Adipositas bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen und Klinik.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022. p. 201-9.
16. Bingham NC, Cone RD. Regulation of orexigenic AgRP neurons: A third way? *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2015;26(7):339-40.
17. Kühnen P, Krude H, Biebermann H. Melanocortin-4 Receptor Signalling: Importance for Weight Regulation and Obesity Treatment. *Trends Mol Med.* 2019;25(2):136-48.
18. Wade KH, Lam BYH, Melvin A, Pan W, Corbin LJ, Hughes DA, Rainbow K, Chen JH, Duckett K, Liu X, Mokrosiński J, Mörseburg A, Neaves S, Williamson A, Zhang C, Farooqi IS, Yeo GSH, Timpson NJ, O'Rahilly S. Loss-of-function mutations in the melanocortin 4 receptor in a UK birth cohort. *Nat Med.* 2021;27(6):1088-96.
19. Littleton SH, Berkowitz RI, Grant SFA. Genetic Determinants of Childhood Obesity. *Mol Diagn Ther.* 2020;24(6):653-63.
20. Hinney A, Körner A, Fischer-Posovszky P. The promise of new anti-obesity therapies arising from knowledge of genetic obesity traits. *Nat Rev Endocrinol.* 2022:1-15.
21. Farooqi IS. Monogenic human obesity syndromes. *Handb Clin Neurol.* 2021;181:301-10.
22. Li YQ, Shrestha Y, Pandey M, Chen M, Kablan A, Gavriloova O, Offermanns S, Weinstein LS. G(q/11) α and G(s) α mediate distinct physiological responses to central melanocortins. *J Clin Invest.* 2016;126(1):40-9.
23. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* 2003;348(12):1085-95.
24. Loos RJF, Yeo GSH. The genetics of obesity: from discovery to biology. *Nat Rev Genet.* 2022;23(2):120-33.
25. Vollbach H, Brandt S, Lahr G, Denzer C, von Schnurbein J, Debatin KM, Wabitsch M. Prevalence and phenotypic characterization of MC4R variants in a large pediatric cohort. *International Journal of Obesity.* 2017;41(1):13-22.
26. Baumgartner-Parzer S. Monogene Adipositas (Melanocortin-4-Rezeptor-Mangel). *Journal für Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel.* 2018;11(3):101-3.

27. Collet TH, Dubern B, Mokrosinski J, Connors H, Keogh JM, Mendes de Oliveira E, Henning E, Poitou-Bernert C, Oppert JM, Tounian P, Marchelli F, Alili R, Le Beyec J, Pépin D, Lacorte JM, Gottesdiener A, Bounds R, Sharma S, Folster C, Henderson B, O'Rahilly S, Stoner E, Gottesdiener K, Panaro BL, Cone RD, Clément K, Farooqi IS, Van der Ploeg LHT. Evaluation of a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist (Setmelanotide) in MC4R deficiency. *Mol Metab.* 2017;6(10):1321-9.
28. Heyder N, Kleinau G, Szczepek M, Kwiatkowski D, Speck D, Soletto L, Cerdá-Reverter JM, Krude H, Kühnen P, Biebermann H, Scheerer P. Signal Transduction and Pathogenic Modifications at the Melanocortin-4 Receptor: A Structural Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:515.
29. MC4R gene. University of Cambridge Metabolic Research Laboratories. <https://www.mc4r.org.uk/>. Zugriff am 28.09.2023.
30. Kerem E. ELX-02: an investigational read-through agent for the treatment of nonsense mutation-related genetic disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 2020;29(12):1347-54.
31. Benhabiles H, Gonzalez-Hilarion S, Amand S, Bailly C, Prévotat A, Reix P, Hubert D, Adriaenssens E, Rebuffat S, Tulasne D, Lejeune F. Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases. *PLoS One.* 2017;12(11):e0187930.
32. Namjou B, Stanaway IB, Lingren T, Mentch FD, Benoit B, Dikilitas O, Niu X, Shang N, Shoemaker AH, Carey DJ, Mirshahi T, Singh R, Nestor JG, Hakonarson H, Denny JC, Crosslin DR, Jarvik GP, Kullo IJ, Williams MS, Harley JB. Evaluation of the MC4R gene across eMERGE network identifies many unreported obesity-associated variants. *Int J Obes (Lond).* 2021;45(1):155-69.
33. Brumm H, Mühlhaus J, Bolze F, Scherag S, Hinney A, Hebebrand J, Wiegand S, Klingenspor M, Grüters A, Krude H, Biebermann H. Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through. *Obesity.* 2012;20(5):1074-81.
34. FDA approves first treatment for weight management for people with certain rare genetic conditions. FDA. Stand: 27.11.2020. <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-first-treatment-weight-management-people-certain-rare-genetic-conditions>. Zugriff am 26.08.2023.
35. Davies J, Gilbert W, Gorini L. STREPTOMYCIN, SUPPRESSION, AND THE CODE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964;51(5):883-90.
36. Translarna. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna>. Zugriff am 27.08.2023.
37. van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E. Mukoviszidose. *Monatsschrift Kinderheilkunde.* 2017;165(8):681-7.

38. Spanakis E, Milord E, Gragnoli C. AVPR2 Variants and Mutations in Nephrogenic Diabetes Insipidus: Review and Missense Mutation Significance. *Journal of cellular physiology*. 2008;217:605-17.
39. Clancy JP, Bebök Z, Ruiz F, King C, Jones J, Walker L, Greer H, Hong J, Wing L, Macaluso M, Lyrene R, Sorscher EJ, Bedwell DM. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(7):1683-92.
40. Sangkuhl K, Schulz A, Römpler H, Yun J, Wess J, Schöneberg T. Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum Mol Genet*. 2004;13(9):893-903.
41. Wang W, Guo DY, Tao YX. Therapeutic strategies for diseases caused by loss-of-function mutations in G protein-coupled receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;161:181-210.
42. Schilff M, Sargsyan Y, Hofhuis J, Thoms S. Stop Codon Context-Specific Induction of Translational Readthrough. *Biomolecules*. 2021;11(7).
43. Paisdzior S, Dimitriou IM, Schöpe PC, Annibale P, Scheerer P, Krude H, Lohse MJ, Biebermann H, Kühnen P. Differential Signaling Profiles of MC4R Mutations with Three Different Ligands. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
44. Höpfner F, Paisdzior S, Reininghaus N, Sohail I, Scheerer P, Annibale P, Biebermann H, Kühnen P. Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Nonsense Mutations by Aminoglycoside. *Life*. 2022;12(11):1793.
45. Tabatabaei M, Caetano FA, Vedraïne S, Norton PR, Ferguson SS, Lagugné-Labarthe F. Directing GPCR-transfected cells and neuronal projections with nano-scale resolution. *Biomaterials*. 2013;34(38):10065-74.
46. Shaw G, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb j*. 2002;16(8):869-71.
47. He B, Soderlund DM. Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Na v 1.7 sodium channels. *Neurosci Lett*. 2010;469(2):268-72.
48. Marti A, Corbalán MS, Forga L, Martínez JA, Hinney A, Hebebrand J. A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated with obesity in a Spanish population. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27(3):385-8.
49. Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(4):1483-6.

50. Brumm H. Aminoglykosid-induzierte Wiederherstellung der Signaltransduktion von Melanocortin-4-Rezeptoren mit prä-matur terminierendem Stoppcodon. Dissertation, FU Berlin. 2008.
51. Reinehr T, Hinney A, de Sousa G, Austrup F, Hebebrand J, Andler W. Definable somatic disorders in overweight children and adolescents. *J Pediatr.* 2007;150(6):618-22, 22.e1-5.
52. Taylor RG, Walker DC, McInnes RR. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(7):1677-8.
53. Chan WT, Verma CS, Lane DP, Gan SK. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Biosci Rep.* 2013;33(6).
54. pBiT3.1-N [CMV/HiBiT/Blast] Vector Product Information: Promega Corporation. https://www.promega.de/resources/protocols/product-information-sheets/n/pbit3_1-n-cmv_hibit_blast_-vector-product-information/. Zugriff am 11.08.2023.
55. METAFECTENE® - DNA & RNA Transfektionsreagenz: Biontix Laboratories GmbH. 2016. <https://www.biontix.com/metafectene.html>. Zugriff am 13.08.2023.
56. FuGENE HD Transfection Reagent Technical Manual, TM328: Promega Corporation. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-hd-transfection-reagent.pdf?rev=005226306ffd4b06abc60af9b2d0ac5d&la=en>. Zugriff am 05.09.2023.
57. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, Baell J, Chung TDY, Coussens NP, Dahlin JL, Devanarayan V, Foley TL, Glicksman M, Haas JV, Hall MD, Hoare S, Inglese J, Iversen PW, Kales SC, Lal-Nag M, Li Z, McGee J, McManus O, Riss T, Saradjian P, Sittampalam GS, Tarselli M, Trask OJ, Jr., Wang Y, Weidner JR, Wildey MJ, Wilson K, Xia M, Xu X, editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.
58. Technical Bulletin - CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay. Promega Corporation. Zugriff am 11.08.2023.
59. Nano-Glo® HiBiT Extracellular Detection System Technical Manual #TM523: Promega Corporation. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/nano-glo-hibit-extracellular-detection-system-technical-manual.pdf?rev=563b05c828674a2cbdef8c5ee6e12086&la=en>. Zugriff am 13.08.2023.
60. Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System Technical Manual #TM516: Promega Corporation. <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/500/nano-glo-hibit-lytic-detection-system-technical-manual.pdf?rev=c60ea014d049499484b20ae1da288eec&la=en>. Zugriff am 13.08.2023.

61. Reininghaus N, Paisdzior S, Höpfner F, Jyrch S, Cetindag C, Scheerer P, Kühnen P, Biebermann H. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules*. 2022;12(8):1119.
62. GloSensor cAMP Assay Technical Manual TM076: Promega Corporation. https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/glosensor-camp-assay-protocol.pdf?rev=9d9652ea9c0f4079808487ff62d1cc07&sc_lang=en. Zugriff am 14.08.2023.
63. Brasell EJ, Chu L, El Kares R, Seo JH, Loesch R, Iglesias DM, Goodyer P. The aminoglycoside geneticin permits translational readthrough of the CTNS W138X nonsense mutation in fibroblasts from patients with nephropathic cystinosis. *Pediatric Nephrology*. 2019;34(5):873-81.
64. Lombardi S, Ferrarese M, Marchi S, Pinton P, Pinotti M, Bernardi F, Branchini A. Translational readthrough of GLA nonsense mutations suggests dominant-negative effects exerted by the interaction of wild-type and missense variants. *RNA Biol*. 2020;17(2):254-63.
65. Salvatori F, Breveglieri G, Zuccato C, Finotti A, Bianchi N, Borgatti M, Feriotto G, Destro F, Canella A, Brognara E, Lampronti I, Breda L, Rivella S, Gambari R. Production of beta-globin and adult hemoglobin following G418 treatment of erythroid precursor cells from homozygous beta(0)39 thalassemia patients. *Am J Hematol*. 2009;84(11):720-8.
66. Buhr F, Kohl-Landgraf J, tom Dieck S, Hanus C, Chatterjee D, Hegelein A, Schuman EM, Wachtveitl J, Schwalbe H. Design of Photocaged Puromycin for Nascent Polypeptide Release and Spatiotemporal Monitoring of Translation. *Angewandte Chemie International Edition*. 2015;54(12):3717-21.
67. Jung JH, Lee H, Kim JH, Sim DY, Ahn H, Kim B, Chang S, Kim SH. p53-Dependent Apoptotic Effect of Puromycin via Binding of Ribosomal Protein L5 and L11 to MDM2 and its Combination Effect with RITA or Doxorubicin. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
68. Bick D, Bick SL, Dimmock DP, Fowler TA, Caulfield MJ, Scott RH. An online compendium of treatable genetic disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2021;187(1):48-54.
69. Genterapeutika. Paul-Ehrlich-Institut. Stand: 09.08.2023. <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/genterapeutika/genterapeutika-liste.html>. Zugriff am 02.09.2023.
70. Fachinformation für Luxturna® 5 × 10¹² Vektorgenome/ml Konzentrat und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung. Novartis Pharma GmbH.
71. Luxturna : EPAR - Risk-management-plan summary: Europea Medicines Agency; Stand: 04.05.2023. https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/luxturna-epar-risk-management-plan-summary_en.pdf. Zugriff am 08.09.2023.
72. Voretigen Neparvovec (erbliche Netzhautdystrophie) – Bewertung gemäß § 35a Abs. 1 Satz 11 SGB V: Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) Stand: 29.06.2022.

