

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

DISSERTATION

Aminoglykosid-induzierte Wiederherstellung der Signaltransduktion  
von Melanocortin-4-Rezeptoren mit prä-matur terminierendem  
Stoppcodon

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Harald Brumm

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich

2. Prof. Dr. med. T. Schöneberg

3. Prof. Dr. J. Köhrle

Datum der Disputation: 19.5.2008

# Inhalt

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>iii</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Adipositas.....	1
1.2 Genetik der Appetitregulation.....	3
1.3 MC4-Rezeptor.....	9
1.3.1 G-Protein-koppelnde Rezeptoren.....	9
1.3.2 Melanocortinrezeptoren.....	10
1.3.3 Molekulargenetik.....	11
1.4 Liganden des MC4R.....	12
1.5 Stoppmutationen.....	12
1.6 Aminoglykoside.....	13
1.6.1 allgemein.....	13
1.6.2 Molekulare Wirkungsweise.....	15
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
3.1 Material.....	20
3.1.1 Chemikalien.....	20
3.1.2 Medien und Puffer.....	23
3.1.2.1 Allgemein.....	23
3.1.2.2 Bakterienkultur.....	24
3.1.2.3 Zellkultur.....	24
3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Patienten.....	25
3.2.2 DNA-Isolation.....	25
3.2.3 Mutationsscreening.....	25
3.2.4 Sequenzierung.....	26
3.2.5 Klonierung der MC4R-Varianten in Expressionsplasmide.....	27
3.2.5.1 PCR der Zielsequenz.....	29
3.2.5.2 TOPO-Klonierung.....	31
3.2.5.3 Umklonierung in Expressionsplasmid pcDps.....	32
3.2.6 Kultivierung der verwendeten Zelllinie.....	33
3.2.7 Genexpression in eukaryoten Zellen.....	33
3.2.8 Funktionelle Charakterisierung der Rezeptormutanten.....	34
3.2.8.1 allgemeines Prinzip.....	34
3.2.8.2 cAMP-Akkumulationsassay.....	34
3.2.9 Immunologische Untersuchungen.....	36
3.2.9.1 Untersuchung der Oberflächenexpression.....	36
3.2.9.2 Total-ELISA zur Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression.....	37
3.2.10 Datenbewertung.....	39
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
4.1 Herstellung der MC4R-Konstrukte.....	40
4.2 Nachweis des Überleseeffektes.....	42
4.3 Untersuchungen zur Rezeptorexpression.....	43
4.3.1 Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression.....	43
4.3.2 Untersuchung der Oberflächenexpression.....	44
4.4 Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften.....	46
4.5 Signaltransduktionseigenschaften unter Aminoglykosideinfluß.....	47
4.5.1 Verbessertes Überleseeffekt durch Stimulation mit hochpotentem Agonisten.....	47

4.5.2	Untersuchung des Einflusses der G418-Konzentration .....	49
4.5.3	Einfluß unterschiedlicher Aminoglykoside auf die Signaltransduktionseigenschaften ....	54
4.6	Funktionelle Wiederherstellung der Rezeptoraktivität im Mausmodell .....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>58</b>
5.1	MC4R-Mutationen als Ursache der Adipositas .....	58
5.2	Aminoglycosid-vermittelte Wiederherstellung der MC4R-Funktion .....	61
5.2.1	MC4R-Expression.....	61
5.2.2	Oberflächenexpression von MC4R-Stoppmutationen .....	63
5.2.3	Signalübertragung von MC4R-Stoppmutationen.....	64
5.2.3.1	proof of principle.....	64
5.2.3.2	Einfluß eines Superagonisten .....	65
5.2.3.3	Charakteristiken verschiedener Aminoglykoside bezüglich der Überleserate.....	67
5.2.3.4	Ermittlung der wirksamen G418-Konzentration .....	68
5.3	Weitere Therapiemöglichkeiten von MC4R-Mutationen .....	69
5.4	Der MC4R als Ziel medikamentöser Intervention .....	70
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
	<b>Aussicht.....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>76</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>85</b>
Verzeichnis der Abbildungen .....		85
Verzeichnis der Tabellen.....		86
Eigene Publikationen .....		87
Danksagung .....		91
Erklärung .....		92

## Abkürzungen

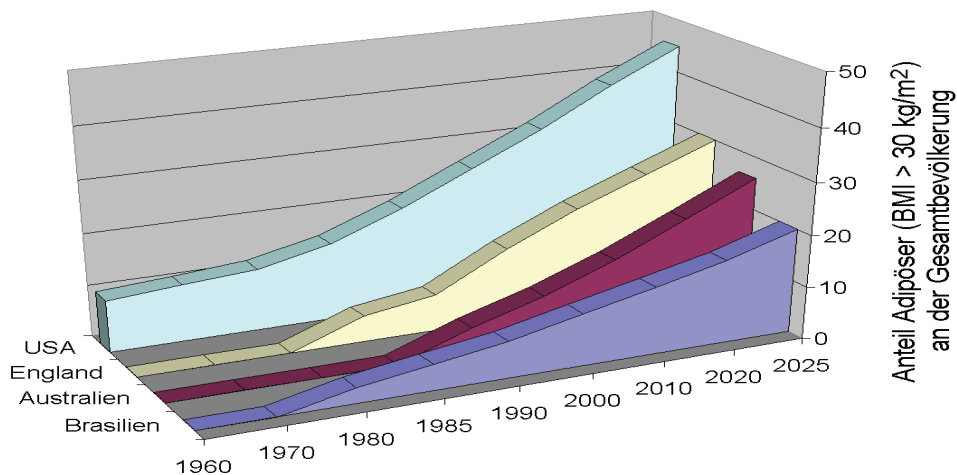
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AgRP	Agouti related peptide
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CART	Cocaine-amphetamine regulated transcript
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COS-7	Nierenzellen von <i>Cercopithecus aethiops</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC <sub>50</sub>	für halbmaximale Rezeptoraktivierung notwendige Effektivkonzentration
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FISH	<i>in situ</i> -Fluoreszenzhybridisierung
FKS	fetales Kälberserum
FLAG	artifizielles Epitop
BSA	Rinderserumalbumin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	regulatorisches heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
HA	Epitop des Hämagglutininproteins des Influenzavirus
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
kb	Kilobasenpaare
KORA	Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg
LEPR	Leptinrezeptor
MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor ( <i>human</i> )
mMC4R	Melanocortin-4-Rezeptor ( <i>Mus musculus</i> )
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
NPY	Neuropeptid Y
PC	Prohormonconvertase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVN	Nucleus paraventricularis
POMC	Pro-Opio-Melanocortin
RT	Raumtemperatur
TM	Transmembranregion
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Adipositas

Bedingt durch die sozioökonomische Entwicklung der Industriestaaten im letzten Jahrhundert ist in den letzten Jahrzehnten ein Wandel in der Freizeitgestaltung und dem Konsumverhalten eines essentiellen Anteiles der Gesamtbevölkerung zu beobachten. Dieser Wandel geht hin zu übermäßigem Verzehr hochkalorischer Erzeugnisse („fast food“) bei gleichzeitiger Reduzierung körperlicher Anstrengung. Infolge dessen hat sich die weltweite Prävalenz der Adipositas mit anhaltend steigender Tendenz in den beiden Jahrzehnten nahezu verdoppelt (Kopelman 2000). Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aus dem Jahre 1995 besteht Übergewicht bei einem „body mass index“ (Körpergewicht des Patienten in [kg] geteilt durch das Quadrat dessen Körperlänge in [m]) größer 25. Bei einem BMI > 30 wird von Adipositas gesprochen. Die zugrunde liegende Annahme ist, daß die Variation des Gewichtes Personen gleicher Körpergröße in Unterschieden in der Fettmasse begründet ist.

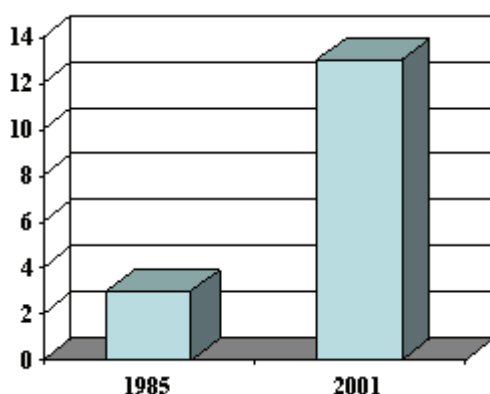
Derzeit leiden weltweit 250 Mio. Erwachsene an Adipositas. Mindestens weitere 500 Mio. Erwachsene sind übergewichtig (Gasbarini and Piscaglia 2005). Die USA in ihrer Vorreiterrolle sowohl hinsichtlich wirtschaftlicher Entwicklung als auch derer sozialen Begleiterscheinungen wartet in diesem Zusammenhang mit besonders augenfälligen Zahlen auf. Bereits seit den 60er-Jahren mit einem substantiellen aber gleich bleibenden Anteil adipöser Personen ausgestattet, verzeichnet die USA seit 1980 einen massiven Anstieg des Anteils Adipöser an ihrer Gesamtbevölkerung. Im Jahr 1980 waren von den 20-74 jährigen Männern und Frauen 47,4% übergewichtig oder adipös; 1994 waren es 56% und im Jahr 2000 bereits 64,5% (Ehram et al., 2004). Diese Tendenz zeigt sich mit zeitlicher Verzögerung in Abhängigkeit der wirtschaftlichen Entwicklung des jeweiligen Landes ebenso für Europa und die gesamte übrige Welt. Nach einer Hochrechnung von Kopelman (2000) wird erwartet, dass in 20 Jahren jeder dritte Einwohner Englands und nahezu jeder zweite in den USA adipös sein wird (s. Abb. 1).



**Abb. 1: Adipositasentwicklung 1960-2025**

Vergangene, gegenwärtige und projizierte Adipositasrate in den USA, England und Wales, Australien und Brasilien von 1960 bis 2025 (modifiziert nach Kopelman, 2000).

Die Tendenz zeigt sich auch hierzulande manifestiert. Von 1985 bis 2001 ist der Anteil adipöser am Anteil der Berliner Schulkinder von 3% auf 13% angestiegen (s. Abb. 2). Die gesellschaftliche Relevanz dieser Entwicklung zeigt sich in ihrer vollen Brisanz bei Betrachtung der klinischen Folgen übermäßiger Gewichtszunahme. Übergewicht prädisponiert für Typ II Diabetes, Bluthochdruck, Herz-Kreislauf-Krankheiten und vielen Formen von Krebs (Calle et al., 2003, Must et al., 1999). Die körperlichen Begleiterscheinungen der Adipositas führen in einem Maße zu gesteigerter Morbidität und Mortalität, dass laut WHO die Adipositas als das größte chronische Gesundheitsproblem weltweit gilt.



**Abb. 2: Prozentualer Anteil adipöser Berliner Schulkinder in den Jahren 1985 und 2001**

Von insgesamt 412 567 Berliner Schülern des Schuljahres 2002/2003 sind 53 600 Kinder adipös. Die Werte des Anteils adipöser Schulkinder in Berlin am Gesamtkollektiv der Jahre 1985 und 2001 im Vergleich verzeichnen eine Steigerung von 430% in 16 Jahren. Aus: Gesundheitsbericht Berlin 2002-2003

Neben der Beobachtung, dass in den Industrienationen der Anteil übergewichtiger Personen gestiegen ist, zeigt sich ein besonders auffälliger Anstieg der Zahl morbid adipöser Personen ( $BMI > 40 \text{ kg/m}^2$ ), was die Zahl übertrifft, die von einer Verschiebung des Medians der Bevölkerung allein zu erwarten gewesen wäre (Flegal et al., 2002). Diese Beobachtung impliziert, daß die adiposigene Umwelt, welche sich seit der Mitte des 20. Jhd. entwickelt, eine Untergruppe in der Bevölkerung zu Tage treten ließ, die genetisch bedingt besonders empfänglich für eine Gewichtszunahme ist und somit geeignete physiologische Voraussetzungen mitbringt, um extrem adipös zu werden. Eine erklärende Theorie hierzu stammt von Neel (1962), die „Theorie der Wirtschaftlichkeit der Gene“, („Thrifty gene“): Für Adipositas prädisponierende Gene besitzen einen Selektionsvorteil in Populationen, die häufige Hungerphasen durchlaufen. Hochrisikogruppen wie Pima-Indianer und Bewohner der pazifischen Inseln (Friedman et al., 2003) sowie Studien in den USA (Cossrow et al., 2004) zeigen einen unproportional hohen Anteil von adipösen Personen in ersten Gruppen sowie in Gruppen afrikanischer und spanischer Abstammung verglichen mit Kaukasiern. Diese Unterschiede lassen sich nicht allein mit Umweltfaktoren wie Lebensweise und ökonomischen Faktoren erklären, wodurch für die Entstehung und Ausprägung adipöser Phänotypen im Menschen eine wichtige Rolle genetischer Faktoren impliziert ist.

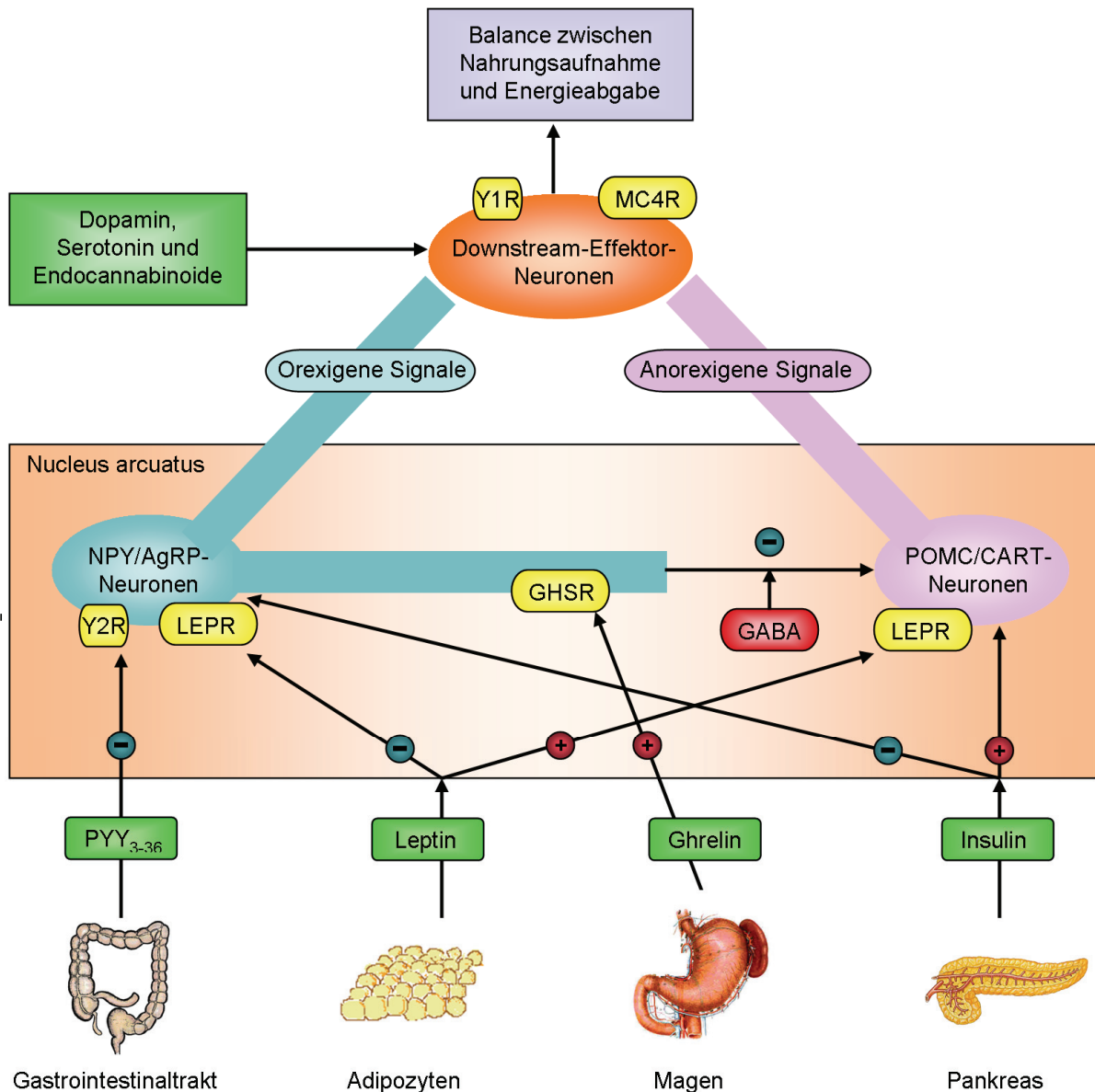
## **1.2 Genetik der Appetitregulation**

Adipositas ist das physiologische Resultat eines gestörten Gleichgewichtes zwischen Energieaufnahme und Energieabgabe. Diese Balance wird durch ein komplexes physiologisches System reguliert, welches als zentraler Koordinator im Gehirn die Integration verschiedener peripherer Signale bewerkstelligt. Der Hypothalamus fungiert als zentraler Regulator in diesem System. Er empfängt Informationen über das Energiegleichgewicht über neuronale als auch hormonelle Signale (dies findet insbesondere in drei seiner Kerngebiete statt, ventro-medial, paraventricular und im lateralen hypothalamischen Kern). Der Nucleus arcuatus spielt hierbei eine essentielle Rolle. Er beinhaltet zwei Sorten von Neuronen. Eine exprimiert agouti related protein (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY), die andere Pro-opio-melanocortin (POMC) und cocaine amphetamine related transcript (CART). Erstere wirken orexigen, führen somit zu Essensaufnahme und Reduktion energieverbrauchender Aktivitäten, zweitere fördern den umgekehrten anorexigenen Effekt. Endokrine



Signale wirken über dieses System sowohl mit Langzeit- als auch mit Kurzeiteffekten. Insulin hat über einen Langzeiteffekt eine anorexigene Wirkung über Stimulation der POMC/CART-Neuronen und Inhibition der AgRP/NPY-Neuronen (Barsh und Schwartz, 2002). Das anorexigene Hormon Leptin ist der hauptsächliche Indikator für den Ernährungszustand des Organismus. Die Plasmakonzentration des Leptins korreliert eng mit der Adipozytenzahl und deren Fettgehalt (Friedman & Halaas 1998). Daher ist auch Leptin ein Hormon mit Langzeiteffekt und stimuliert über den Leptinrezeptor (LEPR) im N. arcuatus die anorexigenen und inhibiert die orexigenen Neuronen. Ein Peptid, das für die kurzfristige Regulation des Appetites zuständig ist, ist das hauptsächlich von Magen und Zwölffingerdarm sezernierte Ghrelin, dessen Plasmakonzentration vor einer Mahlzeit ansteigt und danach wieder abfällt (Kohno et al., 2003). Das Peptid YY3–36 (PYY3–36) wird vom Gastrointestinaltrakt nach Nahrungsaufnahme sezerniert. Es bindet an den auf den NPY-Neuronen exprimierten Y2-Rezeptor.

Sättigungssignale werden durch weitere Faktoren vermittelt wie das Peptid Cholecystinin (CCK) (Spiegelman & Flier, 2001). Im N. arcuatus werden diese verschiedenen Signale verarbeitet und an Effektorneuronen weitergeleitet. Zu diesen gehören die orexigenen MCH-(melanin-concentrating hormone)-Neuronen im lateralen Hypothalamus (Spiegelman & Flier, 2001), sowie die anorexigenen TRH-(thyrotrophin-releasing hormone)-Neuronen der HPT-(Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse)-Achse (Flier et al., 2000) und GABA-( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-freisetzende Neuronen im Nukleus paraventricularis.  $\alpha$ -MSH hat über Wirkung des MC4R einen aktivierenden Effekt auf TRH-exprimierende Neuronen im PVN (über Phosphorylierung von CREB). Exogen gegebenes  $\alpha$ -MSH kehrt eine durch Fasten induzierte Inhibition der TRH-Expression im PVN vollständig um. AgRP besitzt den zu  $\alpha$ -MSH umgekehrten, einen inhibitorischen Effekt über Wirkung des MC4R. Die Schilddrüsenfunktion ist über die HPT-Achse (Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse) reguliert. Das hypothalamische Peptid TRH wird in das Pfortadersystem dem Hypophysenvorderlappen zugeführt und stimuliert dort die Biosynthese des TSH, welches wiederum die Ausschüttung von T3 und T4 in der Schilddrüse bewirkt, welche negativ rückkoppelnd die Ausschüttung von TSH und TRH regulieren.



**Abb. 3: Physiologische Regulierung des Energiegleichgewichtes.**

Die Neuropeptid Y (NPY)/agouti-related peptide (AgRP) Neuronen sowie Pro-Opiomelanocortin (POMC)/cocaine and amphetamine related transcript (CART)-Neuronen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus haben eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Energiehaushaltes. Aktivierung der NPY/AgRP-Neuronen hat einen orexigenen Effekt mit gesteigerter Nahrungsaufnahme, während POMC/CART-Neuronen den umgekehrten anorexigenen Effekt bewirken. POMC wird durch dessen post-translationale Modifikation zu  $\alpha$ -Melanocortin-stimulierendem Hormon ( $\alpha$ -MSH) aktiviert. Diese beiden Neuronenarten erhalten Signale zahlreicher endokriner Hormone: Leptin wird von Fettgewebe sekretiert, der Leptinspiegel im Blut repräsentiert die Menge gespeicherten Fettgewebes. Leptin entfaltet seine Wirkung über den Leptinrezeptor (LEPR) mit inhibierender Wirkung auf die NPY/AgRP-Neuronen und stimulierender Wirkung auf POMC/CART-Neuronen. Der Pankreas sekretiert Insulin, welches einen anorexigenen Effekt auf den N. arcuatus besitzt. Ghrelin wird von Magen und Zwölffingerdarm produziert und stimuliert die NPY/AgRP-Neuronen durch die growth hormone secretagogue Rezeptoren (GHSR). Die vom hinteren Gastrointestinaltrakt sekretierten Peptide YY3–36 (PYY3–36) signalisieren über Y2 -Rezeptoren (Y2R) mit inhibierendem Effekt auf NPY/AgRP-Neuronen. NPY/AgRP-Neuronen besitzen über die Ausschüttung von  $\gamma$ -Amino-Buttersäure (GABA) ebenfalls einen inhibierenden Effekt auf die POMC/CART-Neuronen. Orexigene und anorexigene Signale der NPY/AgRP- und POMC/CART-Neuronen werden an Effektoren weitergeleitet, die ebenso Signale von Dopamin, Serotonin und Endocannabinoiden erhalten. Diese Effektorneuronen exprimieren den Y1R und den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R). Diese verschiedenen Signale vermitteln konzentriert die Balance zwischen Nahrungsaufnahme und Energieabgabe. (modifiziert nach Bell et al., 2005)

Die Ausschüttung des TRH wird durch den neuronalen Input auf die TRH-exprimierenden Neuronen bewirkt, der durch das über Melanocortinrezeptoren

signalisierende neuroregulatorische System geliefert wird. Zusätzlich erlaubt dieses System auch Änderungen der HPT-Achse unter besonderen Bedingungen wie Fasten, wo Spiegel zirkulierender TH durch Herabregulation des setpoint für TRH und TSH fallen. Dieses System dient dem homöostatischen Mechanismus, um in Fastenzeiten Energie zu sparen (DeGroot 1999).

Die Wirkung des am Ende der HPT-Achse gebildeten Schilddrüsenhormones (TH) bewirkt nicht nur Proteinsynthese und metabolische Aktivität, sondern auch die Regulation der Thermogenese. Etwa 30% des Ruhe-Energieverbrauches ist TH-abhängig. Fehlt es, ist die Thermogenese in Tieren, die der Kälte ausgesetzt sind, stark eingeschränkt (Silva 2003).

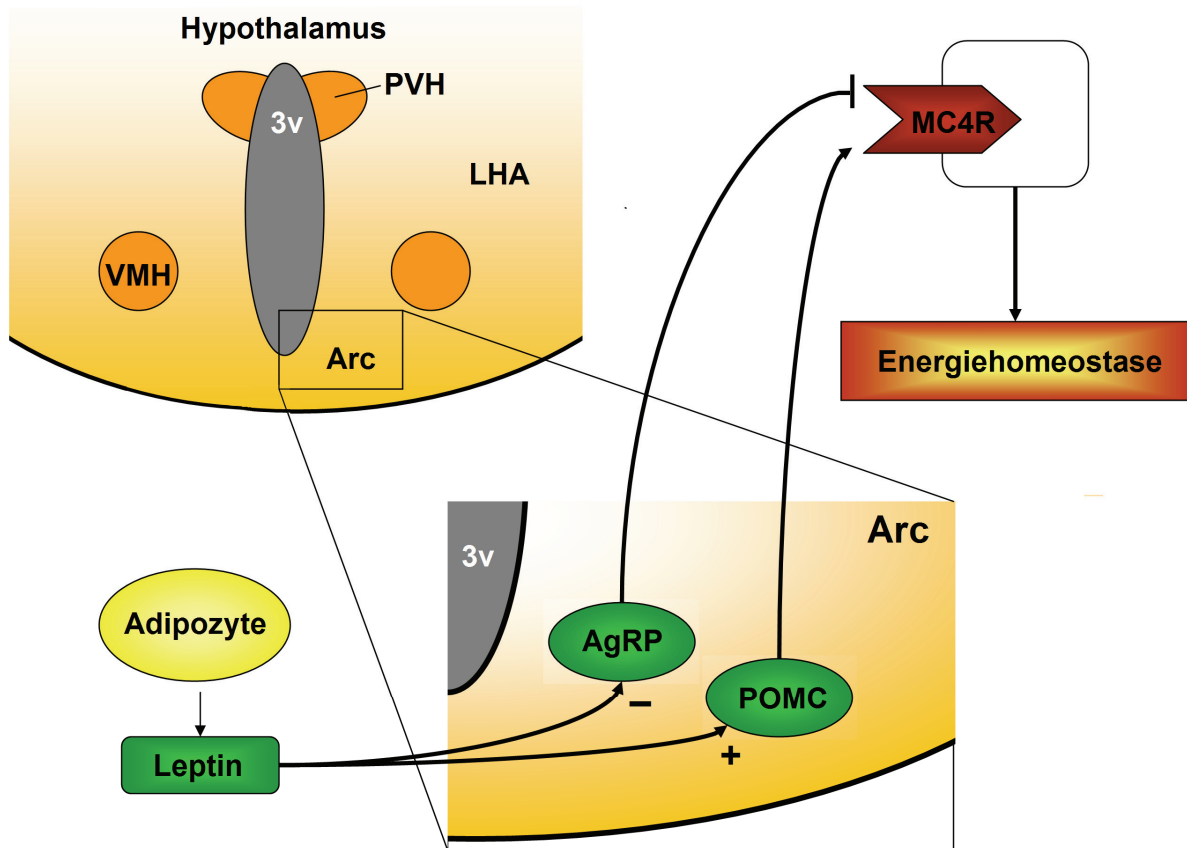
Im Leptin-Melanocortin-Weg stimuliert Leptin über den LEPR im N. arcuatus die anorexigenen POMC/CART-Neuronen und inhibiert die orexigenen AgRP/NPY-Neuronen, Eine Stimulation der POMC/CART-Neuronen führt zur Expression von POMC, welches durch die Enzyme Prohormonkonvertase 1 (PC1) und Prohormonkonvertase 2 (PC2) zu  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH, ACTH und  $\beta$ -Endorphin prozessiert wird. Das zelltypspezifische Vorhandensein der Endonukleasen entscheidet über das gewebespezifische Muster an Produkten. In der Hypophyse spaltet PC1 Proopiomelanocortin in ACTH und  $\beta$ -Endorphin. Im Hypothalamus und in der Haut wird neben PC1 auch PC2 exprimiert, so daß ACTH und  $\beta$ -Endorphin weiter zu  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und  $\gamma$ -MSH prozessiert werden.  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH binden als endogene Liganden an den MC4R im Nukleus paraventricularis und greifen über diesen Weg in anorexigener Weise in die Energiehomöostase ein.

Dieses gewichtsregulatorische System bietet mit Hilfe dieser Mediatoren einen wirkungsvollen Schutz vor Gewichtsverlust, nicht jedoch vor Gewichtszunahme (Schwartz et al., 2003).

### **Monogene Form von Adipositas**

Neben der syndromalen Form von Adipositas, welche durch einen komplexen Phänotyp mit verschiedenen aberranten Funktionen neben der Ansammlung von Körperfett gekennzeichnet ist (z.B. Prader Willi mit Adipositas, Hyperphagie, Muskelhypotonus, mentaler Retardierung, Kleinwuchs und hypogonadotrophem Hypogonadismus) sind verschiedene monogene Formen beschrieben (Tabelle 1). Diese finden ihre Ursache in Defekten einzelner Gene, hauptsächlich des Leptin-

Melanocortin-Stoffwechselweges. Die einzige bisher beschriebene monogene nicht-syndromale Erkrankung ist die Störung des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R).



**Abb. 4: Der Leptin-Melanocortin-Weg**

Die Abbildung zeigt eine schematisierte Darstellung des hypothalamischen Gewebes um den dritten Ventrikel (3v) und die dort angesiedelten Signalwege. Im N. arcuatus (Arc) stimuliert Leptin POMC-exprimierende Neuronen. AgRP-Neuronen hingegen werden durch Leptin inhibiert. POMC wird zu  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH prozessiert, welche als endogene Liganden den MC4R stimulieren, was eine anorexigen wirkende Signalkaskade auslöst. In dieser Weise durch Leptin angetrieben inhibiert das Melanocortinsystem die Nahrungsaufnahme und verstärkt Energie verbrauchende Prozesse. Im Gegensatz dazu führt eine Blockade des MC4R zur Ausprägung von Adipositas. Weitere Abkürzungen: LHA, lateraler hypothalamischer Kern; PVH, N. paraventricularis; VMH, N. ventromedialis.

