

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

DISSERTATION

Untersuchung von Varianten in der kodierenden sowie  
angrenzenden Sequenz von Adipositas-relevanten Genen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jessica Mühlhaus (geb. Grothe)  
aus Berlin

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

2. Prof. Dr. med. T. Schöneberg

3. Prof. Dr. Dr. med. D. Führer-Sakel

Datum der Promotion: 3. Juni 2012

**Inhaltsverzeichnis**

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen.....	III
1. Abstract .....	1
2. Einleitung.....	2
2.1 Adipositas als wachsendes Gesundheitsproblem .....	2
2.2 Genetische Prädisposition für Adipositas .....	2
2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) .....	3
2.3.1 Gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR) .....	4
2.3.2 Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) .....	4
3. Zielstellung .....	5
3.1 Untersuchung von Single-Nukleotid-Polymorphismen in der kodierenden sowie nicht kodierenden Sequenz des <i>GIPR</i> .....	6
3.2 Bewertung von Assoziationssignalen häufiger Genvarianten am Beispiel des <i>MC4R</i> .....	7
3.3 Untersuchung von Adipositas-relevanten Genvarianten im <i>MC4R</i> im Hinblick auf eine mögliche Abstammungsidentität oder einen Mutationshotspot.....	7
3.4 Untersuchung von möglichen pharmakologischen Therapieansätzen zur Wiederherstellung der Rezeptorfunktion - exemplarisch an Nonsense- Mutationen im <i>MC4R</i> .....	7
4. Methoden .....	8
4.1 Analyse von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) .....	8
4.2 Statistische Auswertung und Haplotypanalyse.....	9
5. Ergebnisse.....	10
5.1 Die untersuchten SNPs im Bereich des <i>GIPR</i> zeigen keine Assoziation mit Adipositas, jedoch eine Assoziation mit erhöhtem HOMA-IR.....	10
5.2 SNP-Haplotypen außerhalb des kodierenden Bereichs des <i>MC4R</i> sind mit erhöhtem BMI assoziiert, unabhängig von möglichen <i>MC4R</i> -Mutationen. ....	11
5.3 „Cryptic relatedness“ beeinflusst die Auswertung von Fall-Kontroll-Studien. ..	11
5.4 Das häufige Auftreten der europäischen Doppelmutationen im <i>MC4R</i> [p.Tyr35Stop;c.110 A>T] und p.[Val103Ile;Ser127Leu] basiert auf einem „Common-Founder-Effekt“ . ....	12

---

5.5	Aminoglykosid-vermitteltes Überlesen von Nonsense-Mutationen im <i>MC4R</i> bewirkt die Wiederherstellung funktioneller Rezeptoreigenschaften. ....	14
6.	Diskussion .....	14
6.1	Bedeutung und Interpretation von Adipositas-assoziierten SNPs im Umfeld Adipositas-relevanter Gene .....	14
6.2	Bewertung von Genomweiten Assoziationsstudien vor dem Hintergrund synthetischer Assoziation .....	16
6.3	Einfluss von Populationsstrukturen wie „cryptic relatedness“ auf Assoziationsstudien.....	17
6.4	Therapeutische Intervention bei Nonsense-Mutationen im <i>MC4R</i> .....	17
6.5	Schlussbetrachtung.....	19
7.	Literaturverzeichnis .....	20
8.	Anteilsklärung.....	31
9.	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen.....	33
10.	Curriculum Vitae .....	36
11.	Publikationsliste.....	37
12.	Selbständigkeitserklärung .....	40
13.	Danksagung .....	41

**Verzeichnis der Abkürzungen**

<u>Abkürzung</u>	<u>Bedeutung</u>
AgRP	agouti-related peptide
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (Zyklisches Adenosinmonophosphat)
CART	cocaine and amphetamine-related transcript
CF	cystische Fibrose
COS-7	Nierenzellen der grünen Meerkatze <i>Cercopithecus aethiops</i>
DMD	Duchenne muscular dystrophy (Muskeldystrophie vom Typ Duchenne)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FTO	fat mass and obesity related locus
GIP	gastric inhibitory polypeptide, auch: glucose-dependent insulinotropic peptide
GIPR	gastric inhibitory polypeptide receptor, auch: glucose-dependent insulinotropic peptide receptor
<i>GIPR</i>	gastric inhibitory polypeptide receptor, auch: glucose-dependent insulinotropic peptide receptor (Gen)
GPCR	G-protein-coupled receptor (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GWAS	genome-wide association study (genomweite Assoziationsstudie)
HOMA-IR	homeostatic model assessment of insulin resistance
kb	Kilobasen
LD	linkage disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
<i>LepR</i>	Leptin-Rezeptor (Gen)
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight
MS	mass-spectrometry
MC4R	melanocortin 4 receptor (Melanocortin-4-Rezeptor)
<i>MC4R</i>	melanocortin 4 receptor (Melanocortin-4-Rezeptor) (Gen)
NPY	Neuropeptid Y
<i>Ob</i>	Leptin (Gen)
<i>PC1</i>	Prohormone convertase-1 (Gen)
<i>POMC</i>	pro-opiomelanocortin (Gen)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SNP	Single-Nukleotid-Polymorphismus
$\alpha$ -MSH	melanocyte-stimulating hormone alpha

## 1. Abstract

Im Rahmen von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden bisher 32 Genorte identifiziert, für die eine Assoziation mit Adipositas nachgewiesen werden konnte, darunter *MC4R* (Melanocortin-4-Rezeptor) und *GIPR* (gastric inhibitory polypeptide receptor). Der *MC4R* ist an der hypothalamischen Gewichtsregulation und der *GIPR* an der Insulinsekretion in Reaktion auf orale Aufnahme glukosehaltiger Nahrung beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden genetische Varianten (Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) und Mutationen) in der kodierenden sowie angrenzenden Sequenz dieser beiden Gene im Hinblick auf folgende Aspekte untersucht: a) auf ihren Einfluss auf das Auftreten von Adipositas sowie möglichen Komorbiditäten, b) auf die Bedeutung positiver Assoziationssignale, c) auf ihre Verbreitung und d) auf mögliche zukünftige Therapieansätze.

Für die von uns analysierten SNPs im Bereich des *GIPR* konnte keine Assoziation mit Adipositas bestätigt werden, jedoch zeigte sich eine Assoziation mit erhöhten HOMA-IR-Werten (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance). Für den *MC4R* konnte ein SNP-Haplotyp identifiziert werden, der mit erhöhtem BMI assoziiert ist. Diese Assoziation ist unabhängig von möglichen *MC4R*-Mutationen im kodierenden Bereich. Zusätzlich konnten wir erste Hinweise auf einen Haplotyp feststellen, der sowohl zwischen übergewichtigen *MC4R*-Mutationsträgern und Nichtträgern, als auch zwischen Trägern funktionell relevanter und nicht relevanter Mutationen unterscheidet. Dabei wurde der Einfluss von „cryptic relatedness“ deutlich, da eine größere Anzahl an Studienteilnehmern Träger der häufigen europäischen Doppelmutation [p.Tyr35Stop; c.110 C>T] war. Eine zusätzliche Haplotypanalyse bei den Familien der Doppelmutationsträger und unabhängigen Kontroll-Trios ergab, dass ein „Common-Founder-Effekt“ als sehr wahrscheinlich angenommen werden kann.

Da *MC4R*-Nonsense-Mutationen wie die [p.Tyr35Stop; c.110 C>T] in der Regel mit schwerer, frühmanifestester Adipositas einhergehen, wurde schließlich die Möglichkeit eines pharmakologischen Therapieansatzes untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Aminoglykosid-vermittelte Überleseeffekt bei *MC4R*-Nonsense-Mutationen in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren eine (teilweise) Wiederherstellung der Proteinexpression bzw. Rezeptorfunktion bewirkt. In Zukunft sind weitere Analysen, auch im Hinblick auf polygene Effekte notwendig, um die Zusammenhänge bei genetisch bedingter Adipositas zu verstehen und um weitere Diagnosemethoden und Therapieansätze entwickeln zu können.

## 2. Einleitung

### 2.1 Adipositas als wachsendes Gesundheitsproblem

Adipositas ist durch eine über die Maßen hohe Anreicherung von Körperfett charakterisiert, wodurch die Gesundheit stark beeinträchtigt werden kann (World Health Organization, 2011). Während Adipositas bei Erwachsenen über den sogenannten Body Mass Index ( $BMI = \text{Gewicht in kg} / (\text{Größe in cm})^2$ ) bestimmt wird (World Health Organization, 2011), gibt es für Kinder und Jugendlichen eine eigene Einteilung über Perzentilen, beruhend auf einem Referenzsystem, das auf Datensätze zu Körpergröße und Gewicht in verschiedenen Alters- und Geschlechtsgruppen sowie Ethnien zurückgeht (Kromeyer-Hauschild *et al.*, 2001, Rosario *et al.*, 2010). Adipositas gilt heute aufgrund der daraus resultierenden Folgeerkrankungen wie Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Dyslipidämie), Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Muskel-Skelett-Erkrankungen (z.B. Osteoarthritis) und bestimmte Krebsformen (Brust-, Gebärmutter-, Darmkrebs) als ständig wachsendes globales Gesundheitsproblem (World Health Organization, 2011).

### 2.2 Genetische Prädisposition für Adipositas

Adipositas ist eine multifaktorielle Erkrankung, die neben Umweltfaktoren (z.B. Stress, Bewegungsmangel und dem erleichterten Zugriff auf hochkalorische Nahrungsmittel) bei Erwachsenen zu ca. 50 bis 85 % (Stunkard *et al.*, 1986, Allison *et al.*, 1996, Maes *et al.*, 1997, Bulik *et al.*, 2003) und bei Kindern zu bis zu 77 % (Wardle *et al.*, 2008) durch genetische Faktoren bestimmt wird.

Bei genetischer Betrachtungsweise wird zwischen monogener und polygener Adipositas unterschieden (Hinney *et al.*, 2010, Russo *et al.*, 2010). Monogene Adipositas wird durch einen Hauptgendefekt ausgelöst, während bei polygener Adipositas häufige Genvarianten an mehreren Genorten für die Entwicklung von Adipositas verantwortlich gemacht werden. Zu den Hauptgendefekten zählen seltene Mutationen in einzelnen Genen wie zum Beispiel *MC4R* (Melanocortin-4-Rezeptor) (Yeo *et al.*, 1998), *POMC* (pro-opiomelanocortin) (Krude *et al.*, 2003, Farooqi *et al.*, 2002), *PC1* (prohormone convertase-1) (Jackson *et al.*, 1997), *Ob* (Leptin) (Montague *et al.*, 1997) und *LepR* (Leptin-Rezeptor) (Clement *et al.*, 1998), die schon im heterozygoten Status zu adipösen Phänotypen führen können (Hinney *et al.*, 2010). Polygene Adipositas basiert auf dem gleichzeitigen Vorhandensein von häufigen Varianten in mehreren Genen, die

einzelnen geringe Effekte auf die Gewichtsregulation haben. Man geht jedoch davon aus, dass sie in der Summe den größten Anteil an der genetischen Variation der humanen Gewichtsregulation haben (Hinney & Hebebrand, 2008).