73. Yu J, Tang B, He X, Zou P, Zeng Z, Xiao R. Nonsense Suppression Therapy: An Emerging Treatment for Hereditary Skin Diseases. *Acta Derm Venereol.* 2022;102:adv00658.
74. Zilberberg A, Lahav L, Rosin-Arbesfeld R. Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut.* 2010;59(4):496-507.
75. Keeling KM, Wang D, Conard SE, Bedwell DM. Suppression of premature termination codons as a therapeutic approach. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2012;47(5):444-63.
76. Rowe SM, Varga K, Rab A, Bebok Z, Byram K, Li Y, Sorscher EJ, Clancy JP. Restoration of W1282X CFTR activity by enhanced expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007;37(3):347-56.
77. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nature Medicine.* 1996;2(4):467-9.
78. Pinotti M, Rizzotto L, Pinton P, Ferraresi P, Chuansumrit A, Charoenkwan P, Marchetti G, Rizzuto R, Mariani G, Bernardi F, Group TIFVDS. Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2006;4(6):1308-14.
79. Hamid R, Hedges LK, Austin E, Phillips JA, 3rd, Loyd JE, Cogan JD. Transcripts from a novel BMPR2 termination mutation escape nonsense mediated decay by downstream translation re-initiation: implications for treating pulmonary hypertension. *Clin Genet.* 2010;77(3):280-6.
80. Teng S, Gao L, Paajanen V, Pu J, Fan Z. Readthrough of nonsense mutation W822X in the SCN5A gene can effectively restore expression of cardiac Na⁺ channels. *Cardiovasc Res.* 2009;83(3):473-80.
81. Howard MT, Shirts BH, Petros LM, Flanigan KM, Gesteland RF, Atkins JF. Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2000;48(2):164-9.
82. Merritt JK, Collins BE, Erickson KR, Dong H, Neul JL. Pharmacological read-through of R294X Mecp2 in a novel mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet.* 2020;29(15):2461-70.
83. Dunant P, Walter MC, Karpati G, Lochmüller H. Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle. *Muscle Nerve.* 2003;27(5):624-7.
84. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, Aviram M, Bdolah-Abram T, Bebok Z, Shushi L, Kerem B, Kerem E. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1433-41.

85. Pinotti M, Rizzotto L, Chuansumrit A, Mariani G, Bernardi F, Group TIFVDS. Gentamicin induces sub-therapeutic levels of coagulation factor VII in patients with nonsense mutations. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(8):1828-30.
86. Peled A, Samuelov L, Sarig O, Bochner R, Malki L, Pavlovsky M, Pichinuk E, Weil M, Sprecher E. Treatment of hereditary hypotrichosis simplex of the scalp with topical gentamicin. *Br J Dermatol*. 2020;183(1):114-20.
87. Wang S, Yang Z, Liu Y, Zhao MT, Zhao J, Zhang H, Liu ZY, Wang XL, Ma L, Yang YH. Application of topical gentamicin-a new era in the treatment of genodermatosis. *World J Pediatr*. 2021;17(6):568-75.
88. Clément K, Biebermann H, Farooqi IS, Van der Ploeg L, Wolters B, Poitou C, Puder L, Fiedorek F, Gottesdiener K, Kleinau G, Heyder N, Scheerer P, Blume-Peytavi U, Jahnke I, Sharma S, Mokrosinski J, Wiegand S, Müller A, Weiß K, Mai K, Spranger J, Grüters A, Blankenstein O, Krude H, Kühnen P. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat Med*. 2018;24(5):551-5.
89. Tan K, Stupack DG, Wilkinson MF. Nonsense-mediated RNA decay: an emerging modulator of malignancy. *Nature Reviews Cancer*. 2022;22(8):437-51.
90. Hug N, Longman D, Cáceres JF. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(4):1483-95.
91. Hwang J, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr Opin Genet Dev*. 2011;21(4):422-30.
92. Brocke KS, Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Human Molecular Genetics*. 2002;11(3):331-5.
93. McHugh DR, Cotton CU, Hodges CA. Synergy between Readthrough and Nonsense Mediated Decay Inhibition in a Murine Model of Cystic Fibrosis Nonsense Mutations. *Int J Mol Sci*. 2021;22(1):344.
94. de Poel E, Spelier S, Suen SWF, Krusselbrink E, Graeber SY, Mall MA, Weersink EJM, van der Eerden MM, Koppelman GH, van der Ent CK, Beekman JM. Functional Restoration of CFTR Nonsense Mutations in Intestinal Organoids. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2022;21(2):246-53.
95. Keeling KM, Wang D, Dai Y, Murugesan S, Chenna B, Clark J, Belakhov V, Kandasamy J, Velu SE, Baasov T, Bedwell DM. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay enhances in vivo nonsense suppression. *PLoS One*. 2013;8(4):e60478.
96. Temaj G, Telkoparan-Akillilar P, Nuhii N, Chichiarelli S, Saha S, Saso L. Recoding of Nonsense Mutation as a Pharmacological Strategy. *Biomedicines*. 2023;11(3):659.
97. Gavriilidou AFM, Hunziker H, Mayer D, Vuckovic Z, Veprintsev DB, Zenobi R. Insights into the Basal Activity and Activation Mechanism of the β 1 Adrenergic Receptor

Using Native Mass Spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. 2019;30(3):529-37.

98. Piechowski CL, Rediger A, Lagemann C, Mühlhaus J, Müller A, Pratzka J, Tarnow P, Grüters A, Krude H, Kleinau G, Biebermann H. Inhibition of melanocortin-4 receptor dimerization by substitutions in intracellular loop 2. *J Mol Endocrinol*. 2013;51(1):109-18.

99. Schulz A, Sangkuhl K, Lennert T, Wigger M, Price DA, Nuuja A, Grüters A, Schultz Gn, Schöneberg T. Aminoglycoside Pretreatment Partially Restores the Function of Truncated V2 Vasopressin Receptors Found in Patients with Nephrogenic Diabetes Insipidus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002;87(11):5247-57.

100. HEK-293 CRL-1573™: ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-1573>. Zugriff am 09.09.2023.

101. COS-7 CRL-1651™. ATCC. <https://www.atcc.org/products/crl-1651>. Zugriff am 09.09.2023.

102. Wen Z-Y, Liu T, Qin C-J, Zou Y-C, Wang J, Li R, Tao Y-X. MRAP2 Interaction with Melanocortin-4 Receptor in SnakeHead (*Channa argus*). *Biomolecules*. 2021;11(3):481.

103. Schonnop L, Kleinau G, Herrfurth N, Volckmar AL, Cetindag C, Müller A, Peters T, Herpertz S, Antel J, Hebebrand J, Biebermann H, Hinney A. Decreased melanocortin-4 receptor function conferred by an infrequent variant at the human melanocortin receptor accessory protein 2 gene. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(9):1976-82.

104. Sebag JA, Hinkle PM. Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(51):20244-9.

105. Wagner RN, Wießner M, Friedrich A, Zandanell J, Breitenbach-Koller H, Bauer JW. Emerging Personalized Opportunities for Enhancing Translational Readthrough in Rare Genetic Diseases and Beyond. *Int J Mol Sci*. 2023;24(7):6101.

106. Hamada K, Omura N, Taguchi A, Baradaran-Heravi A, Kotake M, Arai M, Takayama K, Taniguchi A, Roberge M, Hayashi Y. New Negamycin-Based Potent Readthrough Derivative Effective against TGA-Type Nonsense Mutations. *ACS Med Chem Lett*. 2019;10(10):1450-6.

107. Georg Löffler MM. In: Peter C. Heinrich MM, Lutz Graeve, editor. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Lehrbuch. 9 ed. Springer Medizin: Springer Berlin, Heidelberg. p. 26 - 53.

108. Stäubert C, Tarnow P, Brumm H, Pitra C, Gudermann T, Grüters A, Schöneberg T, Biebermann H, Römpler H. Evolutionary aspects in evaluating mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology*. 2007;148(10):4642-8.

109. Dalvi P, Loganathan N, McIlwraith EK, Tran A, Belsham DD. Chapter 2 - Hypothalamic Cell Models. In: Ulloa-Aguirre A, Tao Y-X, editors. *Cellular Endocrinology in Health and Disease (Second Edition)*. Boston: Academic Press; 2021. p. 27-77.

110. Zimmer B, Piao J, Ramnarine K, Tomishima MJ, Tabar V, Studer L. Derivation of diverse hormone-releasing pituitary cells from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2016;6(6):858-72.
111. Pituitary Lineage Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells in 2D and 3D Cultures. *Stem Cells and Development*. 2022;31(9-10):239-49.
112. Advances in Central Nervous System Organoids: A Focus on Organoid-Based Models for Motor Neuron Disease. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2021;27(3):213-24.
113. Rouleau N, Murugan NJ, Kaplan DL. Functional bioengineered models of the central nervous system. *Nat Rev Bioeng*. 2023;1(4):252-70.
114. Karasawa T, Steyger PS. Intracellular mechanisms of aminoglycoside-induced cytotoxicity. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(9):879-86.
115. Jospe-Kaufman M, Siomin L, Fridman M. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorg Med Chem Lett*. 2020;30(13):127218.
116. Nau R, Sörgel F, Eiffert H. Penetration of drugs through the blood-cerebrospinal fluid/blood-brain barrier for treatment of central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(4):858-83.
117. Sullins AK, Abdel-Rahman SM. Pharmacokinetics of antibacterial agents in the CSF of children and adolescents. *Paediatr Drugs*. 2013;15(2):93-117.
118. Nudelman I, Glikin D, Smolkin B, Hainrichson M, Belakhov V, Baasov T. Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(11):3735-46.
119. Campofelice A, Lentini L, Di Leonardo A, Melfi R, Tutone M, Pace A, Pibiri I. Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs). *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
120. Friesen WJ, Trotta CR, Tomizawa Y, Zhuo J, Johnson B, Sierra J, Roy B, Weetall M, Hedrick J, Sheedy J, Takasugi J, Moon YC, Babu S, Baiazitov R, Leszyk JD, Davis TW, Colacino JM, Peltz SW, Welch EM. The nucleoside analog clitocine is a potent and efficacious readthrough agent. *Rna*. 2017;23(4):567-77.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Friederike Josephine Höpfner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Pharmakologische Wiederherstellung funktionell eingeschränkter Melanocortin-4-Rezeptoren (MC4R) / Pharmacological rescue of functionally impaired Melanocortin-4-receptors (MC4R) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Publikation: **Höpfner F**, Paisdzior S, Reininghaus N, Sohail I, Scheerer P, Annibale P, Biebermann H und Kühnen P. Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Non-sense Mutations by Aminoglycoside. Life. 2022.