Positionelle Klonierung einer Reihe von Adipositas-assoziierten Genen in der Maus zeigte als Ursachen adipöser Phänotypen Defekte in den Genen für Leptin (Zhang et al., 1994), dem LEPR (Tartaglia et al., 1995), der Carboxypeptidase E (diese prozessiert Prohormone z.B. Proinsulin) (Naggert et al., 1995), und das orexigene Protein Agouti (Bultman et al., 1992). Außerdem wurde 1997 von Huszar und Mitarbeitern die wichtige regulative Funktion des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R) im Melanocortinweg, sowie von Ollmann und Mitarbeitern (1997) des orexigenen

AgRP aufgezeigt. Diese Entdeckungen wurden schnell von der Identifizierung seltener monogener rezessiver Formen der Adipositas im Menschen gefolgt. Diese sind durch Mutationen in den Genen von Leptin (Montague et al., 1997), (die erste monogene Form von Adipositas die entdeckt wurde, mit der Identifizierung der Leptingenmutation als Ursache der Adipositas), LEPR (Clement et al., 1998), Prohormonkonvertase 1 (eine Endopeptidase, sie prozessiert Prohormone wie Insulin und POMC) (Jackson et al. 1997) und POMC (Krude et al., 1998) verursacht, welche allesamt in einem Phänotyp mit exzessiver Energieaufnahme relativ zum Energieverbrauch resultieren.

Mit der Beschreibung eines extrem adipösen 9-jährigen Kindes mit einer inaktivierenden Mutation im Leptingen wurde die Schlüsselrolle des Leptins in einigen Formen monogener Adipositas herausgestellt. Durch tägliche Injektion von Leptin über den Zeitraum eines Jahres wurde ein kompletter Rückgang der Adipositas erreicht (Farooqi et al., 1999). Jedoch nur wenige Familien mit extremer Adipositas in jungen Jahren haben ursächliche Mutationen in diesem Gen.

Häufiger hingegen werden autosomal-dominante Formen der Adipositas durch Mutationen im MC4R-Gen verursacht (Vaisse et al., 1998; Yeo et al., 1998). MC4R-Defizienz repräsentiert daher die häufigste monogene zu Adipositas führende Störung und ist die Ursache in 5% der adipösen Patienten aus verschiedenen ethnischen Gruppen (Lubrano-Berthelmer et al., 2003; Farooqi et al., 2003). Weitere Gene, die infolge von Sequenzveränderungen eine monogene Form der Adipositas verursachen können, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Ein durch eine Mutation komplett oder aber auch nur partiell inaktivierter MC4R führt durch herabgesetzte Signalübertragung nach Ligandenbindung zu einem verminderten Sättigungssignal und damit zu einer Inbalance des Energiehaushaltes. Wie im Falle einer Leptinresistenz aufgrund eines inaktiven LEPR wäre auch im Falle eines inaktiven MC4R eine kurative Behandlung der Adipositas durch Gabe des Agonisten zwecklos, daher muß eine Ebene höher angesetzt werden: in dem entsprechenden Rezeptor, dem MC4R welcher als Hormonrezeptor zur Familie der G-Protein koppelnden Rezeptoren (GPCR) gehört.

## Tabelle 1: Ursachen monogener Adipositas

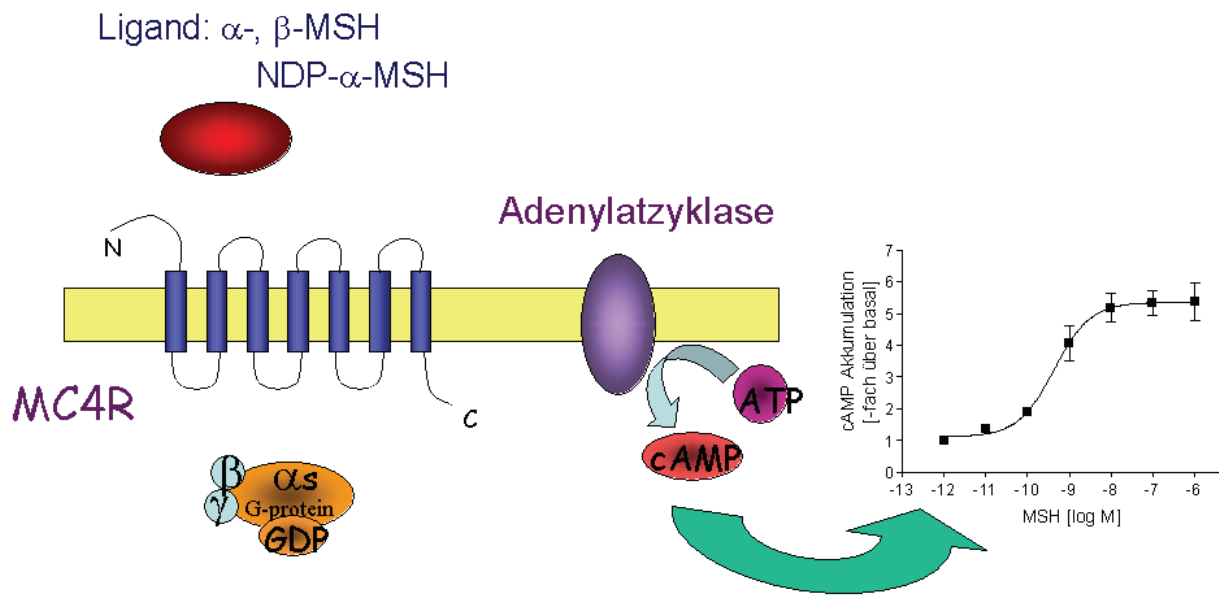
Die Tabelle listet die Gene, welche als Ursache monogener Adipositas im Menschen beschrieben wurden. Es sind Genname, Kurzbezeichnung, OMIM-Referenznummer und die entsprechenden Literaturreferenzen angegeben.

Gen	Name	OMIM-Nr.	Referenz
CART	Cocaine- and amphetamine regulated transcript	602606	del Giudice et al., 2001
LEP	Leptin	164160	Montague et al., 1997;
LEPR	Leptinrezeptor	601007	Clement et al., 1998;
MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor	155540	Lee et al., 2002
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor	155541	Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998
NR0B2	Nuclear receptor subfamily 0, group 2	604630	Nishigori et al., 2001;
POMC	Proopiomelanocortin	176830	Krude et al., 1998
PC1	Proproteinkonvertase Typ 1	162151	Jackson et al., 1997
PYY	Peptid YY	600781	Ahituv et al., 2006
SIM1	Drosophila single minded homolog 1	603128	Holder et al., 2000;
UCP3	Uncoupling protein 3	602044	Dalgaard et al., 2001

## 1.3 MC4-Rezeptor

### 1.3.1 G-Protein-koppelnde Rezeptoren

Diese Familie integraler Membranproteine besteht aus sieben Transmembrandomänen, welche durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Der N-Terminus des Rezeptormoleküls befindet sich extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär (s. Abb. 5). Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) sind Heterotrimere und bestehen aus einer  $\alpha$ - sowie einer kombinierten  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit. In Abwesenheit des Liganden ist die  $\alpha$ -Untereinheit GDP-gebunden und mit der  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit assoziiert. Spezifische Ligandenbindung an den Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, welche intrazellulär die Bindung eines G-Proteins an den Rezeptor ermöglicht. Infolge der Rezeptorbindung wird in der  $\alpha$ -Untereinheit GDP gegen GTP ausgetauscht und die  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit dissoziiert.



**Abb. 5: Der Gs-Adenylatzyklase-Signalweg.**

Die Abbildung stellt den Signalweg der MC4R-Signalübertragung beginnend bei der Ligandenbindung über die Aktivierung des downstream-Effektors und der daraus resultierenden Bildung des second messengers (cAMP) dar.

Bindung des Liganden ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, oder NDP- $\alpha$ -MSH) an den Rezeptor induziert die Bindung eines G-Protein-Heterotrimers. Nach Aktivierung der  $\alpha$ -Untereinheit und der darauf folgenden Dissoziation der  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit aktiviert die  $\alpha$ -Untereinheit eine Adenylatzyklase, welche ATP zu cAMP zyklisiert. Die Konzentration akkumulierten cAMPs wird im verwendeten Assay gemessen und in Form einer Konzentrationswirkungskurve (rechts in der Abbildung) dargestellt.

Diese Schritte aktivieren das G-Protein und initiieren die Interaktion mit einem downstream-Effektormolekül, im Fall des MC4R stimuliert die aktivierte Gs- $\alpha$ -Untereinheit die Adenylatzyklase, welche infolgedessen ATP zu cAMP zyklisiert. Die  $\alpha$ -Untereinheit beinhaltet eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche GTP zu GDP konvertiert und damit den inaktiven Zustand des G-Proteins wiederherstellt welcher eine erneute Reassoziierung mit der  $\beta$ - $\gamma$ -Untereinheit ermöglicht.

### 1.3.2 Melanocortinrezeptoren

Die Bindung seines endogenen Liganden führt über die Aktivität des MC4R zu einer Signalkaskade, die zu verminderter Essensaufnahme, erhöhter Energieabgabe und somit zu einem Verlust an Körperfett führt. Ein MC4R mit vermindertem Signalübertragungspotential ist nicht in der Lage, das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -Abgabe aufrecht zu erhalten. Das Resultat ist eine stetige

Zunahme des Körpergewichtes. Diese endogenen Liganden,  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH werden aus dem Prohormon Pro-Opio-Melanocortin (POMC) prozessiert.

Insgesamt sind fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannt, die von POMC abgeleiteten Peptiden stimuliert werden: In der Haut regen  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH durch die Bindung an MC1R die Melaninbildung an. Das in der Hypophyse gebildete ACTH bindet in der Nebenniere an MC2R, was zur Cortisolsekretion führt.

Im N. arcuatus bewirkt die Bindung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH an MC3R und MC4R als Antwort auf das Leptinsignal eine Verringerung der Energieaufnahme und einen gesteigerten Energieverbrauch. Der MC5R wird in verschiedenen exokrinen Drüsen zur Herstellung ihrer Produkte benötigt, welche Teil eines koordinierten Systems der Regulation exokriner Drüsen durch Melanocortine sind (Chen et al., 1997).

Das vierte Mitglied der Melanocortinrezeptorfamilie, der MC4R, wurde 1993 von Gantz und Mitarbeitern kloniert und via FISH auf 18q22 lokalisiert (Sundaramurthy et al., 1998). Northern blot und *in-situ*-Hybridisierung zeigte, dass der MC4R hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird. Ebenfalls 1988 erfolgte die weitere strukturelle Aufklärung durch Yeo und Mitarbeiter: Der MC4R ist ein 333-AS-Protein kodiert durch ein einzelnes Exon.

### **1.3.3 Molekulargenetik**

Yeo und Mitarbeiter (1998) und Vaisse und Mitarbeiter (1998) beschrieben ein stark adipöses Kind bzw. einen Erwachsenen, mit einer heterozygoten MC4R-Mutation. Weitere Familienmitglieder zeigten einen adipösen Phänotyp in Übereinstimmung mit einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster.

1999 wurden von Hinney und Mitarbeitern in einer Studie mit 306 adipösen Probanden drei Personen entdeckt, welche in haploinssuffizienter Ausprägung Mutationen im MC4R-Gen tragen. Sina und Mitarbeiter erweiterten 1999 die von Hinney und Mitarbeitern durchgeführte Studie um weitere 186 Probanden aus einer Gruppe extrem adipöser Kinder und Erwachsenen und identifizierten einen weiteren zusätzlichen Haploinsuffizienz-Träger. 43 Familienmitglieder dieser insgesamt 4 Patienten wurden geno- und phänotypisiert. 19 Mutationsträger wurden identifiziert. Der prädominante Phänotyp war extreme Adipositas. Weitere phänotypische Besonderheiten waren nicht auffällig. Weibliche Haploinsuffizienzträger waren



schwerer als männliche in den jeweiligen Familien, eine Beobachtung in Konkordanz mit Beobachtungen von MC4R-knockout-Mäusen (Huszar et al., 1997).

Die häufigste europäische MC4R-Mutation ist die 1999 von Hinney und Mitarbeitern beschriebene Stoppmutation Y35X. Diese Mutation führt zu einem vorzeitig terminierten und nur aus der N-terminalen Domäne bestehenden Protein.

## 1.4 Liganden des MC4R

Der MC4R wird von seinen natürlichen Agonisten, den aus POMC prozessierten Hormonen  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH zur Signalübertragung stimuliert, sowie von dem inversen Agonisten AgRP antagonisiert. Zusätzlich ist eine Stimulation mit einem artifiziellen Agonisten möglich, wie dem hochpotenten Liganden NDP- $\alpha$ -MSH (Tabelle 2), einem Derivat des  $\alpha$ -MSH, welcher hochaffin an den MC4R bindet und ihn bereits in niedrigerer Konzentration zu stärkerer Signalübertragung stimuliert, als dies mit den natürlichen Liganden möglich ist. In der Konzentrationswirkungskurve ist dieses Verhalten durch eine Verschiebung des  $EC_{50}$ -Wertes zu niedrigerer Ligandenkonzentration in der Größenordnung einer Zehnerpotenz gegenüber dem natürlichen Liganden  $\alpha$ -MSH und zweier Zehnerpotenzen verglichen mit  $\beta$ -MSH gekennzeichnet.

**Tabelle 2: Peptidsequenzen der MC4R-Agonisten  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH**

Die Tabelle zeigt die die Peptidsequenzen der beiden natürlichen MC4R-Agonisten  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH sowie des hochpotenten Agonisten Nle<sup>4</sup>-D-Phe<sup>7</sup>- $\alpha$ -MSH (NDP- $\alpha$ -MSH) (Nargund et al., 2006). NDP- $\alpha$ -MSH unterscheidet sich von  $\alpha$ -MSH lediglich an zwei Aminosäurepositionen, Norleucin anstelle von Methionin an Position 4 und D-Phenylalanin anstelle von L-Phenylalanin an Position 7.

$\alpha$ -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>
$\beta$ -MSH	Ac-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-NH <sub>2</sub>
NDP- $\alpha$ -MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH <sub>2</sub>

## 1.5 Stoppmutationen

In mehr als 1800 erblichen humanen Krankheiten sind nonsense-Mutationen (in-frame, Punktmutationen im genetischen Code, welche zu einem vorzeitigen Stoppen der Translation führen und verkürzte nicht funktionierende Moleküle produzieren) in einem nicht unerheblichen Anteil der betroffenen Personen die Ursache der

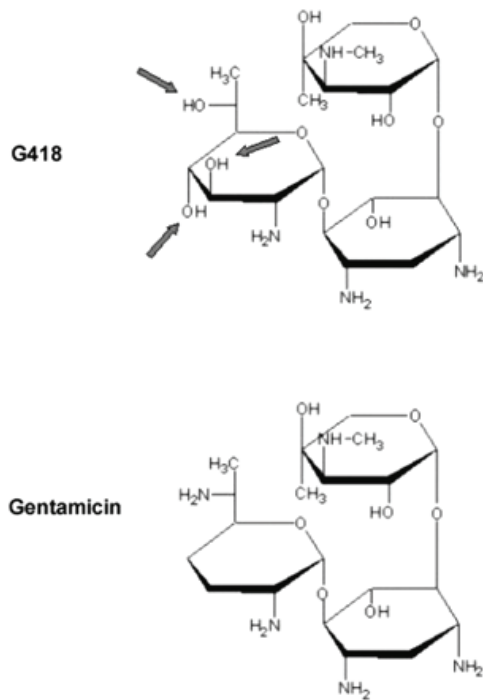
Erkrankung. (Kusik 1998). Zu den häufigsten genetischen Störungen gehören hiervon Muskeldystrophie Duchenne (DMD, MIM #310200) und Zystische Fibrose (CF, MIM #219700). 10-20% (Clancy et al., 2001; Roberts et al., 1994) der betroffenen Patienten tragen hier nonsense-Mutationen im betroffenen Gen. In einigen humanen Erkrankungen wie Mukopolysaccharidosis Typ I (MIM #607014) machen pathogene nonsense-Mutationen bis zu 70% aus (Hein et al., 2004).

Zur Behandlung von durch nonsense-Mutationen verursachten Krankheiten können zwei Vorgehensweisen in Betracht gezogen werden: Gentherapie ist die eine. Trotz einiger Fortschritte ist sie weit davon entfernt zu klinischen Erfolgen zu führen (Parekh-Olmedo et al., 2005). Die zweite Vorgehensweise zielt in die Richtung, den Effekt der nonsense-Mutation durch Modifikation der Genexpression zu schwächen. Die Strategie liegt in der Unterdrückung des Effektes des vorzeitigen Stoppcodons und somit des Überlesens desselben. Dies geschieht durch Absenken der translationalen Genauigkeit und außerdem durch Reduktion der Effizienz der Translations-Terminierungs-Maschinerie (Salas-Marco und Bedwell, 2005). Es wurde gezeigt, daß Antibiotika der Gruppe der Aminoglykoside in der Lage sind, die Genauigkeit des eukaryotischen Elongationsmechanismus herabzusetzen (Davies et al., 1964; Friedman et al., 1964). Damit beinhaltet die Gruppe der Aminoglykoside ein hohes Potential in der pharmakogenetischen Therapie von nonsense-Mutationsvermittelten genetischen Störungen.

## **1.6 Aminoglykoside**

### **1.6.1 allgemein**

Bereits 1964 beschrieben Gorini und Kataja einen Streptomycin-abhängigen Arginin-auxotrophen *E.coli*-Stamm, welcher in Anwesenheit von Streptomycin in der Lage ist, Ornithintranscarbamylase zu produzieren, jedoch nicht in Abwesenheit von Streptomycin.



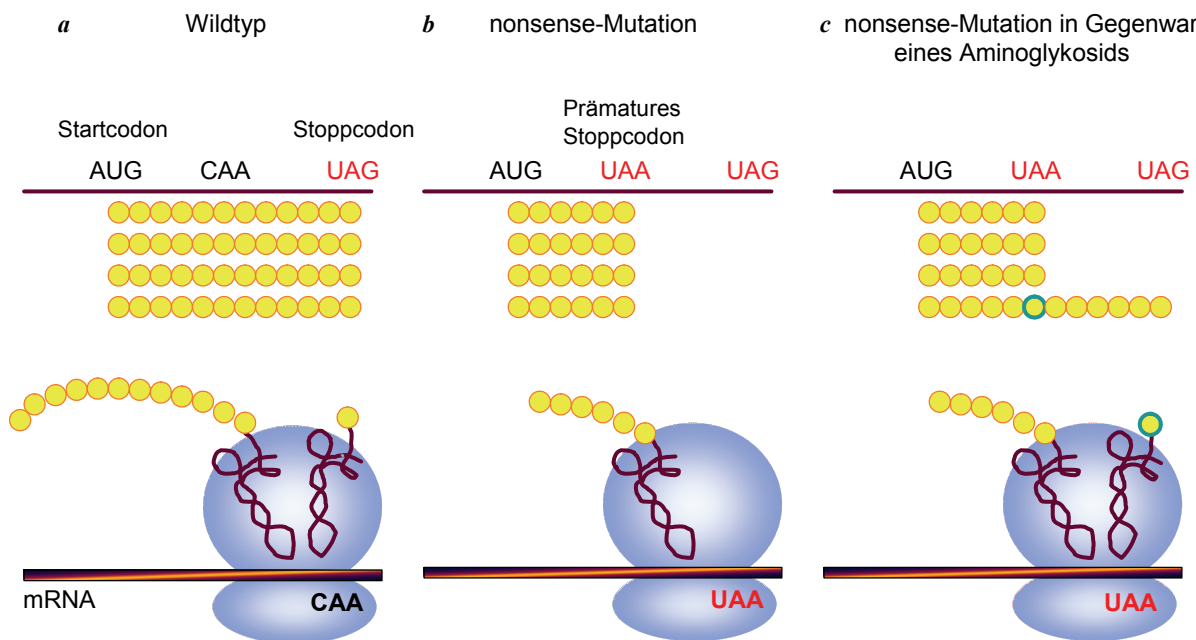
**Abb. 6: Struktur der Aminoglycoside G418 und Gentamicin**

Es sind die Strukturformeln von Gentamicin und G418 als Vertreter der Stoffgruppe der Aminoglycoside dargestellt. Die strukturellen Unterschiede zwischen Gentamicin und G418 sind durch Pfeile hervorgehoben

Streptomycin ist ein Aminoglykosid und gehört somit einer Klasse in der Familie der antibiotisch wirksamen Agenzien an, welche gegen Gram(-) Bakterien eingesetzt werden. Wichtige Vertreter dieser Klasse sind neben Streptomycin auch Gentamicin, Puromycin, Hygromycin Kanamycin, Neomycin und Geneticin. Aminoglykoside unterbinden in therapeutischer Dosis verabreicht die prokaryotische Proteinsynthese indem sie an die 30 S-Untereinheit der Ribosomen binden und Ablesefehler der t-RNA verursachen. In sub-letaler Dosis hingegen können einige die Inkorporierung falscher Aminosäuren begünstigen oder ebenso zum Einbau einer Aminosäure anstelle eines Stoppkodons (translationales Überlesen) führen (Davies et al., 1964; Friedman et al., 1964). Derselbe Effekt wurde ebenfalls in eukaryotischen Zellen gezeigt, allerdings erst in 10-15-fach höheren Konzentrationen als in prokaryotischen Zellen, was diese Substanzen im Einsatz als Antibiotika qualifiziert (Palmer et al., 1979; Wilhelm et al., 1978a; Wilhelm et al., 1978b).

## 1.6.2 Molekulare Wirkungsweise

Die antibiotische Wirkungsweise der Aminoglykoside beruht auf deren Eigenschaft, die ribosomale Translation zu beeinflussen, indem die Codon-Antikodon-Erkennung gestört wird. Aminosäure-beladene tRNA werden von den falschen Codons erkannt, was zu aberranter Translation führt und somit zu missense-Proteinen, ein Effekt der die derart behandelten Bakterien tötet.



**Abb. 7: Molekularer Mechanismus des translationalen Überlesens**

Die Abbildung zeigt das translationale Überlesen in Gegenwart eines Aminoglykosids.

**a** Wildtyp-mRNA kodiert das komplette Protein. Die zur Sequenz passende tRNA bindet an das sense-Kodon, in diesem Beispiel CAA. Der Kettenabbruch erfolgt am terminierenden UAG, das Protein wird vollständig synthetisiert.

**b** mRNA mit prämaturom Stopp-Kodon und entsprechend trunkiertem Polypeptid. release-Factoren binden am Stoppcodon (hier Basenaustausch von C nach T) und bewirken somit einen vorzeitigen Kettenabbruch. **c** Das Aminoglykosid erlaubt in geringer Rate die Inkorporierung einer Aminosäure an Stelle des vorzeitigen Stoppcodons des mutierten Genes. Das trunkierte Protein wird weiterhin gebildet, allerdings bewirkt dieser Überleseeffekt in einigen Fällen die Synthese eines Proteins voller Länge mit einer zufälligen Aminosäure an Stelle des aberranten Stoppcodons. (modifiziert nach Markin & Liebman, 1999)

Aminoglykoside unterdrücken vorzeitige Stoppcodons, indem sie die Inkorporierung einer Aminosäure anstelle des Stoppcodons begünstigen. Damit kann die Translation weiterlaufen und ein vollständiges Protein gebildet werden. Der Mechanismus der Translationstermination ist zwischen den meisten Organismen hochkonserviert und ist stets durch ein amber- (UAG), ochre- (UAA) oder opal- (UGA) Stoppcodon signalisiert. Die das Stoppcodon umschließende Nucleotidsequenz besitzt ebenfalls eine wichtige Bedeutung für die Effizienz des Translationsabbruchs. Aminoglykoside

können die Translationsrate reduzieren, hauptsächlich indem sie die ribosomale Fehlerkorrektur inhibieren, ein Mechanismus, der nicht passende Aminoacyl-tRNA daran hindert, in die Polypeptidkette eingebaut zu werden. Somit erhöhen Aminoglykoside die Frequenz irrtümlich an Stelle des Stoppcodons eingefügter Aminosäuren und erlauben die Translation bis zum Ende des Genes, wie von Burke und Mogg 1985 für eukaryote Zellen gezeigt wurde.

**Tabelle 3: Arbeiten zum Überleseffekt in anderen Genen und Organismen**

<b>Mucoviszidose</b>	<i>in vitro und in vivo rescue</i> (Maus und human) von Stoppmutationen im CFTR- Gen	Wilschanski et al., 2003 Howard et al., 1996 Bedwell et al., 1997 Du et al., 2002
<b>Muskeldystrophie Duchenne</b>	<i>in vitro und in vivo rescue</i> (Maus und human) von Stoppmutationen im Dystrophin-Gen	Politano et al., 2003 Bidou et al., 2004 Barton-Davis et al., 1999
<b>neph. Diabetes insipidus</b>	<i>in vitro und in vivo rescue</i> (Maus und human) von Stoppmutationen im V2R- Gen	Sangkuhl et al., 2004
<b>Hurlers syndrome</b>	<i>in vitro rescue</i> des L- Iduronidase-Genes	Keeling et al., 2001

In den folgenden Jahren konnten Aminoglykoside *in vitro* und *in vivo* zur Korrektur durch von nonsense-Mutationen verursachten Defekten eingesetzt werden.

Howard und Mitarbeiter (1996) zeigten, daß zwei CFTR-assoziierte Stoppmutationen durch Behandlung der Zellen mit niedrigen Dosen eines aminoglykosidischen Antibiotikums unterdrückt wurden. In einer bronchialen Zelllinie aus Zystischer Fibrose mit der Mutation CFTR W1282X zeigten Bedwell und Mitarbeiter 1997, daß Behandlung mit den Aminoglykosiden G418 and Gentamicin die CFTR-Expression wiederherstellt. Keeling und Mitarbeiter zeigten 2001 *in vitro* die Wiederherstellung der L-Iduronidase (Hurlers-Syndrom), Politano und Mitarbeiter 2003 *in vitro* und *in vivo* die Wiederherstellung des Dystrophin-Genes in Muskeldystrophie Duchenne. Wilschanski und Mitarbeiter (2003) gaben Patienten mit einer Stoppmutation im

CFTR-Gen Gentamycin intranasal. Dies führte zur Expression eines vollständigen CFTR-Proteins an der apikalen Zellmembran und konnte damit die elektrophysiologischen Fehlfunktionen des CFTR-Verlustes korrigieren. Sangkuhl und Mitarbeiter zeigten 2004 *in vivo* die Wiederherstellung (Mensch und Maus) von Stoppmutationen im V2R-Gen bei Diabetes-insipitus-Patienten.

## 2 Zielsetzung

Infolge des weltweiten Trends zu übermäßigem Verzehr hochkalorischer Erzeugnisse bei gleichzeitiger Reduzierung körperlicher Anstrengung in den entwickelten Industriestaaten hat sich in gleichem Maße dazu in einer Parallelentwicklung die weltweite Prävalenz der Adipositas nahezu verdoppelt. Die körperlichen Begleiterscheinungen der Adipositas führen in einem Maße zu gesteigerter Morbidität und Mortalität, dass laut WHO die Adipositas als das größte chronische Gesundheitsproblem weltweit gilt. Neben fehlgesteuertem Verhalten werden heute 40-70% als genetisch bedingt angenommen (Barsh et al., 2000) Diese Daten wurden durch Zwillingsstudien begründet, die eine Korrelation für Zwillingspaare in Bezug auf eine Prädisposition zu adipösem Phänotyp herstellten, und die Bedeutung sowohl des genetischen Hintergrundes als auch der Umweltfaktoren betonten (Price et al., 1991) und einen genetischen Hintergrund von 50-90% sahen (Maes et al., 1997). Tatsächlich sind zur Zeit ca. 6% angeborene Mutationen hauptsächlich in Kandidatengenen des Leptin-Melanocortin-Signalweges als Ursache für Adipositas erkannt worden (Lubrano-Bertheliet, 2003), wobei Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor die häufigste molekulare Ursache der frühmanifesten Adipositas darstellen. Die am meisten beobachtete europäische Mutation ist eine Stopp-Mutation in Codon 35 im N-Terminus des Rezeptors, die stets im Haplotyp Y35X/D37V auftritt und zum vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation und somit zur Synthese eines funktionell inaktiven Proteins führt. Aufgrund des hohen Leidensdruckes der betroffenen Patienten sowie aufgrund der erheblichen gesundheitlichen Folgen übermäßigem Körpergewichtes und der damit verbundenen finanziellen Belastung für die nationalen Gesundheitssysteme erscheint die Suche nach einer pharmakologischen Behandlungsmöglichkeit der phänotypisch zur Adipositas führenden MC4R-Mutationen als lohnenswerte Herausforderung. Dieser soll sich diese Arbeit am Beispiel der MC4R-Stoppmutationen stellen.

Ziel dieser Untersuchung ist daher die funktionelle Wiederherstellung der Signaltransduktionseigenschaften von durch Stopp-Mutationen funktionell komplett inaktivierten MC4R-Varianten. Dies soll durch ein Überlesen der nonsense Mutation durch Aminoglykoside erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll überprüft werden, ob und wenn welche Aminoglykoside hierzu geeignet sind, welche Konzentrationen *in vitro* geeignet sind und welchen Einfluß Qualität und Lokalisation

der Stoppmutation auf den Überlese-Erfolg besitzen. Weiterhin soll die erfolgreiche Synthese funktionell kompetenter Rezeptormoleküle durch direkte (Nachweis des kompletten Rezeptors auf der Zelloberfläche) und indirekte Methoden (Nachweis der Signalübertragungseigenschaften des Rezeptors) nachgewiesen werden.