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) basieren auf Daten zu über 30 Millionen Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) im menschlichen Genom (National Center for Biotechnology Information, 2011) und haben ein hohes Potential für die Aufdeckung geringerer Geneffekte. Bis heute wurden im Rahmen von GWAS 32 Loci im humanen Genom identifiziert, für die eine Assoziation mit Adipositas bestätigt werden konnte. Auf diese Weise konnten diverse polygene Varianten mit reproduzierbarem Effekt auf das Körpergewicht identifiziert werden, darunter SNPs in der Genregion des *FTO* (fat mass and obesity related locus) und des *MC4R* (Speliotes *et al.*, 2010). Im Bereich des *MC4R* zeigten unter anderem die SNPs rs17782313 (Loos *et al.*, 2008), rs17700633 (Loos *et al.*, 2008) und rs12970134 (Chambers *et al.*, 2008) positive Assoziationssignale mit erhöhtem BMI. Der Polymorphismus rs2229616 (p.Val103Ile) in der kodierenden Region des *MC4R* konnte als erste protektive Variante gegen Adipositas identifiziert werden (Geller *et al.*, 2004). Für viele Gene ist die Funktion und Rolle für die Gewichtsregulation jedoch noch weitestgehend ungeklärt.

### 2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf zwei Genen, die für den MC4R bzw. den GIPR (gastric inhibitory polypeptide receptor, auch: glucose-dependent insulinotropic peptide receptor) kodieren. Sie gehören der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und sind durch sieben Transmembranhelices, drei intrazellulären und drei extrazellulären Schleifen sowie einen extrazellulären N-Terminus und einen intrazellulären C-Terminus charakterisiert.

GPCRs spielen eine zentrale Rolle bei diversen physiologischen Funktionen im menschlichen Organismus, sodass bis heute mehr als 30 humane Erkrankungen bekannt sind, die monogen durch Mutationen in GPCRs bedingt sind (Schöneberg *et al.*, 2004). 5 - 10 % der bekannten krankheitsbedingenden Mutationen in GPCRs sind sogenannte Nonsense-Mutationen (Schöneberg *et al.*, 2004), bei denen es zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und damit vorzeitigem Abbruch der Proteintranslation kommt. In diesem Zusammenhang stellen Nonsense-Mutationen im *MC4R* ein vielversprechendes Target für klinische Interventionen dar.

### 2.3.1 Gastric inhibitory polypeptide receptor (GIPR)

Der GIPR gehört der Klasse B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an und aktiviert den Adenylat-Cyclase-Weg über Gas-Kopplung. Der Rezeptor wird auf Chromosom 19q13.2 - 13.3 in 14 Exons kodiert (Usdin *et al.*, 1993, Yamada *et al.*, 1995, Volz *et al.*, 1995) und wird in vielen Geweben exprimiert, verstärkt aber in den Beta-Zellen des Pankreas und den Adipozyten (Yip *et al.*, 1998). Er bindet das Inkretin GIP (gastric inhibitory polypeptide, auch: glucose-dependent insulinotropic peptide), welches von den K-Zellen des Duodenums in Reaktion auf die orale Aufnahme größerer Mengen glukose- und lipidreicher Nahrung ausgeschüttet wird. GIP löst in den Beta-Zellen die Insulin-Sekretion aus und fördert deren Zellteilung und Zellüberleben (Yip & Wolfe, 2000). In Adipozyten bewirkt GIP die Aufnahme von Fettsäuren, allerdings sind die genauen molekularen Mechanismen noch weitgehend ungeklärt (Getty-Kaushik *et al.*, 2006, Kieffer, 2003).

Der GIPR ist an einem breiten Spektrum physiologischer Antworten auf die Aufnahme und Verfügbarkeit von Nährstoffen beteiligt (McIntosh *et al.*, 2009). Studien haben gezeigt, dass dem GIPR eine Bedeutung für die Glukose-Homöostase (Saxena *et al.*, 2010, Yip & Wolfe, 2000) und für Symptome des metabolischen Syndroms (Nitz *et al.*, 2007) zuzuschreiben ist. Zusätzlich wird für den GIPR eine Beteiligung an der Regulation von Körpergewicht und damit eine Bedeutung für Adipositas vermutet. So konnten für SNPs in der umliegenden, nicht kodierenden Sequenz des *GIPR* positive Assoziationssignale mit erhöhtem BMI (Vogel *et al.*, 2009, Speliotes *et al.*, 2010) ermittelt werden, und *GIPR*-Knockout-Mäuse zeigen sich unter „High-fat“-Diät resistent gegenüber Diät-induzierter Adipositas (Miyawaki *et al.*, 2002). Somit ist das für den GIPR kodierende Gen ein interessanter Kandidat bei der Untersuchung von Adipositas und damit einhergehenden Folgeerkrankungen.

### 2.3.2 Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)

Bei dem MC4R handelt es sich um einen GPCR der Klasse A, der in nur einem Exon auf Chromosom 18q21.3 kodiert ist und über Gas-Kopplung signalisiert (Tao, 2010). Der MC4R wird unter anderem im Hypothalamus exprimiert und ist wesentlicher Bestandteil des Leptin-Melanocortin-Signalweges und somit wesentlich an der hypothalamischen Appetitregulation beteiligt (Lee, 2009).

Mutationen im *MC4R* können zu frühmanifestierter Adipositas führen, was den MC4R zu einem Ansatzpunkt für mögliche weitere Behandlungsmethoden von genetisch

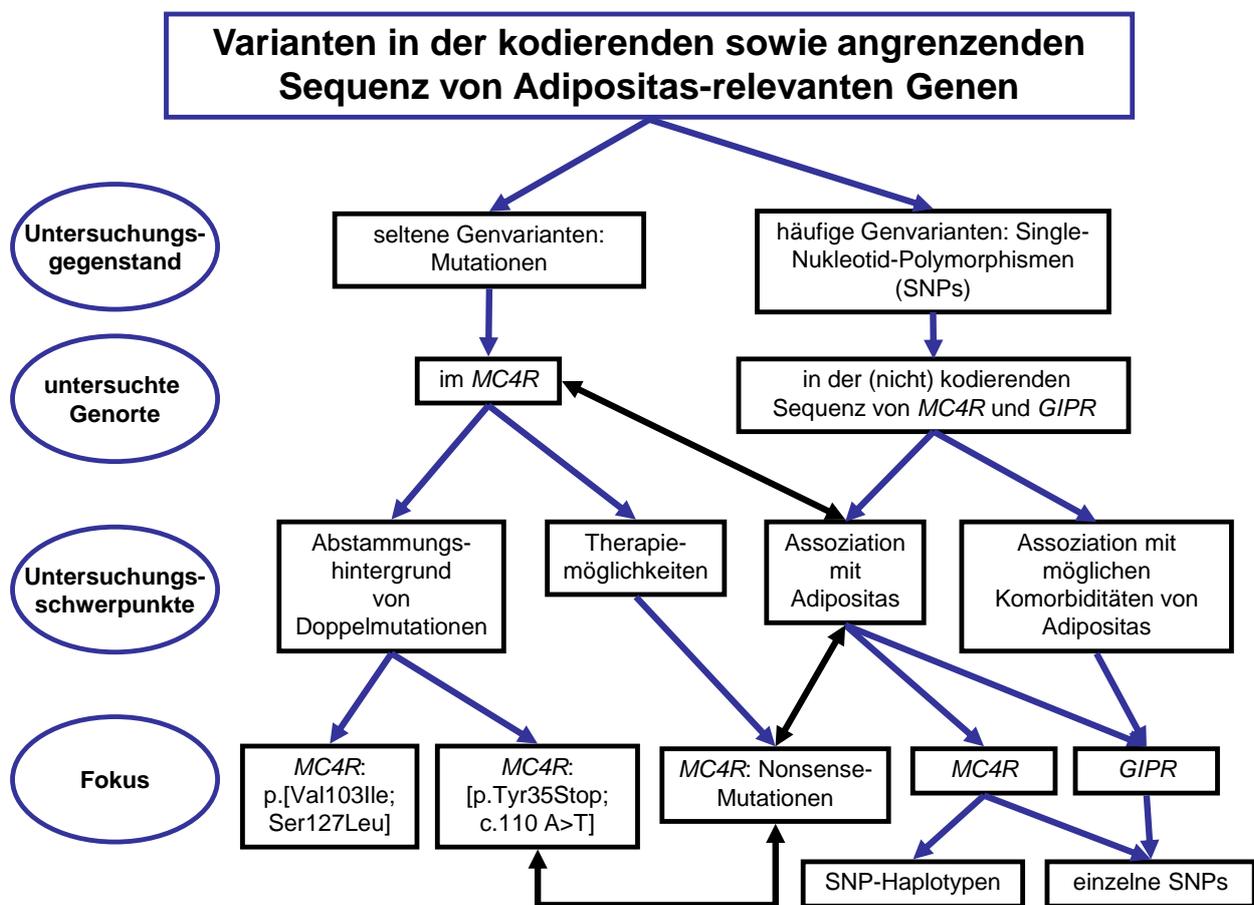
bedingter Adipositas macht. Bei *MC4R*-Nonsense-Mutationen bewirken Punktmutationen durch einen Basenaustausch im genetischen Code die Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons (TAG, TAA oder TGA), was zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteintranslation und somit zu einem verkürzten, nicht funktionsfähigen Rezeptorprotein führt.

Im *MC4R*-Gen sind mittlerweile insgesamt acht Nonsense-Mutationen bekannt. Das Aminoglykosid-vermittelte Überlesen von Nonsense-Mutationen in anderen Genen wurde bereits erfolgreich *in vitro* und in Mausmodellen gezeigt, wobei die Expression funktionsfähiger Proteine erfolgte (Keeling *et al.*, 2001, Wilschanski *et al.*, 2003, Sangkuhl *et al.*, 2004, Howard *et al.*, 1996, Burke & Mogg, 1985, Davies *et al.*, 1964). Dabei beruht das Prinzip auf der Absenkung der Translationsgenauigkeit an den Ribosomen durch Bindung des Aminoglykosids an der 18S rRNA eukaryotischer Zellen. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Überleserate des Stopp-Codons und somit zur Unterdrückung der Translationsterminierung (Salas-Marco & Bedwell, 2005, Zingman *et al.*, 2007). Klinische Studien zur Überleseeseigenschaft von Aminoglykosiden wurden bereits erfolgreich an Patienten mit zum Beispiel Cystischer Fibrose (Wilschanski *et al.*, 2003), Muskeldystrophie vom Typ Duchenne (Malik *et al.*, 2010) und Hailey-Hailey-Syndrom (Kellermayer *et al.*, 2006) durchgeführt. Eine bis 2008 vollständige Liste aller klinischen Studien mit Aminoglykosiden ist bei Linde *et al.* aufgeführt (Linde & Kerem, 2008). Untersuchungen zur Überleseeffizienz von Nonsense-Mutationen im *MC4R* unter Gabe von Aminoglykosiden stellen eine Neuheit dar und bislang sind noch keine Studien bekannt, die Aminoglykoside als Therapieansatz für Adipositas untersucht haben.