Beitrag von Höpfner, F zur Publikation im Einzelnen:

- Konzeptualisierung (zusammen mit Biebermann H, Kühnen P)
- Durchführung der Klonierung und Assays (Hauptanteil, zusammen mit Paisdzior S, Jyrch S, Cetindag C, Reininghaus N, Sohail I)
 - Klonierung: 85 % (15 % Cetindag C, Reininghaus N)
 - Zellviabilitätsassay: 95 % (5 % Paisdzior S)
 - Fluoreszenzmikroskopie: 75 % (25 % Paisdzior S, Jyrch S, Sohail I)
 - HiBiT-Assay: 90 % (10 % Paisdzior S, Jyrch S)
 - GloSensor-Assay: 90 % (10 % Paisdzior S, Jyrch S)
 - Reporteragenassay: 90 % (10 % Paisdzior S, Jyrch S)
- Datenanalyse und Datenauswertung (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H, Paisdzior S, Kühnen P)
- Erstellen von Abbildungen und Tabellen (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H und Paisdzior S)
 - Abbildung 1: 100 %
 - Abbildungen 2 - 4: 90% (10% Paisdzior S, Biebermann H)
 - Tabellen 1 - 3: 100%
- Interpretation der Daten und Diskussion der Ergebnisse (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H und Paisdzior S)
- Konzeption und Entwurf des Manuskripts der Publikation (Hauptanteil, zusammen mit Biebermann H und Kühnen P)
- Schreiben der Publikation sowie Erstellen der Revisionen (Hauptanteil, zusammen mit Co-Autoren)

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation



Article

Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Nonsense Mutations by Aminoglycoside

Friederike Höpfner ¹, Sarah Paisdzior ¹, Nanina Reininghaus ¹, Iqra Sohail ², Patrick Scheerer ^{3,4}, Paolo Annibale ^{2,5}, Heike Biebermann ^{1,†} and Peter Kühnen ^{1,6,*}

¹ Institute of Experimental Pediatric Endocrinology, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

² Max Delbrück Center, Robert-Rössle-Straße 10, 13092 Berlin, Germany

³ Group Protein X-ray Crystallography and Signal Transduction, Institute of Medical Physics and Biophysics, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Virchowweg 6, 10117 Berlin, Germany

⁴ DZHK (German Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

⁵ School of Physics and Astronomy, University of St Andrews, North Haugh, St Andrews KY16 9SS, UK

⁶ Institute of Pediatric Endocrinology, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany

* Correspondence: peter.kuehnen@charite.de

† Joint senior authorship.



Citation: Höpfner, F.; Paisdzior, S.; Reininghaus, N.; Sohail, I.; Scheerer, P.; Annibale, P.; Biebermann, H.; Kühnen, P. Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Nonsense Mutations by Aminoglycoside. *Life* **2022**, *12*, 1793. <https://doi.org/10.3390/life12111793>

Academic Editors: Manuela Marcoli, Rossella Miele and Roberta Lattanzi

Received: 19 September 2022

Accepted: 2 November 2022

Published: 5 November 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The *melanocortin-4 receptor (MC4R)* is critical for central satiety regulation, therefore presenting a potent target for pharmacological obesity treatment. *Melanocortin-4 receptor* mutations prevalently cause monogenetic obesity. A possibility of overcoming stop mutations is aminoglycoside-mediated translational readthrough. Promising results were achieved in COS-7 cells, but data for human cell systems are still missing, so uncertainty surrounds this potential treatment. In transfected HEK-293 cells, we tested whether translational readthrough by aminoglycoside Geneticin combined with high-affinity ligand setmelanotide, which is effective in proopiomelanocortin or leptin receptor deficiency patients, is a treatment option for affected patients. Five *MC4R* nonsense mutants (W16X, Y35X_D37V, E61X, W258X, Q307X) were investigated. Confocal microscopy and cell surface expression assays revealed the importance of the mutations' position within the *MC4R*. N-terminal mutants were marginally expressed independent of Geneticin treatment, whereas mutants with nonsense mutations in transmembrane helix 6 or helix 8 showed wild-type-like expression. For functional analysis, G_s and G_{q/11} signaling were measured. N-terminal mutants (W16X, Y35X_D37V) showed no cAMP formation after challenge with alpha-MSH or setmelanotide, irrespective of Geneticin treatment. Similarly, G_s activation was almost impossible in W258X and Q307X with wild-type-like cell surface expression. Results for G_{q/11} signaling were comparable. Based on our data, this approach improbably represents a therapeutic option.

Keywords: *melanocortin 4 receptor; MC4R; stop mutation; PTC; translational readthrough; G418*

1. Introduction

Obesity is an issue of global importance, affecting nearly 700 million people worldwide [1]. It is expected that in 2025, around 20% of the world's population will suffer from obesity [2], which is associated with several comorbidities, such as diabetes, cardiovascular disease, infertility, and some cancer types, as well as increased mortality [3–6]. Often, overweight already develops in childhood, with over 340 million children aged 5–19 being overweight or obese in 2016, according to WHO [7]. Therefore, successful treating options for obesity are in high demand and urgently needed. However, obesity prevention and treatment have so far been unsuccessful in the long term, and especially several forms

of obesity caused by monogenetic defects still lack treatment options [4,8,9]. The most common type of monogenetic obesity is linked to *melanocortin-4 receptor (MC4R)* deficiency, which was identified in 2–5% of obese patients [10].

MC4R is a G-protein-coupled receptor (GPCR) that physiologically plays a pivotal role in energy homeostasis, and its activation leads to decreased food intake [11]. Until now, the G_s /adenylyl cyclase pathway is seen as the major signaling pathway of *MC4R*. However, in recent years, it has become evident that *MC4R* can also signal via activation of a variety of pathways, such as $G_{q/11}$ [12–15].

To date, over 300 *MC4R* mutations have been described [16,17]. Out of these, around 25% lead to a complete loss of function [18], causing hyperphagia with subsequent early-onset obesity [19–21]. Nonsense mutations, in which a premature termination codon (PTC) leads to early termination of translation and a nonfunctional protein, can occur in almost every part of the *MC4R*. Up until now, nonsense mutations have been identified at 22 different sites within the *MC4R* [17,18]. So far, no successful treatment option has been found for patients suffering from those mutations in *MC4R*.

A technique to overcome PTCs is translational readthrough, which was first mentioned in 1964 [22] and since then has been more broadly investigated. The goal of translational readthrough is to restore protein function, and it is a potential candidate for treating genetic diseases caused by PTCs [23]. It works by interfering with the process of translation. Readthrough agents increase the probability of continuation in translations by acting at the ribosome and purposefully inducing errors [24]. In this case, a deliberate error is wanted, as instead of the PTC, a random amino acid is inserted into the polypeptide, allowing for generating of a full-length protein.

Aminoglycoside antibiotics are very prominent readthrough agents, as discussed in an excellent review by Wang et al. [25]. Especially the aminoglycosides Geneticin (G418) and Gentamicin have been found to be good candidates for translational readthrough [26]. Cystic fibrosis was the first disease for which translational readthrough was considered as a new therapeutic approach, but several other genetic conditions have been investigated since, including Duchenne muscular dystrophy and nephrogenic diabetes insipidus [27–29].

For *MC4R* nonsense mutations, aminoglycoside-mediated translational readthrough may be an interesting therapeutic approach too. In this respect, some promising results have already been obtained in nonhuman CV-1 in Origin with SV40 gene (COS)-7 cells, transfected with various *MC4R* nonsense mutations (W16X, Y35X, E61X, Q307X). Treatment of COS-7 cells with aminoglycoside G418 led to an increase in full-length *MC4R* protein expression, and a partial regaining of functional properties of the investigated mutant, measured by intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) accumulation, could be restored to a certain extent [30]. To date, however, no data are available for a human cell model, so it is unclear whether translational readthrough is a potential treatment option for affected patients. Thus, in this study, we evaluated the hypothesis of a readthrough of stop mutations in combination with the synthetic *MC4R* ligand setmelanotide (SM) being a treatment option for obese patients carrying *MC4R* stop mutations and performed our investigation in a human cell model for the first time.

Therefore, we here used human embryonic kidney 293 (HEK-293) cells to come closer to the human physiological state than green monkey-derived COS-7 cells. HEK-293 cells are a standard cell system in GPCR research, which are readily available and allow a profound understanding about the function and regulation of GPCRs due to their overexpression of the latter [31]. It is noteworthy that HEK-293 cells have been found to hold some neuron-specific characteristics by expressing more than 60 neuronal genes [32,33]. This resemblance to neurons presents another advantage of using this specific cell model, as *MC4R* is mainly expressed in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus [34]. Five different *MC4R* nonsense mutations were investigated (W16X, Y35X_D37V, E61X, W258X, Q307X), all of them positioned in different parts of *MC4R* (see Table 1), thus allowing for additionally inquiring the importance of the position of the respective mutation for its susceptibility to translational readthrough induced by aminoglycoside treatment.

Table 1. Analyzed MC4R stop mutations and their stop codon sequences.

MC4R Mutation	WT Sequence	Stop Mutation Sequence	Stop Codon Name	Localization of Mutation
W16X	CAC-CTC-TGG-AAC-CGC	CAC-CTC-TGA-AAC-CGC	opal	N-terminus
Y35X_D37V	AAA-GGC-TAC-TCT-GAT	AAA-GGC-TAA-TCT-GTT	ochre	N-terminus
E61X	TTG-TTG-GAG-AAT-ATC	TTG-TTG-TAG-AAT-ATC	amber	TMH 1
W258X	GTC-TGC-TGG-GCC-CCA	GTC-TGC-TGA-GCC-CCA	opal	TMH 6
Q307X	CGG-AGT-CAA-CAA-CTG	CGG-AGT-TAA-GAA-CTG	ochre	helix 8

Another important aspect of this study was the usage of a reliable assay to determine cell surface and total protein expression as well as the investigation of $G_{q/11}$ signaling properties, which recently have been found to have a substantial effect on weight regulation [35], after G418 treatment. However, all previous research on the functional rescue of MC4R nonsense mutations has solely focused on G_s signaling, so this study may allow a new and more extensive perspective on this interesting issue.

2. Materials and Methods

2.1. Ligands and Plasmids

The ligand alpha melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) was purchased from Merck (Taufkirchen, Germany). MC4R-wild-type (WT) was amplified from genomic deoxyribonucleic acid (DNA) and cloned into eukaryotic expression vector pcDps (kindly provided by Torsten Schöneberg, University of Leipzig). Using site-directed mutagenesis, the MC4R mutations W16X, Y35X_D37V, E61X, W258X and Q307X were introduced into MC4R-WT. For confocal microscopy, the mutants were tagged with a yellow fluorescent protein (YFP)-tag at C-terminus. For protein expression measurements, MC4R-WT and mutations were cloned into pBiT3.1-N (Promega, Mannheim, Germany), yielding a N-terminally tagged receptor with the HiBiT protein tag.

2.2. Cell Culture

The HEK-293 cell line was purchased from ATCC. Cells were cultivated in minimal essential medium (MEM; Biochrom, Berlin, Germany) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 1% nonessential amino acids (NEAA; Biochrom, Berlin, Germany) at 37 °C in humidified air containing 5% CO₂. The HEK-293 cells were tested for mycoplasma contamination at regular intervals. For measurements of cAMP, cell viability, total, and cell surface expression as well as for reporter gene assays, 1.5×10^4 cells per well were seeded in 96-well plates and incubated for 24 h. For viability and reporter gene assays, translucent 96-well plates (Falcon, Kaiserslautern, Germany) coated with poly-L-lysine (Gibco, Waltham, MA, USA) were used, and for cAMP and total and cell surface expression, white 96-well plates (Corning, Costar, NY, USA). For confocal microscopy, 1.5×10^5 cells were seeded in translucent 6-well plates with one round 24 mm glass coverslip, #1.5, added to each well.

2.3. Transfection

Transient transfection of MC4R-WT and MC4R stop mutation plasmid DNA (0.45 ng/μL/well) was performed 24 h after the seeding of HEK-293 cells in supplement-free advanced MEM (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). Metafectene (Biontex, Munich, Germany) was used as a transfection agent according to the manufacturer's protocol. For confocal microscopy (FuGene HD, Promega, Mannheim, Germany) was used according to the manufacturer's protocol. In case of antibiotic treatment, G418 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) was added during transfection.