Niemals zuvor wurde der Nachweis geführt, dass eine monogene Form der Adipositas auf Translationsebene korrigiert werden kann. Diese Lücke möchte diese Arbeit schließen.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien

<sup>3</sup> H-Adenin	Perkin Elmer, Boston, USA
Adenosin-5'-Triphosphat (ATP)	Sigma, Deisenhofen
Agar-Agar	ICN Biochemicals, Aurova, USA
Agarose	Biozym Diagnostik, Hameln
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching
Desoxycholat-Na	Sigma, Deisenhofen
Desoxyribonukleotide (dNTP)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, GB
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
1 kB-DNA-Standard	Gibco, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Metafectene	Biontex, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumtetraborat	Sigma, Deisenhofen
Nonylphenoxypolyethoxyethanol (NP-40)	Applichem, Darmstadt
Oligonukleotide	TIB Molbiol, Berlin
o-Phenylendiamin	Sigma, Deisenhofen
Opti-Phase Supermix (Szintillator)	Perkin Elmer, Boston, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypsin	Biochrom, Berlin
Trypton	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma, Deisenhofen
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
zyklisches 3'5'-Adenosinmonophosphat (cAMP)	Sigma, Deisenhofen

## Säulenmaterial

Dowex: AG 1-X8-Resin  
Alumina: Alumina N, Akt I

BioRad, Hercules, USA  
MP Biomedicals, Eschwege

## Antibiotika

Ampicillin  
Penicillin/Streptomycin  
Puromycin  
Hygromycin  
Geneticin (G418)  
Gentamycin

Sigma, Deisenhofen  
Biochrom, Berlin  
Sigma, Deisenhofen  
PAA Laboratories, Pasching  
Hyclone, Logam, USA  
Biochrom, Berlin

## Hormone

$\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH, NDP- $\alpha$ -MSH

Dr. Henklein, Inst. für Biochemie,  
Charité Berlin

## Enzyme

Restriktionsendonukleasen  
T4-DNA-Ligase  
Taq-DNA-Polymerase  
Pfu-DNA-Polymerase

New England Biolabs, Schwalbach  
New England Biolabs, Schwalbach  
Bioline, Luckenwalde  
Stratagene Europe,  
Amsterdam, Niederlande

## Antikörper

anti-Hämagglutinin (HA)-Antikörper,  
Biotin gekoppelt  
anti-FLAG-Antikörper  
Peroxidase-konjugiertes Streptavidin

Roche, Mannheim  
Roche, Mannheim  
Dianova, Hamburg

## Reagenziensysteme

Expand™ High Fidelity System  
BigDye 3.1 Terminator™  
Cycle Sequencing Kit  
QIAamp blood DNA Mini Kit  
Qia PCR Purification Kit  
Qia Gel Extraction Kit  
TOPO 2.1 Cloning Kit

Boehringer Mannheim, Mannheim  
Applied Biosystems, Weiterstadt  
Qiagen, Hilden  
Qiagen, Hilden  
Qiagen, Hilden  
Stratagene Europe,  
Amsterdam, Niederlande

## Zellsysteme

E. coli-Stamm DH5 $\alpha$ , Genotyp:

F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, $\Delta$ (*lacZYA-argF*),U169,*deoR,recA1,endA1,phoA,hsdR17*(r<sub>k-</sub>,m<sub>k+</sub>),*supE44, $\lambda^-$ ,thi-l,gyrA96,relA1*

COS-7, Affennierenzellen

American Type Culture Collection, USA

## Vektoren

pCR2.1-TOPO  
pcDps

Invitrogen, Leek, NL  
Prof. Torsten Schöneberg, Leipzig

## Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
PBS-Dulbecco

Biochrom, Berlin  
Biochrom, Berlin

## Geräte

Brutschrank Certomat BS1  
Flüssigszintillationszähler Wallac 1409  
Photometer Bio-Photometer  
Sequenziergerät

Sicherheitswerkbank Gelaire BSB 4A  
Thermocycler Mastercycler gradient  
Thermomixer Compact  
Vortexer  
Zentrifuge Centrifuge 5417R

Heraeus Instruments, Berlin  
Perkin Elmer Wallac, Freiburg  
Eppendorf, Hamburg  
3130xl Genetic Analyzer, Hitachi via  
Applied Biosystems, Weiterstadt  
Flow Laboratories, Opera, Italien  
Eppendorf, Hamburg  
Eppendorf, Hamburg  
Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz  
Eppendorf, Hamburg

### 3.1.2 Medien und Puffer

#### 3.1.2.1 Allgemein

##### X-Gal

0,1 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid in 5 ml Dimethylformamid

##### Loading Dye für Agarosegele

Bromphenolblau 0,25%  
Xylenglycerol 0,25%  
Glycerol 25%  
in H<sub>2</sub>O

##### 10X TBE

Tris 0,89 M  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0,89 M  
EDTA 0,02 M  
in H<sub>2</sub>O; pH 8,0

##### Lysispuffer

Tris/HCl 10 mM  
NaCl 150 mM  
EDTA 1 mM  
DTT 1 mM  
Desoxycholat-Na 1%  
NP-40 1%  
PMSF 0,2 mM  
in H<sub>2</sub>O

##### Beschichtungspuffer

Natriumtetraborat 0,15 M  
in H<sub>2</sub>O, pH 8,0

##### PBS-T

Triton-X 0,05%  
in PBS

##### Substratpuffer

Citrat 0,1 M  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M  
in H<sub>2</sub>O pH 5,2

### 3.1.2.2 Bakterienkultur

#### LB-Medium

10g/l Trypton  
5g/l Yeast extract  
10g/l NaCl  
25mg/l Ampicillin  
in H<sub>2</sub>O; pH 7,4

#### SOB-Medium

20 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
0,5 g/l NaCl  
2,6 mM KCl

#### SOC-Medium

nach Hitzesterilisation werden zu 500 ml SOB-Medium zugesetzt:

5 ml 2 M MgCl<sub>2</sub>, steril in H<sub>2</sub>O  
10 ml 1 ml Glukose, steril in H<sub>2</sub>O

### 3.1.2.3 Zellkultur

#### COS-7-Medium

DMEM  
5 % FKS  
20 mM Glutamin

#### COS-7-Mangelmedium

DMEM ohne Zusätze

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Patienten**

Die untersuchten Stoppmutationen wurden entweder im Rahmen des MC4R-Mutationsscreenings in Patienten der Adipositassprechstunde des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie identifiziert (Y35X, E61X), wurden von der Arbeitsgruppe Hebebrand/Hinney im Rahmen der KORA-Kohortenstudie detektiert und zur Verfügung gestellt (W16X), oder ist über Mutagenese artifiziell entstanden (W258X). Von der Mutation MC4R W16X wurde uns bereits isolierte DNA des Patienten zur Verfügung gestellt. Aus dieser wurde der mutierte Rezeptor kloniert. Die genomische DNA der Träger der Varianten MC4R Y35X und E61X wurde nach 3.2.2 isoliert.

### **3.2.2 DNA-Isolation**

DNA wurde aus Leukozyten mit Hilfe des QIAamp Blood Kit Kit isoliert. 300 µl EDTA-Blut wurden mit 30 µl Protease und 300 µl Lysepuffer für 15 s vermischt und anschließend 10 min bei 56°C im Wasserbad lysiert. Nach Zugabe von 300 µl Ethanol und Abzentrifugation des Zelldebris wurde der Überstand auf eine Säule mit DNA-bindender Matrix gegeben und diese bei 8000 rpm für 1 min beladen. Die auf der Säulenmatrix haftende DNA wurde zweimalig mit je 500 µl Waschpuffer bei 8000 rpm für 1 min gewaschen. Die Elution erfolgte mit 75 µl H<sub>2</sub>O dest. nach 1 min Inkubation bei RT durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Die Kontrolle der quantitativen Elution vom Säulenmaterial erfolgte durch Lauf von 3 µl Eluat in Loading Dye in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,1 ‰ Ethidiumbromid bei 8 V/cm.

### **3.2.3 Mutationsscreening**

Aus adipösen Patienten gewonnene genomische DNA wurde routinemäßig auf das Vorhandensein von Mutationen im MC4R getestet. Im Rahmen dieses Screenings sind die Mutationen MC4R Y35X und E61X entdeckt worden. Das Screening beinhaltet die Amplifikation der Zielsequenz mittels PCR und die anschließende Sequenzierung derselben.

Die Amplifikation der Zielsequenz erfolgte nach Sambrook et al. (1989) mit den Oligonukleotiden F1F und F3R (s. Tabelle 4) im Eppendorf 9000 Thermocycler bei 95°C 120 s, 30x (94°C-30s, 56°C-30s, 72°C-60s) mit Taq-Polymerase. Anschließend

wurden die amplifizierten Fragmente durch Sequenzlängen-selektive Bindung an Trägermaterial mittels Qiagen PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll gereinigt.

### **3.2.4 Sequenzierung**

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde das zu sequenzierende PCR-Produkt gereinigt, um nicht verbrauchte Oligonukleotide, Desoxynukleotide und entstandene Oligonukleotiddimere aus der PCR-Reaktion zu entfernen. Plasmide sind durch den terminalen Wasch- und Fällungsschritt der Miniprep-Prozedur bereits gereinigt. Produkte der PCR wurden durch selektive Bindung des Amplifikates an DNA-bindendes Säulenmaterial gereinigt. Hierzu wurde eine PCR-Aufreinigung mit QiaQuick (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

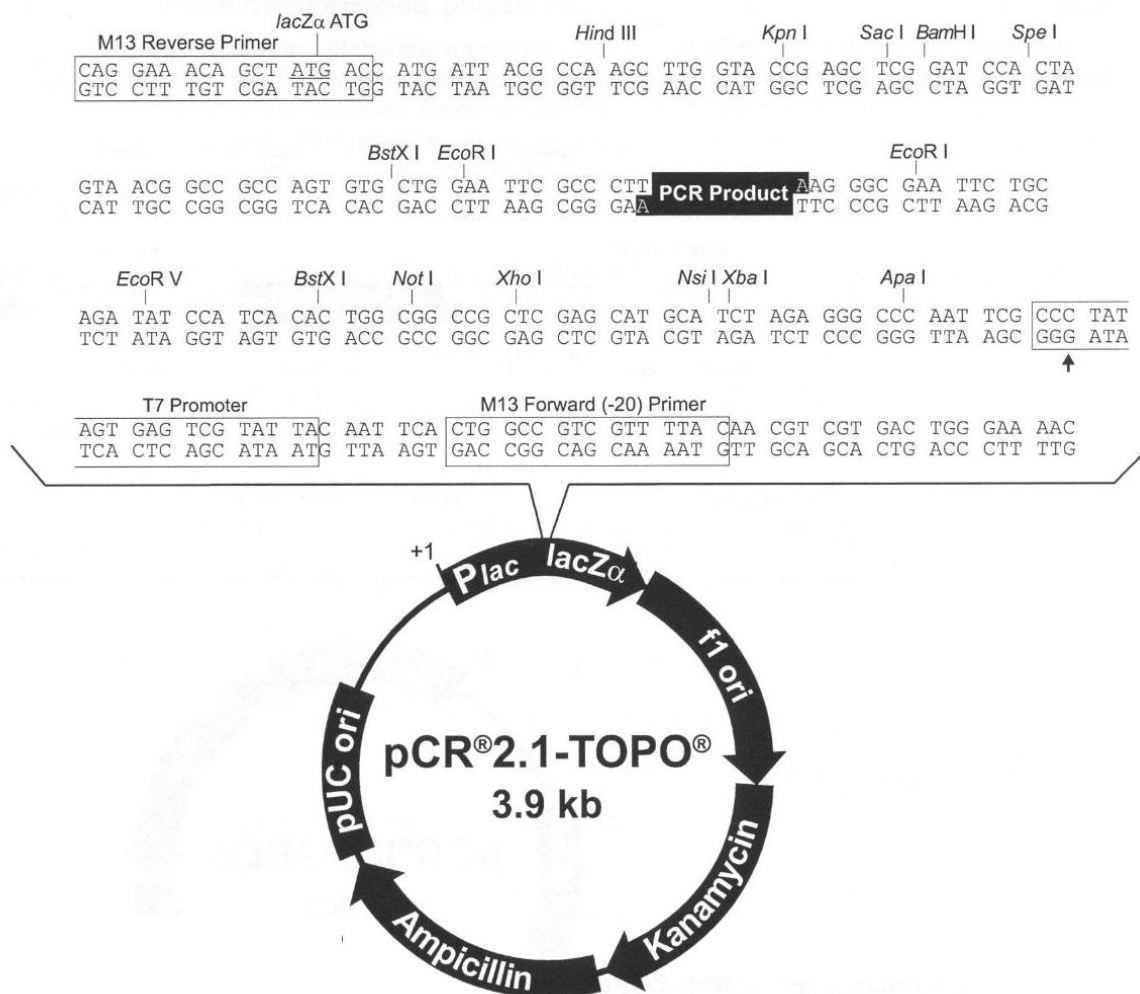
Die Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al. (1977) in halbautomatischem Verfahren mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Terminatoren mit BigDye v3-Chemie (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die Prozedur folgt im Wesentlichen dem Firmenprotokoll, allerdings fanden modifizierte Reagenzienmengen Anwendung:

2 µl Vektor bzw. 4 µl Amplifikat, 4 µl 2,5-fach konzentrierter BigDye-Puffer, 1 µl Oligonukleotid 5 µM und 1 µl BigDye v3 wurden im 10 µl-Ansatz mit H<sub>2</sub>O nach Protokoll in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Die Reinigung der Sequenzierreaktion erfolgte zur Abtrennung überschüssiger unverbrauchter Terminatoren durch Ethanol-fällung. Der Sequenzieransatz wurde mit 2 µl 1,5M Natriumacetat pH 5,5 und 55 µl Ethanol absolut versetzt, 15 min zur Fällung bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 10500 rpm 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde mit 200 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend 5 min bei 10500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet bis zur Trocknung bei 65 °C inkubiert. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst und hiervon 4 µl (Vektor als Template) bzw. 20 µl (Amplifikat als Template) im Sequenzierer (3100xl, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Firmenprotokoll analysiert.

Die Auswertung erfolgte durch manuellen Vergleich der Elektropherogramme mit der unter NCBI-Nr. AY236539 bei NCBI hinterlegten MC4R-Referenzsequenz und selbsterstellter Referenzsequenzen der HA- und FLAG-Tag tragenden N- und C-terminalen Sequenzbereiche mittels Sequencher (GeneCodes, Ann Arbor, USA).

### 3.2.5 Klonierung der MC4R-Varianten in Expressionsplasmide

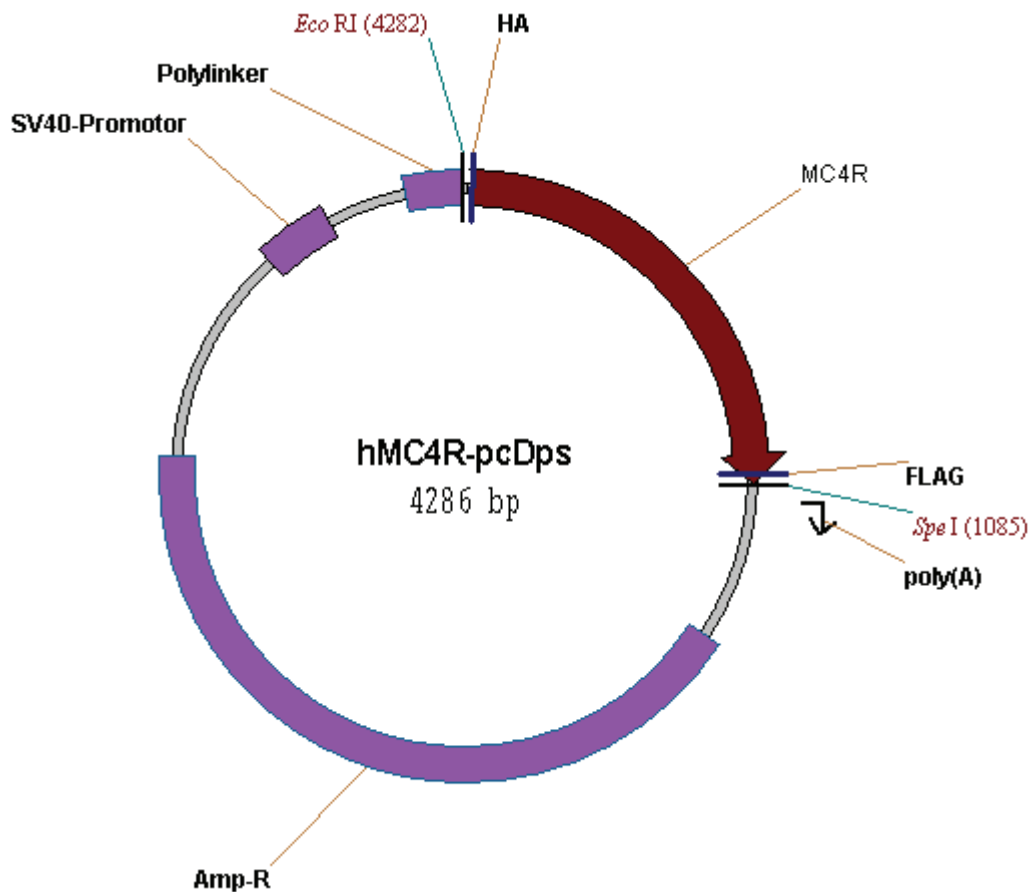
Für die Expression der untersuchten MC4R-Varianten wurde das eukaryotische Expressionsplasmid pCDps verwendet. Dieser Vektor wurde von Bonner und Mitarbeitern 1988 auf Grundlage des pcD-Vektors von Okayama & Berg (1983) generiert. Er enthält Promotor und Replikationsursprung des SV40-Virus, ein Ampicillin-Resistenzgen, eine Polyadenylierungssignal, einen Polylinker und einen Replikationsursprung für *E. coli*.



**Abb. 8: Vektorkarte des Plasmides pCR 2.1-TOPO**

Der Vektor pCR 2.1-TOPO ist Bestandteil des verwendeten TOPO cloning kits. Der Vektor liegt linear mit A-Überhängen vor, das Amplifikat wird ebenfalls mit A-Überhang in den Vektor ligiert. Die Subklonierung erfolgt über die direkt upstream des Produktes liegende EcoRI-site sowie die im downstream-Ende des Produktes über das Reverse-Oligonukleotid eingefügte SpeI-site.





**Abb. 9** :Schematische Darstellung des humanen MC4R im pcDps-Vektor

Der pcD-Vektor (Ampicillinresistenz und Replikationsursprung für *E. coli*) wurde von Okayama und Berg (1983) aus einem pcDV1-Vektor hergestellt. Aus diesem wurde ein pBR322-Segment sowie der Poly-A-Bereich des SV40-Virus sowie ein SV40-Segment aus des pL1-vektors verwendet. Bonner und Mitarbeiter modifizierten 1988 den Vektor zum pcDps. Die cDNA des humanen TSHR wurde 1996 von Dr. Torsten Schöneberg über die *EcoRI*-site in die polylinker site kloniert und in dieser Form zur Verfügung gestellt. Über die *EcoRI* und die *SpeI*-site (5'-Ende der TSHR-Sequenz) wurde das TSHR-Fragment entfernt und gegen den MC4R ausgetauscht. Die Vektorkarte zeigt die kodierende Sequenz des hMC4R (MC4R), das Ampicillin-Resistenzgen (Amp-R), den SV40-Promotor, das Polyadenylierungssignal (polyA) und die zur Subklonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen des Vektors. Die Zahl hinter dem Enzym markiert die Position im Plasmid.

Um das heterozygote mutierte Allel vom Wildtypallel zu trennen, wurden zuerst MC4R-Konstrukte im TOPO-Plasmid hergestellt. Nach blau-weiß-Selektion und nach Verifizierung des korrekten Inserts durch Restriktion und Messung der Insertlänge durch Agarosegellauf wurde durch Sequenzierung aller Klone ein Klon mit dem gewünschten Insert ermittelt. Dieses wurde sodann in den Expressionsvektor pcDps umklont.

### 3.2.5.1 PCR der Zielsequenz

Die kodierende Sequenz des MC4R-Genes wird von einem einzigen Exon kodiert. Daher ist die Klonierung der MC4R-Varianten aus der genomischen DNA der Patienten möglich. Die kodierende Sequenz wurde mit Antikörperdomänen versehen, wobei N-terminal über den Vorwärtsprimer MC4R-N-HA-F ein Hämagglutinin-tag (HA) und C-terminal über den Rückwärtsprimer MC4R-C-FLAG-R ein FLAG-tag angefügt wurden. Zusätzlich wird C-terminal eine *SpeI*-Schnittstelle eingeführt. Nicht mit einem tag versehene Konstrukte wurden mit MC4R-Spe-R erstellt. In Tabelle 4 sind die verwendeten Oligonukleotidsequenzen aufgeführt. Die Klonierung in den TOPO 2.1-Vektor erfolgte über den A-Überhang, die Umklonierung in den pcDps-Vektor über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *SpeI*.

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide**

Es sind die Namen und die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide dargestellt. Die genannten Namen korrelieren mit den Angaben in Abb. 10. Die ebenfalls verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung im TOPO 2.1-Vektor (M13-F/M13-R) sind Bestandteil des Kits und daher hier nicht aufgeführt. Die Antikörperepitope HA und FLAG sind durch Fettdruck, die *SpeI*-Restriktionsstellen durch Kursivsatz kenntlich gemacht.

Name	Sequenz
MC4R-N-HA-F	5'-gccgcccgcacatg <b>tacc</b> <i>cctacgacgtccccgactacgccc</i> gtgaactccaccaccgtggg-3'
MC4R-Spe-R	5'-ggactagtttaatatctgctagacaagtc-3'
MC4R-C-FLAG-R	5'-ctagactagttta <b>ctt</b> <i>atcgtcatcgtcctt</i> atagtcataatctgctagacaagtcacaaaagg-3'
pcDps-F	5'-taggcctgtacggaagtg-3'
pcDps-R	5'-gtccaaactcatcaatgtatc-3'
F1F	5'-tctgggtgtcatcagcttgttg-3'
O1R	5'-ggctattgccacaatcactaag-3'
F2F	5'-gtaccataacattatgacag-3'
F1R	5'-cttatgatgatcccaaccgc-3'
F3F	5'-cttcctccacttaatatctac-3'
F2R	5'-gaagcacacacaatatggattc-3'
F3R	5'-cctacacggaagagaaagctg-3'

```

agtgagaaca agaaagcaaa gagcagactc tttcaactga gaatgaatat tttgaagccc
aagatttttaa agtgatgatg attagagtcg tacctaaaag agactaaaaa ctccatgtca

agctctggac ttgtgacatt tactcacagc aggcatggca attttagcct cacaactttc
      F1F ->
agacagataa agacttggag gaaataactg agacgactcc ctgaccagg aggttaaactc
aattcagggg gacactggaa ttctcctgcc agc

gccgccgcatgtaccctacgacgtccccgactacgccgtgaactccaccaccgt
ggg
      MC4R-N.HA-F ->
1 atggtgaaact ccaccaccg tgggatgac acttctctgc acctctggaa ccgcagcagt
      W16X
      Y35X
61 tacagactgc acagcaatgc cagtgagtcc cttgaaaag gctactctga tggagggtgc
      F1F ->
121 tacgagcaac tttttgtctc tctgagggtg ttgtgactc tgggtgtcat cagcttgttg
      E61X <- 01R
181 gagaatatct tagtgattgt ggcaatagcc aagaacaaga atctgcattc acccatgtac
241 tttttcatct gcagcttggc tgtggctgat atgctggtga gcgtttcaaa tggatcagaa
301 accattgtca tcaccctatt aacagtaca gatacggatg cacagagttt cacagtgaat
361 attgataatg tcattgactc ggtgatctgt agctccttgc ttgcatccat ttgcagcctg
421 ctttcaattg cagtggacag gtactttact atcttctatg ctctccagta ccataacatt
      F2F -> <- F1R
481 atgacagtta agcgggttgg gatcatcata agttgtatct gggcagcttg cacggtttca
541 ggcattttgt tcatcattta ctcagatagt agtgctgtca tcatctgcct catcaccatg
601 ttcttcacca tgetggctct catggcttct ctctatgtcc acatgttctt gatggccagg
661 cttcacatta agaggattgc tgtcctcccc ggcactgggtg ccacccgcca aggtgccaat
      W258X
721 atgaagggag cgattacctt gaccatcctg attggcgtct ttgttgtctg ctgggccccca
      F3F -> <- F2R
781 tttctcctcc acttaatat ctacatctct tgtcctcaga atccatattg tgtgtgcttc
841 atgtctcact ttaacttgta tctcactctg atcatgtgta attcaatcat cgatcctctg
901 atttatgcac tccggagtca agaactgagg aaaaccttca aagagatcat ctgttgctat
      <- Spe-R
961 cccctgggag gccttttga cttgtctagc agatattaa
ctagtcc
atgggggac agagcagca atataggaac atgcataaga gactttttca
      <- F3R
ctcttaccct acctgaatat tgtacttctg caacagcttt ctcttccgtg tagggtactg
gttgagatat ccattgtgta aatttaagcc tatgattttt aatgagaaaa aatgcccagt
ctctgtatta tttccaatgt catgctactt ttttgccat aaaatatgaa tctatgttat

```

### Abb. 10: Sequenz des MC4R und Positionen der verwendeten Oligonukleotide

Die Abbildung zeigt die Basensequenz des MC4R. Die kodierende Sequenz ist schwarz, die 5'- und 3'-UTR sind grau dargestellt. Verwendete Oligonukleotide sind durch Einrahmung markiert. Die Positionen der Codons welche bei den untersuchten Stoppmutationen mutiert sind wurden rot hervorgehoben. Das native und das artifizielle Startcodon sind blau markiert.

Die Amplifikation fand im Eppendorf 9000 Thermocycler bei 95°C 120 s, 30x (94°C-30s, 60°C-30s, 72°C-90s) mit der „proof-reading“-Polymerase Pfu-Turbo-Polymerase statt. Durch einen anschließenden Amplifikationsdurchgang mit Taq-Polymerase (Bioline) für 5 Zyklen 94°C-30s, 60°C-30s, 72°C-90s wurde der A-Überhang angefügt. Anschließend wurden die amplifizierten Fragmente durch Sequenzlängenselektive Bindung an Trägermaterial zur Abtrennung überschüssiger Oligonukleotide und Primerdimere mittels Qiagen PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll gereinigt.

### 3.2.5.2 TOPO-Klonierung

Die Einklonierung der amplifizierten und gereinigten MC4R-Fragmente in den TOPO-Vektor erfolgte direkt der Amplifikation folgend, um einer Abtrennung der weniger stabilen A-Überhänge zu begegnen. Die verwendeten Materialien entstammen dem TOPO-2.1-Kit der Firma Invitrogen. Zur Ligation des Amplifikates in den Vektor wurden 2 µl des gereinigten Amplifikates mit 1 µl TOPO-2.1-Vektor und 2 µl H<sub>2</sub>O für 10 min bei RT inkubiert, dann auf 4°C temperiert. Die Transformation erfolgte mit „OneShot“ *E coli*-Zellen (Invitrogen), von welchen 50 µl auf den Ligationsansatz gegeben wurde. Dieser Transformationsansatz wurde für 45 min bei 4°C inkubiert und anschließend für die Aufnahme der DNA in die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min ausgesetzt und wieder für 2 min auf 4°C temperiert. Dann wurden dem Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugeben und für 45 min bei 37°C und 900 rpm schüttelnd inkubiert. Der Ansatz wurde auf mit 40 µl X-Gal bestrichenen Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C für 12 h inkubiert. Da sich die Klonierungsstelle inmitten des Gens der β-Galaktosidase befindet, kann nur bei selbstligiertem Plasmid dieses Enzym seine Wirkung entfalten und den farblosen Stoff X-Gal spalten, womit er eine blaue Farbe annimmt. Dementsprechend werden weiße Kolonien von der Platte abgenommen und einzelne Kolonien jeweils in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin geben und ½ Tag bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmidisolation und Aufreinigung erfolgt nach Herstellerangaben mittels DNA-Mini-Kit von Qiagen (Hilden). Das Insert im TOPO-Vektor wird von *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen flankiert. Zur Verifizierung der erfolgreichen Transformation wird der Vektor mit *EcoRI* geschnitten. Hierzu wurden 8 µl DNA aus der Minipräparation mit 1 µl 10x *EcoRI*-Puffer und 10 U *EcoRI* für 30 min bei 37°C

inkubiert und das Produkt auf 1% Ethidiumbromid-versetztem Agarosegel zur Überprüfung der Insertlänge bei 8 V/cm in der Elektrophorese getrennt. Hat das Insert die korrekte Länge von 1 kB, wurde es zur Überprüfung auf Sequenzrichtigkeit wie in 3.2.3 beschrieben sequenziert. Fehlerfreie MC4R-TOPO-Plasmide wurden in den eukaryoten Expressions-Vektor pcDps umkloniert.

### 3.2.5.3 Umklonierung in Expressionsplasmid pcDps

Das Insert wurde über die Klonierungsstellen *EcoRI* und *SpeI* in den pcDps-Vektor kloniert. Diese Asymmetrie hat zur Folge, dass das Fragment in richtiger Orientierung zum im Vektor liegenden Promotor erfolgt. Die Ligation erfolgte im 20 µl-Ansatz. 16 µl des MC4R-TOPO-Plasmides und 2 µg Expressionsplasmid (pcDps) wurden jeweils zuerst mit 10 U *SpeI* für 45 min und 37°C, anschließend mit 10 U *EcoRI* für 30 min bei 37°C in Gegenwart von 2 µl 10x-Puffer *EcoRI* und 0,2 µl BSA geschnitten. Das Insert (1kB-Bande) und der aufgeschnittene pcDps-Vektor (3,5 kB-Bande) wurde nach Auftrennung bei 8 V/cm auf 1% Agarosegel aus dem Gel isoliert und mit MinElute-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus der Agarose präpariert und mit 20 µl Elutionspuffer (Kitbestandteil) eluiert. Die Ligation des Inserts in den Vektor erfolgte in drei 15 µl-Ansätzen mit jeweils 7,5 µl 2x Ligationspuffer, 1 µl aufgeschnittenem und mit H<sub>2</sub>O 1:5 verdünntem Vektor, 0 µl (Negativkontrolle) bzw. 1 µl bzw. 2 µl geschnittenem und gereinigtem Insert und 1 µl Ligase. Die Ansätze wurden 12 h bei RT inkubiert.

Die Transformation erfolgte mit kompetenten DH5α-*E.coli*-Zellen, von welchen 90 µl auf den Ligationsansatz gegeben wurde. Dieser Transformationsansatz wurde für 45 min bei 4°C inkubiert und anschließend für die Aufnahme der DNA in die Zellen einem Hitzeschock bei 42°C für 1 min ausgesetzt und wieder für 2 min auf 4°C temperiert. Dann wurden dem Ansatz 250 µl SOC-Medium hinzugeben und für 45 min bei 37°C und 900 rpm schüttelnd inkubiert. Der Ansatz wurde auf Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und bei 37°C für 12 h inkubiert.