### 3. Zielstellung

Seit Langem sind Positionen im humanen Genom bekannt, die mit monogener oder polygener Adipositas assoziiert sind. Im Fokus dieser Arbeit steht die Untersuchung genetische Varianten (Mutationen und SNPs) in der umgebenden nicht kodierenden Sequenz sowie innerhalb zwei prominenter Adipositas-relevanter Gene, *MC4R* und *GIPR*. Die Varianten sollen im Hinblick auf verschiedene Aspekte beleuchtet werden. Die Untersuchung soll zunächst in Bezug auf polygene Effekte hervorgerufen durch häufige Varianten (SNPs) und SNP-Haplotypen im Bereich des *GIPR* sowie *MC4R* erfolgen und schließlich auf der Ebene monogener Adipositas mit Fokus auf Mutationen

im *MC4R*. In Abbildung 1 sind die Zusammenhänge und Untersuchungsstrukturen dieser Arbeit schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Schematische Übersicht zu den im Rahmen der Arbeit untersuchten Strukturen und deren Zusammenhänge.** Schwarze Pfeile repräsentieren bereits bekannte Zusammenhänge. Blaue Pfeile repräsentieren die Zusammenhänge, die im Rahmen der Arbeit untersucht werden sollen.

Folgende Untersuchungsschwerpunkte liegen dieser Arbeit zugrunde:

### 3.1 Untersuchung von Single-Nukleotid-Polymorphismen in der kodierenden sowie nicht kodierenden Sequenz des *GIPR*

Am Beispiel des *GIPR* soll der Einfluss häufiger genetischer Varianten auf Adipositas und mögliche Komorbiditäten untersucht werden. Die Bedeutung bereits bekannter SNPs, die außerhalb des kodierenden Bereiches des *GIPR* lokalisiert sind, ist jedoch noch weitgehend unklar. Der *GIPR* ist an der Regulation von Körpergewicht (Miyawaki *et al.*, 2002) und Glukose-Homöostase (Saxena *et al.*, 2010, Yip & Wolfe, 2000) beteiligt. Ziel war es somit, eine mögliche Assoziation von SNPs im Bereich des *GIPR* mit Adipositas zu überprüfen. Da Insulinresistenz und eine gestörte Glukosetoleranz

typische Begleiterscheinungen von Adipositas darstellen (Kieffer, 2003), soll zusätzlich der Zusammenhang zwischen *GIPR*-SNPs und Insulinresistenz untersucht werden.

### **3.2 Bewertung von Assoziationssignalen häufiger Genvarianten am Beispiel des *MC4R***

Bisher ist es noch weitgehend ungeklärt, in wieweit einzelne bekannte Varianten in umgebenden, nicht kodierenden Bereichen von Genen tatsächlich auf diese Gene hinweisen, Teil eines Signals sind, das von mehreren Varianten hervorgerufen wird, oder für sich alleine typische anthropometrische Merkmale für Adipositas wie BMI oder Hüftumfang beeinflussen. Ein Ziel dieser Arbeit war somit, exemplarisch am Beispiel des *MC4R* SNPs in der umgebenden, nicht kodierenden Sequenz mit Mutationen innerhalb des *MC4R* in Beziehung zu setzen und ihre Bedeutung im Hinblick auf eine Assoziation mit Adipositas zu bewerten.

### **3.3 Untersuchung von Adipositas-relevanten Genvarianten im *MC4R* im Hinblick auf eine mögliche Abstammungsidentität oder einen Mutationshotspot**

Bei den Doppelmutationen [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] (Hinney *et al.*, 1999) und p.[Val103Ile; Ser127Leu] (Valli-Jaakola *et al.*, 2004) handelt es sich um häufig auftretende *MC4R*-Mutationen, die zum (teilweisen) Funktionsverlust des Rezeptors führen und mit frühmanifestester Adipositas assoziiert sind. Doppelmutationen, bei denen sich die beiden Mutationen auf einem Allel befinden, machen eine gemeinsame Abstammungsidentität wahrscheinlich. Daher ist eine Zielstellung der Arbeit, am Beispiel der *MC4R*-Doppelmutationen [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] und p.[Val103Ile; Ser127Leu] Entstehungsursprünge von Doppelmutationen und mögliche Verwandtschaftsmuster zu untersuchen.

### **3.4 Untersuchung von möglichen pharmakologischen Therapieansätzen zur Wiederherstellung der Rezeptorfunktion - exemplarisch an Nonsense-Mutationen im *MC4R***

GPCRs sind zu bis zu 60 % Angriffspunkt pharmakologischer Interventionen (Schöneberg *et al.*, 2004). Mutationen in GPCRs können nicht nur Aufschluss über Struktur und Funktion geben, sondern auch Ansatzpunkte für neue Behandlungsmethoden darstellen. So ist ein Ziel, durch Mutationen beeinträchtigte GPCRs wie den *MC4R* in ihrer Funktion wiederherzustellen. Als Vorarbeiten wurden

innerhalb der Arbeitsgruppe bereits drei *MC4R*-Nonsense-Mutationen (p.Trp16Stop; [p.Tyr35Stop; c.110 A>T]; p.Glu61Stop) im Hinblick auf die Überleseeffizienz durch Aminoglykoside betrachtet. In dieser Arbeit soll eine vierte Nonsense-Mutation im *MC4R* (p.Gln307Stop) auf die Wiederherstellung der Rezeptorfunktionen durch Aminoglykoside untersucht und den anderen drei Mutationen gegenübergestellt werden.

#### 4. Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben diversen molekularbiologischen Standardmethoden projektbezogene Methoden einschließlich funktioneller Assays angewandt, die in den jeweiligen Publikationen beschrieben sind (Sauber, Grothe *et al.*, 2010, Scherag, Jarick, Grothe *et al.*, 2010, Brumm\*, Mühlhaus\* *et al.*, 2011). Im Folgenden soll kurz auf einige spezielle projektbezogene Methoden eingegangen werden.

##### 4.1 Analyse von Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNP)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren zur Multiplex-Analyse von SNPs genutzt:

- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie unter Anwendung des iPLEX<sup>®</sup> Gold-Assays (Sequenom, San Diego, USA)
- SNaPShot<sup>™</sup>-Verfahren unter Anwendung des ABI PRISM<sup>®</sup> SNaPShot<sup>™</sup> Multiplex Kits (Applied Biosystems, Carlsbad, USA)

Beide Verfahren gehen von einem mittels PCR amplifizierten DNA-Fragment als Ausgangsprodukt aus, das den zu analysierenden SNP beinhaltet.

Das Verfahren der MALDI-TOF Massenspektrometrie ermöglicht die gleichzeitige Analyse von bis zu 40 SNPs in einem Reaktionsansatz (Multiplex). Im Rahmen der iPLEX-Reaktion werden die jeweiligen Einzelstränge nach der Abbruchreaktion massenmodifiziert und dann in der MALDI-TOF Massenspektrometrie über ihre molekulargewichtsbedingte Flugzeit im elektrischen Feld allelspezifisch unterschieden (Oeth *et al.*, 2005, Pusch *et al.*, 2002).

Das SNaPShot<sup>™</sup>-Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von bis zu zehn verschiedenen SNP-Positionen in einem Reaktionsansatz unter Verwendung des ABI

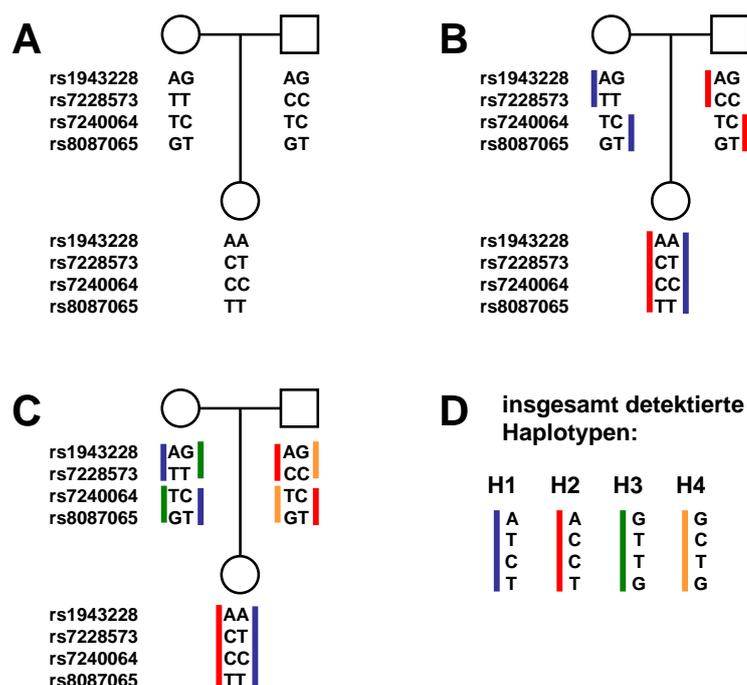
PRISM<sup>®</sup> SNaPshot<sup>™</sup> Multiplex Kits (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Das Grundprinzip beruht hier auf der Unterscheidung der entsprechenden SNP-Positionen über allelspezifische Farbmarkierung der Extensionsprodukte (Applied Biosystems, 2005).

#### **4.2 Statistische Auswertung und Haplotypanalyse**

Ein Großteil der statistischen Analysen (vgl. Abschnitt 5.2 und 5.3) wurde im Rahmen des NGFN-Netzwerkes mit Kooperationspartnern aus Essen durchgeführt. Die Analysen sind in den jeweiligen Veröffentlichungen beschrieben. Statistische Auswertung und Darstellung der Zellkulturexperimente erfolgte mittels GraphPad Prism 4 und 5 (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA).

Ein Teil der in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Analysen beruht auf der Bestimmung von Haplotypen und deren Assoziation mit Adipositas (vgl. Abschnitt 5.2, 5.3 und 5.4). Unter einem Haplotyp versteht man einen bestimmten Satz Allele (z.B. aus polymorphen DNA-Markern wie SNPs) auf einem Chromosom oder Chromosomenabschnitt (The International HapMap Consortium, 2003).

Die Analyse von Haplotypen im Rahmen der Untersuchung auf eine mögliche Abstammungsidentität wurde anhand von Familientrios durchgeführt. Hierzu habe ich die Familienmitglieder im Hinblick auf bestimmte SNP-Positionen genotypisiert. Anschließend habe ich die jeweiligen Basenpositionen des Kindes mit denen der Eltern verglichen und darüber eine Zuordnung zu dem jeweiligen Allel von Mutter bzw. Vater vollzogen (vgl. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Beispielhafte, schematische Darstellung der Bestimmung von Haplotypen über Familientrios.** Die Familienmitglieder wurden jeweils im Hinblick auf die zu untersuchenden SNPs genotypisiert (hier mit vier Beispielen angegeben). Die Haplotypen wurden schließlich über den Vergleich der Allelverteilung beim Kind mit der Allelverteilung der Eltern bestimmt. Farbige Markierungen symbolisieren die Zugehörigkeit zu dem jeweiligen Haplotyp. Das Kind ist demnach Träger der Haplotypen H1 (blau) und H2 (rot), die Eltern besitzen jeweils noch einen zusätzlichen Haplotyp (Mutter: H3 (grün); Vater: H4 (gelb)). A. Stammbaum und Genotyp-Verteilung eines Familientrios bestehend aus Vater, Mutter, Tochter; B. Familientrio mit markierten Allelen des Kindes, jeweils von Vater und Mutter; C. Familientrio mit ergänzter Markierung zusätzlicher Haplotypen bei Mutter und Vater; D. Sämtliche mögliche Haplotypen (H1-H4), die über dieses Familientrio detektiert werden konnten.