2.4. Antibiotic Kill Curve for Evaluation of Cell Viability

Colorimetric viability assay with CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega, Mannheim, Germany) was performed to determine the appropriate G418 concentration for the following assays [36]. Untransfected HEK-293 cells were treated with different concentrations of G418 (50–1000 µg/mL) and then incubated at 37 °C. After 48 h incubation, CellTiter 96[®] AQueous One Solution was added to each well following the manufacturer's protocol, and cells were incubated for an additional 1.5 h. Measurements were performed with an Anthos microplate reader 2001 (Biochrom, Berlin, Germany). Controls with untreated cells as well as with 5 µg/mL puromycin were also conducted.

2.5. Confocal Microscopy

Cells were maintained in Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA, USA), in the presence or absence of 125 µg/mL G418 and transfected with YFP-tagged *MC4R* stop mutations. As adapted from previous research [30], cells were incubated for 48 h at 37 °C. Then cells were washed three times with 1 mL phosphate-buffered saline (PBS) and, after incubation for 20 min at room temperature, fixed on a cover glass with 1 mL/well 4% paraformaldehyde (PFA). After 5 min incubation with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at room temperature, cells were again washed three times with PBS before being embedded with a mounting medium (RotiMount FluorCare, Roth, Karlsruhe, Germany). Microscopic analysis of *MC4R* expression was performed with a confocal laser microscope (Leica DMI8 Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), equipped with a White Light Laser and Hybrid Detectors. Excitation of YFP was performed using a 514 nm line. Images were edited and evaluated using the ImageJ software (v 1.53; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.6. Analysis of Cell Surface and Total Protein Expression

The Nano-Glo[®] HiBiT detection system (Promega, Mannheim, Germany) was used to quantify the cell surface and the total expression of *MC4R* [12]. Measurements were performed according to the manufacturer's protocol. Two days after transfection, the medium was changed to 50 µL/well Opti-MEM without phenol red, and 50 µL of either HiBiT extracellular substrate (Promega, Mannheim, Germany) or HiBiT lytic substrate (Promega, Mannheim, Germany) was added. After orbital shaking for 3 min at 300 cycles/min and incubation at room temperature for 10 min, luminescence was measured using a Berthold Microplate Reader (Mithras LB 940, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany). HEK-293 cells transfected with the empty vector pcDNA3 served as background control.

2.7. Measurement of cAMP Increase via GloSensorTM

GloSensorTM assay enables measuring of G_s signaling via real-time measurement of cAMP formation [35]. HEK-293 cells were transfected with *MC4R*-WT or nonsense mutations. In case of antibiotic treatment, 125 µg/mL G418 was added to cells at the time of transfection. Cells without antibiotic treatment received MEM (Gibco, Waltham, MA, USA) only. Forty-eight hours after transfection, cells were equilibrated with a mixture of 88% CO₂ dependent medium (Gibco, Waltham, MA, USA), 10% FBS, and 2% GloSensorTM cAMP reagent. Quantitative measurements of luminescence were performed using a plate reader (Mithras LB940, Berthold Technologies GmbH & Co., Bad Wildbad, Germany). Basal cAMP activity was measured for 10 min. Following stimulation of the cells with 1 µM alpha-MSH, or 1 µM SM, the cAMP accumulation was measured 21 times at 2 min intervals. GloSensorTM results were expressed as relative luminescence units (rlu). The total cAMP accumulation was assessed in a time-response curve. Quantification of the total cAMP accumulation was performed by calculating the area under the curve (AUC; Supplementary Information, Table S1).

2.8. Reporter Gene Assays for the Determination of PLC Activation

To draw conclusions about $G_{q/11}$ signaling, phospholipase C (PLC) activation was assessed. Luciferase-based reporter gene assays were performed that use responsive elements in the promoter region of the gene encoding a firefly luciferase [37]. Equal amounts of MC4R-WT and MC4R stop mutations and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) reporter plasmid were cotransfected. In the case of G418 treatment, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 was added to cells at the time of transfection. After 48 h, cells were treated with alpha-MSH or SM, then incubated in supplement-free MEM at 37 °C with 5% CO_2 . After 6 h, the reaction was terminated by discarding the medium. Cells were lysed at room temperature using 50 μL passive lysis buffer (PLB; Promega, Fitchburg, WI, USA), then frozen at -80 °C for 10 min. Afterwards, 10 μL lysate was transferred onto a white opaque 96-well plate. Automatic injection of 40 μL firefly luciferase substrate (Promega, Mannheim, Germany) and determination of luminescence were performed with the plate reader Mithras LB940.

2.9. Statistical Analysis

Statistical testing and calculation of the AUC were performed using the GraphPad Prism 9.3.1 software (San Diego, CA, USA). The significance between parameters was calculated with one-way ANOVA (Dunnett's test) and two-way ANOVA (Tukey's test). $p \leq 0.05$ was set as a significant outcome. All data represent means \pm standard error of mean (SEM), if not indicated otherwise.

3. Results

3.1. Evaluation of G418 Cytotoxicity in HEK-293 Cells

To exclude significant cytotoxic side effects of aminoglycoside treatment, in a first step, the appropriate concentration of G418 was determined by cell viability assays in untransfected HEK-293 cells. In previous studies, the concentration of G418 used for readthrough experiments often ranges from 75 to 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [30,38–40]. As some of these studies have been performed in HEK-293 cells [39], but others in different cell lines [30,38,40], the appropriate concentration for the HEK-293 cells, which were used in our assays, had to be determined.

As shown in Figure 1, G418 (0–1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration-dependently decreased the viability of HEK-293 cells by up to 45% after 48 h of treatment. However, significant cytotoxic effects became apparent only at concentrations of 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and higher. Up to 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, only a nonsignificant decrease of up to 15% occurred. The appropriate concentration for the functional assays was thus found to be 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with two important factors playing into that decision: higher concentrations of G418 should yield more pronounced rescuing effects, whereas a good survival of the cells is vital for a safe treatment. This concentration is in accordance with previous studies [39].

Additionally, puromycin was used as a positive control for the cytotoxicity of aminoglycosides. Puromycin is known to be cytotoxic even at low concentrations [41,42], and accordingly, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of puromycin already decreased the viability of HEK-293 cells by >75%.

3.2. Determination of MC4R Cell Surface and Total Expression

In a next step, the expression and localization of MC4R in transfected HEK-293 cells was determined using confocal microscopy and the HiBiT assay system.

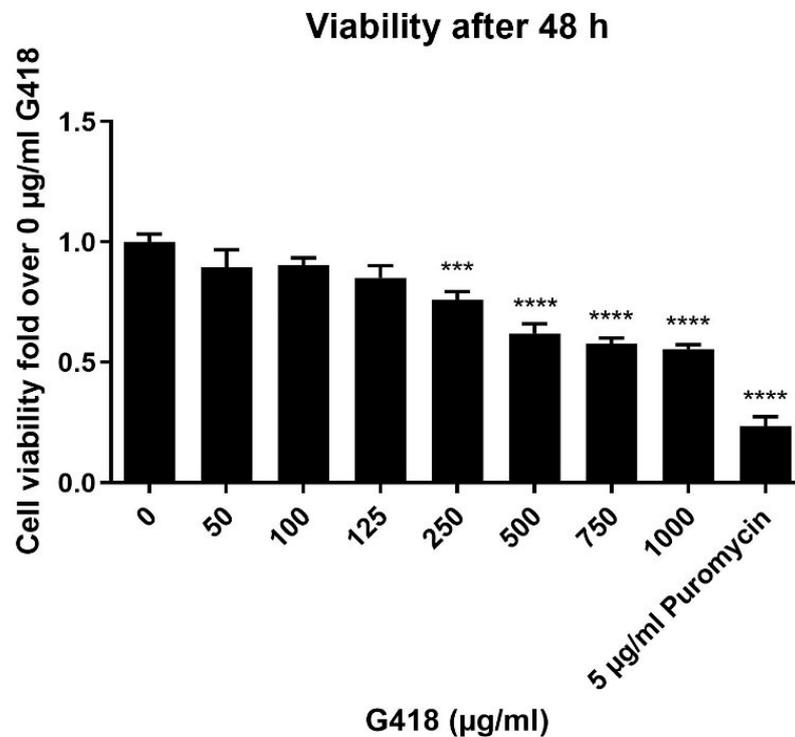


Figure 1. Concentration-dependent increase in the cytotoxicity of G418 in HEK-293 cells. Viability of cells was determined using untransfected HEK-293 cells and increasing concentrations of G418 (0–1000 µg/mL). Puromycin (5 µg/mL) served as a positive control. After incubation at 37 °C for 48 h, colorimetric measurements were performed (CellTiter AQueous One Solution, Promega). The viability of cells with 0 µg/mL G418 was set at 1. With an increasing concentration of G418, a steady decrease in viability was seen. Data represent mean ± SEM from three independent experiments performed in triplicate. Significant differences were calculated using Dunnett’s test and are denoted as follows: *** p -value = 0.0001–0.001; **** p -value < 0.0001.

3.2.1. Confocal Microscopy Showed Successful Readthrough Activity

Confocal fluorescence microscopy was performed in the absence and presence of G418, where MC4R-WT and stop mutants were C-terminally tagged with YFP. W16X and Q307X, in which the mutations are positioned at different domains of the MC4R, are shown to be exemplary for the MC4R stop mutants.

MC4R-WT showed a strong expression on the membrane and intracellularly (Figure 2, upper panel). MC4R expression is similar in both conditions, with or without G418. In contrast, for the MC4R nonsense mutants without G418, only a very faint signal could be detected (Figure 2, middle and lower panels). After G418 treatment, the signal was slightly enhanced, and distinct spots of MC4R could be detected, indicating that the readthrough is working. Compared with the WT, the fluorescence signal remained low for the MC4R stop mutants.

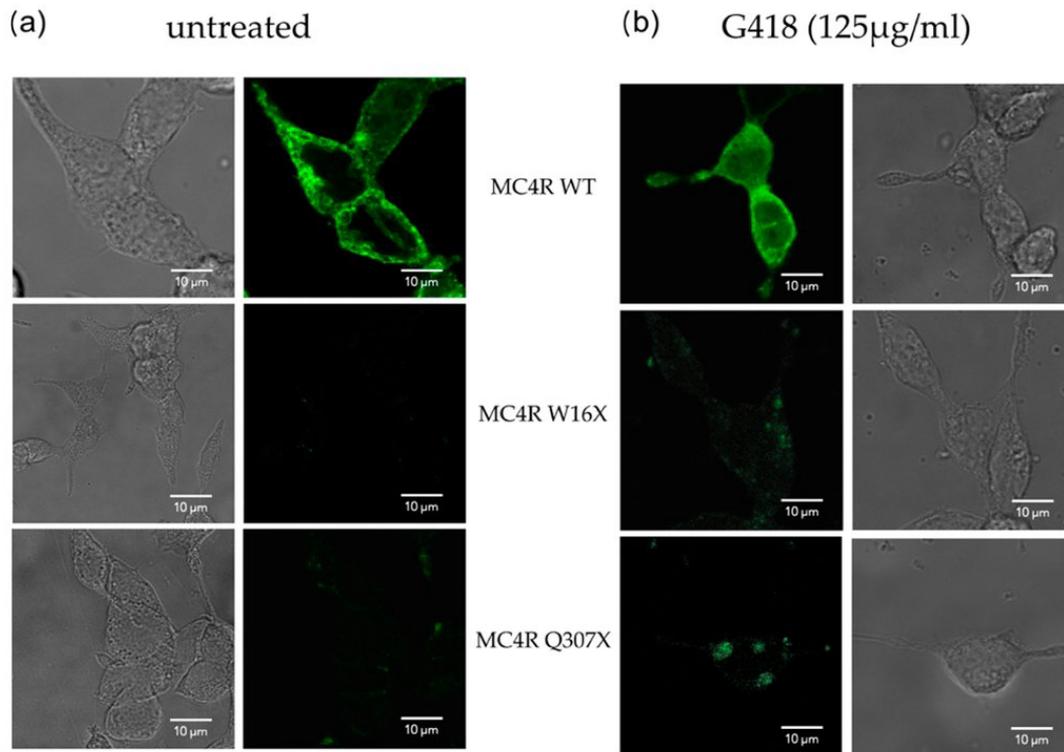


Figure 2. *MC4R* localization in the absence and presence of G418 is determined by confocal fluorescence microscopy. One column shows phase contrast microscopy, the other fluorescence microscopy with (a) depicting untreated and (b) G418 treated conditions. *MC4R*-WT and the stop mutants W16X and Q307X were tagged with YFP. The WT shows high expression on the cell surface and intracellularly with comparable results for the absence and presence of G418 (upper panel). *MC4R* stop mutants show very low signal in untreated conditions. After G418 treatment, a slight enhancement in signal is seen, but still to a lower degree than the WT. Contrast settings are the same in all fluorescence panels.