Bei koloniefreier Negativkontrolle wurden Kolonien der anderen beiden Platten jeweils in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin geben und ½ Tag bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmidisolation und Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben mittels DNA-Mini-Kit von Qiagen (Hilden).

Zur Überprüfung des Konstruktes auf Sequenzrichtigkeit wurde das Insert wie in 3.2.4 beschrieben sequenziert. Fehlerfreie MC4R-pcDps-Plasmide wurden in 250 ml LB-Medium mit 250 µl Ampicillin für 12 h bei 37°C und 900 rpm schüttelnd inkubiert und anschließend exprimierte Plasmide mittels Maxi-Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Menge erfolgte photometrisch (Photometer Eppendorf).

### **3.2.6 Kultivierung der verwendeten Zelllinie**

Die in den Experimenten verwendeten MC4R-Stoppmutations-Konstrukte wurden mittels des eukaryoten Expressionsvektors pcDps transient in COS-7-Zellen exprimiert. Um eine zur Erzielung reproduzierbarer Ergebnisse gleichmäßige Vitalität der Zellen zu gewährleisten, wurden die verwendeten COS-7-Zellen für 3 Tage in 250 ml- Zellkulturflaschen mit 25 ml COS-7-Medium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit angezogen und bei Erreichen einer 90-95 %igen Konfluenz umgesetzt. Hierzu wurden die Zellen mit 10 ml 37°C warmem PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin bei 37°C für 2 min vom Trägermaterial gelöst und in 75 ml 37°C warmem COS-7-Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde sowohl für die Experimente eingesetzt, als auch in 20-facher Verdünnung in COS-7-Medium zur Kultivierung der nächsten Zellpassage verwendet.

### **3.2.7 Genexpression in eukaryoten Zellen**

#### *Funktionsprinzip*

Die Expression der MC4R-Stopp-Varianten wurde durch transiente Transfektion von COS-7-Zellen mit dem eukaryotischen Expressionsplasmid pcDps durchgeführt. Der Vektor pcDps enthält das Ampicillin-Resistenzgen, mit Hilfe dessen die Selektion in *E. coli* erfolgt.

Die transiente Transfektion der COS-7-Zellen mit dem mutationstragenden MC4R-Plasmid erfolgte zur Expression des Rezeptors zum Zwecke der funktionellen Charakterisierung. Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte durch Behandlung mit Metafectene, einem Transfektionsreagenz für Liposomentransfektion (Lipofektion), welches in Vorversuchen mit dem verwendeten Zellsystem Transfektionsraten von 60% erreichte.

### *Durchführung*

COS-7-Zellen wurden über einen Zeitraum von drei Tagen in 250 ml Zellkulturflaschen mit 25 ml COS-7-Vollmedium bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen. Am Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 12-well-Platten in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/well ausgesetzt. Am folgenden Tag wurde wie folgt transfiziert: pro 12-well-Platte wurde 1500  $\mu$ l COS-7-Mangelmedium mit 3  $\mu$ g Plasmid versetzt, sowie 1500  $\mu$ l COS-7-Mangelmedium mit 15  $\mu$ l Metafectene. Die Ansätze wurden durch Aufziehen mit der Pipette gemischt und sodann vereinigt. Nach 20 min wurde je well 250  $\mu$ l von diesem Ansatz sowie 250  $\mu$ l frisches COS-7-Mangelmedium auf die COS-7-Zellen gegeben. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit COS-7-Medium. Am 2. Tag nach Transfektion wurden die Zellen für die Untersuchung der Signalübertragungseigenschaften (cAMP-Assay) zusätzlich mit 2  $\mu$ Ci/ml  $^3$ H-Adenin für 24h inkubiert.

Wurden die Zellen mit Aminoglycosiden behandelt, so sind diese im Zuge des Mediumwechsels (48h-Assays) oder bei cAMP-Akkumulationsassays zusammen mit dem radioaktiv markierten Adenin oder bei nicht radioaktiven Assays im Zuge eines zusätzlichen Mediumwechsels (24h-Assays) mit Aminoglycosiden versetzt worden. In allen Fällen ist die entsprechende Menge der Aminoglycoside in Zellkulturmedium gelöst worden und anschließend auf die Zellen aufgeteilt worden,

## **3.2.8 Funktionelle Charakterisierung der Rezeptormutanten**

### **3.2.8.1 allgemeines Prinzip**

Um die Eignung der verwendeten Aminoglykoside für eine Wiederherstellung der Rezeptorfunktion nachzuweisen, wird die funktionelle Wirkung des Rezeptors über dessen Signalübertragungseigenschaft (cAMP-Assay) als auch über den Nachweis des Rezeptors selbst (Oberflächen-ELISA) und eine Gesamtproteinbestimmung des Rezeptors (Total-ELISA) nachgewiesen.

### **3.2.8.2 cAMP-Akkumulationsassay**

#### *Funktionsprinzip*

Der cAMP-Assay liefert eine Aussage über die relative cAMP-Konzentration der durch den mutierten Rezeptor vermittelten Signalübertragung im Vergleich zum Wildtyprezeptor.

Rezeptorstimulation führt über Gs-Kopplung und Aktivierung zur Aktivierung der Adenylatcyclase und damit zur Bildung von intrazellulärem cAMP, welches durch die vorangegangene Inkubation der Zellen mit radioaktiv markiertem Adenin Tritium-markiert ist und damit im Szintillationszähler nachgewiesen wird. Die Menge des gebildeten cAMP ist proportional zur Rezeptoraktivität in Hinblick auf die Gs-Signalübertragung. Mit in dekadischen Schritten steigender Ligandenkonzentration stimuliert zeigt die cAMP-Produktionsrate ein sigmoides Kurvenverhalten (Konzentrationswirkungskurve). Der Punkt der halbmaximalen Stimulation ist der für die Rezeptoraktivität signifikante Wert ( $EC_{50}$ ).

Durch Zugabe von IBMX wird der cAMP-Abbau während der Assay-Durchführung verhindert. Zyklische Nucleotide binden selektiv an Aluminiumoxid. Diese Eigenschaft macht sich der Assay zunutze, die Abtrennung des radioaktiv markierten cAMP von den ebenfalls radioaktiv markierten Molekülen Adenin, Adenosin, ATP, ADP und AMP erfolgt säulenchromatographisch (Salomon et al., 1974).

### *Durchführung*

Transfizierte Zellen wurden 1 Tag nach Inkubation mit  $^3H$ -Adenin mit 1 mM IBMX in COS-7-Mangelmedium gewaschen. Die Stimulation des Rezeptors erfolgte ebenfalls in COS-7-Mangelmedium mit IBMX. Die Durchführung des Assays erfolgte in Duplikaten einer dekadischen Verdünnungsreihe von 1000 nM bis 100 pM ( $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH) bzw. 100 nM bis 10 pM (NDP- $\alpha$ -MSH). Zur Stimulation wurden die Zellen bei 37°C und 5 %  $CO_2$  inkubiert. Durch Absaugen des Mediums wurde die Reaktion nach 60 min gestoppt und die Zellen durch Überschichtung mit eiskalter 5%igen Trichloressigsäure, die 1 mM ATP und 1 mM cAMP enthielt, und 20 minütiger Lagerung bei 4°C aufgeschlossen.

Die chromatographische Abtrennung des cAMP erfolgt an Dowex-Säulen (AG 50W-X8, Kationentauscher) und Aluminiumoxid. Zur Regeneration werden Dowex-Säulen mit 5 ml 1 M HCl und darauf folgend zweimalig mit jeweils 10 ml  $H_2O$ , Aluminiumoxid mit 10 ml 0,5 M Tris/HCl pH 7,4, 10 ml  $H_2O$  und 2 ml 0,1 M Imidazol pH 7,4 gewaschen.

Das Zelllysat wird auf das Dowex-Material gegeben und mit 1,5 ml  $H_2O$  gewaschen. Alsdann wurden die Dowex-Säulen auf die Aluminiumoxydsäulen platziert und mit 10 ml  $H_2O$  gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift ausschließlich der Aluminiumoxydsäulen mit 10 ml  $H_2O$ . Das gebundene cAMP wurde nun mit 5 ml



0,1 M Imidazol pH 7,4 von den Säulen eluiert. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen mit 14 ml Szintillatorflüssigkeit „Optiphase Supermix“ versetzt und der Gehalt radioaktiv markierten cAMPs im Szintillationszähler gemessen.

### **3.2.9 Immunologische Untersuchungen**

#### **3.2.9.1 Untersuchung der Oberflächenexpression**

##### *Funktionsprinzip*

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde ein gegen den N-terminalen HA-Tag gerichteter Antikörper benutzt. Da ein gegen die MC4R-Aminosäuresequenz oder dessen strukturelle Eigenschaften gerichteter Antikörper nicht zur Verfügung stand, wurde der Rezeptor mit einem N-terminalen Epitop versehen, gegen das ein käuflicher Antikörper gerichtet ist (Anti-HA). Um sicherzustellen, dass dieses Epitop nicht mit der Rezeptorfunktion interferiert, wurden sowohl epitopmarkierte Konstrukte als auch Konstrukte ohne Epitop hergestellt und parallel untersucht. Im Übrigen wurden Epitop-markierte Konstrukte für alle Studien verwendet. Der Anti-HA-Antikörper ist Biotin-markiert. Im anschließenden Bindungsschritt, vor dem überschüssiger Anti-HA-Antikörper gewaschen wurde, wird Peroxidase-konjugiertes Streptavidin hinzugesetzt. Streptavidin bindet hochaffin an Biotin, die Peroxidase katalysiert eine Farbreaktion auf Basis der Oxidation des im reduzierten Zustand farblosen Farbstoffes o-Phenyldiamin (s. auch Abb. 11). Im linearen Bereich der Redoxreaktion ist der Grad der Farbreaktion proportional zur Menge der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptormoleküle.

##### *Durchführung*

COS-7-Zellen wurden in 48-well-Platten ausgesetzt und jeweils 6 wells wurden mit 1,5 µg der Rezeptorkonstrukte und 3 µl Metafectene in Mangelmedium transfiziert. 1 Tag später wurde das Medium gegen Vollmedium ausgetauscht. 24h bzw. 48h nach Transfektion wurden Aminoglycoside zugesetzt. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen mit 250 µl/well PBS gewaschen und mit 100 µl 4%igem Formaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 250 µl PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit 100 µl DMEM Vollmedium für 1h bei 37°C blockiert. Die Inkubation mit dem Antikörper (Anti-HA-Biotin) erfolgte nach Waschen

mit 200 µl PBS für 2h bei 37°C in DMEM-Vollmedium. Zur Entfernung überschüssigen Antikörpers wurde dreimal mit je 250 µl PBS gewaschen.

Die Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Straptavidin erfolgte für 1h bei 37°C in DMEM-Vollmedium. Zur Entfernung überschüssigen POD-Streptavidin-Konjugates wurde dreimal mit je 250 µl PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 150 µl/well Substratlösung initiiert. Nach 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/well 1 n HCl mit 0,05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> gestoppt. Die Extinktionsmessung erfolgte bichromatisch bei 492 und 620 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Multiscan, Labsystems, Finnland).

### **3.2.9.2 Total-ELISA zur Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression**

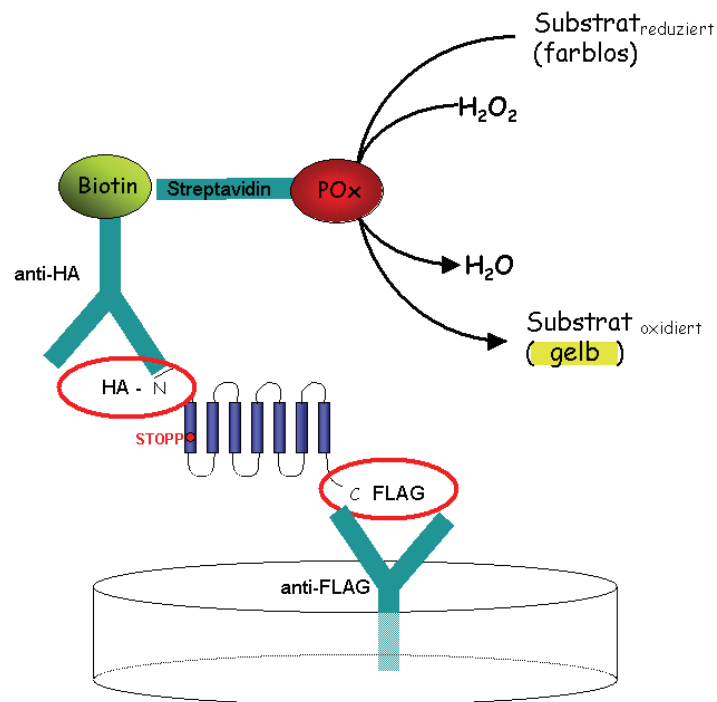
#### *Funktionsprinzip*

Der Total-ELISA zur Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression mißt sowohl die Menge der auf der Zelloberfläche exprimierten Moleküle (wie im Oberflächenassay) als auch die intrazellulär zurückgehaltenen und akkumulierten MC4R-Transkripte. Die Bestimmung der Gesamtexpression der untersuchten Rezeptormutanten gibt Auskunft über mutationsbedingte Expressionsveränderungen, die nicht über die Untersuchung der Oberflächenexpression erkannt werden können. In dieser Arbeit dient dieser Assay der Beweisführung des Überlesens des Stoppcodons. Da es sich um zellfreies Lysat handelt, aus dem das Protein isoliert wurde, kann eine Farbreaktion im Gegensatz zum Oberflächen-ELISA nur stattfinden, wenn das Protein über den carboxyterminalen FLAG-tag in Antikörperbindung am Boden des wells der 96-well-Platte fixiert wird (s. Abb. 11).

#### *Durchführung*

COS-7-Zellen wurden in 6 cm-Schalen angezogen und 1 Tag später mit den zu untersuchenden Rezeptormutanten sowie dem WT mit COS-7-Mangelmedium und Metafectene transfiziert. Am darauf folgenden Tage wurde das Medium gegen COS-7-Medium ausgewechselt. Am dritten Tag nach Transfektion wurden die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml eiskaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und in 1,5 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden bei 13.000 U/min pelletiert. Das Pellet wurde in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und zur Zelllyse über Nacht in einem

Rotationsschüttler inkubiert. Solubilisierte Proteine wurden bei 14.000 U/min von Zelldebris getrennt. Das Lysat wurde mit 100 µl PBS-T versetzt.



**Abb. 11: Schematische Darstellung der Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression**

Die Abbildung schematisiert Antikörperbindungen und Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates, welche über eine Redoxreaktion die Menge an Epitop-markiertem Protein quantifizieren. Dieses Verfahren fand sowohl im Gesamtprotein-ELISA (wie in dieser Abbildung dargestellt) als auch im Oberflächen-ELISA (der Rezeptor ist auf den am well-Boden haftenden Zellen immobilisiert) Anwendung.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden sofern nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt. Tags zuvor wurde eine 96-well-Platte über Nacht mit 10 µg/ml Anti-FLAG-Antikörper in Beschichtungspuffer beschichtet. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation für 1h bei 37°C in 250 µl COS-7-Vollmedium blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 250 µl PBS-T erfolgte die Inkubation mit 100 µl des Lysates je well auf der Schüttelplatte bei 2000 rpm für 2h bei RT, wobei jeweils eine Probe auf drei wells aufgeteilt wurde. Ungebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit 100 µl/well eines 1 µg/ml biotinmarkiertem anti-HA-Antikörpers. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurde für 1h mit 100 µl/well eines POD-Streptavidin-Konjugates (0,2 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde viermalig mit PBS-T gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mit 150 µl Substratlösung pro well. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von

50 µl/well 1 M HCl in Gegenwart von 0,05 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> gestoppt. Die Extinktion wurde bei 492 nm und 620 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Multiscan, Labsystems, Finnland) gemessen.

### **3.2.10 Datenbewertung**

Die Datenerhebung der funktionellen Experimente erfolgte in mindestens drei unabhängigen Experimenten die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden.

Die statistischen Daten (nichtlineare Regressionsanalyse mit Anpassung an einen sigmoidalen Kurvenverlauf, Bestimmung des EC<sub>50</sub>-Wertes) wurden von GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) geliefert.

## 4 Ergebnisse

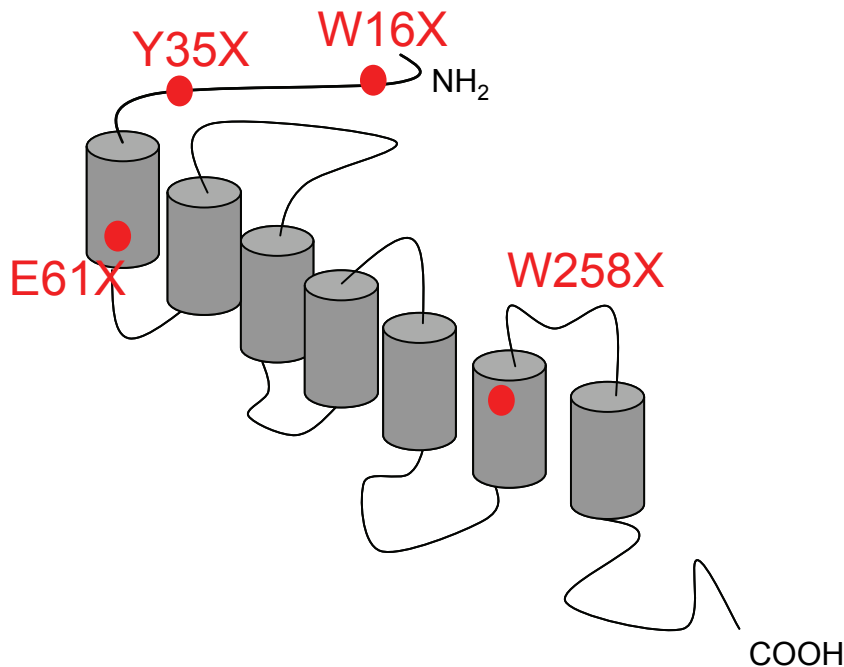
### 4.1 Herstellung der MC4R-Konstrukte

Die häufigsten molekularen Ursachen monogener Adipositas sind als Mutationen im MC4R beschrieben. Am meisten ist hierbei die Variante MC4R Y35X vertreten, sie führt zu vorzeitiger Termination der Proteinsynthese und damit zu vollständigem Funktionsverlust des Rezeptors. Daher lag es nahe, im Rahmen der gemeinsamen Anstrengung des Institutes für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie im Verbund der Kinderklinik der Charité im Ringen um therapeutische Maßnahmen zur Bekämpfung der Folgen der Adipositas, einen möglichen therapeutischen Weg zur Behandlung einer Ursache der Adipositas aufzuzeigen. Dies soll in dieser Arbeit am Beispiel von MC4R-Stoppmutationen durchgeführt werden. Neben der MC4R-Stoppmutation Y35X wurden im Rahmen dieser Arbeit noch drei weitere MC4R-Varianten untersucht:

Die Variante MC4R W16X wurde von der Arbeitsgruppe Hebebrand (Essen) im Verlauf eines MC4R-Mutationsscreening im NGFN2-Netzwerk „Adipositas und assoziierte Erkrankungen“ identifiziert und die Patienten-DNA uns zur Verfügung gestellt. Die Varianten Y35X und E61X wurden in Patienten unserer Klinik entdeckt. Die genomische DNA wurde wie beschrieben isoliert. Die anschließende Sequenzierung der MC4R-DNA-Sequenz ergab, dass die Mutationen heterozygot ausgeprägt sind und daß durch diese drei Mutationen alle drei Stoppcodons repräsentiert sind (Tabelle 5). Diese befinden sich in der N-terminalen extrazellulären Domäne, bzw. in der ersten Transmembrandomäne (Abb. 12). Diese MC4R-Varianten wurden wie unter 3.2.5 beschrieben in den prokaryoten Vektor TOPO 2.1 über TA-cloning kloniert. Im Zuge der Klonierung erfolgte eine Alleltrennung des mutierten vom Wildtypallel. Hierzu wurden die inserierten Sequenzabschnitte sämtlicher erzeugter Klone nach Überprüfung der Insertlänge über Restriktion und Fragmentlängenmessung im Agarosegel durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das inserierte Fragment in den eukaryoten Expressionsvektor pcDps subkloniert.

Der erste Schritt dieser Prozedur besteht aus einer exponentiellen Amplifikation des mutierten MC4R aus genomischer Patienten-DNA. Die verwendete *Taq*-Polymerase besitzt keine proof-reading-Aktivität und hat eine Fehlerrate von etwa 1/1000 bp. Da der MC4R eine Länge von 999 bp hat, ist der fehlerhafte Einbau eines falschen

Basenpaares wahrscheinlich und auch häufig aufgetreten. Aufgrund dieser Erfahrungen wurde des Weiteren mit einem Gemisch aus *Taq*-Polymerase und einer *Pfu*-Polymerase mit proof-reading-Aktivität gearbeitet.



**Abb. 12: Schematische Darstellung der Positionen der untersuchten Stoppmutationen im MC4R.**

In der schematischen Darstellung des MC4R-Rezeptors sind die vier in dieser Arbeit untersuchten MC4R-Stoppmutationen eingezeichnet, ihre respektiven Stoppcodi sind in Tabelle 5 aufgeführt. MC4R W16X und Y35X befinden sich inmitten der wenig konservierten N-terminalen Domäne, MC4R E61X und W258X hingegen in der ersten bzw. sechsten TM.

Somit sind zahlreiche Laborartefakte entstanden, von denen eines zur weiteren Charakterisierung mitgeführt wurde. Die Variante MC4R W258X, eine artifizielle MC4R-Mutation, wurde ausgewählt, da es sich um ein vorzeitiges Stopp im weiter C-terminal gelegenen Teil des MC4R handelt, eine Position die in den untersuchten natürlichen Varianten nicht vorkam, und es sich außerdem um die leicht zu überlesende Variante opal (Stoppcodon tga) handelt (s. Ergebnisse weiter unten und Diskussion). Diese liegt allerdings nicht wie bei der Variante W16X im wenig konservierten N-terminalen Bereich, sondern wie die Variante E61X in einer Transmembrandomäne.

**Tabelle 5: Die genetische Sequenz im Umfeld der vier Stoppmutationen**

<b>MC4R-Variante</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Stoppcodon</b>
MC4R W16X	ACCTCT <b>TGA</b> AACCG	opal
MC4R Y35X	AAGGC <b>TAA</b> TCTGA	ochre
MC4R E61X	TGTTG <b>TAG</b> AATAT	amber
MC4R W258X	TCTGCT <b>TGA</b> GCCCC	opal

Daher verspricht diese Mutation weitere Erkenntnisse in Bezug auf unterschiedliche Überleseeffektivität in Abhängigkeit von Art und Position der Stoppmutation, weswegen sie mit den drei anderen natürlich vorkommenden Stoppmutationen in die Charakterisierung mit einbezogen wurde.

## **4.2 Nachweis des Überleseeffektes**

Der Nachweis, dass ein translationaler Überleseeffekt stattfindet und ein Protein nicht nur in voller Länge, sondern als funktionell aktives Protein gebildet wurde, soll durch folgendes Konzept im Experimentdesign geliefert werden:

- a) Die Durchführung eines MC4R-Gesamtexpressions-ELISA soll den Nachweis eines in voller Länge translatierten MC4R-Proteins führen.
- b) Anschließend wird mit Hilfe eines Oberflächen-ELISA die Oberflächenexpression des MC4R-Proteins gemessen und
- c) schließlich der Nachweis der funktionellen Aktivität des Proteins erbracht. Der Nachweis dieses dem Wildtyprezeptor entsprechenden Signalübertragungsverhaltens des Rezeptors soll in Form einer Messung der cAMP-Produktion nach Agonistenstimulation geführt werden

In den im folgenden dargestellten Experimenten wurden Zellen in der Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen verschiedener Aminoglykoside inkubiert, es wurden die beiden endogenen Agonisten  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH sowie der artifizielle hochpotente Ligand NDP- $\alpha$ -MSH zur Stimulation der cAMP-Produktion benutzt, es wurde die Oberflächenexpression der wiederhergestellten MC4R-Proteine bestimmt, sowie die Menge des in voller Länge gebildeten Gesamt-MC4R-Proteins.

## 4.3 Untersuchungen zur Rezeptorexpression

### 4.3.1 Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression

Die Wiederherstellung der Rezeptorfunktion eines Rezeptors mit vorzeitig terminierendem Stoppcodon setzt voraus, daß das Stoppcodon überlesen wird, und die Translation bis zum nativen Stoppcodon fortgesetzt wird. Um diese Untersuchung zu führen, wurden die zu untersuchenden MC4R-Stopp-Konstrukte C-terminal mit einem FLAG-Antikörperepitop markiert. Wird im Immunoassay dieses FLAG-Epitop bestätigt, so dient dies als Nachweis für ein bis zum FLAG-Epitop und somit vollständig translatiertes Protein.

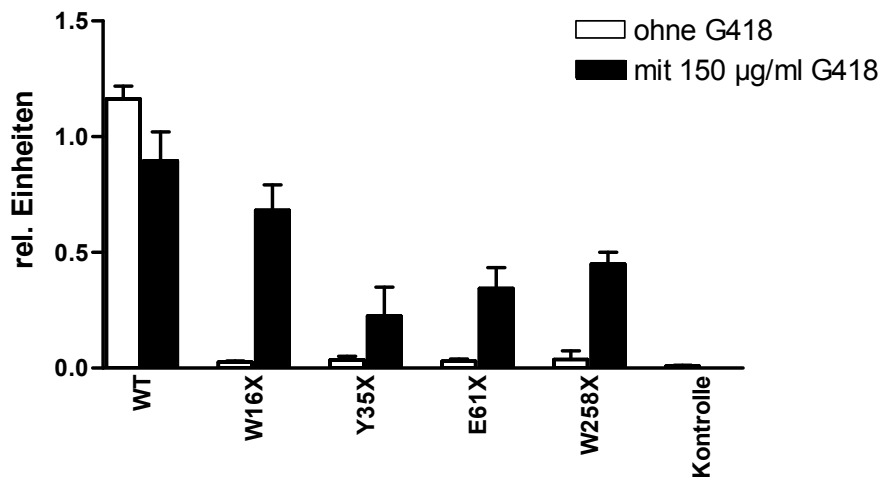
Da in vorangegangenen Untersuchungen das Aminoglykosid G418 den größten Effekt auf die Überlebensrate im Vergleich mit Gentamycin, Hygromycin, Puromycin und Streptomycin gezeigt hatte (Abb. 21), wurde zur Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression G418 verwendet. COS-7-Zellen wurden nach Transfektion mit den MC4R-Stopp-Konstrukten, dem MC4R WT sowie einem nicht FLAG-markiertem MC4R-Rezeptor als Negativkontrolle mit 100 µg/ml G418 für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, um eine Bestimmung sowohl der auf der Zelloberfläche als auch der intrazellulär akkumulierten MC4R-Moleküle durchführen zu können. Der Nachweis des C-terminalen FLAG-Epitopes erfolgte wie in 3.2.9.2 beschrieben mittels MC4R-Gesamtprotein-ELISA.

Ohne Aminoglykosidbehandlung kann mit Ausnahme des Wildtyps kein MC4R-Protein nachgewiesen werden (Abb. 13). Unter Einfluß des Aminoglykosides G418 konnte für alle vier untersuchten MC4R-Stopp-Varianten ein in voller Länge translatisiertes MC4R nachgewiesen werden. Die Mengen der vollständig exprimierten MC4R-Moleküle der Varianten MC4R W16X und W258X erreichen hierbei sogar 2/3 bzw. 1/2 des Wildtypniveaus, gefolgt von Y35X und E61X mit etwa 1/3 des Wildtypniveaus.

Unter Einbeziehung der Information über das respektive Stoppcodon (s.



Tabelle 5) zeigen diese Ergebnisse, daß in beiden Fällen, in denen das Stoppcodon opal vorlag, ein deutlich höherer Überleseeffekt durch das Aminoglykosid G418 stimuliert werden konnte, als für ochre und amber, wobei das Kodon ochre die niedrigste Aminoglykosid-vermittelte Überleaserate zulässt.

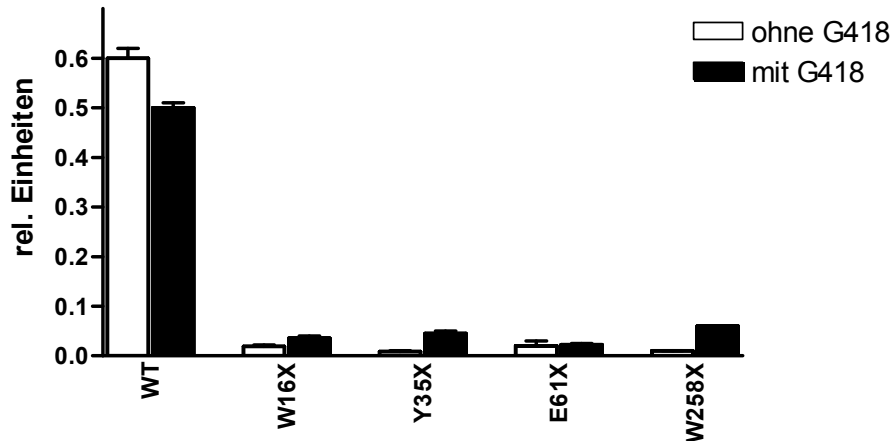


**Abb. 13: MC4R-Gesamtexpressions-ELISA**

COS-7-Zellen wurden mit den in der Abbildung genannten Plasmiden transfiziert und ohne Aminoglykosid (weiße Balken) bzw. mit 150 µg/ml G418 (schwarze Balken) für zwei Tage bebrütet und danach die Menge in vollständiger Länge translatierten MC4R-Proteins wie in 3.2.9.2 beschrieben über einen Immunoassay gegen die C-terminale FLAG-Domäne des MC4R-Konstruktes bestimmt. Als Kontrolle diente ein MC4R-Konstrukt ohne FLAG-Markierung.