## 5. Ergebnisse

Folgende Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt und in drei ausgewählten Publikationen veröffentlicht, auf die im Einzelnen hingewiesen wird.

### 5.1 Die untersuchten SNPs im Bereich des *GIPR* zeigen keine Assoziation mit Adipositas, jedoch eine Assoziation mit erhöhtem HOMA-IR.

[ **Publikation 1:** Sauber, J., Grothe, J. *et al.* (2010): Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. *European Journal of Endocrinology* 163:259-264.]

Es konnte keine Assoziation zwischen erhöhtem BMI und jeweils einem der drei betrachteten *GIPR*-SNPs (rs811428, rs230382, 1800437) festgestellt werden. Jedoch

konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem SNP rs1800437 (in Exon 12) und einem erhöhten HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance) Level ( $p < 0,001$ ) ermittelt werden. Dies bestätigt den *GIPR* als einen möglichen Kandidaten für die Ursache gestörter Glukose-Homöostase.

## **5.2 SNP-Haplotypen außerhalb des kodierenden Bereichs des *MC4R* sind mit erhöhtem BMI assoziiert, unabhängig von möglichen *MC4R*-Mutationen.**

[ **Publikation 2:** Scherag, A., Jarick, I., Grothe, J. *et al.* (2010). Investigation of a Genome Wide Association Signal for Obesity: Synthetic Association and Haplotype Analyses at the Melanocortin 4 Receptor Gene Locus. *PLoS One* 5:e13967.]

Bei der Analyse von 78 SNPs in der nicht kodierenden Sequenz um den *MC4R* hat der SNP rs12970134 die höchste Assoziation mit Adipositas gezeigt ( $p = 0.004$ ). Er liegt im Kopplungsungleichgewicht (LD, linkage disequilibrium) mit dem schon zuvor beschriebenen SNP rs17782313 (Loos *et al.*, 2008). Konditionale Analysen haben sieben weitere SNPs offenbart, die unabhängige Assoziationssignale liefern. Aus diesen insgesamt acht SNPs (ausgenommen rs17782313, da dieser kein unabhängiges Signal liefert) konnten drei Haplotypen (bestehend aus jeweils zwei SNPs) mit dem geringsten p-Wert ermittelt und in 363 unabhängigen, übergewichtigen Trios bestätigt werden. Der Haplotyp aus rs12970134 und rs1943229 umschließt die kodierende Region des *MC4R* und liefert das höchste relative Risiko für Adipositas. Die Einbeziehung von kodierenden Varianten im *MC4R*-Gen zeigte keinen Einfluss auf die Effektstärke dieses Haplotyps und schließt somit eine synthetische Assoziation aus.

## **5.3 „Cryptic relatedness“ beeinflusst die Auswertung von Fall-Kontroll-Studien.**

[Mühlhaus, J. *et al.* (2011): Do common variants separate between obese melanocortin 4 receptor gene mutation carriers and non-carriers? The impact of cryptic relatedness. *Obesity Facts*. (submitted)]

Zur Feststellung eines Haplotyps, der zwischen funktionell relevanten und nicht relevanten *MC4R*-Mutationsträgern unterscheidet, wurden Haplotypenanalysen basierend auf 28 SNPs in übergewichtigen *MC4R*-Mutationsträgern (62 Individuen) und Nichtträgern (28 Individuen) durchgeführt, in die insgesamt 25 verschiedene *MC4R*-Mutationen einbezogen wurden. Diese Mutationen wurden aufgrund ihrer funktionellen Charakterisierung drei verschiedenen Kategorien zugeordnet: a) „wie Wildtyp“, b)

„teilweiser Funktionsverlust“ und c) „kompletter Funktionsverlust“. Haplotypanalysen unter Einbeziehung sämtlicher zur Verfügung stehender Mutationsträger zeigten einen SNP-Haplotyp 3' von *MC4R* (rs17782313, rs12958350, rs17066829), der zwischen Trägern und Nichtträgern von *MC4R*-Mutationen sowie zwischen funktionell relevanten (Kategorie c) „kompletter Funktionsverlust“) und nicht relevanten Mutationen (Kategorie a) „wie Wildtyp“) unterscheidet. Sensitivitätsanalysen, bei denen jeweils nur ein Mutationsträger pro Mutation in die Rechnung einbezogen wurde, konnten dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Dies zeigt den Einfluss von „cryptic relatedness“, d.h. den Einfluss von möglichen verborgenen (fernen) Verwandtschaftsverhältnissen. So beinhaltet die Kategorie c) „kompletter Funktionsverlust“ eine große Anzahl an Trägern der *MC4R*-Mutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] (17 von 25 Patienten), für die ein gemeinsamer Vorfahre als sehr wahrscheinlich angenommen werden kann. Ebenso ist für die Träger der Mutation p.Thr112Met, die in der Kategorie a) „wie Wildtyp“ in Mehrzahl vertreten sind (10 von 19 Patienten), ein Verwandtschaftsverhältnis anzunehmen. Die Einflüsse von möglichen unterschwelligem Verwandtschaftsbeziehungen stellen somit einen wesentlichen Faktor dar, der bei Haplotyp-basierten Fall-Kontroll-Studien und bei der Zusammenführung von Datensätzen aus GWAS und Resequenzierungen in die Auswertung mit einbezogen werden muss.

#### **5.4 Das häufige Auftreten der europäischen Doppelmutationen im *MC4R* [p.Tyr35Stop;c.110 A>T] und p.[Val103Ile;Ser127Leu] basiert auf einem „Common-Founder-Effekt“.**

[Mühlhaus, J. *et al.* (2011): Obesity Relevant Melanocortin 4 Receptor Gene Variants: Mutational Hotspot or Identical by Descent? (in preparation)]

Zur Untersuchung von möglichen Abstammungsidentitäten der beiden *MC4R*-Doppelmutationen [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] und p.[Val103Ile;Ser127Leu] wurden insgesamt 30 SNPs in der umgebenden, nicht kodierenden Sequenz des *MC4R*-Gens (28 SNPs 40 Kilobasen (kb) 5' bis 60 kb 3'; zusätzlich: rs17782313 ca. 188 kb und rs17700633 ca. 110 kb 3' vom *MC4R*-Gen) in Familientrios europäischer Herkunft (normal- und übergewichtig) genotypisiert. Mit Hilfe dieser Daten habe ich mögliche vorhandene Haplotypen (bestehend aus 13 SNPs) wie im Methodenteil schematisch dargestellt (vgl. Abbildung 2) ermittelt, sowohl für die Kontrolltrios als auch für die

Träger der Doppelmutationen und deren Familien. Insgesamt konnte ich 11 unterschiedliche Haplotypen (vgl. Tabelle 1) ermitteln, wobei sich ein Haplotyp mit einer Frequenz von 71,3 % als „Haupthaplotyp“ herausgestellt hat. Die europäische Doppelmutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] liegt auf dem Haupthaplotyp H1, womit eine gemeinsame Abstammungsidentität als sehr wahrscheinlich angesehen werden kann. Träger der Doppelmutation p.[Val103Ile;Ser127Leu] haben hingegen den seltenen Haplotyp H7 gemeinsam, womit auch hier ein gemeinsamer Vorfahre als sehr wahrscheinlich anzunehmen ist.

**Tabelle 1: Auflistung aller durch Genotypisierung und Haplotypanalyse in den Kontroll- und Patienten-Trios ermittelten Haplotypen.** Die Haplotypanalyse erfolgte über Kontrolltrios wie im Methodenteil dargestellt. Die Position beschreibt die SNP-Position auf Chromosom 18q21.3 (dbSNP (Sherry *et al.*, 2001) genome build 36.3). Die Haplotypen H1 - H10 wurden in normal- und übergewichtigen Familientrios europäischer Herkunft ermittelt, wobei H1 mit einer Frequenz von 71,3 % als Haupthaplotyp und vermutlich ältester Haplotyp anzusehen ist. H11 wurde zusätzlich in der Familie eines Trägers der *MC4R*-Mutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] ermittelt. Die *MC4R*-Mutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] liegt auf einem Haplotyp mit H1 (gelb), die Mutation p.[Val103Ile;Ser127Leu] liegt auf einem Haplotyp mit H7 (blau).

Position *	SNP	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11
56187483	rs8093815	G	A	A	A	G	A	A	A	A	G	G
56188413	rs35748167	G	G	G	G	G	G	C	G	G	G	G
56191604	rs17066842	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G
56204183	rs8091237	C	G	G	G	C	C	C	G	C	G	C
56206768	rs7228573	C	T	T	T	T	C	T	T	T	C	T
56210509	rs7240064	C	T	T	C	C	T	C	C	C	C	C
56210914	rs1943228	A	G	G	A	A	G	A	A	A	A	A
56211106	rs17773774	C	A	A	C	C	A	C	C	C	C	C
56211541	rs8087065	T	G	G	T	T	G	T	T	T	G	T
56214080	rs17773792	T	G	G	T	T	G	T	T	T	G	T
56215839	rs17066879	A	T	T	A	A	T	A	A	A	A	A
56216588	rs17066883	G	A	A	G	G	G	A	A	A	G	A
56223516	rs17066892	C	T	C	T	T	C	T	T	T	T	T
<b>Frequenz in den Kontroll-Trios [%]</b>		71.3	11.4	4.0	3.0	2.0	1.5	1.0	1.0	1.5	3.5	0,0**

\* Position *MC4R* auf Chromosom 18q21.3: 5618954 - 56190981

\*\* nicht in den Kontrollen detektiert, aber in einem Träger der Doppelmutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] (Allel vom Vater des Patienten)

## 5.5 Aminoglykosid-vermitteltes Überlesen von Nonsense-Mutationen im *MC4R* bewirkt die Wiederherstellung funktioneller Rezeptoreigenschaften.

[**Publikation 3:** Brumm, H.\*, Mühlhaus, J.\* *et al.* (2011): Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through. *Obesity (Silver Spring)*, 7 July [Epub ahead of print]; \* gleichberechtigte Erstautoren]

Anhand von funktionellen Assays zur Proteinexpression und Rezeptorsignalisierung konnten wir einen Überleseeffekt bei Nonsense-Mutationen im *MC4R*-Gen unter Vermittlung von Aminoglykosiden detektieren. Die Wiederherstellung der funktionellen Rezeptoreigenschaften ist dabei abhängig von vier verschiedenen Faktoren: a) der Triplet-Seqenz des Stopp-Codons, b) der das Stopp-Codon umgebenden Sequenz, c) der Position der Nonsense-Mutation innerhalb des Rezeptors und d) von den applizierten Aminoglykosiden und den verwendeten *MC4R*-Liganden. Nachfolgend sind die Sequenz des jeweiligen Stopp-Codons sowie die für die Überleseeffizienz wichtige Sequenzposition +1 in Klammern angegeben. Funktionelle Rezeptoreigenschaften konnten wiedererlangt werden für die im N-Terminus befindlichen Nonsense-Mutationen p.Trp16Stop (TGA A) und p.Tyr35Stop (TAA T). Die Rezeptorfunktion konnte bei der im C-Terminus befindlichen Mutation p.Gln307Stop (TAA G) nur in geringem Maße wieder hergestellt werden, während bei der *MC4R*-Mutation p.Glu61Stop (TAG A), die sich in der ersten Transmembranhelix befindet, keine bzw. nur sehr geringe Rezeptorsignalisierung messbar war.