3.2.2. HiBiT Assay for the Determination of Cell Surface and Total Receptor Expression

Interestingly, the results of the HiBiT assay, which is dependent on the N-terminal HiBiT-tag, present differently compared with the microscopy data, which depend on a C-terminal fluorescent tag. The expression of *MC4R*-WT and mutant *MC4R* was detected on the cell surface (Figure 3a). Remarkably, cell surface expression strongly differed among the different *MC4R* mutants, and a certain pattern became apparent, indicating that cell surface expression was dependent on the position of the mutation within the GPCR: the earlier in the amino acid sequence the mutation occurs, the lower the expression on the cell surface is, indicating that an early stop codon abolishes receptor expression.

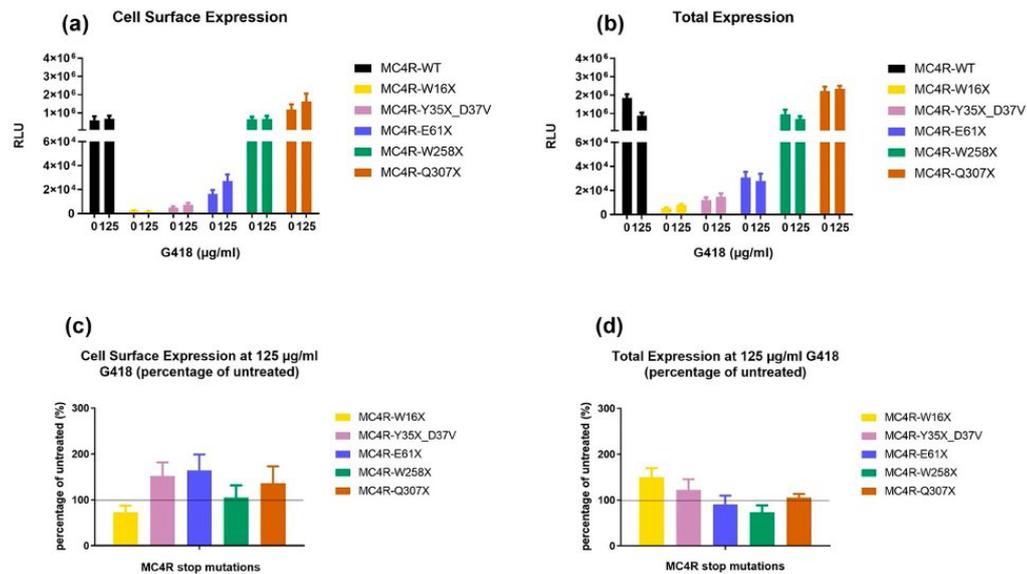


Figure 3. Expression of the *MC4R* variants in the absence or presence of G418. In the upper part, (a) shows cell surface expression, and (b) shows total expression of *MC4R*. In the lower segment, (c,d) show the percentage change of expression measured against their expression at untreated conditions. HEK-293 cells were transfected with N-terminally HiBiT-tagged *MC4R*-WT or mutation. This small protein tag is able to complement a split luciferase that cannot cross the plasma membrane. In case of antibiotic treatment, cells were incubated in medium containing 125 µg/mL G418. For cell surface expression (a), the cell membrane remained intact, and for the determination of total expression (b), the cells were lysed. The expression of the *MC4R* variant was quantified in rlu. Results are shown in pairs with the first column showing results of untreated cells and the second column showing the cells treated with G418. Calculation of the percentage change in the expression of *MC4R* stop mutants (c,d) showed that E61X had the highest increase regarding cell surface expression, whereas W16X had the highest increase in total protein expression. Values represent mean \pm SEM from four independent experiments performed in triplicate.

Accordingly, the W16X mutant, in which the PTC occurs in the N-terminus region of *MC4R*, showed a much lower cell surface expression than the WT. The Y35X_D37V mutant, which harbors mutations located only slightly further downstream the N-terminus, yielded very similar results. E61X with its PTC in the first transmembrane domain already showed a slightly higher cell surface expression, but nevertheless still to a much lower extent than the WT. On the other hand, the W258X mutant, in which the mutation is part of the highly conserved and important CWxP motif in *MC4R* and other GPCRs [37], in transmembrane helix (TMH) 6, and the Q307X mutant with a PTC in the beginning of helix 8 showed a cell surface expression that was similar to the WT. Comparable results were found when looking at the total expression of the receptor (Figure 3b).

To check for the putative effect of aminoglycoside treatment on the expression of mutated *MC4R*, G418 (125 µg/mL) was added during transfection. As shown in Figure 3c, the cell surface expression increased for all stop mutants except W16X. The effect was most pronounced in E61X. For total protein expression, Y35X_D37V showed the highest increase compared with untreated conditions. However, none of the results reached statistical significance.

3.3. G418 Did Not Restore Intracellular G_s Signaling of MC4R Stop Mutants

The functional properties of MC4R stop mutants challenged with the endogenous ligand alpha-MSH or the synthetic ligand SM and the modulation by G418 treatment were investigated by GloSensor™ assays for the determination of G_s signaling. These allow the monitoring of intracellular cAMP accumulation in real time, thereby allowing the determination of G_s signaling properties of the MC4R variants.

As expected, the stimulation of MC4R-WT with the endogenous ligand alpha-MSH (1 μ M) led to an immediate and lasting increase in intracellular cAMP levels (Figure 4a). Stimulation with SM (1 μ M) also increased the concentration of intracellular cAMP in a comparable manner, showing an even slightly higher induction than the activation with the endogenous ligand alpha-MSH (Figure 4b). In both cases, additional treatment with G418 (125 μ g/mL) resulted in a similar cAMP induction, indicating that the cAMP signaling of fully functional MC4R-WT may not be affected by additional stimulation with aminoglycosides.

Almost no appreciable induction of cAMP was seen after stimulation of the mutants W16X, Y35X_D37V, and E61X with either the natural or the synthetic ligand regardless of G418 treatment (Figure 4c,d). Stimulation of the mutants W258X and Q307X with alpha-MSH (Figure 4e) or SM (Figure 4f) in the absence of G418 did not induce remarkable increases in intracellular cAMP levels. However, under G418 pretreated conditions, a more pronounced increase in cAMP was seen for both mutants, especially after stimulation with SM. Additional calculation of the AUC supported this notion, as the AUC of the mutants W258X and Q307X increased after G418 treatment (Figure 4g,h). Nevertheless, this increase by G418 treatment yielded no statistical significance, and in comparison with the AUC of the WT, both W258X and Q307X only were at ~2% of the WT.

3.4. G418 Only Increased Basal $G_{q/11}$ Signaling in MC4R Stop Mutants

To evaluate $G_{q/11}$ signaling properties of MC4R nonsense mutants, reporter gene assays were performed, and PLC activity was measured through NFAT responsive element activity.

As anticipated, MC4R-WT showed a strong increase of signaling after stimulation with 1 μ M alpha-MSH or SM (Figure 5a). A steady increase was measured both with and without G418 treatment, but the increase was slightly higher without G418 treatment. The basal activity of MC4R-WT was faintly increased after G418 treatment.

Interestingly, all MC4R stop mutants showed a significant increase in their basal activity after G418 treatment (Figure 5b–f). Nevertheless, stimulation with 1 μ M alpha-MSH or SM did not result in $G_{q/11}$ activation. Overall, PLC activation after stimulation was higher after G418 treatment for all MC4R stop mutants but not statistically significant.

In summary, functional data demonstrate that a readthrough of MC4R stop mutations in HEK-293 cells is generally possible; however, the efficacy in readthrough did not efficiently restore MC4R expression and function. So far, it is uncertain what the increase in basal activity in $G_{q/11}$ signaling after G418 treatment means for MC4R function in vivo. Therefore, at this point, we have to conclude that readthrough of MC4R stop mutations does not represent a promising treatment strategy.

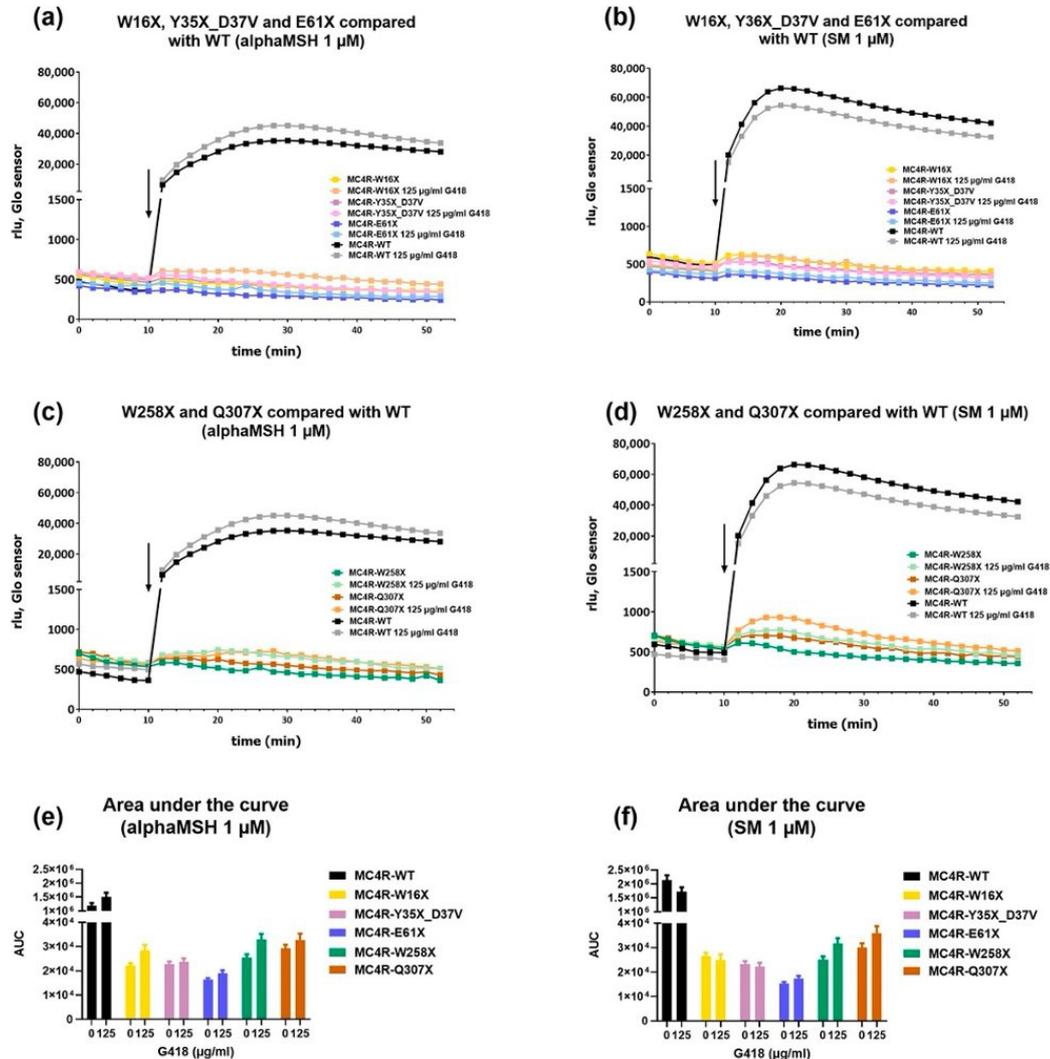


Figure 4. G_s signaling properties of *MC4R* variants after stimulation in the absence or presence of G418. HEK-293 cells were transfected with *MC4R*-WT or mutation and GloSensor™ reporter and incubated for 48 h, and in the case of antibiotic treatment, the medium contained 125 μ g/mL G418. After a basal measurement, cells were stimulated with alpha-MSH (a,c) or SM (b,d), and cAMP accumulation was measured over time and quantified in rlu. The arrow indicates the start of stimulation. The WT showed a pronounced increase in cAMP accumulation after stimulation with both alpha-MSH and SM regardless of G418 treatment. While W16X, Y35X_D37V, and E61X showed very little to no increase in cAMP (a,b), stimulation of W258X and Q307X after G418 treatment led to a slightly more noticeable increase, especially when stimulated with SM (c,d). (e,f) show the increase in AUC after stimulation. Data represent three independent experiments, each performed in triplicate. Values represent mean (\pm SEM for (e,f)) from three independent experiments.