#### 4.3.2 Untersuchung der Oberflächenexpression

Der funktionsfähige MC4R befindet sich in der äußeren Zellmembran, wobei seine N-terminale Domäne nach außen weist. Dies setzt voraus, dass der Rezeptor zuvor korrekt durch die Membran gefädelt wurde, um eine wie in den vorangegangenen beschriebenen Experimenten gemessenen Signalübertragung gewährleisten zu können.



**Abb. 14: Oberflächenexpression der untersuchten MC4R-Stoppmutanten**

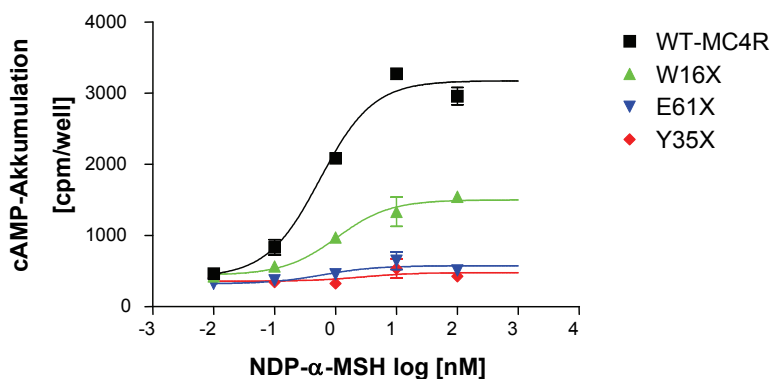
COS-7-Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen Plasmiden transfiziert und mit 150 µg/ml G418 (schwarze Balken) bzw. ohne Aminoglykosid (weiße Balken) versetzt und 24 h danach die Oberflächenexpression wie in 3.2.9.1 beschrieben bestimmt.

Diese Oberflächenexpression sollte nun mit Hilfe eines ELISA-Ansatzes wie unter 3.2.9.1 beschrieben gemessen werden. Mit den verschiedenen MC4R-Konstrukten transfizierte COS-7-Zellen wurden in Gegenwart von 150 µg/ml des Aminoglykosides G418 inkubiert und 24h später der ELISA-Assay durchgeführt. Im Ergebnis zeigt sich neben dem Nachweis des toxischen Effektes der Aminoglykosidbehandlung ersichtlich in der verminderten Oberflächenexpression aufgrund geringerer Zelldichte des Wildtyprezeptors (weiße Balken (ohne Aminoglykosid) gegen schwarze Balken (mit 150 µg/ml G418) in Abb. 14) keine signifikante Erhöhung der Oberflächenexpression der Stopp-Varianten bei Aminoglykosidbehandlung. Die im Folgenden beschriebenen Versuche werden nachweisen, daß trotz fehlender messbarer Oberflächenexpression die Rezeptoren signalisieren. Dies kann nur auf die wesentlich niedrigere Sensitivität dieses Assays gegenüber der Messung der cAMP-Akkumulation zurückzuführen sein und zeigt auf, daß der Überleseeffekt nur zu einer sehr geringen Menge an funktionsfähigem Protein führt, aber diese Menge bereits ausreicht, um zu einem Wildtyp-ähnlichen Signalübertragungsverhalten, also einer partiellen Wiederherstellung der Rezeptorfunktion zu führen.

#### 4.4 Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften

Die Experimente zur Untersuchung der Signalübertragungseigenschaften der MC4R machen sich die Eigenschaft des MC4R als Gs-koppelnder GPCR zunutze, nach Ligandenstimulation an das Gs $\alpha$ -Adenylatcyclasesystem zu koppeln und somit eine Zyklisierung intrazellulären ATP zu cAMP zu stimulieren. Der Abbau des cAMP wird im Assay infolge der Anwesenheit von IBMX blockiert, so daß cAMP intrazellulär akkumuliert wird. Zur funktionellen Charakterisierung des Signalübertragungsverhaltens des MC4R-Wildtyps und der Stoppmutationen unter Standardbedingungen wurden COS-7-Zellen transient transfiziert und drei Tage später die Agonisten-induzierte cAMP-Akkumulation gemessen.

Wie zu erwarten ist, sind die Stoppmutationen Y35X und E61X funktionell inaktiv, zeigen somit nach Ligandenstimulation keine cAMP-Produktion, wohingegen der Wildtyprezeptor eine Konzentrationswirkungskurve in Abhängigkeit von der Agonistenkonzentration liefert. Allerdings wurde bei Stimulation des Rezeptors MC4R W16X eine leichte aber reproduzierbare cAMP-Akkumulation beobachtet (Abb. 15).

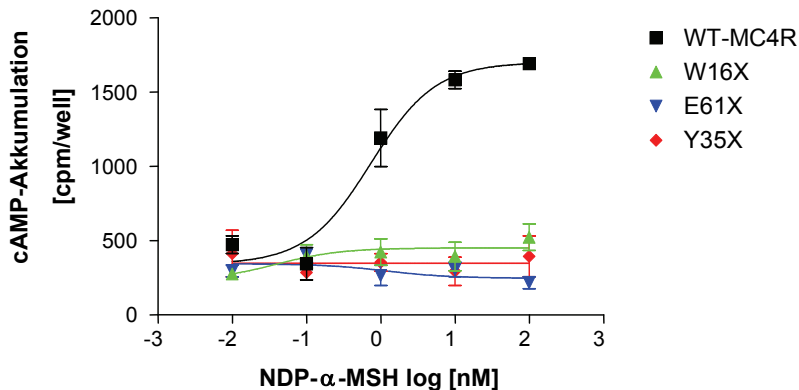


**Abb. 15: cAMP-Akkumulation in COS-7-Zellen in Vollmedium nach Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH.**

Es sind die cAMP-Akkumulationen der drei untersuchten MC4R-Mutationen und des Wildtyps im Vergleich nach Stimulation mit dem Liganden NDP- $\alpha$ -MSH gezeigt. Das im verwendeten Vollmedium enthaltene Streptomycin bewirkt bei der Mutation W16X einen leichten Überleseeffekt.

Die verwendeten Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen gehalten (DMEM mit 5% FKS, 20 mM Glutamin und 1 mg/ml Penicillin/Streptomycin). Eine Kulturführung der COS-7-Zellen über drei Passagen ohne Penicillin/Streptomycin führte zu Versuchsergebnissen, in denen auch nach Stimulation mit einer 100 nM-

Konzentration des hochpotenten Liganden NDP- $\alpha$ -MSH keine cAMP-Akkumulation mehr erreicht wurde (Abb. 16).



**Abb. 16: cAMP-Akkumulation in COS-7-Zellen in AB-freiem Medium nach Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH.**

Es sind die cAMP-Akkumulationen der drei untersuchten MC4R-Mutationen und des Wildtyps im Vergleich nach Stimulation mit dem Liganden NDP- $\alpha$ -MSH gezeigt. Im Gegensatz zu dem in Abb. 15 dargestellten Ergebnis wurde Medium ohne Streptomycin verwendet.

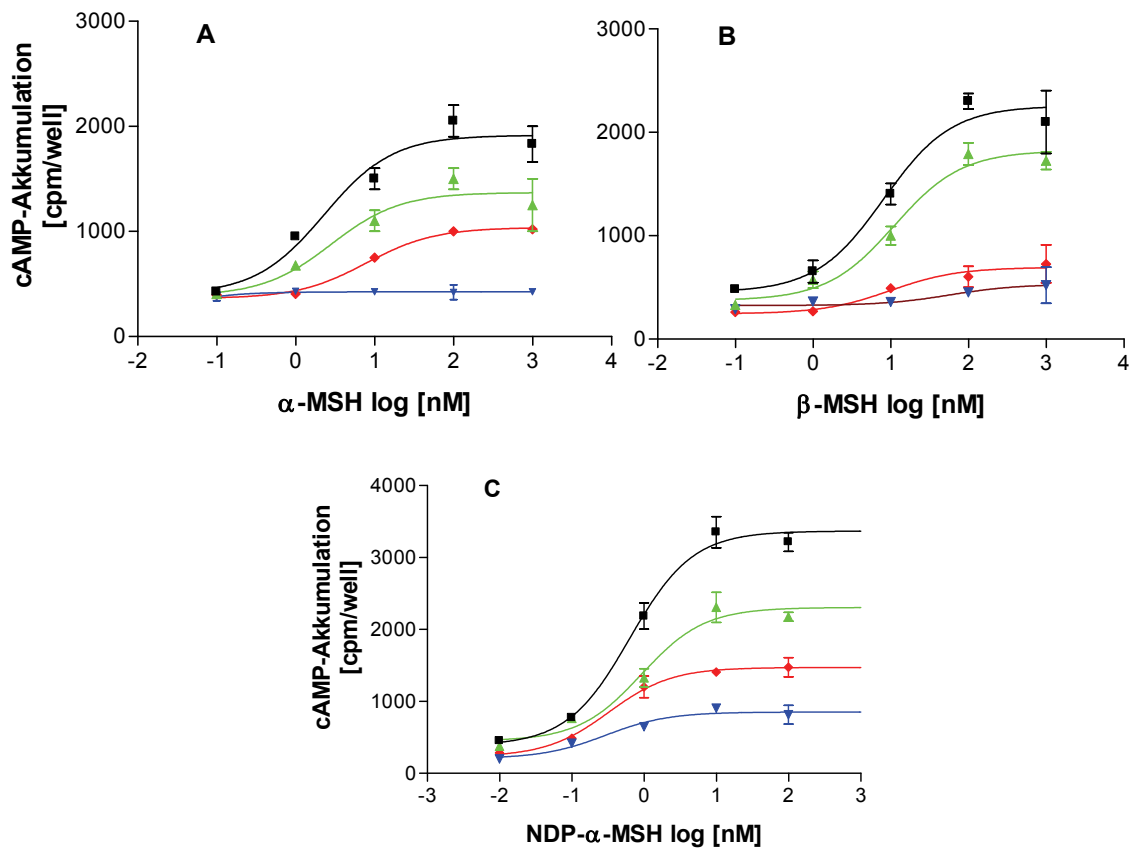
Diese beiden Experimente zeigen die Eignung des Systems auf und liefern den „proof of principle“ für den Überleseeffekt zumindest für die MC4R-Mutante W16X durch das im Standardkulturmedium enthaltene Aminoglykosid Streptomycin.

## 4.5 Signaltransduktionseigenschaften unter Aminoglykosideinfluß

### 4.5.1 Verbesserter Überleseeffekt durch Stimulation mit hochpotentem Agonisten

COS-7-Zellen wurden mit dem eukaryoten Expressionsplasmid pcDps transfiziert, welches die jeweils zu untersuchende Variante des MC4R trägt. Die Zellen wuchsen in Gegenwart des Aminoglykosides G418, zur Ermittlung der Dosiswirkungskurve wurden Zellen mit  $\alpha$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH stimuliert und die resultierende cAMP-Akkumulation gemessen. Die Ergebnisse der Stimulation mit dem natürlichen Liganden  $\alpha$ -MSH sind in Abb. 17A dargestellt. Ein qualitativ vergleichbares Ergebnis wurde ebenfalls durch Stimulation mit  $\beta$ -MSH erzielt (Abb. 17B). Sowohl MC4R W16X als auch MC4R Y35X zeigen ein Signalübertragungsverhalten, das einen Rezeptor mit Wildtyp-Verhalten charakterisiert: Die EC<sub>50</sub>-Werte liegen im gleichen Bereich, was eine identische Sensitivität bezüglich des Liganden auszeichnet. Die

Maximalakkumulationen unterscheiden sich hinsichtlich der Qualität der Überleserate und damit der Wiederherstellungsrate. Die höchste Überleserate zeichnet MC4R W16X aus, gefolgt von Y35X. Für MC4R E61X konnte in diesem Experiment keine funktionelle Wiederherstellung nachgewiesen werden.



**Abb. 17: Konzentrationswirkungskurven nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH im Vergleich**

Die Abbildung zeigt die Konzentrationswirkungskurven der drei MC4R-Stoppmutationen W16X, Y35X und E61X im Vergleich zum WT MC4R nach Behandlung mit 75  $\mu$ g/ml G418 und Stimulation mit  $\alpha$ -MSH (A),  $\beta$ -MSH (B) und NDP- $\alpha$ -MSH (C). Der WT ist mit schwarzer Kurve und quadratischen Symbolen, die Variante W16X mit grüner Kurve nach oben weisendem Dreieck, Y35X mit roter Kurve und Rautensymbol, E61X mit blauer Kurve und nach unten weisendem Dreieck dargestellt. Nach Agonistenstimulation werden unterschiedliche Maximalwerte in cAMP-Akkumulation bei identischen  $EC_{50}$ -Werten erreicht (Tabelle 6), wobei die cAMP-Akkumulation durch Signalübertragung des MC4R E61X-Konstruktes erst bei Verwendung von NDP- $\alpha$ -MSH messbare Werte erreicht.

**Tabelle 6: Konzentrationswirkungskurven nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH im Vergleich**

Die Tabelle zeigt die Werte der Konzentrationswirkungskurven der drei MC4R-Stoppmutationen W16X, Y35X und E61X im Vergleich zum WT MC4R nach Behandlung mit 75  $\mu$ g/ml G418 und Stimulation mit  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH. Im Vergleich der drei Agonisten zeigen sich unterschiedliche Maximalwerte der cAMP-Akkumulation bei identischen  $EC_{50}$ -Werten (Tabelle 6), wobei die Akkumulation durch Signalübertragung des MC4R E61X-Konstruktes erst bei Verwendung von NDP- $\alpha$ -MSH messbare Werte erreicht (n.d.=nicht mit ausreichender Genauigkeit nachweisbar).

Konstrukt	$\alpha$ -MSH		$\beta$ -MSH		NDP- $\alpha$ -MSH	
	$E_{max}/E_{maxWT}$	$EC_{50}$	$E_{max}/E_{maxWT}$	$EC_{50}$	$E_{max}/E_{maxWT}$	$EC_{50}$
	[%]	[nM]	[%]	[nM]	[%]	[nM]
MC4R WT	100	2,3	100	8,1	100	0,63
MC4R W16X	71 $\pm$ 12	2,8 $\pm$ 0,8	81 $\pm$ 17	11,1 $\pm$ 2,6	68 $\pm$ 22	0,92 $\pm$ 0,12
MC4R Y35X	54 $\pm$ 8	7,8 $\pm$ 2,3	31 $\pm$ 9	9,8 $\pm$ 1,4	44 $\pm$ 11	0,33 $\pm$ 0,06
MC4R E61X	22 $\pm$ 4	n.d.	26 $\pm$ 4	n.d.	25 $\pm$ 10	0,29 $\pm$ 0,09

Deshalb wurde in den folgenden Experimenten zur Rezeptorstimulation der hochpotente MC4R-Agonist NDP- $\alpha$ -MSH ausgewählt. Abb. 17C zeigt im Ergebnis ein ähnliches Verhalten wie bereits für  $\alpha$ -MSH beschrieben, allerdings unter Berücksichtigung der zwischen diesen beiden Agonisten typischen Unterschiede: Eine leicht erhöhte Maximalakkumulation von cAMP bei gleichzeitig geringerer Ligandenkonzentration (Verschiebung der Konzentrationswirkungskurve zu niedrigeren Ligandenkonzentrationen) bei Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH im Vergleich zur Stimulation mit  $\alpha$ -MSH. Allerdings zeigen diese Experimente, dass ebenso für den Rezeptor MC4R E61X der Mechanismus der aminoglykosidvermittelten Funktionsherstellung gültig ist, nur ist ein hochpotenter Ligand notwendig, um die cAMP-Akkumulation auf Werte im messbaren Bereich zu stimulieren.

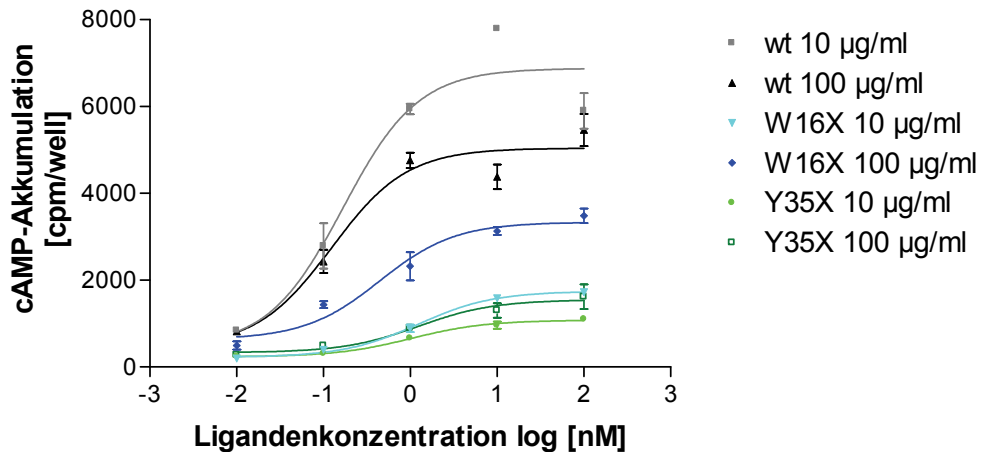
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden der Agonist NDP- $\alpha$ -MSH zur Rezeptorstimulation verwendet, um klarere und deutlichere Ergebnisse zu erhalten.

#### 4.5.2 Untersuchung des Einflusses der G418-Konzentration

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Experimente zur Ermittlung des Einflusses unterschiedlicher applizierter Konzentrationen des Aminoglykosids G418 dargestellt. G418 wurde gewählt, da es den stärksten Effekt auf das Überlesen und die damit verbundene Expression des vollständigen MC4R-Proteins besitzt. COS-7-Zellen

wurden wie unter 3.2.6 beschrieben angezogen und wie unter 3.2.8.2 beschrieben die intrazelluläre cAMP-Akkumulation nach Stimulation mit dem hochpotenten Liganden NDP- $\alpha$ -MSH als Dosiswirkungskurve bestimmt. 24h vor Stimulation wurde den Zellen das Aminoglykosid G418 in den Konzentrationen 10, und 100  $\mu\text{g/ml}$  appliziert. Die Mutante MC4R W16X zeigt in Abb. 18 im Vergleich zum Wildtyp eine deutliche cAMP-Formation von etwa der halben Intensität verglichen mit der cAMP-Akkumulation der den Wildtyp exprimierenden Zellen. MC4R Y35X zeigt eine gegenüber W16X verminderte allerdings deutliche cAMP-Formation sowohl bei 10 als auch bei 100  $\mu\text{g/ml}$  G418-Gabe.

Weiterhin zeigt dieses Experiment in aller Deutlichkeit den toxischen Effekt, den eine G418-Gabe, insbesondere bei höherer Konzentration, auf das verwendete Zellsystem besitzt. Die Wildtyp cAMP-Akkumulation nimmt deutlich von 10  $\mu\text{g/ml}$  G418 zu 100  $\mu\text{g/ml}$  G418 ab. Dies korreliert mit dem visuellen Bild der Zellen in lichtmikroskopischer Betrachtung vor Durchführung der Stimulationsexperimente. Wildtypzellen mit hoher Aminoglykosidkonzentration versetzt zeigen 24h später ein deutlich in ihrer Vitalität vermindertes Bild, vermehrt abgeschwommene tote Zellen und deutlich weniger große sich teilende Zellen. Daher ist die in Abb. 18 beschriebene verminderte cAMP-Bildung auf die niedrigere Zelldichte verursacht durch die toxische Wirkung des G418 zurückzuführen. Für die beiden MC4R-Varianten W16X und Y35X zeigt sich hingegen ein entgegengesetztes Bild. Die höheren G418-Konzentrationen führen in beiden Fällen auch zu einer höheren cAMP-Formation nach Stimulation. Dies interpretiere ich mit einer Überlagerung beider Effekte: der Verminderung der cAMP-Akkumulation aufgrund des soeben beschriebenen toxischen Effektes und einer Zunahme der cAMP-Bildung durch die höhere Überlebensrate infolge der höheren G418-Konzentration, wobei der zweite Effekt überwiegt, und somit der in höherer Überlebensrate begründete Nutzen der höheren G418-Konzentration den Nachteil der Toxizität überwiegt.



**Abb. 18: Auswirkungen unterschiedlicher G418-Konzentrationen auf die cAMP-Akkumulation in MC4R-WT, W16X und Y35X exprimierenden COS-7-Zellen**

Die Abbildung zeigt die cAMP-Akkumulation der MC4R-Mutationen W16X und Y35X sowie den MC4R-WT exprimierenden COS-7-Zellen, die 24 h vor der Stimulation mit 100 nM NDP- $\alpha$ -MSH mit 10  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml G418 behandelt wurden. Die toxische Wirkung des Antibiotikums mit zunehmender Konzentration ist an der Absenkung der Maximalstimulation des WT bei Gabe von 100  $\mu$ g/ml im Vergleich zu 10  $\mu$ g/ml G418 zu erkennen. Trotz der aufgrund dieser Toxizität verminderten Gesamtzellzahl lässt sich sowohl bei der W16X-Mutante als auch in geringerem Umfang bei der Y35X-Mutante bei höherer G418-Konzentration eine stärkere maximale Stimulierbarkeit beobachten.

Die Kurven unterscheiden sich in den Werten ihrer Maximalstimulation, nicht aber in den EC50-Werten (Tabelle 7). Somit wurde gezeigt, daß sich die wiederhergestellten Rezeptoren MC4R W16X und MC4R Y35X vom Wildtyp lediglich in der Signalübertragungsintensität in Abhängigkeit von der Überleserate, nicht aber in den Eigenschaften bezüglich der Sensitivität bezüglich des Liganden unterscheiden. Die wiederhergestellten Rezeptoren zeigen Signalübertragungseigenschaften vergleichbar dem Wildtyprezeptor.

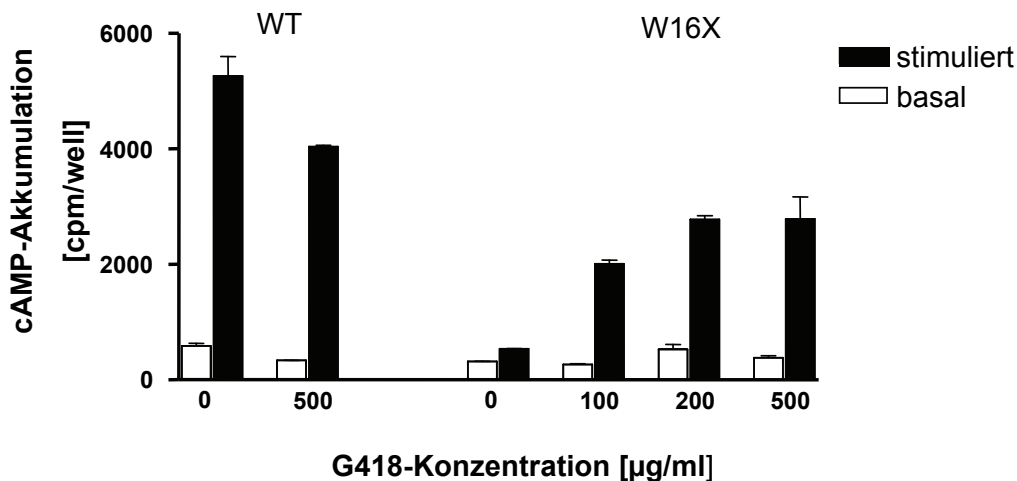


**Tabelle 7: Auswirkungen unterschiedlicher G418-Konzentrationen auf die cAMP-Akkumulation in MC4R-WT, W16X und Y35X exprimierenden COS-7-Zellen**

Es sind die Werte der cAMP-Akkumulation von COS-7-Zellen gezeigt, welche die MC4R-Mutationen W16X und Y35X sowie den MC4R-WT exprimieren. 24 h vor der Stimulation mit 100 nM NDP- $\alpha$ -MSH wurden diese mit 10  $\mu$ g/ml bzw. 100  $\mu$ g/ml G418 behandelt.

Konstrukt	NDP- $\alpha$ -Konzentration	$E_{\max}/E_{\max\text{WT}/10\mu\text{g/ml}}$	$EC_{50}$
	[ $\mu$ g/ml]	[%]	[nM]
MC4R WT	10	100	$0,17 \pm 0,07$
	100	$73 \pm 26$	$0,12 \pm 0,06$
MC4R W16X	10	$25 \pm 8$	$1,23 \pm 0,36$
	100	$48 \pm 13$	$0,45 \pm 0,20$
MC4R Y35X	10	$15 \pm 7$	$1,02 \pm 0,41$
	100	$23 \pm 6$	$1,25 \pm 0,48$

Zur Untersuchung des bezüglich einer funktionellen Wiederherstellung wirksamen Anwendungsbereiches der G418-Gabe wurden COS-7-Zellen wie unter 3.2.6 beschrieben angezogen, mit 0, 100, 200 und 500  $\mu$ g/ml G418 versetzt und zur Bestimmung der maximalen cAMP-Akkumulation 3 Tage nach Zellanzucht mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH stimuliert.

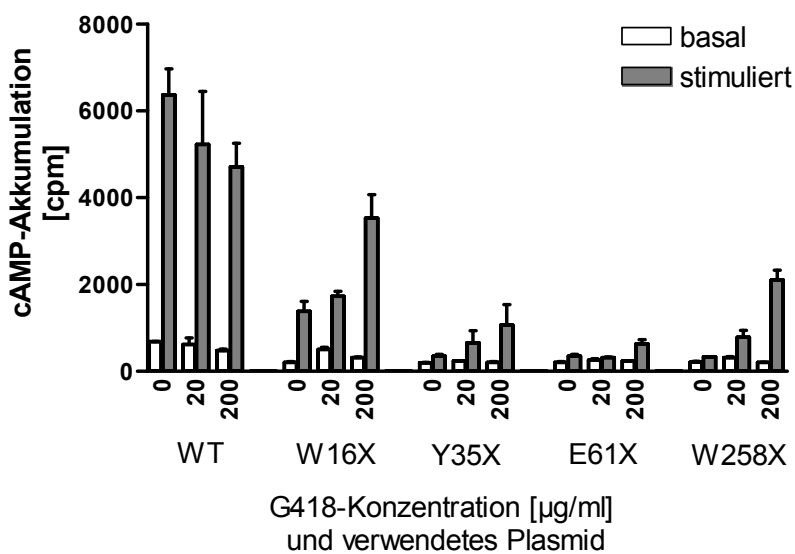


**Abb. 19: Stimulation von MC4R W16X mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH und verschiedenen G418-Konzentrationen**

COS-7-Zellen wurden mit MC4R WT und W16X-Plasmiden transfiziert und ohne Aminoglykosid bzw. 200  $\mu$ g/ml G418 (WT) und ohne Aminoglykosid, sowie mit 100, 200 und 500  $\mu$ g/ml G418 für drei Tage bebrütet und danach die cAMP-Akkumulation wie in 3.2.8.2 beschrieben bestimmt. Basale cAMP-Akkumulation ist mit weißen Balken, mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH stimulierte cAMP-Akkumulation mit schwarzen Balken dargestellt.

Abb. 19 zeigt die maximale cAMP-Akkumulation sowie die zugehörigen basalen cAMP-Akkumulationen für den Wildtyprezeptor und die Mutante MC4R W16X. Bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml G418 wird eine stete Zunahme der cAMP-Akkumulation bei Maximalstimulation verzeichnet, bei höheren Konzentrationen lässt sich dieser Effekt nicht weiter steigern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde im Folgenden mit G418-Konzentrationen bis maximal 200 µg/ml gearbeitet.

Die vier untersuchten MC4R Stoppvarianten zeigen im Vergleich im wirksamen Bereich der G418-Behandlung deutliche Unterschiede in der maximalen cAMP-Akkumulation (Abb. 20). Die Experimente wurden wie unter 3.2.6 beschrieben durchgeführt, die Zellen 24h vor Stimulation mit 0, 20 und 200 µg/ml G418 versetzt. 200 µg wurde als Maximalkonzentration gewählt, da vorangegangene und obig beschriebene Experimente aufgezeigt haben, dass oberhalb einer G418-Konzentration von 200 µg/ml keine gesteigerte cAMP-Maximalakkumulation erwartet werden kann. Die höchste Überleserate und damit cAMP-Akkumulation wurde bei Stimulation der W16X-Variante erzielt.



**Abb. 20: Einfluß verschiedener G418-Konzentrationen auf die Signalübertragung der untersuchten Stoppmutanten**

COS-7-Zellen wurden mit den in der Abbildung angegebenen Plasmiden transfiziert und ohne Aminoglykosid (jeweils linkes Balkenpaar einer Dreiergruppe), mit 20 µg/ml G418 (mittleres Balkenpaar) und mit 200 µg/ml G418 (rechtes Balkenpaar) für drei Tage bebrütet und danach die cAMP-Akkumulation wie in 3.2.8.2 beschrieben bestimmt. Basale cAMP-Akkumulation ist mit weißen Balken, mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH stimulierte cAMP-Akkumulation mit schwarzen Balken dargestellt.