Die Wiederherstellung eines kompletten Rezeptorproteins bei der *MC4R*-Nonsense-Mutation p.Trp16Stop nach Zugabe des Aminoglykosids G418 konnte ich mittels Fluoreszenzmarkierung und mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie nachweisen. Die Fluoreszenzerkennung zeigt außerdem die Lokalisierung der exprimierten Rezeptoren in der Zellmembran, die mit der des Wildtyp-Rezeptors vergleichbar ist.

## 6. Diskussion

### 6.1 Bedeutung und Interpretation von Adipositas-assoziierten SNPs im Umfeld Adipositas-relevanter Gene

In den letzten Jahren haben sich GWAS zu einer gängigen Methode für die Identifizierung von krankheitsverursachenden genetischen Faktoren entwickelt, die es

ermöglichen, das gesamte humane Genom mit Hilfe von Hochdurchsatz-Methoden in mehreren Tausend Individuen zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir Ergebnisse aus vorangegangenen genomweiten Assoziationsstudien teilweise bestätigen: So bestehen Assoziationen zwischen SNPs (sowie Haplotypen aus diesen) in der umgebenden, nicht kodierenden Sequenz des *MC4R* mit Adipositas (Scherag, Jarick, Grothe *et al.*, 2010, Mühlhaus *et al.*, 2011). Für den *GIPR* konnten wir, im Gegensatz zum *MC4R*, keine Assoziation mit erhöhtem BMI bestätigen, jedoch konnten wir eine Assoziation zwischen dem *GIPR*-SNP rs1800437 und einem erhöhten HOMA-IR-Wert ermitteln (Sauber, Grothe *et al.*, 2010). Damit konnten wir die Ergebnisse anderer Studien bestätigen, die dem *GIPR* eine Bedeutung für die Glukose-Homöostase (Saxena *et al.*, 2010) zuschreiben. Gestörte Glukosetoleranz und Insulinresistenz als Komorbiditäten von Adipositas sowie *GIPR*-Knockout-Mausmodelle (Miyawaki *et al.*, 2002) und Assoziationsstudien (Vogel *et al.*, 2009, Speliotes *et al.*, 2010) deuten weiterhin auf eine Rolle des *GIPR* bei der Ausprägung von Adipositas hin. Der *GIPR* stellt somit nach wie vor einen möglichen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen bei der Behandlung von Übergewicht dar (Kieffer, 2003, Fulurija *et al.*, 2008).

Außerdem bestätigen unsere Ergebnisse, dass regulatorische Elemente oftmals in größerer Entfernung vom eigentlichen Gen auftreten können (Yang *et al.*, 2011). So konnten wir zeigen, dass die beiden SNPs rs12970134 und rs17782313, die in 154 kb bzw. 188 kb Entfernung vom *MC4R* liegen und bereits in vorangegangenen Studien eine Assoziation mit Adipositas zeigten (Chambers *et al.*, 2008, Loos *et al.*, 2008), zum jeweiligen Haplotyp gehören, der ein Assoziationssignal mit erhöhtem BMI zeigt (Scherag, Jarick, Grothe *et al.*, 2010, Mühlhaus *et al.*, 2011). Die Untersuchung von Haplotypen im Gegensatz zu einzelnen SNPs war sinnvoll, da insgesamt davon ausgegangen wird, dass SNP-Haplotypen ein stärkeres Assoziationssignal liefern als einzelne SNPs (Schaid, 2004).

Zur weiteren Klärung der Rolle des *GIPR* im Zusammenhang mit Adipositas sind somit zusätzlich Analysen auch im Hinblick auf mögliche Haplotypen und polygene Effekte in der umgebenden Sequenz des *GIPR*-Gens nötig.

## 6.2 Bewertung von Genomweiten Assoziationsstudien vor dem Hintergrund synthetischer Assoziation

In Bezug auf Adipositas konnten bisher insgesamt 32 verschiedene Genorte über SNPs identifiziert werden, für die positive genetische Assoziationssignale mit BMI-Variabilität und Adipositas bestätigt werden konnten (Speliotes *et al.*, 2010). Jedoch können bis heute erst 1,5 % der interindividuellen BMI-Varianz erklärt werden (Speliotes *et al.*, 2010), während auf der Grundlage von Zwillings- und Adoptionsstudien ein Anteil von bis zu 85 % vermutet wird (Allison *et al.*, 1996, Maes *et al.*, 1997, Stunkard *et al.*, 1986, Bulik *et al.*, 2003). Diese geringe Prozentzahl könnte teilweise darauf zurückzuführen sein, dass in GWAS nur häufige Varianten erfasst werden, da das Grundprinzip auf der Annahme der sogenannten „common disease - common variant“-Hypothese basiert. Diese besagt, dass bei vielen häufigen Erkrankungen („common diseases“) die genetischen Einflüsse teilweise auf eine limitierte Anzahl häufiger allelischer Varianten („common variants“) zurückzuführen sind, die in der Bevölkerung mit einer Frequenz von 1 % bis 5 % auftreten (Pearson & Manolio, 2008, Collins *et al.*, 1997). Die Folge ist, dass viele seltene Varianten (Frequenz < 1 %), die ebenfalls krankheitsfördernd sein können, nicht erfasst werden. Das „1000-Genome-Projekt“ wird in Zukunft helfen, neue Varianten mit geringerer Frequenz zu identifizieren (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

Eine Alternative bei der Interpretation von GWAS stellt das Modell der „synthetischen Assoziation“ dar, welches das Problem der geringen Effektstärke der in GWAS bisher betrachteten Varianten auszugleichen versucht. Dabei besteht die Grundannahme darin, dass Assoziationssignale von häufigen SNPs außerhalb der kodierenden Sequenz eines Gens das Resultat einer Kombination aus häufigen Varianten mit seltenen kodierenden Mutationen ist (Robinson, 2010, Dickson *et al.*, 2010). Ausgehend von Haplotypenanalysen von SNP-Varianten in der umgebenden, nicht kodierenden Sequenz des *MC4R* konnten wir dieses Modell für den *MC4R* jedoch nicht bestätigen, da das Assoziationssignal der Haplotypen nicht durch seltene kodierende Varianten innerhalb des *MC4R* beeinflusst wurde (Scherag, Jarick, Grothe *et al.*, 2010). Zusätzlich konnten wir in einer weiteren Analyse keine SNP-Haplotypen identifizieren, von denen eindeutig auf (funktionell relevante) Mutationen innerhalb des kodierenden Bereiches des *MC4R* geschlossen werden könnte (Mühlhaus *et al.*, 2011). Das Modell der synthetischen Assoziation scheint somit für den *MC4R* keine Anwendung zu finden, was die Bedeutung von *MC4R*-SNPs im Rahmen polygener Adipositas bestätigt. Für

die klinische Routine bedeutet das außerdem, dass zur Feststellung einer MC4R-Störung bei adipösen Patienten, die Analyse einer eng begrenzten Anzahl an SNPs keine Alternative zu einem Mutationsscreening des gesamten Rezeptors darstellt (Mühlhaus *et al.*, 2011).

### **6.3 Einfluss von Populationsstrukturen wie „cryptic relatedness“ auf Assoziationsstudien**

Das Phänomen der „cryptic relatedness“ stellt ein weiteres Problem dar, das wir im Rahmen dieser Arbeit aufzeigen konnten und das bei der Bewertung von GWAS- und Assoziationsdaten berücksichtigt werden muss. „Cryptic relatedness“ bedeutet, dass ein (entferntes) Verwandtschaftsverhältnis zwischen den untersuchten Individuen der Fall- und Kontrollgruppe besteht, das während der Untersuchung unentdeckt bleibt, das Ergebnis jedoch beeinflussen kann (Voight & Pritchard, 2005). Yang *et al.* postulieren, dass ungefähr 0,09 % der phänotypischen Varianz des BMI in GWAS auf „cryptic relatedness“ zurückzuführen sei, wobei diese Zahl stark abhängig von der Datenstruktur der Studie sei (Yang *et al.*, 2011). In unserer Analyse zur Aufdeckung einer Assoziation von SNP-Haplotypen mit funktionell relevanten *MC4R*-Mutationen (vgl. Abschnitt 5.3) waren die beiden Mutationen p.Thr112Met (in der Kategorie a) „wie Wildtyp“ mit 10 von 19 Patienten) und [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] (in Kategorie c) „kompletter Funktionsverlust“ mit 17 von 25 Patienten) in ihrer jeweiligen Kategorie in der Mehrzahl vertreten (Mühlhaus *et al.*, 2011). Für die Doppelmutation [p.Tyr35Stop; c.110 A>T] konnte ich einen „Common-Founder-Effekt“ über eine weitere Haplotypanalyse als sehr wahrscheinlich bestätigen (vgl. Abschnitt 5.4). Diese Ergebnisse sind nicht nur bei der Bewertung von GWAS- und Assoziationsdaten von Bedeutung. Resequenzierungen von vielversprechenden Regionen, die positive Assoziationssignale in GWAS geliefert haben, können zur Aufdeckung weiterer seltener Varianten führen (Manolio, 2010) und damit zur Identifikation weiterer erblicher Faktoren, die an der phänotypischen Varianz des BMI beteiligt sind. Dabei sind jedoch stets unterschwellige Populationsstrukturen zu berücksichtigen, um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen.

### **6.4 Therapeutische Intervention bei Nonsense-Mutationen im *MC4R***

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Vermittlung durch Aminoglykoside sowohl die Proteinexpression als auch die funktionelle Signalisierung von verkürzten *MC4R*-Proteinen *in vitro* wieder hergestellt werden kann (Brumm\*,

Mühlhaus\* *et al.*, 2011). Für eine Übertragung auf den humanen Organismus und für Therapieansätze bei Adipositas infolge von *MC4R*-Nonsense-Mutationen müssen jedoch verschiedene zusätzliche Faktoren beachtet werden:

Ein Problem stellt die in der Regel hohe Toxizität von Aminoglykosiden dar. Aminoglykoside zeigen in eukaryotischen Zellen eine geringere Effektivität, weshalb ihre Dosierung bei der Behandlung von Nonsense-Mutationen 10 - 15 mal höher ist als bei Verwendung als Antibiotikum (Zingman *et al.*, 2007). So sind das im Rahmen unserer Untersuchungen verwendete Aminoglykosid G418 sowie Gentamicin in höherer Dosierung und über einen längeren Anwendungszeitraum stark toxisch und können zu Nebenwirkungen wie Gehör- und Nierenschäden führen (Hainrichson *et al.*, 2008). Eine vielversprechende Alternative der letzten Jahre stellte daher das Aminoglykosid PTC124 (Ataluren) dar. PTC124 ist ein oral verabreichbares bioverfügbares Mittel, das sich durch besonders geringe Toxizität auszeichnet (Hirawat *et al.*, 2007, Welch *et al.*, 2007) und in ersten klinischen Versuchen über 12 Wochen bei Patienten mit cystischer Fibrose keine offensichtlichen Nebenwirkungen zeigte (Wilschanski *et al.*, 2011). Die tatsächliche Wirksamkeit von PTC124 ist jedoch in den verschiedenen Studien noch widersprüchlich (Kerem *et al.*, 2008, Pichavant *et al.*, 2011, Welch *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir die Wirksamkeit von PTC124 *in vitro* nicht bestätigen (Brumm\*, Mühlhaus\* *et al.*, 2011).