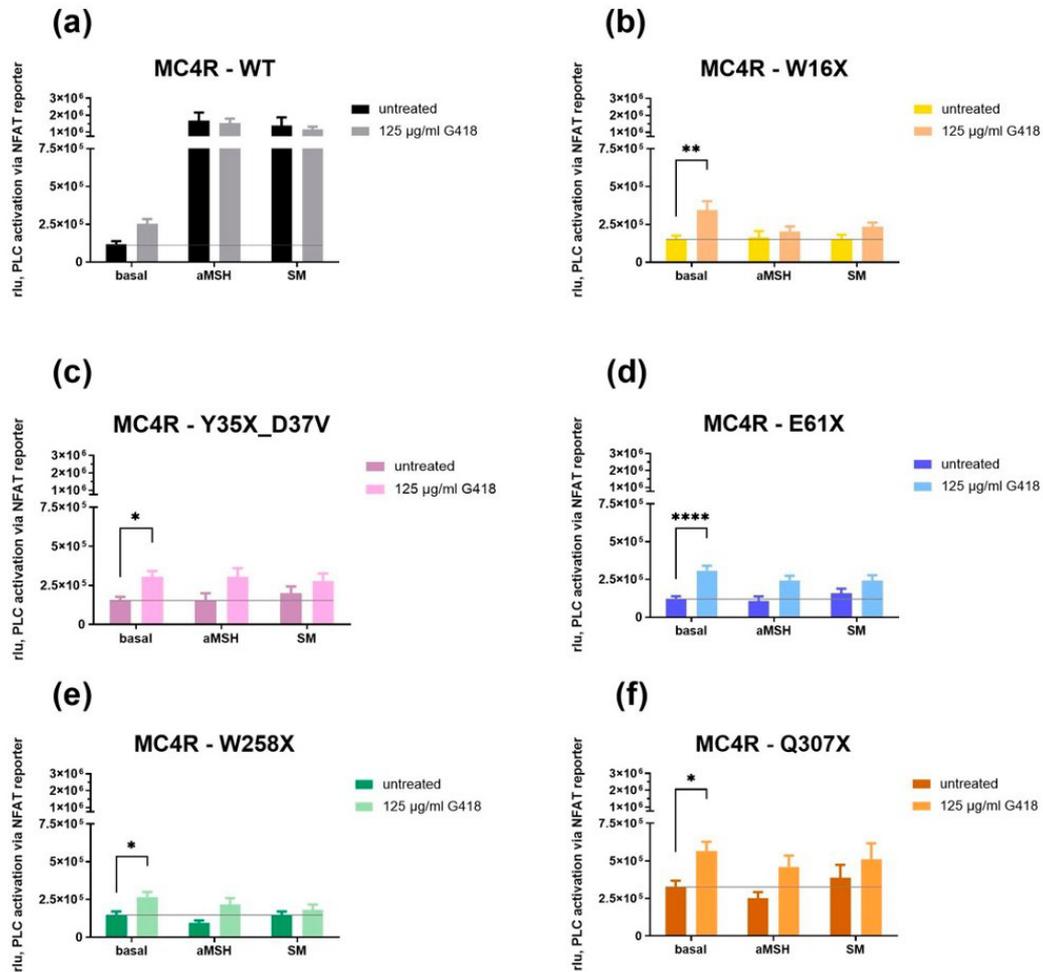


Figure 5. $G_{q/11}$ signaling of MC4R-WT and mutants in the absence or presence of G418. HEK-293 cells were cotransfected with an MC4R variant and NFAT responsive element. In the case of antibiotic treatment, 125 µg/mL G418 was added to cells. Basal activity and activity after stimulation, with or without G418, was measured and quantified in rlu to determine $G_{q/11}$ signaling capacities. Results of stimulation with alpha-MSH and SM are shown for MC4R-WT and each stop mutant separately (a–f). An increase in signaling after stimulation with both alpha-MSH and SM and both in the presence and absence of G418 was seen in the WT (a). In contrast, none of the mutants showed a significant increase in rlu after stimulation regardless of G418 treatment. However, a significantly higher basal activity after treatment with G418 could be measured in all MC4R mutants. Values represent mean \pm SEM from four to eight independent experiments performed in triplicate. Significant differences (Tukey's test) from the respective MC4R without aminoglycoside administration are denoted as follows: * p -value = 0.01–0.05; ** p -value = 0.001–0.01; **** p -value < 0.0001.

4. Discussion

The *MC4R* is a key player in energy homeostasis and satiety regulation [12], and *MC4R* deficiency is the most common cause of monogenetic obesity [35]. It therefore is an interesting target for antiobesity treatment approaches. SM is a high-affinity ligand for *MC4R*, described in 2021 as an *MC4R*-SM structure complex [37], and has been approved in 2020 by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of some forms of rare monogenetic obesity due to mutations in the melanocortin–leptin pathway, namely, pro-opiomelanocortin (*POMC*) deficiency, proprotein subtilisin/kexin type 1 (*PCSK1*) deficiency, and leptin receptor (*LEPR*) deficiency [43]. However, up until today, no treatment options exist for patients suffering from *MC4R* deficiency due to *MC4R* nonsense mutations. Recently, the efficacy of glucagon-like peptide (GLP)-1 receptor agonist treatment has been evaluated in short-term clinical studies [44]. Whereas incretin treatment targets the GLP-1 receptor, for stop mutations directly affecting the *MC4R*, aminoglycosides have been shown to effectively induce the readthrough of PTCs. As PTCs usually lead to truncated and functionless proteins, aminoglycoside-induced readthrough restores the expression and functional properties of proteins [38] and may thus also work in the restoration of the expression and function of nonsense mutated *MC4R*.

The use of translational readthrough agents has been investigated in several clinical studies, including a trial on the use of Gentamicin in recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB). The conclusion of their study was that Gentamicin therapy might be a readily available treatment option for patients suffering from RDEB due to nonsense mutations [45]. Additionally, since 2014, the drug Translarna, a nonaminoglycoside drug that induces translational readthrough, has been approved by the European Medicines Agency (EMA) as an orphan drug for the treatment of Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene in ambulatory patients aged 2 years and older [46]. More closely related to our research, the rescue of nonsense mutated leptin receptors causing monogenetic obesity was attempted in an in vitro setting using HEK-293 cells and the readthrough agents G418, Gentamicin, and ataluren. Surprisingly, the investigated human nonsense mutation could be suppressed when characterized within nonhuman receptors, but not after insertion into the human receptor [47].

Thus, we here evaluated whether treatment with the aminoglycoside G418 can rescue *MC4R* stop mutations and increase receptor expression as well as signaling in human *MC4R*-transfected HEK-293 cells. Functional testing of G_s and $G_{q/11}$ signaling of the receptors was performed after challenging them with the endogenous *MC4R* ligand alpha-MSH as well as with the synthetic cyclic ligand SM, which has also been shown to be an interesting candidate for the therapeutic activation of *MC4R* mutations [8].

We conducted research on human HEK-293 cells transiently transfected with different *MC4R* stop mutations, as so far, a rescue of *MC4R* stop mutations has only been investigated in nonhuman COS-7 cells, focusing on G_s signaling only, and the results were auspicious [30]. In our study, we first wanted to use a human cell system and, second, also get a broader overview by investigating not only G_s signaling but also $G_{q/11}$ signaling, which since then has been found out to be of importance.

After determining a nontoxic and appropriate concentration of G418 in viability assays, *MC4R*-WT and five selected *MC4R* stop mutants (W16X, Y35X_D37V, E61X, W258X, Q307X) were investigated for their expression and signaling properties after treatment with 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418, and the findings were compared with untreated control conditions. Surprisingly, HiBiT assays and confocal microscopy, both focusing on the detection of *MC4R* expression and localization patterns, revealed results that seemed to contradict each other at first: Using confocal fluorescence microscopy, hardly any expression of *MC4R* stop mutants could be detected in untreated conditions, which is expected. After G418 treatment, the expression appeared higher, but still low compared with the WT. The reason for this might be that by readthrough, a random amino acid is incorporated, probably resulting in misfolding of the receptor in case the position of the *MC4R* stop mutation is of importance for receptor conformation. In the HiBiT cell surface assay, however, the

expression of *MC4R* stop mutants varied to a great extent, and the *MC4R* stop mutants with PTCs further downstream (W258X, Q307X) showed a WT-like expression, because here, correct folding and membrane expression might occur, while the early N-terminal mutant (W16X) had by far the lowest expression, with or without G418.

We can therefore assume that *MC4R* is expressed on the cell surface despite the stop mutation, especially if the mutation occurs further downstream of the receptor. These results contradict the previous finding of Moore et al. from 2018, which state that truncation early in the *MC4R* C-terminus (before position C318) leads to improper localization and no signaling [48]. We detected *MC4R* stop mutants on the cell surface, with especially W258X and Q307X showing WT-like expression. However, in the case of the Q307X mutant, parts of helix 8 and the remaining C-terminus are missing due to the early termination.

This interesting finding might be explained by the fact that *MC4R* does not induce nonsense-mediated decay (NMD). NMD describes a process in which ribonucleic acid (RNA) selectively gets degraded after a PTC is detected in its sequence [49]. Thus, this surveillance mechanism is supposed to remove RNA, which would produce a protein with a harmful effect for the organism [50]. In mammals, NMD is dependent on exon–exon junctions after post-translational splicing. However, as the *MC4R* is a single exon gene, no exon–exon junction exists, and therefore, *MC4R* mutants harboring a PTC are insensitive to NMD [51].

As after G418 treatment some improvement was seen in *MC4R* expression, we wanted to determine whether a rescue of functional properties was possible. In COS-7 cells, it has been shown that a readthrough of nonsense mutations is generally possible, and even some functional rescue was possible [30]. At first, we performed GloSensor™ assays to enable live measurement of cAMP accumulation and, therefore, deduce G_s signaling capacities. In the presence of G418, cAMP accumulation of stimulated *MC4R* stop mutants was only slightly and not significantly increased. This is concordant with the findings from our HiBiT assays, in which protein expression is slightly but not significantly increased for most *MC4R* stop mutants after G418 treatment.

As in recent years, the role of $G_{q/11}$ has been found to be of importance for *MC4R* signaling [12–15], an investigation about a possible rescue of this pathway was compelling. Interestingly, our results showed a significant increase in basal $G_{q/11}$ signaling after G418 treatment for all stop mutants, but no $G_{q/11}$ activation after stimulation was observed. This is a new and intriguing finding, but so far, the effect this might have in vivo remains unclear.