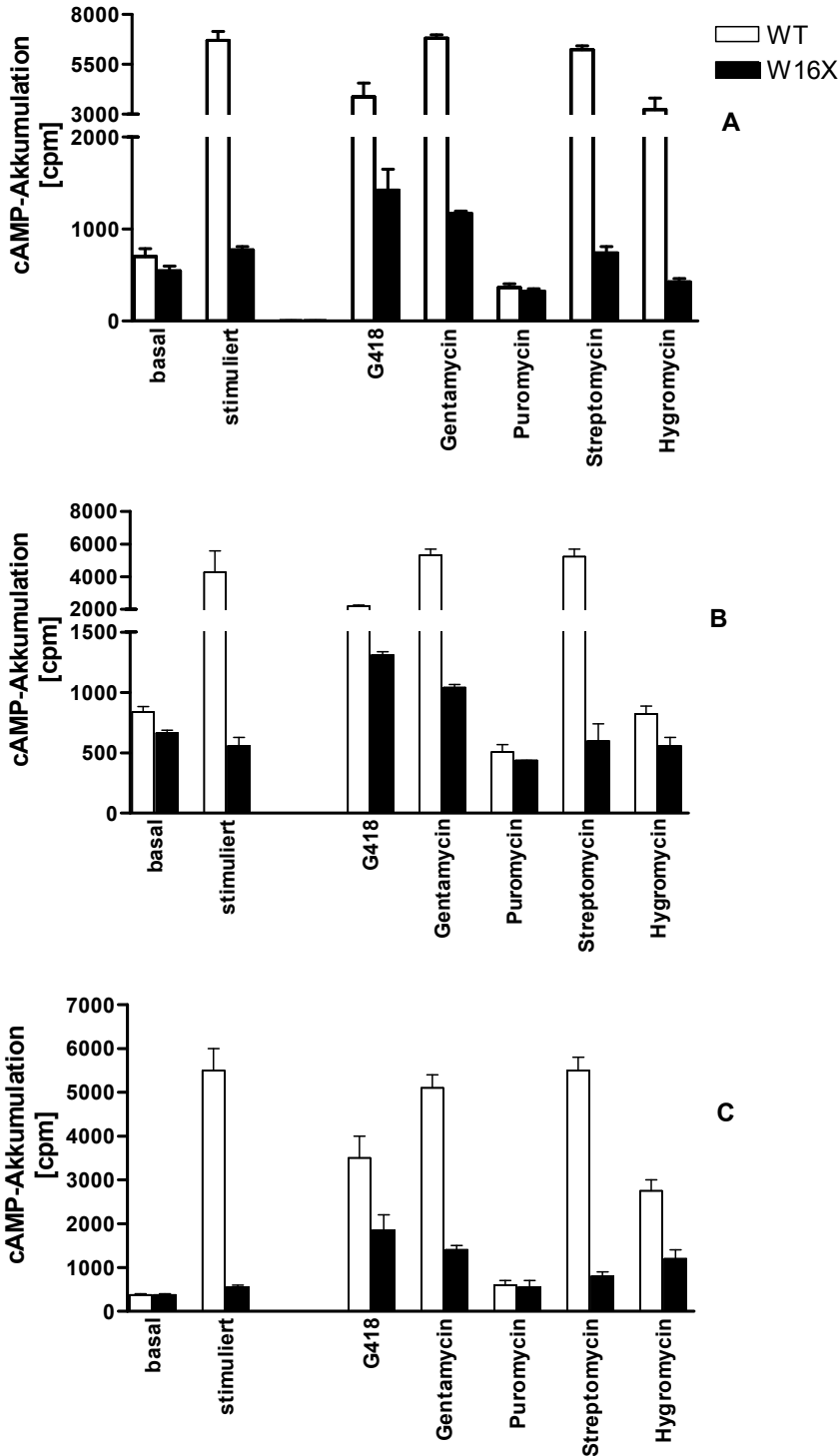
Hier wurde bei Stimulation mit 10 mM NDP- $\alpha$ -MSH eine cAMP-Akkumulation von 3/4 der Wildtyp-Maximalakkumulation erreicht. Obwohl diese Werte für die übrigen MC4R-Varianten sehr viel niedriger liegen, ist sowohl bei der Variante Y35X als auch bei W258X ein deutlicher Überleseeffekt bei höheren G418-Konzentrationen zu erkennen. Lediglich für E61X liegen die Werte nach Stimulation im Bereich der Aktivität der nicht G418-behandelten Zellen. Wo diese leichte Grundaktivität herrührt, wird später zu diskutieren sein.

#### **4.5.3 Einfluß unterschiedlicher Aminoglykoside auf die Signaltransduktions-eigenschaften**

Zur Untersuchung der Aminoglycosid-vermittelten funktionellen Wiederherstellung der Rezeptoraktivität wurden verschiedene Vertreter der Antibiotikaklasse der Aminoglycoside untersucht. Neben dem in der Literatur beschriebenen und in vorangegangenen Arbeiten verwendeten G418 wurde das zu therapeutischen Zwecken zumeist angewandte Gentamycin für Überleeseexperimente verwendet, als auch Puromycin, Hygromycin und das in der Zellkultur zum Schutz der eukaryoten Zellen vor prokaryoter Kontamination benutzte Streptomycin.

COS-7-Zellen wurden mit MC4R W16X und dem WT transfiziert, mit jeweils 150  $\mu$ g/ml der genannten Aminoglycoside behandelt und 24h später nach Stimulation mit 10nM NDP- $\alpha$ -MSH sowie 100 nM  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH die maximale cAMP-Akkumulation bestimmt.

Die höchste Signalübertragungsrate zeigte in allen Experimenten das Aminoglycosid G418, gefolgt von Gentamycin. Unterschiede zeigen sich auch in der cAMP-Akkumulation beim Aminoglycosid-behandelten WT. Hier zeigt sich, dass Gentamycin und Streptomycin bei der verwendeten Konzentration von 150  $\mu$ g/ml keinen nachweisbaren toxischen Effekt auf die verwendeten COS-7-Zellen haben. G418 wirkt leicht, Hygromycin und insbesondere Puromycin hingegen wirken stark inhibierend auf die Zellen, so dass auch die Signalübertragungsrate stark abgesenkt ist. Insgesamt sind die Ergebnisse qualitativ unabhängig von der Wahl des Agonisten und unterscheiden sich nur quantitativ infolge der Wahl von  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH oder NDP-  $\alpha$ -MSH als Liganden.



**Abb. 21: Überleserate bei verschiedenen Aminoglykosiden**

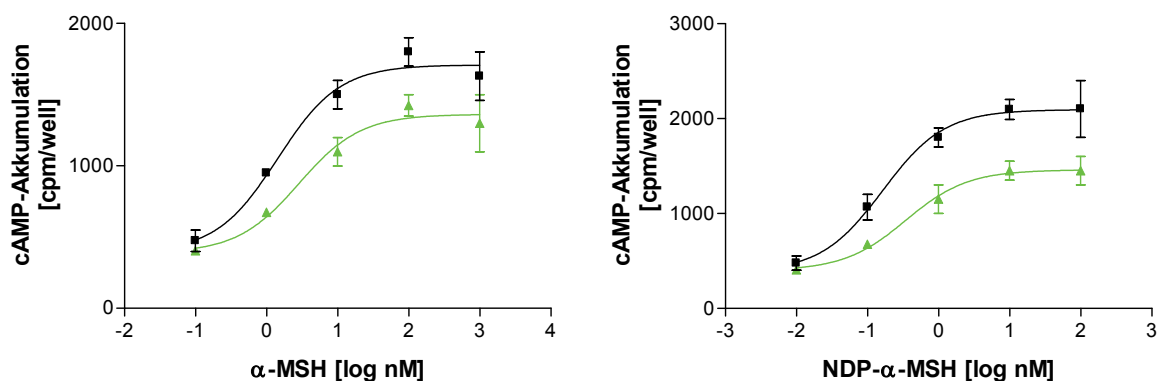
COS-7-Zellen wurden mit MC4R WT und W16X-Plasmiden transfiziert und ohne Aminoglykosid bzw. mit jeweils 150  $\mu\text{g/ml}$  G418, Gentamycin, Puromycin, Streptomycin und Hygromycin versetzt und 24h später die cAMP-Akkumulation wie in 3.2.8.2 beschrieben bestimmt. Stimuliert wurde mit 100 nM  $\alpha$ -MSH (Graphik A), 100 nM  $\beta$ -MSH (Graphik B) und mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH (Graphik C). Die cAMP-Akkumulation der WT-exprimierenden Zellen sind mit weißen Balken, die der W16X-exprimierenden Zellen mit schwarzen Balken dargestellt.

## 4.6 Funktionelle Wiederherstellung der Rezeptoraktivität im Mausmodell

Die im vorangegangenen beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß eine funktionelle Wiederherstellung der Rezeptoraktivität für den MC4R *in vitro* im verwendeten Zellsystem mit COS-7-Zellen funktioniert. Es wurde weiterhin gezeigt, daß funktionell aktives in voller Länge translatiertes Protein exprimiert wird. Damit drängen sich nun weitere Fragen auf:

Wie verhält sich dieser Mechanismus *in vivo*? Kann eine Aminoglykosidgabe *in vivo* als therapeutischer Ansatz zur Behandlung Stoppmutations-verursachter Adipositas in Betracht gezogen werden?

Der Grundstein hierfür ist durch die vorliegende Arbeit gelegt. Zur Beantwortung dieser Fragen soll diese Arbeit in einem MC4R W16X-knock-in-Mausmodell fortgeführt werden. Hierzu wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Klingenspor, TU München, initiiert. Das mMC4R W16X-Plasmid ist kloniert, die Konstruktion der transgenen Maus ist derzeit im Rahmen des NGFN-Netzwerkes in welches auch diese Arbeit integriert ist im Gange.

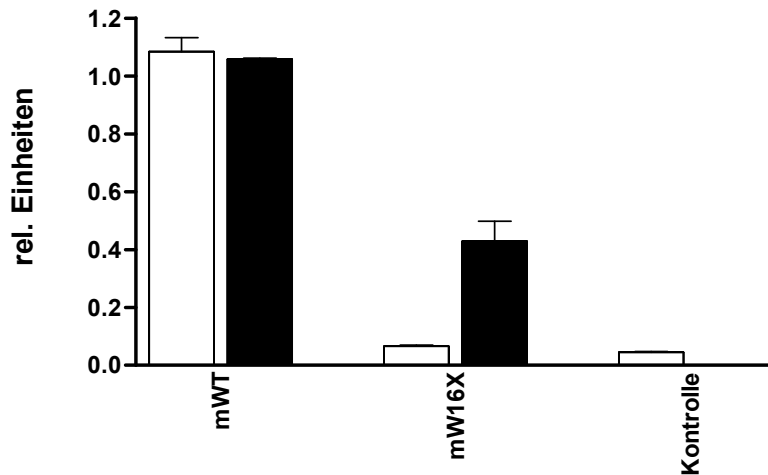


**Abb. 22: Signalübertragung von mMC4R W16X nach Inkubation mit G418**

Die Abbildung zeigt die Konzentrationswirkungskurven der mMC4R (Maus)-Stoppmutationen W16X im Vergleich zum WT mMC4R nach Behandlung mit 150 µg/ml G418 und Stimulation mit  $\alpha$ -MSH (linker Graph) und NDP- $\alpha$ -MSH (rechter Graph). Der WT ist mit schwarzer Kurve und quadratischen Symbolen, die Variante W16X mit grüner Kurve und nach obenweisendem Dreieck dargestellt. Bei beiden Agonisten findet eine partielle Wiederherstellung bei identischem  $EC_{50}$ -Werten (s. Tabelle 8) der Rezeptoraktivität der Variante mMC4R W16X statt.

Die funktionelle Charakterisierung des mMC4R W16X-Konstruktes verlief analog zu der des humanen MC4R W16X-Konstruktes wie obig beschrieben und dargestellt. Die Ergebnisse sind ebenso denen des humanen MC4R vergleichbar: Sowohl mit  $\alpha$ -MSH als auch mit NDP- $\alpha$ -MSH stimuliert zeigt dieser Rezeptor in der

Konzentrationswirkungskurve deutlich eine wiederhergestellte Rezeptoraktivität mit einem  $EC_{50}$ -Wert vergleichbar dem des WT-Rezeptors (Abb. 22 und Tabelle 8).



**Abb. 23: mMC4R-Gesamtexpression**

COS-7-Zellen wurden mit den C-terminal FLAG-markierten Plasmiden mMC4R WT, mMC4R W16X sowie einem unmarkierten Kontrollplasmid transfiziert und ohne Aminoglykosid (weiße Balken) bzw. mit 150 µg/ml G418 versetzt (schwarze Balken) und 24h später die Menge translatierten mMC4R-Proteins wie in 3.2.9.2 beschrieben über einen Immunoassay gegen die C-terminale FLAG-Domäne des mMC4R-Konstruktes bestimmt.

Ebenso ist im MC4R-Gesamtexpressions-ELISA die Bildung des full-length-mMC4R-Proteines nachgewiesen (Abb. 23). Nach Stimulation der im Experiment zur Verwendung kommenden COS-7-Zellen nach Zusatz von 150 µg/ml G418, einer Konzentration, wie sie auch in den Experimenten mit dem humanen Rezeptor Anwendung gefunden hat, wurde ebenfalls für den MC4R W16X der Maus die Translation des vollständigen MC4R gezeigt.

**Tabelle 8: Signalübertragung von mMC4R W16X unter G418-Einfluß**

Es sind die Werte der cAMP-Akkumulation von COS-7-Zellen gezeigt, welche die MC4R-Mutationen W16X (Maus) sowie den mMC4R-WT exprimieren. 24 h vor der Stimulation mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH bzw. 100nM  $\alpha$ -MSH wurden diese mit 150 µg/ml G418 behandelt.

Konstrukt	$\alpha$ -MSH			NDP- $\alpha$ -MSH		
	$E_{max}/E_{maxWT}$ [%]	$E_{max}$ cpm	$EC_{50}$ [nM]	$E_{max}/E_{maxWT}$ [%]	$E_{max}$ cpm	$EC_{50}$ [nM]
mMC4R WT	100	1708 ± 178	1,4 ± 0,4	100	2094 ± 208	0,16 ± 0,05
mMC4R W16X	80 ± 14	1362 ± 152	2,8 ± 0,6	70 ± 8	1460 ± 84	0,34 ± 0,12

## 5 Diskussion

### 5.1 MC4R-Mutationen als Ursache der Adipositas

Nachdem der weltweit rapide Anstieg der Adipositas in den Industrienationen augenfällig wurde und die Schwellenländer in dieser Hinsicht bereits nachziehen, sind eine Vielzahl von Kandidatengenomen zur Begünstigung eines adipösen Phänotyps identifiziert worden. Der wichtigste Signalweg in der Gewichtsregulation ist der Leptin-Melanocortin-Weg. Dieser beinhaltet die wichtigsten Kandidatengene mit allerdings sehr selten vorkommenden Mutationen im Leptingen und den Genen für den Leptinrezeptor, POMC und Prohormonconvertase-1, die allesamt zu syndromaler Adipositas führen.

Nachdem ein Defekt im Leptingen (Farooqi et al., 1999) als Ursache der Adipositas identifiziert wurde, glaubte man, die Ursache der Adipositas zu kennen, und diese mittels Leptingabe behandeln zu können. Im beschriebenen Fall erreichte der Patient in der Tat auch nach wenigen Monaten ein Normalgewicht. Schnell jedoch stellte sich heraus, dass nur sehr wenige Patienten von einer Mutation im Leptingen betroffen sind. Weiterhin haben adipöse Personen aufgrund ihres großen Adipozytendepots auch hohe Leptinspiegel, wodurch es zur Leptinresistenz kommt. Hier muß eine Behandlung mit Leptin fruchtlos bleiben. Der Rezeptor verliert seine Sensitivität für Leptin, der Rezeptor wird leptinresistent. Nach jüngeren Erkenntnissen ist ein möglicher zugrunde liegender Mechanismus in der Rückkoppelung des aufgrund der Signalierung transkribierten Moleküles begründet: Leptin bindet an den LEPR was zur Aktivierung einer Jak2-Tyrosinkinase führt, die wiederum über die Phosphorylierung einer Tyrosindomäne den Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Dieser induziert die Transkription von SOCS3, welches inhibitorisch auf diesen Signalweg rückkoppelt und derart bei hoher Konzentration von SOCS3 verursacht durch hohe Leptinkonzentration zu einer Hinunterregulierung dieses Signalweges führt (Münzberg et al., 2005). Die einzige Möglichkeit, in den Signalweg korrigierend einzugreifen, liegt beim nächsten down-stream-Effektor des Leptinrezeptors. Dies ist auf der anorexigenen Seite der hypothalamischen Gewichtsregulation der MC4R. Die natürlichen Liganden des MC4R,  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH werden aus POMC prozessiert, wobei  $\alpha$ -MSH durch PC-1 und PC-2 über die Zwischenstufe ACTH gebildet wird.

Fehm und Mitarbeiter versuchten 2001 durch intranasale Applikation von ACTH(4-10) eine Gewichtsreduktion in einem Normalkollektiv zu erreichen, allerdings

nur mit marginalem Resultat. In unserer Klinik wurde daraufhin eine Studie an Patienten mit POMC-Defizienz durchgeführt. Hier konnte allerdings eine intranasale ACTH(4-10)-Gabe keine Gewichtsreduktion bewirken (Krude et al., 2003). Laut Adan und Mitarbeitern (1994) beträgt die Affinität von ACTH(4-10) für den MC4R nur 1/1000 der von  $\alpha$ -MSH, was dieses Resultat erklären könnte. Daher empfiehlt sich als mögliche Therapieoption die Stimulation des MC4R mit einem hochpotenten Agonisten.

Weitere Kandidaten des Leptin-Melanocortinweges, in denen Mutationen als Ursache der Adipositas nachgewiesen wurden, sind neben Leptin (Farooqi et al., 1999) der Leptinrezeptor (Clement et al., 1998; Farooqi et al., 2007), POMC (Krude et al., 1998; Hinney et al., 1998; Krude et al., 2003). und PC1 (O'Rahilly et al., 1995; Jackson et al., 1997). Mutationen in diesen Genen führen zu syndromaler Adipositas. Eine Ausnahme bildet der MC4R. Ist dieser beeinträchtigt resultiert dies in nichtsyndromaler monogener Adipositas.

MC4R-Mutationen sind in etwa 2-6 % adipöser Patienten als genetische Ursache der Erkrankung erkannt worden (Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998; Lubrano-Berthelie et al., 2003; Farooqi et al., 2003; Larsen et al., 2005; Hinney et al., 2006) und stellen somit den größten Anteil an der Ursache schwerer früh manifester Adipositas (Farooqi et al., 2000; Vaisse et al., 2000; MacKenzie et al., 2006). Die Kenntnis des molekulargenetischen Hintergrundes allerdings ist die Voraussetzung zur Entwicklung therapeutisch wirksamer Agenzien. Damit bietet zur Zeit der MC4R den besten Angriffspunkt für eine therapeutische Strategie.

Bei den beschriebenen Mutationen im Gen des MC4-Rezeptors handelt es sich zumeist um missense-Mutationen, Leseraster-Mutationen sind weniger häufig. Die in Europa prädominante MC4R-Mutation ist die in Familien aus Deutschland (Hinney et al., 1999; Hinney et al., 2003; ein Patient aus unserer Klinik), Großbritannien (Farooqi et al., 2004) und Dänemark (Larsen et al., 2005) auftretende nonsense-Mutation Y35X, die sich in allen Fällen als Doppelmutation im Haplotyp Y35X/D37V manifestiert und zu vorzeitiger Termination der Proteinsynthese und damit zu vollständigem Funktionsverlust des Rezeptors führt.

Aufgrund dieses gehäuften Auftretens von ursächlich verantwortlichen MC4R-Mutationen bei der Genese adipöser Phänotypen lag es nahe, im Bemühen um



therapeutische Maßnahmen zur Bekämpfung der Folgen der Adipositas, einen möglichen therapeutischen Weg in der Wiederherstellung der herabgesetzten MC4R-Funktion zu suchen. Dies setzt eine genaue Kenntnis der funktionellen und strukturellen Eigenschaften des Rezeptors und seiner Wirkungsweise voraus. Natürlich vorkommende Mutationen sind dabei ein geeignetes Hilfsmittel, um über funktionelle Studien Informationen zum Wirkungsmechanismus veränderter Rezeptorstruktur zu erlangen (Schöneberg et al., 2004).

Diese Arbeit setzt sich hierbei zum Ziel, die Wiederherstellung der Signaltransduktionseigenschaften vollständig inaktivierender Mutationen zu untersuchen, wie sie infolge eines prämaternen Stopp-codons in der am häufigsten auftretenden MC4R-Mutation, der Variante Y35X vorliegen. Dazu wurden neben dieser Variante im Rahmen dieser Arbeit noch drei weitere MC4R-Varianten untersucht: W16X, E61X und W258X.

Die Sequenzierung der kodierenden Bereiche zeigte, dass die Mutationen heterozygot ausgeprägt waren, und daß durch diese drei Mutationen alle drei existierenden Stoppcodons repräsentiert sind (ochre-TAA, amber-TAG und opal-TGA) (Tabelle 5). Diese befinden sich in der N-terminalen extrazellulären Domäne (W16X und Y35X) und in der ersten (E61X) und sechsten (W258X) Transmembrandomäne (Abb. 12).

Diese Arbeit möchte neben dem Nachweis der funktionellen Wiederherstellung von durch Stoppmutationen unterbrochenen MC4R zusätzlich einen Beitrag zum Verständnis des zugrunde liegenden Mechanismus leisten. Daher wurde Wert darauf gelegt, daß die untersuchten Mutationen alle existierenden Stoppcodi repräsentieren, und zusätzlich sowohl in hochkonservierten als auch niedrig konservierten Bereichen des MC4R liegen, um eine Aussage über topologische Effekte im Mechanismus der Funktionswiederherstellung gewinnen zu können. Daher wurde zu den drei natürlichen Mutationen noch eine weitere artifizielle MC4R-Stoppmutation hergestellt und in die Untersuchungen aufgenommen, die Variante W258R, da diese wie auch die Variante W16X das leicht zu überlesende Codon opal aufweist, allerdings nicht wie W16X in der wenig konservierten N-terminalen Domäne liegt, sondern in einer Region mit mutmaßlicher funktioneller Relevanz jeder einzelnen Aminosäure – in der vorletzten Transmembrandomäne. Damit liefert diese Variante eine in den übrigen drei Mutationen nicht vertretene Kombination aus leicht überlesbarem Codon und einer Funktionswiederherstellung sich widersetzender Topologie.

Der Nachweis, dass ein translationaler Überleseeffekt stattfindet und MC4R-Protein nicht nur in voller Länge, sondern als funktionell aktiver Rezeptor gebildet wurde, ist mit Hilfe folgenden experimentellen Konzeptes geführt worden: Der Nachweis eines in voller Länge translatierten MC4R-Proteins wurde durch Nachweis einer C-terminalen FLAG-Markierung im MC4R-Gesamtexpressions-ELISA erbracht, mit Hilfe eines Oberflächen-ELISA wurde die Oberflächenexpression des MC4R-Proteins gemessen, und es wurde der Nachweis der funktionellen Aktivität des Proteins durch Messung der cAMP-Produktion nach Agonistenstimulation geführt. Die Ergebnisse der entsprechenden Experimente werden im Folgenden diskutiert:

## **5.2 Aminoglycosid-vermittelte Wiederherstellung der MC4R-Funktion**

Bereits 1964 wurde von Gorini und Kataja ein *E.coli*-Stamm beschrieben, der nur in Gegenwart von Streptomycin in der Lage war, das Enzym Ornithintranscarbamylase zu synthetisieren. Sie schlussfolgerten richtig, daß Streptomycin die Enzymsynthese unterstützt und daß diese „phänotypische Reparatur“ auf Translationsebene erfolgt, konnten den Mechanismus aber nicht weitergehend klären. 1985 wurde von Burke und Mogg erstmalig gezeigt, dass Aminoglykoside ebenfalls in Säugerzellen einen Überleseeffekt auslösen. Kürzlich wurde eine Aminoglykosid-vermittelte Wiederherstellung von durch Stoppmutationen vorzeitig terminierter Proteine in verschiedenen Krankheiten wie cystischer Fibrose und Muskeldystrophie Duchenne *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Tabelle 3). Keine Arbeit hat sich jedoch bisher dem Thema des Phänotyps der Adipositas als Folge prämaturer Stoppcodons in Kandidatengen der Adipositas beschäftigt. Diese Lücke möchte diese Arbeit schließen und beschäftigt sich daher eingehend mit dem Aminoglykosid-vermittelten Überlesen von Stoppmutationen im MC4R-Gen.

### **5.2.1 MC4R-Expression**

Die Expression von MC4R-Protein in voller Länge wurde durch Nachweis einer C-terminalen FLAG-Markierung gemessen. Ohne Aminoglykosidbehandlung kann mit Ausnahme des Wildtyps kein MC4R-Protein nachgewiesen werden (Abb. 13). Dieses Ergebnis ist zu erwarten. Unter Einfluß des Aminoglykosides G418 konnte für alle

vier untersuchten MC4R-Stopp-Varianten ein in voller Länge translatierter MC4R nachgewiesen werden. Die Mengen der vollständig exprimierten MC4R-Moleküle der Varianten MC4R W16X und W258X erreichen hierbei sogar  $\frac{2}{3}$  bzw.  $\frac{1}{2}$  des Wildtypniveaus, gefolgt von Y35X und E61X mit etwa  $\frac{1}{3}$  des Wildtypniveaus. In beiden Fällen, in denen das Stoppcodon opal vorlag, wurde ein deutlich höherer Überleseeffekt durch das Aminoglycosid G418 stimuliert, als für ochre und amber, wobei das Kodon ochre die niedrigste Aminoglykosid-vermittelte Überleserate zulässt. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Überleseeffizienz von der Art des Stoppcodons abhängig ist. Dies zeigten bereits 2002 Keeling und Bedwell, sowie Keeling und Mitarbeiter 2004. Sie fanden für das Stoppcodon TGA eine Überleserate von 2% auch ohne Anwesenheit von Aminoglykosiden.

Infolge der Aminoglykosidbehandlung wird eine erhöhte Menge funktionstüchtigen Proteines der korrekten Länge produziert, wenn auch nur in geringerem Anteil als dies bei dem Wildtyp der Fall ist. Es ist jedoch zu erwarten, dass dieser Effekt sich signifikant zumindest bei rezessiven Störungen auswirkt, wenn diese aus nonsense-Mutationen resultieren, wo die translatierte Proteinmenge gegen Null geht. In solchem Fall ist selbst 1 % der normalen Proteinmenge eventuell in der Lage, einen klinisch weniger ausgeprägten oder sogar nahezu normalen Phänotyp wiederherzustellen (Maire et al., 2001). Der MC4R zeichnet sich durch die Exhibition eines Gendosiseffektes aus (Huszar et al., 1997), sodaß diese Betrachtung auch für eine potentielle Aminoglykosidtherapie am MC4R als gültig angenommen werden kann.

Desweiteren ist für die effektive Translationstermination die Position +4 von Bedeutung. Nach Salas-Marco & Bedwell, 2005, wird der Abbruch der Translation durch ein Verschieben des Verhältnisses von miteinander in Wettbewerb stehenden release-Faktoren und Elongationsfaktoren bewirkt.

Cytosin und Adenin direkt dem Stoppcodon TGA folgend begünstigen ein Überlesen eher als Guanin und Thymin. Dem Stoppcodon der Mutation W16X folgt ein Adenin (Tabelle 5). Das Überlesen des Stoppcodons TAA der Mutation Y35X ist ebenfalls möglich, allerdings mit wesentlich niedrigerer cAMP-Akkumulationsrate, verglichen mit W16X. Nach Poole und Mitarbeitern (1995) stellt TAA das übliche Stoppcodon hochexprimierter Gene dar. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um das effektivste der drei möglichen Stoppcodons handelt.

## 5.2.2 Oberflächenexpression von MC4R-Stoppmutationen

Selbst wenn das MC4R-Protein vollständig translatiert wurde, ist eine Signalübertragung des Rezeptors trotzdem erst möglich, wenn der Rezeptor in die äußere Zellmembran inseriert ist. Diese Zelloberflächenexpression wurde durch Nachweis einer N-terminal an den Rezeptor angefügten Hämagglutinin-Markierung geführt. Die in Abb. 14 dargestellten Ergebnisse zeigen im Oberflächen-ELISA allerdings keine signifikante Erhöhung der Oberflächenexpression für alle untersuchten Stopp-Varianten bei Aminoglycosidbehandlung, obwohl eine deutliche cAMP-Akkumulation stattfindet, die in den Negativkontrollen nicht vorhanden ist. Die Bestimmung der translatierten Menge an vollständigem MC4R-Protein und die cAMP-Messungen haben ebenfalls deutlich gemacht, dass nicht nur full-length-Protein gebildet wird, sondern dass der Rezeptor ebenfalls ein wiederhergestelltes Signalübertragungsverhalten zeigt, welches dem des WT nahekommt. Daß trotzdem auf der Zelloberfläche keine Rezeptormoleküle nachgewiesen werden konnte, kann nur auf die wesentlich niedrigere Sensitivität dieses Assays gegenüber der Messung der cAMP-Akkumulation zurückzuführen sein und zeigt auf, daß der Überleseeffekt nur zu einer sehr geringen Menge an funktionsfähigem Protein führt, aber diese Menge bereits ausreicht, um zu einem Wildtyp-ähnlichen Signalübertragungsverhalten, also einer partiellen Wiederherstellung der Rezeptorfunktion zu führen.

Sangkuhl und Mitarbeiter (2004) haben diesen Effekt ebenfalls in einer nonsense-Mutation (E242X) des V2 Vasopressinrezeptors beobachtet und führten dies auf eine Fehlfaltung des wiederhergestellten Rezeptors zurück, die durch Insertion von Aminosäuren an der prämaternen Stoppposition entsteht, die einer Faltung und damit einem Proteintransport in die Membran entgegenstehen. Es bleibt zu untersuchen, ob Chaperone in der Lage wären, MC4R-Überleseprodukte derart zu stabilisieren (Morello et al., 2000), daß eine erhöhte Oberflächenexpression messbar wäre.

## 5.2.3 Signalübertragung von MC4R-Stoppmutationen

### 5.2.3.1 proof of principle

Im Gegensatz zu publizierten Arbeiten zum Thema, die sich zum Nachweis des Überleseeffektes eines dem zu untersuchenden Gen nachgeschalteten Luciferasegenes bedienten und derart die vollständige Translation des untersuchten Genes zeigten, ohne dabei eine Aussage über die Funktionstüchtigkeit desselben zu erhalten (Howard et al., 1996; Bidou et al., 2004), geht diese Arbeit einen anderen Weg. Die vollständige Translation des reifen Proteins wurde immunologisch durch Nachweis eines C-terminal angefügten Antikörperepitopes nachgewiesen. Anschließend wurden dieselben Rezeptorkonstrukte für funktionelle Studien verwendet. Hierzu wurden sie in einem eukaryoten Expressionssystem (COS-7) exprimiert und mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen in dekadischen Schritten stimuliert.