Des Weiteren zeigen Aminoglykoside in den einzelnen Patienten sehr unterschiedliche Wirkung. Eine Studie verzeichnet zum Beispiel Erfolge in der Behandlung von Patienten mit cystischer Fibrose mit Gentamicin (Wilschanski *et al.*, 2003), während die Patienten in einer anderen Studie nicht auf die Therapie ansprechen (Clancy *et al.*, 2007). Diese unterschiedlichen Wirkungsgrade könnten auf die Menge des vorhandenen Nonsense-Transkripts, das das Angriffsziel der Aminoglykoside darstellt, zurückzuführen sein (Linde *et al.*, 2007). Somit bestimmt die vorhandene Menge an mRNA die potentielle Wirksamkeit der Behandlung mit Aminoglykosiden bei den einzelnen Patienten mit (Linde & Kerem, 2008). Allerdings können auch geringe Mengen an funktionellem Protein die jeweiligen Symptome mildern und somit therapeutische Erfolge zeigen (Kellermayer, 2006).

Schließlich stellt die Art der Applikation eine Hürde dar. Da der *MC4R* sich im Hypothalamus befindet, muss eine Darreichungsform gefunden werden, die in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Unter normalen Bedingungen überwinden Aminoglykoside die Blut-Hirn-Schranke in vernachlässigbar geringem Umfang (Barling

& Selkon, 1978, Keeling & Bedwell, 2005, Strausbaugh & Brinker, 1983). Daher sind weitere Untersuchungen zum Beispiel in Maus-Modellen nötig, um eine Wirksamkeit von Aminoglykosiden bei der Behandlung von Adipositas bedingt durch *MC4R*-Nonsense-Mutationen zu überprüfen.

### 6.5 Schlussbetrachtung

GWAS der letzten Jahre haben dazu beigetragen, ein besseres und umfangreicheres Verständnis für die komplexen Zusammenhänge der Gewichtsregulation zu erlangen und weisen auf Gene wie *MC4R* und *GIPR* als Adipositas-assoziiert hin. Wir konnten zeigen, dass ein SNP im Bereich des *GIPR* mit einer gestörten Glukose-Homöostase, einer häufigen Komorbidität von Adipositas, assoziiert ist. Damit stellt der *GIPR* weiterhin einen möglichen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen bei der Behandlung von Adipositas und deren Folgeerkrankungen dar. Unsere Untersuchungen der umgebenden Sequenz des *MC4R* haben SNP-Haplotypen identifiziert, die Bereiche von bis zu 188 kb entfernt vom *MC4R* einschließen und mit Adipositas assoziiert sind. Außerdem konnten wir die Bedeutung von Phänomenen wie „synthetische Assoziation“ und „cryptic relatedness“ aufgrund möglicher „Common-Founder-Effekte“ für die Bewertung von Assoziationsanalysen aufzeigen.

Für die klinische Praxis haben unsere Ergebnisse zur synthetischen Assoziation gezeigt, dass sich ein genaues Mutationsscreening für den *MC4R* nicht durch eine Haplotypbestimmung einiger weniger nicht kodierender SNPs ersetzen lässt. Für die Bewertung von GWAS-Daten müssen unterschwellig vorhandene Populationsstrukturen wie „cryptic relatedness“ berücksichtigt werden, um eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen.

Schließlich konnten wir *in vitro* vielversprechende Therapieansätze bei Adipositas bedingt durch Nonsense-Mutationen im *MC4R* nachweisen. Weiterführende Studien an Mausmodellen werden zeigen, inwieweit unsere Ergebnisse längerfristig Anwendung für die pharmakologische Intervention bei Adipositas finden werden. Für die Zukunft sind weitere Analysen auch im Hinblick auf polygene Effekte nötig, um weitere Zusammenhänge zu verstehen und neue Diagnose- und Behandlungsmethoden bei genetisch bedingter Adipositas entwickeln zu können.

## 7. Literaturverzeichnis

- Allison, D.B., Kaprio, J., Korkeila, M., Koskenvuo, M., Neale, M.C. & Hayakawa, K. (1996) The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 20, 501-6.
- Applied Biosystems (2005) SNaPshot® Kit Analysis Getting Started Guide. URL:<http://www.umassmed.edu/uploadedfiles/GeneMapperSNaPshotKitGuide.PDF> [Stand: 23.03.2011].
- Barling, R.W. & Selkon, J.B. (1978) The penetration of antibiotics into cerebrospinal fluid and brain tissue. *J Antimicrob Chemother*, 4, 203-27.
- Brumm\*, H., Mühlhaus\*, J., Bolze, F., Scherag, S., Hinney, A., Hebebrand, J., Wiegand, S., Klingenspor, M., Grüters, A., Krude, H. & Biebermann, H. (2011) Rescue of melanocortin 4 receptor (MC4R) nonsense mutations by aminoglycoside-mediated read-through. \*These authors contribute equally. *Obesity (Silver Spring)*, 7 july [Epub ahead of print].
- Bulik, C.M., Sullivan, P.F. & Kendler, K.S. (2003) Genetic and environmental contributions to obesity and binge eating. *Int J Eat Disord*, 33, 293-8.
- Burke, J.F. & Mogg, A.E. (1985) Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res*, 13, 6265-72.
- Chambers, J.C., Elliott, P., Zabaneh, D., Zhang, W., Li, Y., Froguel, P., Balding, D., Scott, J. & Kooner, J.S. (2008) Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet*, 40, 716-8.
- Clancy, J.P., Rowe, S.M., Bebok, Z., Aitken, M.L., Gibson, R., Zeitlin, P., Berclaz, P., Moss, R., Knowles, M.R., Oster, R.A., Mayer-Hamblett, N. & Ramsey, B. (2007) No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37, 57-66.

- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. & Guy-Grand, B. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*, 392, 398-401.
- Collins, F.S., Guyer, M.S. & Charkravarti, A. (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science*, 278, 1580-1.
- Davies, J., Gilbert, W. & Gorini, L. (1964) Streptomycin, Suppression, and the Code. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 51, 883-90.
- Dickson, S.P., Wang, K., Krantz, I., Hakonarson, H. & Goldstein, D.B. (2010) Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol*, 8, e1000294.
- Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R.I., Depaoli, A.M. & O'rahilly, S. (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*, 110, 1093-103.
- Fulurija, A., Lutz, T.A., Sladko, K., Osto, M., Wielinga, P.Y., Bachmann, M.F. & Saudan, P. (2008) Vaccination against GIP for the treatment of obesity. *PLoS One*, 3, e3163.
- Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., Siffert, W., Platzer, M., Hess, C., Gudermann, T., Biebermann, H., Wichmann, H.E., Schafer, H., Hinney, A. & Hebebrand, J. (2004) Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet*, 74, 572-81.
- Getty-Kaushik, L., Song, D.H., Boylan, M.O., Corkey, B.E. & Wolfe, M.M. (2006) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity (Silver Spring)*, 14, 1124-31.
- Hainrichson, M., Nudelman, I. & Baasov, T. (2008) Designer aminoglycosides: the race to develop improved antibiotics and compounds for the treatment of human genetic diseases. *Org Biomol Chem*, 6, 227-39.

- Hinney, A. & Hebebrand, J. (2008) Polygenic obesity in humans. *Obes Facts*, 1, 35-42.
- 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. (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 1483-6.
- Hinney, A., Vogel, C.I. & Hebebrand, J. (2010) From monogenic to polygenic obesity: recent advances. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19, 297-310.
- Hirawat, S., Welch, E.M., Elfring, G.L., Northcutt, V.J., Paushkin, S., Hwang, S., Leonard, E.M., Almstead, N.G., Ju, W., Peltz, S.W. & Miller, L.L. (2007) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J Clin Pharmacol*, 47, 430-44.
- Howard, M., Frizzell, R.A. & Bedwell, D.M. (1996) Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med*, 2, 467-9.
- Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C. & O'rahilly, S. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet*, 16, 303-6.
- Keeling, K.M. & Bedwell, D.M. (2005) Pharmacological Suppression of Premature Stop Mutations that Cause Genetic Diseases. *Current Pharmacogenomics*, 3.
- Keeling, K.M., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Li, P., Thompson, J.N. & Bedwell, D.M. (2001) 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, 291-9.
- Kellermayer, R. (2006) Translational readthrough induction of pathogenic nonsense mutations. *Eur J Med Genet*, 49, 445-50.

- Kellermayer, R., Szigeti, R., Keeling, K.M., Bedekovics, T. & Bedwell, D.M. (2006) Aminoglycosides as potential pharmacogenetic agents in the treatment of Hailey-Hailey disease. *J Invest Dermatol*, 126, 229-31.
- Kerem, E., Hirawat, S., Armoni, S., Yaakov, Y., Shoseyov, D., Cohen, M., Nissim-Rafinia, M., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Elfring, G.L., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Kerem, B. & Wilschanski, M. (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet*, 372, 719-27.
- Kieffer, T.J. (2003) GIP or not GIP? That is the question. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 110-2.
- Kromeyer-Hauschild, K., Wabitsch, M., Kunze, D. & Al., E. (2001) Perzentile für den Bodymass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 149, 807-818.
- Krude, H., Biebermann, H. & Gruters, A. (2003) Mutations in the human proopiomelanocortin gene. *Ann N Y Acad Sci*, 994, 233-9.
- Lee, Y.S. (2009) The role of leptin-melanocortin system and human weight regulation: lessons from experiments of nature. *Ann Acad Med Singapore*, 38, 34-11.
- Linde, L., Boelz, S., Nissim-Rafinia, M., Oren, Y.S., Wilschanski, M., Yaacov, Y., Virgilis, D., Neu-Yilik, G., Kulozik, A.E., Kerem, E. & Kerem, B. (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest*, 117, 683-92.
- Linde, L. & Kerem, B. (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet*, 24, 552-63.
- Loos, R.J., Lindgren, C.M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J.H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R.M., Attwood, A.P., Beckmann, J.S., Berndt, S.I., Jacobs, K.B., Chanock, S.J., Hayes, R.B., Bergmann, S., Bennett, A.J., Bingham, S.A., Bochud, M., Brown, M., Cauchi, S., Connell, J.M., Cooper, C., Smith, G.D., Day, I., Dina, C., De, S., Dermitzakis, E.T., Doney, A.S., Elliott, K.S., Elliott, P., Evans,