Overall, G418 was not able to restore substantial improvement of G_s and $G_{q/11}$ signaling in HEK-293 cells. Additionally, results obtained in nonhuman COS-7 cells concerning the rescue of *MC4R* stop mutations could not be replicated in the human cell model. This might be due to certain differences between the cell lines, such as the difference in the expression of regulatory proteins. Melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) is a regulatory protein that is expressed in the HEK-293 cells we used [52], but not in COS-7 cells [53]. Several studies have shown that *MC4R* signaling is highly affected by MRAP2 [54–58]; therefore, the presence or rather, in the case of COS-7 cells, the absence of MRAP2 can affect results. Furthermore, the SV40 promoter used for our *MC4R* expression plasmids is ideal for COS-7 cells [59] but results in reduced expression in HEK-293 cells, which is wanted in our study to better resemble the physiological state. These findings could also explain the observed differences. It is noteworthy that for the leptin receptor, similar results were obtained in the aspect that aminoglycoside-mediated rescue only worked in a nonhuman setting [47].

Some distinctions can be found between the five investigated *MC4R* nonsense mutations: The surrounding nucleotides vary as well as the respective stop codon sequence, as shown in Table 1. In previous studies, these differences have been found to be of importance in terms of the success of aminoglycoside-mediated readthrough [30].

G418 has been shown to have a comparable readthrough activity to all three PTCs, but slightly higher for TAG and TGA than for TAA [60]. In our HiBiT assay, W16X, which carries the TGA codon, showed the highest increase in total protein expression after G418

treatment. Additionally, W16X and E61X, which carry the TAG codon, had the most significant increase in basal activity after G418 treatment in the NFAT assay. However, a stimulation of neither G_s nor $G_{q/11}$ signaling was remarkably different from the *MC4R* stop mutants Y35X_D37V and Q307X, which harbor the TAA codon.

Besides the sequence of the stop codon, the nucleotide directly following the stop codon is known as another factor to play a role in the success of readthrough. Apparently, translational readthrough is most successful if cytosine or adenine is incorporated as the next nucleotide [30]. Again, this is the case for W16X, with adenine in the following position. E61X also has adenine as the nucleotide following the stop codon. In HiBiT assays, E61X showed the highest increase in the cell surface expression of *MC4R* and the most significant increase in basal activity in the NFAT assays.

Certainly, the amino acid that is inserted into the sequence during translational readthrough can also affect the formation of the peptide. As this is a random process, it cannot be interfered with. However, some positions within the *MC4R* are less conserved than others, which indicates that these positions are less important for receptor activity than others. For example, the N-terminus is not conserved throughout different species [61]; therefore, it is likely that the insertion of a random amino acid within the N-terminus is affecting the receptor less than in other parts. However, in our functional assays, we could find no such difference between the two N-terminal mutants W16X and Y35X_D37V compared with the other mutants with PTCs occurring further downstream, as significant induction of signaling was not possible for any of the mutants. Any effect was probably more related to reduced expression than to the position of the mutation.

In conclusion, based on our findings and the currently lacking knowledge on the importance of basal $G_{q/11}$ signaling, we have to state that G418 treatment in combination with SM is very unlikely to be useful as a new therapeutic approach. However, our cell model, albeit already much closer to the physiological state than kidney cells of green monkeys like COS-7 cells, is not ideal, as HEK-293 are not neuronal cells, and it is an in vitro study. It would be intriguing to investigate translational readthrough of the *MC4R* functions in a human neuronal cell line or even in an in vivo setting. The in vivo setting might help clarify the increased basal activity in our NFAT assays and its consequences for the organism. It could also be interesting to focus on the mutations, which have a high potential of functional rescue due to their position within the receptor or their surrounding nucleotides, such as W16X. In COS-7 cells, G418 showed the best readthrough activity compared with other aminoglycosides [30]. As we now found different results in HEK-293 cells compared with COS-7 cells, it might also be useful to test the efficacy of other readthrough agents on HEK-293 cells. These could be different aminoglycosides or also other nonaminoglycoside readthrough-inducing agents, of which many have been developed or investigated in recent years [60,62,63].

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/life12111793/s1>, Table S1: Source data.

Author Contributions: Conceptualization, H.B. and P.K.; methodology, F.H., H.B., S.P., N.R. and I.S.; data analysis, F.H., S.P., H.B., P.A. and P.K.; investigation, F.H., S.P., I.S. and N.R.; resources, H.B., P.S. and P.A.; data curation, F.H., H.B. and S.P.; writing—original draft preparation, F.H., H.B. and P.K.; writing—review and editing, F.H., H.B., S.P., P.S., P.A. and P.K.; visualization, F.H.; supervision, P.K., H.B. and S.P.; project administration, H.B. and P.K.; funding acquisition, H.B., P.S., P.A. and P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (German Research Foundation) through SFB1423, project number 421152132, subprojects B02 to H.B. and P.K., A01 and Z03 to P.S., and C03 to P.A., and project numbers 430971019, 430970922 and KU 2673/6-1 to P.K., and by the European Union's Horizon 2020 MSCA Program under grant agreement 956314 (ALLODD) to P.S.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article or supplementary material. The data presented in this study are available in Table S1, “Source data file”.

Acknowledgments: Special thanks to Cigdem Cetindag and Sabine Jyrch from the Institute of Experimental Pediatric Endocrinology for their technical and experimental support and to Anne Müller for the determination of MRAP2 expression in HEK-293 cells.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Theilade, S.; Christensen, M.B.; Vilsbøll, T.; Knop, F.K. An overview of obesity mechanisms in humans: Endocrine regulation of food intake, eating behaviour and common determinants of body weight. *Diabetes Obes. Metab.* **2021**, *23*, 17–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Di Cesare, M.; Bentham, J.; Stevens, G.A.; Zhou, B.; Danaei, G.; Lu, Y.; Bixby, H.; Cowan, M.J.; Riley, L.M.; Hajifathalian, K.; et al. Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **2016**, *387*, 1377–1396. [[CrossRef](#)]
3. Flegal, K.M.; Graubard, B.I.; Williamson, D.F.; Gail, M.H. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA* **2007**, *298*, 2028–2037. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Blüher, M. Obesity: Global epidemiology and pathogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 288–298. [[CrossRef](#)]
5. Guh, D.P.; Zhang, W.; Bansback, N.; Amarsi, Z.; Birmingham, C.L.; Anis, A.H. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: A systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **2009**, *9*, 88. [[CrossRef](#)]
6. Pasquali, R.; Patton, L.; Gambineri, A. Obesity and infertility. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2007**, *14*, 482–487. [[CrossRef](#)]
7. World Health Organisation. Obesity and Overweight—Key Facts. 2018. Available online: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed on 26 November 2018).
8. Hinney, A.; Körner, A.; Fischer-Posovszky, P. The promise of new anti-obesity therapies arising from knowledge of genetic obesity traits. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2022**, *18*, 623–637. [[CrossRef](#)]
9. Liu, T.; Ji, R.-L.; Tao, Y.-X. Naturally occurring mutations in G protein-coupled receptors associated with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Pharmacol. Ther.* **2022**, *234*, 108044. [[CrossRef](#)]
10. Kühnen, P.; Krude, H.; Biebermann, H. Melanocortin-4 Receptor Signalling: Importance for Weight Regulation and Obesity Treatment. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 136–148. [[CrossRef](#)]
11. Vollbach, H.; Brandt, S.; Lahr, G.; Denzer, C.; Von Schnurbein, J.; Debatin, K.-M.; Wabitsch, M. Prevalence and phenotypic characterization of MC4R variants in a large pediatric cohort. *Int. J. Obes.* **2016**, *41*, 13–22. [[CrossRef](#)]
12. Paisdzior, S.; Dimitriou, I.M.; Schöpe, P.C.; Annibale, P.; Scheerer, P.; Krude, H.; Lohse, M.J.; Biebermann, H.; Kühnen, P. Differential Signaling Profiles of MC4R Mutations with Three Different Ligands. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Newman, E.A.; Chai, B.-X.; Zhang, W.; Li, J.-Y.; Ammori, J.B.; Mulholland, M.W. Activation of the Melanocortin-4 Receptor Mobilizes Intracellular Free Calcium in Immortalized Hypothalamic Neurons. *J. Surg. Res.* **2006**, *132*, 201–207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Clément, K.; Biebermann, H.; Farooqi, I.S.; Van der Ploeg, L.; Wolters, B.; Poutou, C.; Puder, L.; Fiedorek, F.; Gottesdiener, K.; Kleinau, G.; et al. MC4R agonism promotes durable weight loss in patients with leptin receptor deficiency. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 551–555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, Y.-Q.; Shrestha, Y.B.; Pandey, M.; Chen, M.; Kablan, A.; Gavrilova, O.; Offermanns, S.; Weinstein, L.S. Gq/11 α and Gs α mediate distinct physiological responses to central melanocortins. *J. Clin. Investig.* **2015**, *126*, 40–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Collet, T.-H.; Dubern, B.; Mokrosinski, J.; Connors, H.; Keogh, J.M.; de Oliveira, E.M.; Henning, E.; Poitou-Bernert, C.; Oppert, J.-M.; Tounian, P.; et al. Evaluation of a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist (Setmelanotide) in MC4R deficiency. *Mol. Metab.* **2017**, *6*, 1321–1329. [[CrossRef](#)]
17. Heyder, N.; Kleinau, G.; Szczepek, M.; Kwiatkowski, D.; Speck, D.; Soletto, L.; Cerdá-Reverter, J.M.; Krude, H.; Kühnen, P.; Biebermann, H.; et al. Signal Transduction and Pathogenic Modifications at the Melanocortin-4 Receptor: A Structural Perspective. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 515. [[CrossRef](#)]
18. MC4R Gene. Available online: <https://www.mc4r.org.uk/> (accessed on 29 August 2022).
19. Wade, K.H.; Lam, B.Y.H.; Melvin, A.; Pan, W.; Corbin, L.J.; Hughes, D.A.; Rainbow, K.; Chen, J.-H.; Duckett, K.; Liu, X.; et al. Loss-of-function mutations in the melanocortin 4 receptor in a UK birth cohort. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 1088–1096. [[CrossRef](#)]
20. Farooqi, I.S.; Keogh, J.M.; Yeo, G.S.H.; Lank, E.J.; Cheetham, T.; O’Rahilly, S. Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1085–1095. [[CrossRef](#)]
21. Loos, R.J.F.; Yeo, G.S.H. The genetics of obesity: From discovery to biology. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *23*, 120–133. [[CrossRef](#)]
22. Davies, J.; Gilbert, W.; Gorini, L. Streptomycin, Suppression, and the Code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, *51*, 883–890. [[CrossRef](#)]
23. Lee, H.-L.R.; Dougherty, J.P. Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacol. Ther.* **2012**, *136*, 227–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Martins-Dias, P.; Romão, L. Nonsense suppression therapies in human genetic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2021**, *78*, 4677–4701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Wang, W.; Guo, D.-Y.; Tao, Y.-X. Therapeutic strategies for diseases caused by loss-of-function mutations in G protein-coupled receptors. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2018**, *161*, 181–210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Schilff, M.; Sargsyan, Y.; Hofhuis, J.; Thoms, S. Stop Codon Context-Specific Induction of Translational Readthrough. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Clancy, J.P.; Bebök, Z.; Ruiz, F.; King, C.; Jones, J.; Walker, L.; Greer, H.; Hong, J.; Wing, L.; Macaluso, M.; et al. Evidence that Systemic Gentamicin Suppresses Premature Stop Mutations in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2001**, *163*, 1683–1692. [[CrossRef](#)]
28. Sangkuhl, K.; Schulz, A.; Römpler, H.; Yun, J.; Wess, J.; Schöneberg, T. Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *13*, 893–903. [[CrossRef](#)]
29. Keeling, K.M.; Wang, D.; Conard, S.E.; Bedwell, D.M. Suppression of premature termination codons as a therapeutic approach. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2012**, *47*, 444–463. [[CrossRef](#)]
30. Brumm, H.; Mühlhaus, J.; Bolze, F.; Scherag, S.; Hinney, A.; Hebebrand, J.; Wiegand, S.; Klingenspor, M.; Grütters, A.; Krude, H.; et al. Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through. *Obesity* **2012**, *20*, 1074–1081. [[CrossRef](#)]
31. Tabatabaei, M.; Caetano, F.A.; Vedraïne, S.; Norton, P.R.; Ferguson, S.S.; Lagugné-Labarthe, F. Directing GPCR-transfected cells and neuronal projections with nano-scale resolution. *Biomaterials* **2013**, *34*, 10065–10074. [[CrossRef](#)]
32. Shaw, G.; Morse, S.; Ararat, M.; Graham, F.L. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* **2002**, *16*, 869–871. [[CrossRef](#)]
33. He, B.; Soderlund, D.M. Human embryonic kidney (HEK293) cells express endogenous voltage-gated sodium currents and Nav1.7 sodium channels. *Neurosci. Lett.* **2010**, *469*, 268–272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Farooqi, I.S. Monogenic human obesity syndromes. *Handb. Clin. Neurol.* **2021**, *181*, 301–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Reininghaus, N.; Paisdzior, S.; Höpfner, F.; Jyrch, S.; Cetindag, C.; Scheerer, P.; Kühnen, P.; Biebermann, H. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*; Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Baell, J., Chung, T.D.Y., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., et al., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2004.
37. Heyder, N.A.; Kleinau, G.; Speck, D.; Schmidt, A.; Paisdzior, S.; Szczepek, M.; Bauer, B.; Koch, A.; Gallandi, M.; Kwiatkowski, D.; et al. Structures of active melanocortin-4 receptor–Gs-protein complexes with NDP- α -MSH and setmelanotide. *Cell Res.* **2021**, *31*, 1176–1189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Brasell, E.J.; Chu, L.; El Kares, R.; Seo, J.H.; Loesch, R.; Iglesias, D.M.; Goodyer, P. The aminoglycoside geneticin permits translational readthrough of the CTNS W138X nonsense mutation in fibroblasts from patients with nephropathic cystinosis. *Pediatr. Nephrol.* **2018**, *34*, 873–881. [[CrossRef](#)]
39. Lombardi, S.; Ferrarese, M.; Marchi, S.; Pinton, P.; Pinotti, M.; Bernardi, F.; Branchini, A. Translational readthrough of GLA nonsense mutations suggests dominant-negative effects exerted by the interaction of wild-type and missense variants. *RNA Biol.* **2019**, *17*, 254–263. [[CrossRef](#)]
40. Salvatori, F.; Breveglieri, G.; Zuccato, C.; Finotti, A.; Bianchi, N.; Borgatti, M.; Feriotto, G.; Destro, F.; Canella, A.; Brognara, E.; et al. Production of β -globin and adult hemoglobin following G418 treatment of erythroid precursor cells from homozygous $\beta^{0/39}$ thalassemia patients. *Am. J. Hematol.* **2009**, *84*, 720–728. [[CrossRef](#)]
41. Jung, J.H.; Lee, H.; Kim, J.-H.; Sim, D.Y.; Ahn, H.; Chang, S. p53-Dependent Apoptotic Effect of Puromycin via Binding of Ribosomal Protein L5 and L11 to MDM2 and Its Combination Effect with RITA or Doxorubicin. *Cancers* **2019**, *11*, 582. [[CrossRef](#)]
42. Buhr, F.; Kohl-Landgraf, J.; Dieck, S.T.; Hanus, C.; Chatterjee, D.; Hegelein, A.; Schuman, E.M.; Wachtveitl, J.; Schwalbe, H. Design of Photocaged Puromycin for Nascent Polypeptide Release and Spatiotemporal Monitoring of Translation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3717–3721. [[CrossRef](#)]
43. FDA. FDA Approves First Treatment for Weight Management for People with Certain Rare Genetic Conditions. Available online: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-first-treatment-weight-management-people-certain-rare-genetic-conditions> (accessed on 31 August 2022).
44. Iepsen, E.W.; Zhang, J.; Thomsen, H.S.; Hansen, E.L.; Hollensted, M.; Madsbad, S.; Hansen, T.; Holst, J.J.; Holm, J.-C.; Torekov, S.S. Patients with Obesity Caused by Melanocortin-4 Receptor Mutations Can Be Treated with a Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 23–32.e3. [[CrossRef](#)]
45. Woodley, D.T.; Cogan, J.; Hou, Y.; Lyu, C.; Marinkovich, M.P.; Keene, D.; Chen, M. Gentamicin induces functional type VII collagen in recessive dystrophic epidermolysis bullosa patients. *J. Clin. Investig.* **2017**, *127*, 3028–3038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. European Medicines Agency. Translarna. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/translarna> (accessed on 31 August 2022).
47. Bolze, F.; Mocek, S.; Zimmermann, A.; Klingenspor, M. Aminoglycosides, but not PTC124 (Ataluren), rescue nonsense mutations in the leptin receptor and in luciferase reporter genes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