Wie zu erwarten ist, sind die Stoppmutationen Y35X und E61X funktionell inaktiv, zeigen somit nach Ligandenstimulation keine cAMP-Produktion, wohingegen der Wildtyprezeptor eine Konzentrationswirkungskurve in Abhängigkeit von der Agonistenkonzentration liefert. Allerdings wurde bei Stimulation des Rezeptors MC4R W16X eine leichte aber reproduzierbare cAMP-Akkumulation beobachtet. (Abb. 15). Die verwendeten Zellen wurden unter Standardkulturbedingungen gehalten (DMEM mit 5% FKS, 20 mM Glutamin und 1 mg/ml Penicillin/Streptomycin). Diese Versuche waren die ersten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, und es wurde anfänglich nicht beachtet, dass es sich bei dem Antibiotikumszusatz Streptomycin um ein Aminoglycosid handelt. Eine Kulturführung der COS-7-Zellen über drei Passagen ohne Penicillin/Streptomycin führte zu Versuchsergebnissen, in denen auch nach Stimulation mit einer 100 nM-Konzentration des hochpotenten Liganden NDP- $\alpha$ -MSH keine cAMP-Akkumulation mehr erreicht wurde (Abb. 16). Diese beiden Experimente zeigten somit gleich zu Beginn der Experimente die Eignung des Systems auf und liefern den „proof of principle“ für den Überleseeffekt zumindest für die MC4R-Mutante W16X durch das im Standardkulturmedium enthaltene Aminoglykosid Streptomycin.

### 5.2.3.2 Einfluß eines Superagonisten

Um bei Verwendung dieses artifiziellen Expressionssystems eine Aussage unter soweit wie möglich natürlichen Bedingungen zu erhalten wurde mit den endogenen Agonisten  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH stimuliert. Der artifizielle Ligand NDP- $\alpha$ -MSH fand Anwendung da dieser auch in der Lage ist, herabregulierte Systeme zu einer cAMP-Antwort zu stimulieren, und somit auch geringfügige Signalübertragungen messbar werden. Diese Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt. Die MC4R-Varianten W16X, und Y35X zeigten unter Aminoglycosideinfluß sowohl nach Rezeptorstimulation mit  $\alpha$ -MSH als auch mit  $\beta$ -MSH eine partielle Funktionswiederherstellung. Diese konnte für die Variante MC4R E61X jedoch nur nach Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH sichtbar gemacht werden, da nur in diesem Fall cAMP-Konzentrationen erreicht wurden, die im messbaren Bereich lagen. Diese Ergebnisse führten dazu, daß weitergehende Experimente bevorzugt mit dem hochpotenten Agonisten NDP- $\alpha$ -MSH durchgeführt wurden. Hier zeichnet sich bereits ab, dass im Hinblick auf eine mögliche Therapie zusätzlich zu einer Aminoglycosidbehandlung auch die Stimulation mit einem hochpotenten Agonisten in Betracht gezogen werden sollte.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
0      30      40      50      60      70      80
hMC4R   LGKGYSDGGC YIQLFVSPEV FVTLGVISLL ENILVIVAAIA KNKNLHSPMY
Fette SR LGKGYSDGGC YIQLFVSPEV FVTLGVISLL ENILVIVAAIA KNKNLHSPMY
Myotis  LGKGYSDGGC YIQLFVSPEV FVTLGVISLL ENILVIVAAIA KNKNLHSPMY
Heilbutt LGKGYSDGGC YIQLFVSPEV FLTLGIVSLL ENILVVAATI KNKNLHSPMY
Seekuh  ~~~~~~ L FVSPEV FVTLGVISLL ENILVIVAAIA KNKNLHSPMY
Baikalrobbe LGKGYSDGGC YIQLFVSPEV FVTLGVISLL ENILVIVAAIA KNKNLHSPMY

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
90     100    110    120    130    140    150    160
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIIITLLNST DTD~AQSFTV NIDNVIDSVI CSSLLASICS LI SIAVDRYF TIFYALQYHN
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIVITLLNST DTD~AQSFTV NIDNVIDSVI CSSLLASICS LI SIAVDRYF TIFYALQYHN
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIAILLNGT DTK~ASSFTE NIDNVIDSVI CSSLLASICS LI AIAVDRYF TIFYALQYHN
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIVIALINGG NLTIPTVLIK SMDNVFDSMI CSSLLASICS LI AIAVDRYI TIFYALRYHN
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIVITLLNST DTD~AQSFTV NIDNVIDSVI CSSLLASICS LI SIAVDRYF TIFYALQYHN
FFICSLAVAD MLVSVSNGSE TIVITLLNST DTD~AQSFTV NIDNVIDSVI CSSLLASICS LI SIAVDRYF TIFYALQYHN

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
170     180     190     200     210     220     230     240
IMT/KRVGII ISCIWAACTV SGILFIIYSD SSAVIIICLIT MFFTMLALMA SLYVHMFLMA RLHIKRIAVL PGTGAIROGA
IMT/KRVGII ISCIWAACTV SGIVFIIYSD SSAVIIICLIT MFFTMLVLMA SLYVHMFLMA RLHIKRIAVL PGTGPIROGA
IMT/KRVGII LSCIWAACTV AGILFIIYSE SSVVIIICLIS VFLTMLALMA SLYVHMFLMA RLHMKRIAVL PGTGTIROGA
IVTLRRGDAG ITSXWTCNV SGILFIIYSE STRVVICLIT MFFTMLVLMV SLYVHMFLLA RLHMKRIAL PGKXPIHQRA
IMT/KRVGII ISCIWAACTV SGILFIIYSD SSAVIIICLIT MFFTMLALMA SLYVHMFLMA RLHIKRIAVL PGTGAIROGA
IMT/KRVGII ISCIWAACTV SGILFIIYSD SSAVIIICLIT MFFTMLALMA SLYVHMFLMA RLHIKRIAVL PRTGTIROGA