- D.M., Sadaf Farooqi, I., Froguel, P., Ghorri, J., Groves, C.J., Gwilliam, R., Hadley, D., Hall, A.S., Hattersley, A.T., Hebebrand, J., Heid, I.M., Lamina, C., Gieger, C., Illig, T., Meitinger, T., Wichmann, H.E., Herrera, B., Hinney, A., Hunt, S.E., Jarvelin, M.R., Johnson, T., Jolley, J.D., Karpe, F., Keniry, A., Khaw, K.T., Luben, R.N., Mangino, M., Marchini, J., Mcardle, W.L., McGinnis, R., Meyre, D., Munroe, P.B., Morris, A.D., Ness, A.R., Neville, M.J., Nica, A.C., Ong, K.K., O'rahilly, S., Owen, K.R., Palmer, C.N., Papadakis, K., Potter, S., Pouta, A., Qi, L., Randall, J.C., Rayner, N.W., Ring, S.M., Sandhu, M.S., Scherag, A., Sims, M.A., Song, K., Soranzo, N., Speliotes, E.K., Syddall, H.E., Teichmann, S.A., Timpson, N.J., Tobias, J.H., Uda, M., Vogel, C.I., Wallace, C., Waterworth, D.M., Weedon, M.N., Willer, C.J., Wraight, Yuan, X., Zeggini, E., Hirschhorn, J.N., Strachan, D.P., Ouwehand, W.H., Caulfield, M.J., et al. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet*, 40, 768-75.
- Maes, H.H., Neale, M.C. & Eaves, L.J. (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet*, 27, 325-51.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., Hayes, J., Mahan, J.D., Campbell, K.J., Banwell, B., Dasouki, M., Watts, V., Sivakumar, K., Bien-Willner, R., Flanigan, K.M., Sahenk, Z., Barohn, R.J., Walker, C.M. & Mendell, J.R. (2010) Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 67, 771-80.
- Manolio, T.A. (2010) Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*, 363, 166-76.
- Mcintosh, C.H., Widenmaier, S. & Kim, S.J. (2009) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (Gastric Inhibitory Polypeptide; GIP). *Vitam Horm*, 80, 409-71.
- Miyawaki, K., Yamada, Y., Ban, N., Ihara, Y., Tsukiyama, K., Zhou, H., Fujimoto, S., Oku, A., Tsuda, K., Toyokuni, S., Hiai, H., Mizunoya, W., Fushiki, T., Holst, J.J., Makino, M., Tashita, A., Kobara, Y., Tsubamoto, Y., Jinnouchi, T., Jomori, T. & Seino, Y. (2002) Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med*, 8, 738-42.

- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B. & O'rahilly, S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903-8.
- Mühlhaus, J., Pütter, C., Brumm, H., Grallert, H., Illig, T., Scherag, S., Reinehr, T., Pott, W., Albayrak, Ö., Wang, H.J., Bau, A.M., Wiegand, S., Grüters, A., Krude, H., Hebebrand, J., Hinney, A., Biebermann, H. & Scherag, A. (2011) Do common variants separate between obese melanocortin 4 receptor gene mutation carriers and non-carriers? The impact of cryptic relatedness. *Obesity Facts*, (submitted).
- National Center for Biotechnology Information (2011) Database of Single nucleotide Polymorphisms. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> [Stand: 20.06.2011].
- Nitz, I., Fisher, E., Weikert, C., Burwinkel, B., Li, Y., Mohlig, M., Boeing, H., Schreiber, S., Schrezenmeir, J. & Doring, F. (2007) Association analyses of GIP and GIPR polymorphisms with traits of the metabolic syndrome. *Mol Nutr Food Res*, 51, 1046-52.
- Oeth, P., Beaulieu, M., Park, C., Kosman, D., Del Mistro, G., Van Den Boom, D. & Jurinke, C. (2005) iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. *Sequenom Application Note*.
- Pearson, T.A. & Manolio, T.A. (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*, 299, 1335-44.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X. & Tremblay, J.P. (2011) Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *Mol Ther*, 19, 830-40.
- Pusch, W., Wurmbach, J.H., Thiele, H. & Kostrzewa, M. (2002) MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Pharmacogenomics*, 3, 537-48.

- Robinson, R. (2010) Common disease, multiple rare (and distant) variants. *PLoS Biol*, 8, e1000293.
- Rosario, A.S., Kurth, B.M., Stolzenberg, H., Ellert, U. & Neuhauser, H. (2010) Body mass index percentiles for children and adolescents in Germany based on a nationally representative sample (KiGGS 2003-2006). *Eur J Clin Nutr*, 64, 341-9.
- Russo, P., Lauria, F. & Siani, A. (2010) Heritability of body weight: moving beyond genetics. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 20, 691-7.
- Salas-Marco, J. & Bedwell, D.M. (2005) Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. *J Mol Biol*, 348, 801-15.
- Sanguhl, K., Schulz, A., Rompler, H., Yun, J., Wess, J. & Schöneberg, T. (2004) Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum Mol Genet*, 13, 893-903.
- Sauber, J., Grothe, J., Behm, M., Scherag, A., Grallert, H., Illig, T., Hinney, A., Hebebrand, J., Wiegand, S., Gruters, A., Krude, H. & Biebermann, H. (2010) Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. *Eur J Endocrinol*, 163, 259-64.
- Saxena, R., Hivert, M.F., Langenberg, C., Tanaka, T., Pankow, J.S., Vollenweider, P., Lyssenko, V., Bouatia-Naji, N., Dupuis, J., Jackson, A.U., Kao, W.H., Li, M., Glazer, N.L., Manning, A.K., Luan, J., Stringham, H.M., Prokopenko, I., Johnson, T., Grarup, N., Boesgaard, T.W., Lecoeur, C., Shrader, P., O'Connell, J., Ingelsson, E., Couper, D.J., Rice, K., Song, K., Andreasen, C.H., Dina, C., Kottgen, A., Le Bacquer, O., Pattou, F., Taneera, J., Steinthorsdottir, V., Rybin, D., Ardlie, K., Sampson, M., Qi, L., Van Hoek, M., Weedon, M.N., Aulchenko, Y.S., Voight, B.F., Grallert, H., Balkau, B., Bergman, R.N., Bielinski, S.J., Bonnetfond, A., Bonnycastle, L.L., Borch-Johnsen, K., Bottcher, Y., Brunner, E., Buchanan, T.A., Bumpstead, S.J., Cavalcanti-Proenca, C., Charpentier, G., Chen, Y.D., Chines, P.S., Collins, F.S., Cornelis, M., G, J.C., Delplanque, J., Doney, A., Egan, J.M., Erdos, M.R., Firmann, M., Forouhi, N.G., Fox, C.S.,

- Goodarzi, M.O., Graessler, J., Hingorani, A., Isomaa, B., Jorgensen, T., Kivimaki, M., Kovacs, P., Krohn, K., Kumari, M., Lauritzen, T., Levy-Marchal, C., Mayor, V., Mcateer, J.B., Meyre, D., Mitchell, B.D., Mohlke, K.L., Morken, M.A., Narisu, N., Palmer, C.N., Pakyz, R., Pascoe, L., Payne, F., Pearson, D., Rathmann, W., Sandbaek, A., Sayer, A.A., Scott, L.J., Sharp, S.J., Sijbrands, E., Singleton, A., Siscovick, D.S., Smith, N.L., Sparso, T., et al. (2010) Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. *Nat Genet*, 42, 142-8.
- Schaid, D.J. (2004) Evaluating associations of haplotypes with traits. *Genet Epidemiol*, 27, 348-64.
- Scherag, A., Jarick, I., Grothe, J., Biebermann, H., Scherag, S., Volckmar, A.L., Vogel, C.I., Greene, B., Hebebrand, J. & Hinney, A. (2010) Investigation of a genome wide association signal for obesity: synthetic association and haplotype analyses at the melanocortin 4 receptor gene locus. *PLoS One*, 5, e13967.
- Schöneberg, T., Schulz, A., Biebermann, H., Hermsdorf, T., Rompler, H. & Sangkuhl, K. (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther*, 104, 173-206.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M. & Sirotkin, K. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29, 308-11.
- Speliotes, E.K., Willer, C.J., Berndt, S.I., Monda, K.L., Thorleifsson, G., Jackson, A.U., Allen, H.L., Lindgren, C.M., Luan, J., Magi, R., Randall, J.C., Vedantam, S., Winkler, T.W., Qi, L., Workalemahu, T., Heid, I.M., Steinthorsdottir, V., Stringham, H.M., Weedon, M.N., Wheeler, E., Wood, A.R., Ferreira, T., Weyant, R.J., Segre, A.V., Estrada, K., Liang, L., Nemesh, J., Park, J.H., Gustafsson, S., Kilpelainen, T.O., Yang, J., Bouatia-Naji, N., Esko, T., Feitosa, M.F., Kutalik, Z., Mangino, M., Raychaudhuri, S., Scherag, A., Smith, A.V., Welch, R., Zhao, J.H., Aben, K.K., Absher, D.M., Amin, N., Dixon, A.L., Fisher, E., Glazer, N.L., Goddard, M.E., Heard-Costa, N.L., Hoesel, V., Hottenga, J.J., Johansson, A., Johnson, T., Ketkar, S., Lamina, C., Li, S., Moffatt, M.F., Myers, R.H., Narisu, N., Perry, J.R., Peters, M.J., Preuss, M., Ripatti, S., Rivadeneira, F., Sandholt, C.,

- Scott, L.J., Timpson, N.J., Tyrer, J.P., Van Wingerden, S., Watanabe, R.M., White, C.C., Wiklund, F., Barlassina, C., Chasman, D.I., Cooper, M.N., Jansson, J.O., Lawrence, R.W., Pellikka, N., Prokopenko, I., Shi, J., Thiering, E., Alavere, H., Alibrandi, M.T., Almgren, P., Arnold, A.M., Aspelund, T., Atwood, L.D., Balkau, B., Balmforth, A.J., Bennett, A.J., Ben-Shlomo, Y., Bergman, R.N., Bergmann, S., Biebermann, H., Blakemore, A.I., Boes, T., Bonnycastle, L.L., Bornstein, S.R., Brown, M.J., Buchanan, T.A., et al. (2010) Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. *Nat Genet*, 42, 937-48.
- Strausbaugh, L.J. & Brinker, G.S. (1983) Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on gentamicin penetration into the cerebrospinal fluid and brains of normal rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*, 24, 147-50.
- Stunkard, A.J., Foch, T.T. & Hrubec, Z. (1986) A twin study of human obesity. *JAMA*, 256, 51-4.
- Tao, Y.X. (2010) The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocr Rev*, 31, 506-43.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061-73.
- The International Hapmap Consortium (2003) The International HapMap Project. *Nature*, 426, 789-96.
- Usdin, T.B., Mezey, E., Button, D.C., Brownstein, M.J. & Bonner, T.I. (1993) Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology*, 133, 2861-70.
- Valli-Jaakola, K., Lipsanen-Nyman, M., Oksanen, L., Hollenberg, A.N., Kontula, K., Bjorbaek, C. & Schalin-Jantti, C. (2004) Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese finnish children and adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 940-5.