48. Moore, B.S.; Mirshahi, T. Genetic variants help define the role of the *MC4R* C-terminus in signaling and cell surface stability. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Tan, K.; Stupack, D.G.; Wilkinson, M.F. Nonsense-mediated RNA decay: An emerging modulator of malignancy. *Nat. Cancer* **2022**, *22*, 437–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hug, N.; Longman, D.; Cáceres, J.F. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1483–1495. [[CrossRef](#)]
51. Brocke, K.S.; Neu-Yilik, G.; Gehring, N.H.; Hentze, M.; Kulozik, A.E. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 331–335. [[CrossRef](#)]
52. Schonnop, L.; Kleinau, G.; Herrfurth, N.; Volckmar, A.-L.; Cetindag, C.; Müller, A.; Peters, T.; Herpertz, S.; Antel, J.; Hebebrand, J.; et al. Decreased melanocortin-4 receptor function conferred by an infrequent variant at the human melanocortin receptor accessory protein 2 gene. *Obesity* **2016**, *24*, 1976–1982. [[CrossRef](#)]
53. Sebag, J.A.; Hinkle, P.M. Melanocortin-2 receptor accessory protein MRAP forms antiparallel homodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20244–20249. [[CrossRef](#)]
54. Xu, J.; Wang, M.; Fu, Y.; Zhang, C.; Kuang, Z.; Bian, S.; Wan, R.; Qu, S.; Zhang, C. Reversion of MRAP2 Protein Sequence Generates a Functional Novel Pharmacological Modulator for *MC4R* Signaling. *Biology* **2022**, *11*, 874. [[CrossRef](#)]
55. Soletto, L.; Hernández-Balfagó, S.; Rocha, A.; Scheerer, P.; Kleinau, G.; Cerdá-Reverter, J.M. Melanocortin Receptor Accessory Protein 2-Induced Adrenocorticotrophic Hormone Response of Human Melanocortin 4 Receptor. *J. Endocr. Soc.* **2018**, *3*, 314–323. [[CrossRef](#)]
56. Chan, L.F.; Webb, T.R.; Chung, T.-T.; Meimaridou, E.; Cooray, S.N.; Guasti, L.; Chapple, J.P.; Egertová, M.; Elphick, M.R.; Cheetham, M.E.; et al. MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 6146–6151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Liang, J.; Li, L.; Jin, X.; Xu, B.; Pi, L.; Liu, S.; Zhu, W.; Zhang, C.; Luan, B.; Gong, L.; et al. Pharmacological effect of human melanocortin-2 receptor accessory protein 2 variants on hypothalamic melanocortin receptors. *Endocrine* **2018**, *61*, 94–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ji, R.-L.; Tao, Y.-X. Regulation of Melanocortin-3 and -4 Receptors by Isoforms of Melanocortin-2 Receptor Accessory Protein 1 and 2. *Biomolecules* **2022**, *12*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. ATCC. COS-7 CRL-1651™. Available online: <https://www.atcc.org/products/crl-1651> (accessed on 30 August 2022).
60. Hamada, K.; Omura, N.; Taguchi, A.; Baradaran-Heravi, A.; Kotake, M.; Arai, M.; Takayama, K.; Taniguchi, A.; Roberge, M.; Hayashi, Y. New Negamycin-Based Potent Readthrough Derivative Effective against TGA-Type Nonsense Mutations. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1450–1456. [[CrossRef](#)]
61. Stäubert, C.; Tarnow, P.; Brumm, H.; Pitra, C.; Gudermann, T.; Grütters, A.; Schöneberg, T.; Biebermann, H.; Römpler, H. Evolutionary Aspects in Evaluating Mutations in the Melanocortin 4 Receptor. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4642–4648. [[CrossRef](#)]
62. Campofelice, A.; Lentini, L.; Di Leonardo, A.; Melfi, R.; Tutone, M.; Pace, A.; Pibiri, I. Strategies against Nonsense: Oxadiazoles as Translational Readthrough-Inducing Drugs (TRIDs). *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 3329. [[CrossRef](#)]
63. Ko, W.; Porter, J.J.; Sippl, M.T.; Edwards, K.M.; Lueck, J.D. Efficient suppression of endogenous CFTR nonsense mutations using anticodon-engineered transfer RNAs. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2022**, *28*, 685–701. [[CrossRef](#)]

Lebenslauf

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

Komplette Publikationsliste

1. Reininghaus N, Paisdzior S, Höpfner F, Jyrch S, Cetindag C, Scheerer P, et al. A Setmelanotide-like Effect at MC4R Is Achieved by MC4R Dimer Separation. *Biomolecules*. 2022;12(8).

Impact Factor: 6.064

2. Höpfner F, Paisdzior S, Reininghaus N, Sohail I, Scheerer P, Annibale P, et al. Evaluation of Pharmacological Rescue of Melanocortin-4 Receptor Nonsense Mutations by Aminoglycoside. *Life (Basel)*. 2022;12(11).

Impact Factor: 3.251

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Kühnen bedanken, dass er mir die Durchführung meines spannenden Projekts ermöglicht hat und mir als Doktorvater stets mit seinem fachlichen Rat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Heike Biebermann bedanken für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die Übernahme meiner Zweitbetreuung. Vielen Dank, dass du alle meine Fragen rasch und konstruktiv beantwortet hast und ich von deinem enormen Fachwissen profitieren durfte. Dein Engagement und Begeisterung für das Projekt sowie dein stetes Interesse an meinem Fortschritt haben mich immer wieder motiviert.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Sarah Paisdzior. Vielen Dank, liebe Sarah, für deine Unterstützung in den verschiedensten Bereichen meiner Arbeit. Ich habe so viel von dir lernen dürfen und mit deiner gedulden, motivierenden und herzlichen Art warst du immer für mich da und hast mir den Rücken gestärkt. Auch wenn ein Versuch nicht beim ersten Mal funktioniert hat, hattest du immer die richtigen Worte parat und hast sofort angefangen, mir bei der Suche nach Lösungen zu helfen. Ohne dich wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen!

Auch möchte ich mich bei Frau Cigdem Cetindag und Frau Sabine Jyrch für die Einführung in die Klonierung und Zellkultur bedanken sowie für ihre wertvollen Tipps und Tricks, die mir im Laboralltag außerordentlich weitergeholfen haben. Vielen Dank, dass ihr immer ein offenes Ohr für meine Fragen hattet.

Insgesamt habe ich mich von Anfang an sehr willkommen gefühlt in der Arbeitsgruppe und möchte mich bei allen für die durchweg freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie für die andauernde moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Insbesondere möchte ich hierbei meinen Vater hervorheben, der nach den zahlreichen Erzählungen und gemeinsamen Diskussionen über dieses Projekt mittlerweile selbst zum Experten über den Melanocortin-4 Rezeptor geworden ist!