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
250     260     270     280     290     300     310     320
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI SCPQNPYCVCFMESHFNLYLI LIMCNSIIDP LIYALRSQEL RKTFFKEIICC
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI SCPQNPYCVCFMESHFNLYLI LIMCNVIDP LIYALRSQEL RKTFFKEIICC
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI ACPHNPYCVCFMESHFNLYLI LLMCNSIIDP LIYALRSQEL RKTFFKEIICC
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIMI TCPRNPYCTCFMESHFNMYLI LIMCNSVIDP IYALRSQEL RKTFFKEIICC
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI SCPQNPYCVCFMESHFNLYLI LIMCNSIIDP LIYALRSQEL RKTFFKEIICC
NMKGAITLTI LIGVFVVCWA PFFLHLIFYI SCPQNPYCVCFMESHFNLYLI LIMCNSIIDP LIYALRSQ..

```

**Abb. 24: Aminosäurevergleich der MC4R verschiedener Spezies**

Die Aminosäuresequenz des humanen MC4R und orthologe MC4R anderer Spezies sind in der Abbildung dargestellt. Transmembrandomänen sind durch Einkästelung markiert. Nicht konservierte Positionen sind rot dargestellt. (aus: Stäubert et al., 2007)

In Bezug auf eine Aminoglykosid-vermittelte Funktionswiederherstellung spielt somit auch die Position der Mutation im Rezeptor eine entscheidende Rolle. Die N-terminale Region des MC4R ist wenig konserviert, wie ein Sequenzvergleich verschiedener Spezies gezeigt hat. Daher ist es unwahrscheinlich, dass diese Region eine funktionelle Relevanz für die Rezeptoraktivität besitzt.

Diese Einschätzung wird durch die Arbeit von Tao und Segaloff (2005) und eigene (Hinney et al., 2006) unterstützt, welche diverse Punktmutationen im N-terminalen Bereich des MC4R charakterisierten und alle mit dem Wildtyp vergleichbaren Eigenschaften ausgestattet fanden.

Diese Betrachtungen erklären die sehr niedrige Wiederherstellungsrate der Mutation E61X. Im Gegensatz zu den beiden Mutationen W16X und Y35X, die beide in der

wenig konservierten aminoterminalen Region des MC4R liegen, befindet sich Aminosäureposition 61 in der ersten Transmembrandomäne. Bereits untersuchte Mutationen an dieser Position, E61K und N62S, zeichnen sich durch einen vollständigen Funktionsverlust aus (Farooqi et al., 2004; eigene Ergebnisse: Tabelle 9).

### Tabelle 9: cAMP-Akkumulation des MC4R N62S nach Agonistenstimulation

Die Tabelle zeigt die Werte der Konzentrationswirkungskurven der Variante MC4R-N62S im Vergleich mit dem MC4R Wildtyp nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH. N62S zeigt gegenüber dem WT einen vollständigen Funktionsverlust (n.d.=nicht mit ausreichender Genauigkeit nachweisbar).

Konstrukt	cAMP-Akkumulation							Oberflächenexpression
	NDP- $\alpha$ -MSH	$\alpha$ -MSH		$\beta$ -MSH				
	basal [Basal/ BasalWT]	$E_{max}/E_{maxWT}$ [%]	$EC_{50}$ [nM]	$E_{max}/E_{maxWT}$ [%]	$EC_{50}$ [nM]	$E_{max}/E_{maxWT}$ [%]	$EC_{50}$ [nM]	[% des WT- MC4R]
MC4R-WT	1	100	0,36 ± 0,31	100	2,2 ± 1,0	100	10 ± 5	100
N62S	0,85 ± 0,35	22 ± 8	n.d.	28 ± 6	n.d.	20 ± 7	n.d.	51 ± 4

In der Maus zeigten Yang und Mitarbeiter (2000), daß die Mutation E61A mit  $\alpha$ -MSH stimuliert einen partiellen Funktionsverlust aufweist. Somit scheint diese Rezeptorregion eine wichtige Rolle für die Rezeptorfunktion zu spielen. Das Einfügen einer beliebigen Aminosäure im Zuge des Überlesemechanismus kann demnach nicht zu einer Wiederherstellung der natürlichen Rezeptorfunktion führen, es sei denn, es wird zufällig die an dieser Stelle im Wildtyp vorkommende Aminosäure eingefügt.

#### 5.2.3.3 Charakteristiken verschiedener Aminoglykoside bezüglich der Überleserate

Zur Untersuchung der Aminoglycosid-vermittelten funktionellen Wiederherstellung der Rezeptoraktivität wurden verschiedene Vertreter der Antibiotikaklasse der Aminoglycoside untersucht. Neben G418 wurde das zu therapeutischen Zwecken zumeist angewandte Gentamycin für Überleseexperimente verwendet, als auch



Puromycin, Hygromycin und das in der Zellkultur zum Schutz der eukaryoten Zellen vor prokaryoter Kontamination verwendete Streptomycin.

Die höchste Signalübertragungsrate zeigte in allen Experimenten das Aminoglycosid G418, gefolgt von Gentamycin. Unterschiede zeigen sich auch in der cAMP-Akkumulation beim Aminoglycosid-behandelten WT. Gentamycin und Streptomycin zeigten keinen nachweisbaren toxischen Effekt. G418 wirkt leicht, Hygromycin und insbesondere Puromycin hingegen wirken stark inhibierend auf die behandelten Zellen. Dies führt dann notwendigerweise auch zu einer Absenkung der Signalübertragungsrate. Unter Berücksichtigung des toxischen Effektes ist die Überleserate bei G418 deutlich höher, als bei den anderen getesteten Aminoglycosiden. Gentamycin zeigt zwar eine ähnlich hohe Signalübertragungsrate, allerdings auch bei höherer Zellzahl, das heißt bei der Verwendung von G418 wird die Signalübertragung durch weniger Zellen realisiert, als bei Gentamycin. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Arbeiten, die *in vitro* ebenfalls gute Effekte mit der Verwendung von G418 erzielt haben (Sangkuhl et al., 2004; Bedwell et al., 1997), allerdings verwendeten Arbeiten mit *in vivo*-Systemen das Aminoglycosid Gentamycin (Bedwell et al., 1997; Du et al., 2002; Barton-Davis et al., 1999).

#### **5.2.3.4 Ermittlung der wirksamen G418-Konzentration**

Zur Ermittlung des wirksamen Anwendungsbereiches der G418-Gabe wurden MC4R W16X exprimierende COS-7-Zellen mit 0, 100, 200 und 500 µg/ml G418 versetzt und mit NDP- $\alpha$ -MSH stimuliert. Bis zu einer Konzentration von 200 µg/ml G418 wird eine stete Zunahme der cAMP-Akkumulation in der Maximalstimulation verzeichnet, bei höheren Konzentrationen lässt sich dieser Effekt nicht weiter steigern. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in den Experimenten zur Untersuchung der RezeptorSignalübertragungseigenschaften mit G418-Konzentrationen bis maximal 200 µg/ml gearbeitet. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung, die in vorangegangenen Arbeiten Anwendung fand (75 µg/ml bei Sangkuhl et al., 2004).

Daraufhin wurde der Einfluß steigender G418-Konzentrationen im Bereich bis 200 µg/ml auf alle vier Stoppvarianten getestet (Abb. 21). Die höchste Überleserate repräsentiert durch die höchste cAMP-Akkumulation wurde bei Stimulation der W16X-Variante erzielt. Hier wurde bei Stimulation mit 10 nM NDP- $\alpha$ -MSH eine

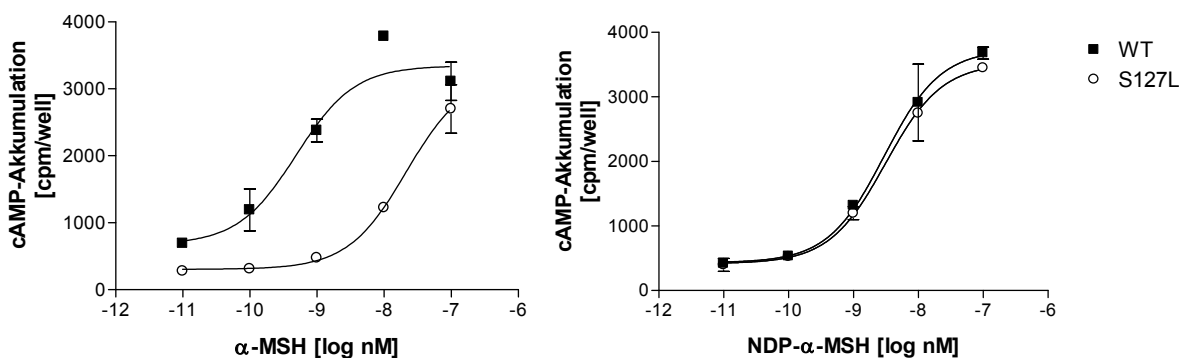
cAMP-Akkumulation von 3/4 der Wildtyp-Maximalakkumulation erreicht. Obwohl diese Werte für die übrigen MC4R-Varianten sehr viel niedriger liegen, ist sowohl bei der Variante Y35X als auch bei W258X ein deutlicher Überleseeffekt bei höheren G418-Konzentrationen zu erkennen. Lediglich für E61X liegen die Werte nach Stimulation im Bereich der Aktivität der nicht G418-behandelten Zellen. Wo diese leichte Grundaktivität herrührt, kann nur spekuliert werden. Es erscheint jedoch einleuchtend, diese auf in geringem Grade endogen im verwendeten Zellsystem exprimierte MC3R und MC2R zurückzuführen. Deutlich ist ebenfalls bei den Wildtypwerten der toxische Effekt der G418-Gabe auf das verwendete Zellsystem abzulesen, der im Bereich bis 200 µg/ml G418 zu einer Verminderung der cAMP-Akkumulation aufgrund geringerer Dichte von Zellen mit zur Genexpression und Signalübertragung ausreichender Fitness führt, da Zellen durch den chemischen Streß der Aminoglykosidbehandlung sterben und zudem durch den toxischen Effekt in ihrer Funktionalität beeinträchtigt sind.

### **5.3 Weitere Therapiemöglichkeiten von MC4R-Mutationen**

Bisherige Arbeiten untersuchten die Überlebensrate mit Hilfe eines Luciferaseassay. Dieser ist geeignet, die Existenz eines in voller Länge translatierten Genproduktes aufzuzeigen, kann jedoch keine Aussage über die Funktionalität desselben liefern. Im Gegensatz dazu ist der Ansatz dieser Arbeit dazu geeignet, die Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit des Proteins zu überprüfen, weswegen Unterschiede wie die hier geschilderten zwischen W16X/Y35X und E61X erstmalig beobachtet werden konnten.

Weiterhin lässt sich die Rate der Funktionsherstellung durch die Wahl des für die Stimulation verwendeten Liganden beeinflussen. Der artifizielle Ligand NDP- $\alpha$ -MSH stimuliert den Rezeptor in Konzentrationen zweier Zehnerpotenzen unter den Konzentrationen der natürlichen Liganden. Außerdem ist er in der Lage, bei einigen Mutationen, die durch einen partiellen Funktionsverlust gekennzeichnet sind, eine Signalübertragungsrates zu erreichen, die näher an der des Wildtyps liegt, als bei der Stimulation mit den natürlichen Liganden: Parallel zur Anfertigung dieser Arbeit sind 32 MC4R missense-Mutationen aus dem KORA-Kollektiv, einem Populations-

Querschnittskollektiv (Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg), funktionell im Hinblick auf ihre Oberflächenexpression und ihr Signalübertragungsverhalten hin untersucht worden. Der größte Teil verhielt sich wildtyp-ähnlich, einige jedoch zeigten einen partiellen oder sogar kompletten Funktionsverlust. Durch Stimulation mit dem hochpotenten Agonisten NDP- $\alpha$ -MSH anstelle des natürlichen Liganden konnte die Funktion der Variante MC4R S127L vollständig wiederhergestellt werden, das Signalübertragungsverhalten dieser Variante entsprach dem des Wildtyps (Abb. 25).



**Abb. 25: Wiederherstellung des Signalübertragungsverhaltens bei MC4R S127L**

Die Abbildung zeigt die Konzentrationswirkungskurven der Variante MC4R-S127L im Vergleich zum WT MC4R nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH (linker Graph) und NDP- $\alpha$ -MSH (rechter Graph). Der WT ist mit quadratischen Symbolen, die Variante S127L mit weißen Kreisen dargestellt. Die c-AMP-Akkumulation nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH zeigt eine Verschiebung der Konzentrationswirkungskurve zu höherer Agonistenkonzentration: der Rezeptor ist partiell inaktiviert (linker Graph). Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH führt zu einer Wiederherstellung der Rezeptoraktivität im Vergleich zum WT-MC4R (rechter Graph).

Dieses Beispiel zeigt, dass die partielle Wiederherstellung einer inaktivierenden MC4R-Mutation mittels eines hochpotenten Agonisten möglich ist.

## 5.4 Der MC4R als Ziel medikamentöser Intervention

Durch die Anfertigung dieser Arbeit wurden einige neue Fragestellungen aufgeworfen: Wie kann die positive Wirkung der Aminoglycoside aufrechterhalten werden, gleichzeitig aber die toxischen Nebenwirkungen vermieden werden? Zum Zwecke einer therapeutischen Maßnahme müsste das Aminoglycosid oral verabreicht werden. Kann bei einem therapeutischen Einsatz von Aminoglycosiden das Agens sein Zielgewebe erreichen? Hierzu müssten Aminoglycoside die Blut-Hirn-Schranke passieren können.

Für hydrophile und elektrisch geladene Moleküle stellen Membranen Barrieren dar. Dementsprechend ist ein ungehindertes Durchdringen der Blut-Hirn-Schranke für die hydrophilen geladenen Aminoglycoside nicht zu erwarten. Diese Einschätzung wurde durch Thea und Mitarbeiter (1989) bestätigt, nachdem Aminoglycoside das Zentralnervensystem nur in sehr geringer Konzentration erreichen, Strausbaugh und Mitarbeiter (1983) konnten für Gentamycin kein Übertreten der Blut-Hirnschranke beobachten und benutzten daher diese Verbindung als Marker für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Um diese Substanzklasse in therapeutisch wirksamer Dosis im Zielgewebe zu akkumulieren, müssten also Alternativstrategien entwickelt werden. Strausbaugh und Mitarbeiter benutzten (1983) hyperosmolare Lösungen zur temporären Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Kreuter berichtete 2001 von einer Strategie, welche beschichtete Nanopartikel benutzt, um Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke zu schleusen, wobei die beschichteten Partikel niedermolekulare Lipoproteine nachahmen und über Interaktion mit dem LDL-Rezeptor eine Aufnahme erreichen.

Vor kurzem berichteten Welch und Mitarbeiter (2007) von einer Substanz (PTC124), welche für therapeutische Zwecke geeignete Eigenschaften besitzt: einem verbesserten Überleseeffekt, Selektivität für prä-mature, nicht aber native Stoppcodi, bei einer gleichzeitig verminderten Toxizität. In Ratte und Hund wurde angeblich keine Zelltoxizität von PTC124 beobachtet.

Ein weiteres therapeutisches Ziel für die Induktion eines Überleseeffektes bzw. die Verstärkung des aminoglycosidinduzierten Überleseeffektes sind Faktoren, die in den stoppmutationsinduzierten mRNA-Abbau (nonsense mediated decay - NMD) eingreifen. NMD ist eine Qualitätskontrolle, die in allen eukaryotischen Zellen aktiv mRNA-Moleküle mit vorzeitigem Kettenabbruch eliminiert. (Maquat et al., 2005). Eine NMD-Supprimierung stabilisiert somit mRNA welche Nonsense-Mutationen enthalten. Somit wären geringere Mengen von Proteinen, die infolge des Überleseeffektes translatiert wurden notwendig, um einen physiologisch signifikanten Proteinspiegel wiederherzustellen (Holbrook et al., 2004).

## 6 Zusammenfassung

Die stetige Zunahme der Anzahl übergewichtiger und adipöser Personen stellt bedingt durch assoziierte Erkrankungen wie Typ-2-Diabetes und koronare Herzdefizienz weltweit eines der größten Gesundheitsprobleme dar. Seit der Identifizierung des Leptingens im Jahre 1994 ist der Erkenntnisstand der Mechanismen der Energiehomeostase immens angestiegen. Einer der wichtigsten Wege der Appetitregulation ist der Leptin-Melanocortin Weg. In diesem Signalweg wird der Füllzustand der Adipozyten durch die Ausschüttung des Hormons Leptin an das Gehirn und dort an Strukturen des Hypothalamus signalisiert. Leptin bindet im hypothalamischen Nucleus arcuatus an seinen Rezeptor, welcher auf zwei verschiedenen Arten von Neuronen, den NPY/AgRP und den POMC/CART Neuronen exprimiert ist. Durch diese Bindung wird die Expression von orexigenen und anorexigenen Peptiden moduliert. Anorexigen wirken zwei aus dem POMC prozessierten Peptide,  $\alpha$ - und  $\beta$ -MSH, welche die natürlichen Liganden des ebenfalls im Nucleus arcuatus exprimierten MC4R sind und zu ihrem Rezeptor axonal transportiert werden. Die Aktivierung des MC4R führt über noch unverstandene Mechanismen zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und einer Steigerung des Energieverbrauchs. Letztendlich führt dies zum Sinken des Füllstandes der Fettzellen, worauf der Leptinspiegel sinkt, was im Folgenden die Expression von NPY und AgRP verstärkt. Die Bindung von AgRP an den MC4R als natürlichem inversen Agonisten führt somit zu einer Inhibierung der Rezeptorfunktion, wodurch nun wiederum die Nahrungsaufnahme gesteigert wird.

Zurzeit stellen heterozygote inaktivierende Mutationen im MC4R die häufigste molekulare Ursache der Adipositas dar. Die häufigste europäische MC4R Mutation ist eine Stopp-Mutation im N-Terminus des Rezeptors, Y35X, welche zur Translation eines vorzeitig terminierten Proteins und somit zu einem kompletten Funktionsverlust des Rezeptors führt. Seit einigen Jahren ist bekannt, daß Aminoglykoside, welche durch ihre Eigenschaft die prokaryote ribosomale Funktion durch Behinderung der Codon-Anti-Codon Erkennung zu stören und daher gegen gram-negative Bakterien eingesetzt werden, ebenfalls eukaryote Ribosomen beeinträchtigen. Dadurch bedingt kann es zu einem Überlesen von mutationsbedingten Stopp-Codons kommen. Es gibt eine Vielzahl von durch derartige mutationsbedingte Stoppcodons verursachten genetischen Erkrankungen wie z.B. Stoppmutationen im CFRT-Gen, welche zur Mukoviszidose führen. Für das CFRT-Gene wurde inzwischen sowohl *in vitro* als

auch *in vivo* gezeigt, daß durch Aminoglykoside ein Überlesen der Stopp-Mutation möglich ist, und die Patienten von einer Aminoglykosid-Therapie profitieren.

In der hier vorliegenden Arbeit wird erstmalig ein Überlesen von Stopp-Mutationen des MC4R (W16X, Y35X, E61X, W258X) durch Aminoglykoside *in vitro* gezeigt. Hierzu wurden alle MC4R-Stoppvarianten in eukaryote Expressionsvektoren kloniert und eine Expression in COS-7 Zellen durchgeführt. Anschließend wurden die Signaltransduktionseigenschaften, die Oberflächenexpression und die Gesamtexpression des Rezeptors von den angegebenen Mutationen im Vergleich zum Wildtyprezeptor sowohl mit als auch ohne Aminoglykosid-Behandlung durchgeführt. Durch Untersuchung der Gesamtexpression wurde gezeigt, daß in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten Aminoglykoside ein Überlesen aller Stopp-Mutationen möglich ist. Hier zeigte sich bereits, daß die Effizienz des Überlesens von der Art der Stopp-Mutation und der Nukleotide um die Stopp-Mutation herum abhängt, wobei sich TGA Mutationen (W16X, W258X) besser überlesen lassen als die Varianten TAG (E61X) und TAA (Y35X). Außerdem spielt die Art des verwendeten Aminoglykosids eine erhebliche Rolle, wobei sich Geneticin (G418) als effizienter gegenüber Gentamycin, Puromycin, Hygromycin und Streptomycin erwies. Dieses wurde zusätzlich durch Untersuchung der ligandeninduzierten Signaltransduktionseigenschaften der Rezeptorvarianten durch Stimulation mit den endogenen Liganden  $\alpha$ -MSH und  $\beta$ -MSH sowie dem hochpotenten Agonisten NDP- $\alpha$ -MSH bestätigt. Hier zeigte sich ein weiterer wichtiger Aspekt des aminoglykosidvermittelten Überlesens in Form der Lage des Stoppcodons innerhalb der MC4R-Sequenz. Stoppvarianten im N-Terminus des Rezeptors (W16X und Y35X), welcher keine entscheidende Rolle für die Funktion des Rezeptors spielt, ließen sich in höherem Maße funktionell wiederherstellen als Mutationen im Rezeptorbereich der Transmembrandomänen (E61X, W258X).

Um zu überprüfen ob auch *in vivo* das Konzept des Aminoglykosid-induzierten Überlesens von Stopp-Mutationen sich therapeutisch nutzen lässt, ist ein transgenes Mausmodell in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Klingenspor, München, in Arbeit. Kürzlich wurde mit PTC124 eine Substanz identifiziert, welche nicht zur Gruppe der Aminoglykoside gehört, jedoch in der Lage ist, TGA Stopp-Kodons effizient *in vitro* zu überlesen. Ob diese Substanz auch die Blut-Hirnschranke passieren kann, um ein geeignetes therapeutisches Agens für das Überlesen von Stopp-Mutationen im MC4R zu sein, werden nachfolgende Studien zeigen.

## Aussicht

Diese Arbeit hat gezeigt, dass das Überlesen von Stoppmutationen im MC4R-Gen *in vitro* möglich ist. Sie hat nachgewiesen, dass sowohl der MC4R in voller Länge synthetisiert wird, als auch das Rezeptormolekül bezüglich seines Signaltransduktionsverhaltens die Wildtypfunktion bis zu einem gewissen Grad zurückerhalten hat. Weiterhin wurde dargestellt, dass dieser funktionelle Überleseeffekt ausreichend viele Rezeptormoleküle in intakter Konformation wiederherstellt, um ein effizientes Signalübertragungsverhalten zu erzielen.

Um ein Überlesen der Stoppcodons zu visualisieren, sollen im Folgenden die prä-matur terminierten MC4R-Varianten GFP-gekoppelt transfiziert werden. Dies hat den Vorteil, dass nach Aminoglycosidbehandlung unter Fluoreszenzlicht nicht nur das überlesene Protein sondern auch dessen subzelluläre Lokalisation dargestellt werden kann.

Leider fehlt dem Aminoglykosideffekt eine Genspezifität und kann zum Überlesen vieler korrekt positionierter Stoppcodons führen. Dieser Effekt wurde ebenso demonstriert. Nebeneffekte einer langanhaltenden Aminoglykosidanwendung könnten somit in dominant negativen Überleseprodukten resultieren. Daher gibt es den experimentellen Ansatz, Elemente der Aminoglykosidstruktur welche Zelltoxizität induzieren von denen zu trennen, die für den erwünschten antibiotischen Effekt benötigt werden (Maldague et al., 1984). Ein Beispiel dafür sei Negamycin, ein dipeptidisches Antibiotikum welches an die ribosomale Codonerkennungsstelle bindet und die translationale Genauigkeit verändert, genau wie Aminoglykoside, dabei aber eine geringere Zelltoxizität als Gentamycin aufweist (Arakawa et al., 2003). Demnach scheinen die toxischen Effekte, welche einmal das translationale Überlesen und zum anderen den Nebeneffekt der Zelltoxizität verursachen, unterschiedlicher Natur zu sein.

Vor wenigen Monaten berichteten Welch und Mitarbeiter (2007) von einer Substanz namens PTC124, welche in einem gezielten Screening isoliert wurde, und selektiv das Überlesen von prä-maturen aber mutierten Stoppcodons induziert, außerdem in geringeren Konzentrationen als die hier untersuchten Antibiotika wirksam ist. Zudem zeigte es in Ratten und Hunden keine toxische Wirkung. Der Mechanismus der

selektiven Unterscheidung nativer von prämaternen Stoppcodons ist zur Zeit nicht bekannt.

Um aus den hier dargestellten Ergebnissen eine Aussage über die Leistungsfähigkeit des Systems *in vivo* gewinnen zu können, scheinen weitergehende Experimente im Mausmodell unerlässlich. Diese Arbeit wurde in Kollaboration mit Prof. Klingenspor in München begonnen. Charakterisierungen des mMC4R sind in dieser Arbeit bereits vorgestellt worden. Von insbesondere Bedeutung ist neben der Toxizität der verabreichten Dosen G418 auch die Frage, inwieweit G418 die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden in der Lage ist. Da bisherige Arbeiten für Aminoglycoside allgemein nur sehr geringe Konzentrationen im Hirngewebe nachweisen konnten (Strausbaugh et al., 1983; Thea et al., 1989) müssten gegebenenfalls Strukturanaloga zu Aminoglykosiden gefunden werden, die bei gleicher Wirkungsweise strukturelle Eigenschaften aufweisen, die sie gehirngängig machen. Es bleibt zu untersuchen, ob PTC124 diese Eigenschaft hat. Weitere Strategien könnten die temporäre Öffnung der Blut-Hirn-Schranke (Strausbaugh et al., 1983) oder die Verwendung von Carriersystemen wie die von Kreuter 2001 verwendeten beschichteten Nanopartikel sein.

Als erste Studie die zeigen konnte, daß Aminoglycoside die funktionellen Eigenschaften von durch prämatere Stoppcodi unterbrochenen MC4-Rezeptoren wiederherstellen können, geht diese Arbeit ein Stück des Weges zu einem regulierenden Eingriff in die MC4R-vermittelte Signalübertragung innerhalb der hypothalamischen Energiehomöostase und stellt damit einen Baustein für eine mögliche Therapie der Adipositas zur Verfügung. Diese könnte zusätzlich auf den Erkenntnissen der Arbeit von Welch und Mitarbeitern (2007) basieren, um ein Therapeutikum mit maximiertem funktionellem Effekt bei minimierter Nebenwirkung zu erhalten. Der nächste Schritt auf diesem Weg, die Entwicklung eines Derivates, welches die Kopplung von Überleseeffekt und Toxizität der zur Zeit verfügbaren Aminoglycoside aufgibt, wird in der nahen Zukunft von äußerstem klinischen Interesse sein.



## 7 Literatur

Adan RA, Cone RD, Burbach JP, Gispen WH. **Differential effects of melanocortin peptides on neural melanocortin receptors.** Mol Pharmacol 46 (1994):1182-1190.

Ahituv N, Kavaslar N, Schackwitz W, Ustaszewska A, Collier JM, Hebert S, Doelle H, Dent R, Penacchio LA, McPherson R, **A PYY Q62P variant linked to human obesity.** Hum Mol Genet 15 (2006):387-391.

Arakawa M, Shiozuka M, Nakayama Y, Hara T, Hamada M, Kondo S, Ikeda D, Takahashi Y, Sawa R, Nonomura Y, Sheykholslami K, Kondo K, Kaga K, Kitamura T, Suzuki-Miyagoe Y, Takeda S, Matsuda R. **Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice.** J Biochem (Tokyo) 134 (2003):751-758.

Argyropoulos G, Brown AM, Willi SM, Zhu J, He Y, Reitman M, Gevaio SM, Spruiell I, Garvey WT. **Effects of mutations in the human uncoupling protein 3 gene on the respiratory quotient and fat oxidation in severe obesity and type 2 diabetes.** J Clin Invest 102 (1998):1345-1351.

Barsh GS und Schwartz MW. **Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration.** Nature Rev. Genet. 3 (2002):589–600.

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

Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL. **Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice.** J Clin Invest. 104 (1999):375-381.

Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Bubien JK, Hong J, Tousson A, Clancy JP, Sorscher EJ. **Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line.** Nat Med. 3 (1997):1280-1284.

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

Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, Rousset JP. **Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment.** Gene Therapy 11 (2004):619-627.

Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. **Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes.** Neuron. 5 (1988):403-10.

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

Burke JF, Mogg AE. **Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin.** Nucleic Acids Res. 13 (1985):6265-6272.

Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pelleymounter MA, Dekoning J et al. **A unique metabolic syndrome causes obesity in the Melanocortin-3 receptor-deficient mouse.** Endocrinology 141 (2000):3518-3521.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. **Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults.** N Engl J Med. 348 (2003):1625-1638.

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

Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. **Inactivation of the mouse Melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass.** Nat Genet 26 (2000a):97-102.

Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan XM, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho RE, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. , **Role of the Melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice,** Transgenic Res. (2000b):145-154.

Clancy JP, Bebok 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 Stopp mutations in patients with cystic fibrosis,** Am J Respir Crit Care Med 163 (2001):1683-1692.

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

Cossrow N und Falkner B. **Race/ethnic issues in obesity and obesity-related comorbidities.** J Clin Endocrinol Metab. 9 (2004)2590-2594.

Cone RD. **Anatomy and regulation of the central melanocortin system.** Nat Neurosci. 5 (2005):571-578.

Dalgaard, LT, Sorensen, TIA, Drivsholm, T, Borch-Johnsen, K, Andersen, T, Hansen, T, Pedersen, O. **A prevalent polymorphism in the promoter of the UCP3 gene and its relationship to body mass index and long term body weight change in the Danish population.** J. Clin. Endocr. Metab. 86 (2001):1398-1402.

Davies J, Gilbert W, Gorini L, **Streptomycin, suppression, and the code,** Proc Natl Acad Sci USA 51 (1964):883-890.

del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, D'Urso L, Di Toro R, Perrone L. **Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (leu34phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family.** Diabetes 50 (2001):2157-2160.

Du M, Jones JR, Lanier J, Keeling KM, Lindsey JR, Tousson A, Bebok Z, Whitsett JA, Dey CR, Colledge WH, Evans MJ, Sorscher EJ, Bedwell DM. **Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cftr<sup>-/-</sup> mouse carrying a human CFTR-G542X transgene.** *J Mol Med.* 9 (2002):595-604.

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

Ehrsam R, Staffel S, Mensink G, Melges T **Übergewicht und Adipositas in den USA, Deutschland, Österreich und der Schweiz** *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 11 (2004):278-285.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD: **Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y.** *Nature* 381 (1996):415-421.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. **Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome.** *Nature* 385 (1997):165-168.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA, O'Rahilly S. **Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency.** *NEJM* 341 (1999):879-884.

Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S. **Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency.** *J Clin Invest.* 106 (2000):271-279.

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,** *NEJM* 348 (2003):1085-1095.

Farooqi IS, O'Rahilly S. **Monogenic human obesity syndromes.** *Recent Prog Horm Res.* 59 (2004):409-424.

Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, and 13 others. **Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor.** *New Eng. J. Med.* 356 (2007):237-247.

Fehm HL, Smolnik R, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Born J. **The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans.** *J Clin Endocrinol Metab.* 86 (2001):1144-1148.

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

Flier JS, Harris, M, Hollenberg AN. **Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring.** *J. Clin. Invest.* 105 (2000):859-861.

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

Friedman SM, Weinstein LB, **Lack of fidelity in the translation of synthetic polyribonucleotides**, Proc Natl Acad Sci USA 52 (1964):988-996.

Friedman, J. M. & Halaas, J. L. **Leptin and the regulation of body weight in mammals**. Nature 395 (1998):763–770.

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

Gorini L, Kataja E. **Phenotypic repair by streptomycin of defective genotypes in E. coli**, PNAS 51 (1964):487-491.

Hein LK, Bawden M, Muller VJ, Sillence D, Hopwood JJ, Brooks DA, **alpha-L-iduronidase premature Stopp codons and potential read-through in mucopolysaccharidosis type I patients**, J Mol Biol 338 (2004):453-462.

Hinney, A.; Becker, I.; Heibult, O.; Nottebom, K.; Schmidt, A.; Ziegler, A.; Mayer, H.; Siegfried, W.; Blum, W. F.; Remschmidt, H.; Hebebrand, J. **Systematic mutation screening of the pro-opiomelanocortin gene: identification of several genetic variants including three different insertions, one nonsense and two missense point mutations in probands of different weight extremes**. J. Clin. Endocr. Metab. 83 (1998):3737-3741.

Hinney, A.; Schmidt, A.; Nottebom, K.; Heibult, O.; Becker, I.; Ziegler, A.; Gerber, G.; Sina, M.; Gorg, 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. Endocr. Metab. 84 (1999):1483-1486.

Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schafer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J. **Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany**. J Clin Endocrinol Metab. 91(2006):1761-1769.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE, **Nonsense-mediated decay approaches the clinic**, Nat Genet 36 (2004):801-808.

Holder JLJr, Butte NF, Zinn AR **Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene**. Hum. Molec. Genet. 9 (2000):101-108.

Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. **Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations**. Nat Med. 2 (1996):467-469.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. **Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice**. Cell. 88 (1997):131-141.

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. **Obesity and impaired prohormone processing**

**associated with mutations in the human proopiomelanocortin 1 gene**, Nature Genet 16 (1997):303-306.

Keeling KM, Brooks DA, Hopwood JJ, Li P, Thompson JN, Bedwell DM. **Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation**. Hum Mol Genet 10 (2001):291-299.

Keeling KM, Bedwell DM, **Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature Stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system**, J Mol Med 80 (2002):367-376.

Keeling KM, Lanier J, Du M, Salas-Marco J, Gao L, Kaenjak-Angeletti A, Bedwell DM. **Leaky termination at premature stop codons antagonizes nonsense-mediated mRNA decay in S. cerevisiae**. RNA 10 (2004):691-703.

Kohno D, Gao HZ, Muroya S, Kikuyama S, Yada T. **Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin**. Diabetes 52 (2003):948–956.

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

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

Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Gruters A. **Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10**. J Clin Endocrinol Metab. 88 (2003):4633-4640.

Kusik V. **Mendelian Inheritance in Man: A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders**. John Hopkins University Press, Baltimore (1998).

Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O. **Prevalence of mutations and functional analyses of Melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity**. J Clin Endocrinol Metab 90 (2005):219-224.

Lee YS, Poh LKS, Loke KY. **A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity**. J. Clin. Endocr. Metab 87 (2002): 1423-1426.

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

Maes HH, Neale MC, Eaves LJ. **Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity**. Behav Genet. 2 (1997):325-351.

- Maire I, **Is genotype determination useful in predicting the clinical phenotype in lysosomal storage diseases?** J Inher Metab Dis 24 (Suppl 2) (2001):57-61.
- Maldague P, Laurent G, Carlier MB, Tulkens P, **A 2'guanidyl derivative of gentamicin (S86451) with reduced nephrotoxicity studies at low and medium dose levels in the rat.** Arch Toxicol Suppl 7 (1984):455-458.
- Maquat LE, **Nonsense-mediated mRNA decay in mammals,** J Cell Sci 118 (2005):1773-1776.
- Markin & Liebman: **Baby, don't stop!** Nat Genet. 1 (1999):8-10.
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. **Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides.** Nat Genet. 21(1999):119-122.
- Medlund P, Cederlöf R, Flodérus-Myrhed B, Friberg L, Sörensen S. **A new Swedish twin registry containing environmental and medical base line data from about 14,000 same-sexed pairs born 1926-58.** Acta Med Scand Suppl. 600 (1976):1-111.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. **Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.** Nature 387 (1997): 903-908.
- Morello JP, Petaja-Repo UE, Bichet DG, Bouvier M. **Pharmacological chaperones: a new twist on receptor folding.** Trends Pharmac Sci. 21 (2000):466-469.
- Münzberg H, Myers MG. **Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance.** Nature neuroscience 8 (2005):566-570.
- Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. **The disease burden associated with overweight and obesity,** JAMA 282 (1999):1523-1529.
- Naggert JK, Fricker LD, Varlamov O, Nishina PM, Rouille Y, Steiner DF, Carroll RJ, Paigen BJ, Leiter EH. **Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity.** Nature Genet, 10 (1995):135-142.
- Nargund RP, Strack AM, Fong TM. **Melanocortin-4 Receptor (MC4R) Agonists for the Treatment of Obesity.** J Med Chem 49 (2006):4035-4043.
- Neel, J. V. **Diabetes mellitus: a 'thrifty' genotype rendered detrimental by 'progress'?** Am. J. Hum. Genet 14 (1962):353-362.
- Nishigori H, Tomura H, Tonooka N, Kanamori M, Yamada S, Sho K, Inoue I, Kikuchi N, Onigata K, Kojima I, Kohama T, Yamagata, K; et al. **Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects.** Proc. Nat. Acad. Sci 98 (2001):575-580.
- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. **Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein,** Science 278 (1997):135-138.

O'Rahilly S, Gray H, Humphreys PJ, Krook A, Polonsky KS, White A, Gibson S, Taylor K, Carr C. **Brief report: impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function.** *New Eng J Med* 333 (1995):1386-1390.

Palmer E, Wilhelm JM, Sherman F, **Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics,** *Nature* 277 (1979):148-150.

Parekh-Olmedo H, Ferrara L, Brachmann E, Kmiec EB, **Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair,** *Gene Ther* 12 (2005) 639-646.

Politano L, Nigro G, Nigro V, Piluso G, Papparella S, Paciello O, Comi LI. **Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results.** *Acta Myol* 22 (2003):15-21.

Poole ES, Brown CM, Tate WP. **The identity of the base following the stop codon determines the efficiency of in vivo translational termination in Escherichia coli.** *EMBO J* 14 (1995):151-158.

Price RA, Gottesman II. **Body fat in identical twins reared apart: roles for genes and environment.** *Behav Genet* 1 (1991):1-7.

Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M, **Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations,** *Hum Mutat* 4 (1994) 1-11.

Salas-Marco J, Bedwell DM. **Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough.** *J Mol Biol* 348 (2005):801-815.

Salomon Y, Londos C, Rodbell M. **A highly sensitive adenylate cyclase assay.** *Anal Biochem* 58 (1974):541-548.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. **Molecular Cloning: A laboratory Manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74 (1977):5463-5467.

Sangkuhl K, Schulz A, Rompler H, Yun J, Wess J, Schoneberg T. **Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo.** *Hum Mol Genet* 13 (2004):893-903.

Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. **Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases.** *Pharmacol Ther* 104 (2004):173-206.

Silva JE. **The thermogenetic effect of thyroid hormone and its clinical implications.** *Ann Intern Med* 139 (2003):247-252.

Sina M, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. **Phenotypes in three pedigrees with autosomal**

**dominant obesity caused by haploinsufficiency mutations in the melanocortin-4 receptor gene.** Am. J. Hum. Genet 65 (1999):1501-1507.

Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, Barsh GS, Baskin DG, Leibel RL. **Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain?** Diabetes 52 (2003):232–238.

Spiegelman BM, Flier JS. **Obesity and the regulation of energy balance.** Cell 104 (2001): 531–543.

Strausbaugh LJ, Brinker GS. **Effect of Osmotic Blood-Brain Barrier Disruption on Gentamicin Penetration into the Cerebrospinal Fluid and Brains of Normal Rabbits.** Antimicrob Agents Chemother. 24 (1983):147-150.

Sundaramurthy, D.; Campbell, D. A.; Leek, J. P.; Markham, A. F.; Pieri, L. F. : **Assignment of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping.** Cytogenet. Cell Genet 82 (1998):97-98.

Tao YX, Segaloff DL. **Functional Analyses of Melanocortin-4 Receptor Mutations Identified from Patients with Binge Eating Disorder and Non-obese or Obese Subjects.** J Clin Endocrinol Metab 90 (2005):5632-5638.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. **Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.** Cell 83 (1995):1263-1271.

Thea D, Barza M. **Use of antibacterial agents in infections of the central nervous system.** Infect Dis Clin North Am 3 (1989):553-570.

Vaisse C, Clement K, Guy-Grant B, Froguel P, **A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity,** Nature Genet 20 (1998):113-4.

Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P, **Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogenous cause of morbid obesity.** J Clin Invest 106 (2000):253-262.

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, et al. **PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.** Nature 447 (2007):87-91.

Wilhelm JM, Jessop JJ, Pettitt SE, **Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells,** Biochemistry 17 (1978a):1149-1153.

Wilhelm JM, Pettitt SE, Jessop JJ, **Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: structure function relationship in the stimulation of misreading with a wheat embryo system,** Biochemistry 17 (1978b):1143-1149.)



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 (W1282X, G542X)**. N Engl J Med 349 (2003):1433-1441.

World Health Organisation Expert Committee. **Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry**, WHO Tech Rep. Ser. no. 854 (World Health Organisation, Geneva, 1995).

Yang YK, Fong TM, Dickinson CJ, Mao C, Li JY, Tota MR, Mosley R, Van Der Ploeg LH, Gantz I. **Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor**. Biochemistry. 39 (2000):14900-14911.

Yeo GSH, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. **A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity**. Nature Genet. 20 (1998):111-112.

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

# Anhang

## Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Adipositasentwicklung 1960-2025 .....	2
Abb. 2: Prozentualer Anteil adipöser Berliner Schulkinder in den Jahren 1985 und 2001 .....	2
Abb. 3: Physiologische Regulierung des Energiegleichgewichtes.....	5
Abb. 4: Der Leptin-Melanocortin-Weg .....	7
Abb. 5: Der Gs-Adenylatzyklase-Signalweg.....	10
Abb. 6: Struktur der Aminoglycoside G418 und Gentamycin.....	14
Abb. 7: Molekularer Mechanismus des translationalen Überlesens .....	15
Abb. 8: Vektorkarte des Plasmides pCR 2.1-TOPO .....	27
Abb. 9 :Schematische Darstellung des humanen MC4R im pcDps-Vektor .....	28
Abb. 10: Sequenz des MC4R und Positionen der verwendeten Oligonukleotide .....	30
Abb. 11: Schematische Darstellung der Bestimmung der MC4R-Gesamtexpression .....	38
Abb. 12: Schematische Darstellung der Positionen der untersuchten Stoppmutationen im MC4R. ....	41
Abb. 13: MC4R-Gesamtexpressions-ELISA .....	44
Abb. 14: Oberflächenexpression der untersuchten MC4R-Stoppmutanten.....	45
Abb. 15: cAMP-Akkumulation in COS-7-Zellen in Vollmedium nach Stimulation mit NDP- $\alpha$ -MSH. ....	46
Abb. 16: cAMP-Akkumulation in COS-7-Zellen in AB-freiem Medium nach Stimulation mit NDP- $\alpha$ - MSH.....	47
Abb. 17: Konzentrationswirkungskurven nach Stimulation mit $\alpha$ -MSH, $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH im Vergleich .....	48
Abb. 18: Auswirkungen unterschiedlicher G418-Konzentrationen auf die cAMP-Akkumulation in MC4R-WT, W16X und Y35X exprimierenden COS-7-Zellen.....	51
Abb. 19: Stimulation von MC4R W16X mit 10 nM NDP-a-MSH und verschiedenen G418- Konzentrationen .....	52
Abb. 20: Einfluß verschiedener G418-Konzentrationen auf die Signalübertragung der untersuchten Stoppmutanten .....	53
Abb. 21: Überleserate bei verschiedenen Aminoglykosiden.....	55
Abb. 22: Signalübertragung von mMC4R W16X nach Inkubation mit G418 .....	56
Abb. 23: mMC4R-Gesamtexpression.....	57
Abb. 24: Aminosäurevergleich der MC4R verschiedener Spezies .....	66
Abb. 25: Wiederherstellung des Signalübertragungsverhaltens bei MC4R S127L.....	70

## Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Ursachen monogener Adipositas .....	9
Tabelle 2: Peptidsequenzen der MC4R-Agonisten $\alpha$ -MSH, $\beta$ -MSH .....	12
Tabelle 3: Arbeiten zum Überleseeffekt in anderen Genen und Organismen .....	16
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide .....	29
Tabelle 5: Die genetische Sequenz im Umfeld der vier Stoppmutationen .....	42
Tabelle 6: Konzentrationswirkungskurven nach Stimulation mit $\alpha$ -MSH, $\beta$ -MSH und NDP- $\alpha$ -MSH im Vergleich .....	49
Tabelle 7: Auswirkungen unterschiedlicher G418-Konzentrationen auf die cAMP-Akkumulation in MC4R-WT, W16X und Y35X exprimierenden COS-7-Zellen.....	52
Tabelle 8: Signalübertragung von mMC4R W16X unter G418-Einfluß.....	57
Tabelle 9: cAMP-Akkumulation des MC4R N62S nach Agonistenstimulation.....	67

# Eigene Publikationen

## Originalarbeiten

Stoeva I, Peneva L, Grigorova R, Vassileva B, **Brumm H**, Grüters A.  
Neonatal TSH screening--an instrument of iodine supplementation monitoring in Bulgaria in comparison to Berlin--a preliminary report.  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997;105 Suppl 4:51-4.

**Brumm H**, Pfeufer A, Biebermann H, Schnabel D, Deiss D, Grüters A.  
Congenital central hypothyroidism caused by homozygous TSH $\beta$  313 $\Delta$ T mutation is caused by a founder effect  
*J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10):4811-4816.

Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, **Brumm H**, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schafer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J.  
Prevalence, Spectrum and Functional Characterization of Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Representative Population-based Sample and Obese Adults from Germany.  
*J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(5):1761-1769.

Rettenbacher E, Tarnow P, **Brumm H**, Prayer D, Wermter AK, Hebebrand J, Biebermann H, Hinney A, Widhalm K.  
A novel non-synonymous mutation in the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) in a 2-year-old Austrian girl with extreme obesity.  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007;115(1):7-12.

Ochoa MC, Azcona C, Biebermann H, **Brumm H**, Razquin C, Wermter AK, Martínez JA, Hebebrand J, Hinney A, Moreno-Aliaga MJ, Marti A, Patiño A, Chueca M, Oyarzabal M, Pelach R; Grupo de Estudio Navarro de la Obesidad Infantil (GENOI).  
A novel mutation Thr162Arg of the melanocortin 4 receptor gene in a Spanish children and adolescent population  
*Clinical Endocrinology* 2007; 66, 652–658.

Friedel S, Reichwald K, Scherag A, **Brumm H**, Wermter AK, Fries HR, Koberwitz K, Wabitsch M, Meitinger T, Platzer M, Biebermann H, Hinney A, Hebebrand J.  
Mutation screen and association studies in the Diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 gene (DGAT2), a positional candidate gene for early onset obesity on chromosome 11q13.  
*BMC Genet*. 2007; 8 (1):17.

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

## Abstracts und Vorträge

Dörnenburg H, **Brumm H**, Halfmann C, Knorr D.  
Effects of phenolic precursors on Vanillin biosynthesis and key enzymes in *Vanilla planifolia* cell cultures  
*Annual IFT Meeting, New Orleans, June 22 - 26, 1996*

Stoeva I, Peneva L, Grigorova R, Vassileva B, **Brumm H**, Grüters A.  
Neonatal TSH screening: an instrument of iodine supplementation monitoring in Bulgaria.  
*Horm Res 1998; 50 (Suppl 3): 65.*

**Brumm H**, Biebermann H, Schöneberg T, Drechsler K, Buhr H, Finke R, Bogner U, Schultz G, Gudermann T, Grüters A.  
Frequency of thyrotropin receptor-Y601H in a European population.  
*J Endocrinol Invest 1998; 21:(Suppl 4) 32.*

**Brumm H**, Biebermann H, Krude H, David M, Stoeva I, Gudermann T, Grüters A.  
Human thyrotropin receptor H601 as a typical example for the importance of functional studies on receptor polymorphisms.  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999, 107 (Suppl 1):12.*

Biebermann H, Schöneberg T, Schulz A, Krause G, **Brumm H**, Grüters A, Schultz G, Gudermann T.  
A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling.  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes 1999; 107 (Suppl 1): 82.*

Biebermann H, **Brumm H**, Wittau N, Schöneberg T, Schultz G, Grüters A, Gudermann T.  
Selective inactivation of one signal transduction pathway by a point mutation in the transmembrane core of the human thyrotropin receptor.  
*J Endocrinol Invest 1999; 22 (Suppl. 6): 124.*

Grüters A, Biebermann H, **Brumm H**, Schöneberg T, Gudermann T.  
Consequences of loss of function mutations of the TSH receptor.  
*Journal of Endocrinology 2000; 164 (Suppl): S20.*

**Brumm H**, Biebermann H, Heinrichs C, Duprez L, Pfeufer A, Grüters A.  
The high frequency of reported newborns with congenital central hypothyroidism due to a TSHB 313 $\Delta$ T mutation is caused by a founder effect  
*ICE - International Congress of Endocrinology, Juni 2001, Denver*  
Abstract ausgewählt zur Publikation im Research Summary Book der ICE

### **Brumm H.**

Identifikation von Kandidatengenen - SNP- und Mikrosatellitenanalyse  
*Methodenworkshop der Arbeitstagung für Experimentelle Schilddrüsenforschung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 6.12.01, Berlin.*

**Brumm H**, Biebermann H, Heinrichs C, Duprez L, Pfeufer A, Grüters A.  
Congenital central hypothyroidism due to a TSHB 313ΔT mutation in a Belgian family is caused by a founder effect  
*XIV Sympozjum Polskiego Towarzystwa Endokrynologów Dzieciecy, 9.9.02, Poznan*  
*Endokrynologia Pediatria 2002, (Suppl. 3).*

Rettenbacher E, Biebermann H, Hinney A, Tarnow P, **Brumm H**, Prayer D, Widhalm K.  
A novel missense mutation in the melanocortin-4 receptor gene (MC4R) in an Austrian 2-year-old girl with extreme obesity and an asymmetry of the amygdaloid nuclei.  
*European Childhood Obesity Group, Wien, 1.10.05*

A. Hinney, T. Bettecken, **H. Brumm**, P. Tarnow, K. Reichwald, P. Lichtner, A. Scherag, C. Vollmert, T. Illig, H.-E. Wichmann, H. Schäfer, D. KORA-Gruppe, H. Biebermann, M. Platzer, T. Meitinger, J. Hebebrand  
MC4R-Mutationen in einem epidemiologischen Kollektiv.  
*21. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, Berlin, 7.10.05*

**H. Brumm**, P. Tarnow, S. Friedel, A. Hinney, J. Hebebrand, A. Grüters, H. Biebermann.  
Die Funktionsherstellung von mutierten MC4R im *in vitro*-Modell.  
*21. Jahrestagung der Deutschen Adipositasgesellschaft, Berlin, 7.10.05*

Hinney A, Bettecken T, **Brumm H**, Tarnow P, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schäfer H, Biebermann H, Platze Mr, Meitinger T, Hebebrand J.  
Melanocortin-4 Receptor Gene (MC4R) Mutations in a Large German Epidemiological Sample.  
*North American Association for the Study of Obesity (NAASO), Vancouver, Canada, 19.10.05*

Scherag A, Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, **Brumm H**, Reichwald K, Lichtner P, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schäfer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J.  
Prevalence, Spectrum and Functional Characterization of Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations in a Representative Population-based Sample and Obese Adults from Germany  
*ICO 2006*

**Brumm H**, Bolze F, Friedel S, Hinney A, Klingenspor M, Hebebrand J.  
Restoration of signalling capabilities in total loss of function MC4R mutations  
*9<sup>th</sup> European Congress of Endocrinology, 1.5.07, Budapest*  
*Endocrine Abstracts 2007 14, OC10.4*

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

## Danksagung

Diese Arbeit entstand am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie -Leitung Prof. Dr. Annette Grüters- an dem ich, mit Unterbrechungen, seit nunmehr zehn Jahren tätig bin. Bereits als Student, gerade frisch mit dem Vordiplom ausgestattet, durfte ich hier ein Praktikum durchführen, das mich sehr schnell für die experimentelle Arbeit in Kooperation mit dem Klinikbetrieb begeistern konnte und folgerichtig in der Anfertigung meiner Studienarbeit in diesem Institut mündete. Daß ich nach einem dreijährigen Ausflug in die Industrie nun zur Anfertigung der Dissertation wieder zu „meinem“ Institut zurückgefunden habe, spricht für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und die Möglichkeiten zu methodisch anspruchsvoller Forschung und selbstbestimmtem Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Annette Grüters, einer Kombination die von ihr gefordert aber auch durch viel persönliches Engagement gefördert wird. Ihr stetes Interesse einerseits an meiner Arbeit am Institut aber auch an meiner beruflichen sowie auch persönlichen Entwicklung durfte ich ebenso wie ihre freundschaftliche Unterstützung in diesen Jahren so oft von ihr erfahren, dass Annette Grüters mein ganz besonderer herzlicher Dank gilt.

Die fachliche Einführung in das Gebiet der hypothalamischen Gewichtsregulation und das spannende Dissertationsthema verdanke ich PD Dr. Heike Biebermann, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit eine ausgesprochen konstruktive und intensive Betreuung zuteil werden ließ und zahlreiche Stunden für die Lektüre früherer Fassungen der vorliegenden Arbeit aufgewendet hat.

Prof. Josef Köhrle danke ich sehr für meine Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1208 "Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth" als assoziiertes Mitglied. Nicht nur die Möglichkeit fachlich über den Tellerrand zu schauen, auch die mehrmaligen Gelegenheiten, meine fortschreitende Arbeit in diesem Rahmen zu präsentieren und zu diskutieren, weiß ich sehr zu schätzen.

Allen meinen Kollegen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und das sehr angenehme, freundschaftliche Arbeitsklima am Institut danken, das mich auf meinem Weg sehr motiviert hat. Insbesondere möchte ich die unschätzbare Mitarbeit von Anna Werner hervorheben, deren großes praktisches Geschick auch bei diffizilen Klonierungen mir die eine oder andere schlaflose Nacht erspart hat.

Nicht unerwähnt bleiben soll, dass diese Arbeit vom BMBF im Rahmen des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN-2) „Adipositas und assoziierte Erkrankungen“ finanziert wurde. Noch höher schätze ich die daraus resultierende Netzwerkbildung ein, insbesondere zur Arbeitsgruppe Prof. Hebebrandt, Dr. Anke Hinney und Susann Friedel (Essen). Sie stellten nicht nur die meisten der in dieser Arbeit untersuchten MC4R-Varianten zur Verfügung sondern lieferten auch über fruchtbare Diskussionen wichtige Aspekte und neue Ideen und Projekte, die es ohne dieses Netzwerk so nicht gegeben hätte. Ich möchte ihnen insbesondere ganz herzlich für ihre freundschaftliche Kollegialität danken. Ein weiterer wichtiger Netzwerkpartner ist die Arbeitsgruppe Prof. Klingenspor, Florian Bolze (München). Sie sind gerade dabei, die vorliegende Arbeit *in vivo* fortzuführen. Auch ihnen gebürt mein Dank für die gute Zusammenarbeit.



## **Erklärung**

„Ich, Harald Brumm, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Aminoglykosid-induzierte Wiederherstellung der Signaltransduktion von Melanocortin-4-Rezeptoren mit prä-matur terminierendem Stoppcodon“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“