- Vogel, C.I., Scherag, A., Bronner, G., Nguyen, T.T., Wang, H.J., Grallert, H., Bornhorst, A., Roskopf, D., Volzke, H., Reinehr, T., Rief, W., Illig, T., Wichmann, H.E., Schafer, H., Hebebrand, J. & Hinney, A. (2009) Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. *BMC Med Genet*, 10, 19.
- Voight, B.F. & Pritchard, J.K. (2005) Confounding from cryptic relatedness in case-control association studies. *PLoS Genet*, 1, e32.
- Volz, A., Goke, R., Lankat-Buttgereit, B., Fehmann, H.C., Bode, H.P. & Goke, B. (1995) Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Lett*, 373, 23-9.
- Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C.M. & Plomin, R. (2008) Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr*, 87, 398-404.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., Wilde, R.G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y.C., Corson, D., Turpoff, A.A., Campbell, J.A., Conn, M.M., Khan, A., Almstead, N.G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A.A., Colacino, J.M., Babiak, J., Ju, W.D., Hirawat, S., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S.W. & Sweeney, H.L. (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447, 87-91.
- Wilschanski, M., Miller, L.L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Cohen, M., Armoni, S., Yaakov, Y., Pugatch, T., Cohen-Cymerknoh, M., Miller, N.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Hirawat, S., Donnelly, K., Elfring, G.L., Ajayi, T. & Kerem, E. (2011) Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J*.
- 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. (2003) Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med*, 349, 1433-41.

- World Health Organization (2011) Obesity and Overweight. *Media Centre*, Fact sheet N°311, updated March 2011.
- Yamada, Y., Hayami, T., Nakamura, K., Kaisaki, P.J., Someya, Y., Wang, C.Z., Seino, S. & Seino, Y. (1995) Human gastric inhibitory polypeptide receptor: cloning of the gene (GIPR) and cDNA. *Genomics*, 29, 773-6.
- Yang, J., Manolio, T.A., Pasquale, L.R., Boerwinkle, E., Caporaso, N., Cunningham, J.M., De Andrade, M., Feenstra, B., Feingold, E., Hayes, M.G., Hill, W.G., Landi, M.T., Alonso, A., Lettre, G., Lin, P., Ling, H., Lowe, W., Mathias, R.A., Melbye, M., Pugh, E., Cornelis, M.C., Weir, B.S., Goddard, M.E. & Visscher, P.M. (2011) Genome partitioning of genetic variation for complex traits using common SNPs. *Nat Genet*, 43, 519-25.
- Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G. & O'rahilly, S. (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet*, 20, 111-2.
- Yip, R.G., Boylan, M.O., Kieffer, T.J. & Wolfe, M.M. (1998) Functional GIP receptors are present on adipocytes. *Endocrinology*, 139, 4004-7.
- Yip, R.G. & Wolfe, M.M. (2000) GIP biology and fat metabolism. *Life Sci*, 66, 91-103.
- Zingman, L.V., Park, S., Olson, T.M., Alekseev, A.E. & Terzic, A. (2007) Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 81, 99-103.

## 8. Anteilserklärung

Frau Jessica Mühlhaus (geb. Grothe) hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

### **Publikation 1:**

Sauber J., **Grothe J.**, Behm M., Scherag A., Grallert H., Illig T., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin.

*European Journal of Endocrinology* (Impact Factor (2009): 3,539)  
2010, 163: 259-264.

Anteil praktische Arbeiten: 20%

Anteil Schreibaarbeit: 70%

Frau Mühlhaus hat an der Erhebung der Daten in Form von SNP-Analysen anteilig mitgewirkt. Dabei hat sie sowohl das SNaPShot- als auch das MALDI-TOF-Verfahren praktisch angewandt. Sämtliche Abbildungen wurden von ihr erstellt. Sie hat den überwiegenden Anteil des Manuskripts verfasst sowie sowohl den Einreichungs- als auch den Reviewprozess durchgeführt.

### **Publikation 2:**

Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I.G., Greene B., Hebebrand J., Hinney A. Investigation of a Genome Wide Association Signal for Obesity: Synthetic Association and Haplotype Analyses at the Melanocortin 4 Receptor Gene Locus.

*PLoS One* (Impact Factor (2009): 4,351)  
2010, 5: e13967

Anteil praktische Arbeiten: 10%

Anteil Schreibaarbeit: 10%

Frau Mühlhaus hat an der Auswertung und Interpretation der Daten mitgewirkt sowie am Korrekturprozess des Manuskripts.

**Publikation 3:**

Brumm\* H., **Mühlhaus\* J.**, Bolze F., Scherag S., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Klingenspor M., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through.

**\* gleichberechtigte Erstautoren**

*Obesity (Silver Spring)* (Impact Factor (2009): 3.366)

Online: 7.Juli 2011 [Epub ahead of print]

Anteil praktische Arbeiten: 40%

Anteil Schreibaarbeit: 80%

Frau Mühlhaus hat die funktionellen Assays zur Bestimmung der Oberflächen- und Totalexpression sowie Rezeptorsignalisierung für die *MC4R*-Nonsense-Mutation p.Gln307Stop nach Aminoglykosid-Behandlung durchgeführt. Außerdem hat sie die Versuche zur Rezeptorlokalisierung mittels Fluoreszenzmarkierung und konfokaler Lasermikroskopie für die *MC4R*-Nonsense-Mutation p.Trp61Stop durchgeführt. Sämtliche Abbildungen und Tabellen sowie die statistische Auswertung der Zellkulturexperimente wurden von ihr erstellt. Der überwiegende Anteil des Manuskripts wurde von ihr verfasst sowie Einreichungs- und Reviewprozess durchgeführt.

---

Jessica Mühlhaus

---

Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

## 9. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

### **Publikation 1:**

Sauber J., **Grothe J.**, Behm M., Scherag A., Grallert H., Illig T., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. *European Journal of Endocrinology*, 2010, 163: 259-264.

<http://dx.doi.org/10.1530/EJE-10-0444>

**Publikation 2:**

Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I.G., Greene B., Hebebrand J., Hinney A. Investigation of a Genome Wide Association Signal for Obesity: Synthetic Association and Haplotype Analyses at the Melanocortin 4 Receptor Gene Locus. *PLoS One*, 2010, 5: e13967.

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0013967>

**Publikation 3:**

Brumm\* H., **Mühlhaus\* J.**, Bolze F., Scherag S., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Klingenspor M., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Rescue of melanocortin 4 receptor (MC4R) nonsense mutations by aminoglycoside-mediated read-through. *Obesity (Silver Spring)*, 7 july [Epub ahead of print].

\* **gleichberechtigte Erstautoren**

<http://dx.doi.org/10.1038/oby.2011.202>

## **10. Curriculum Vitae**

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

## 11. Publikationsliste

### **Originalarbeiten**

Sauber J., **Grothe J.**, Behm M., Scherag A., Grallert H., Illig T., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Grütters A., Krude H., Biebermann H. (2010) Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. *European Journal of Endocrinology*. 163: 259-264.

Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I., Greene B., Hebebrand J., Hinney A. (2010) Investigation of a Genome Wide Association Signal for Obesity: Synthetic Association and Haplotype Analyses at the Melanocortin 4 Receptor Gene Locus. *PLoS One*, 5, e13967.

Brumm\* H., **Mühlhaus\* J.**, Bolze F., Scherag S., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Klingenspor M., Grütters A., Krude H., Biebermann H. (2011) Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Trough. *Obesity (Silver Spring)*, 7 july [Epub ahead of print].

\* gleichberechtigte Erstautoren

**Mühlhaus J.**, Pütter C., Brumm H., Grallert H., Illig T., Scherag S., Reinehr T., Pott W., Albayrak Ö., Wang H.J., Bau A.M., Wiegand S., Grütters A., Krude H., Hebebrand J., Hinney A., Biebermann H., Scherag A. (2011) Do common variants separate between obese melanocortin 4 receptor gene mutation carriers and non-carriers? The impact of cryptic relatedness. *Obesity Facts*. (submitted).

### **Vorträge**

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Tarnow P., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grütters A., Krude H., Biebermann H. Melanocortin-4-Receptor Gene Variants: Hotspot or Identical by Descent? 3rd Annual Retreat Graduate College 1208. Dezember 2008, Rangsdorf.

**Grothe J.**, Sauber J., Behm M., Scherag A., Grallert H., Illig T., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Association of glucose dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) variants with impaired glucose homeostasis in obese Berlin children. 53. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie und Jahrestagung der Slowakischen Gesellschaft für Endokrinologie. März 2010, Leipzig.

**Grothe J.**, Sauber J., Behm M., Scherag A., Grallert H., Illig T., Hinney A., Hebebrand J., Wiegand S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Association of glucose dependent insulinotropic peptide receptor (GIPR) variants with impaired glucose homeostasis in obese Berlin children. Meeting GRK 1041 and internal Retreat GRK 1208. April 2010, Ulm.

### **Poster**

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Tarnow P., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Obesity-relevant Single Nucleotide Polymorphisms and Identity by Descent. Bregenz Summer School on Endocrinology. Juli 2008, Bregenz.

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Tarnow P., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Obesity-relevant Single Nucleotide Polymorphisms and Identity by Descent. 1<sup>st</sup> Annual Meeting NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research. Dezember 2008, München.

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Tarnow P., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Melanocortin-4-Receptor Gene Variant Y35X/D37V: Hotspot or Identical by Descent? 46. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. März 2009, Gießen. (Posterpreis)

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Melanocortin-4-Receptor Gene

Variant Y35X/D37V: Hotspot or Identical by Descent? 11th European Congress of Endocrinology. April 2009, Istanbul.

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Melanocortin-4-Receptor Gene Variant Y35X/D37V: Hotspot or Identical by Descent? Bregenz Summer School on Endocrinology. Juli 2009, Bregenz.

Hinney A., Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I.G., Greene B., Hebebrand J. Lack of synthetic association for obesity at the melanocortin 4 receptor gene coding region. 3<sup>rd</sup> Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research. November 2010, Berlin.

Hinney A., Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I.G., Greene B., Hebebrand J. Investigation of genome wide association signals for obesity: synthetic association and haplotype analyses at the melanocortin 4 receptor gene locus. European Human Genetics Conference. Mai 2011, Amsterdam. URL: [www.nature.com/ejhg](http://www.nature.com/ejhg).

### **Abstracts**

**Grothe J.**, Brumm H., Sauber J., Tarnow P., Grallert H., Illig T., Scherag A., Hinney A., Hebebrand J., Farooqi S., Grüters A., Krude H., Biebermann H. Obesity Relevant Melanocortin-4-Receptor Gene Variants and Identity by Descent: Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms - Not Only in the Context of Association Studies. 24. Jahrestagung der Deutschen Adipositas-Gesellschaft. Oktober 2008, Freiburg.

Scherag A., Jarick I., **Grothe J.**, Biebermann H., Scherag S., Volckmar A.L., Vogel C.I.G., Greene B., Hebebrand J., Hinney A. Lack of synthetic association for the melanocortin 4 receptor gene in obesity. 26. Jahrestagung der Deutschen Adipositas Gesellschaft. Berlin 4.-6. November 2010. In: Obesity Facts 2010, Vol 3 (supplement 1).

## 12. Selbständigkeitserklärung

Ich, Jessica Mühlhaus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Untersuchung von Varianten in der kodierenden sowie angrenzenden Sequenz von  
Adipositas-relevanten Genen“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt,  
ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst habe und auch in Teilen keine Kopien  
anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum \_\_\_\_\_

Unterschrift \_\_\_\_\_

### 13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei meiner Promotion unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle PD Dr. Heike Biebermann für die Überlassung des interessanten Themas, ihre immerwährende Unterstützung und fortwährende Förderung sowie ihren kompetenten Rat in allen Forschungs- und Lebenslagen. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die immer offene Tür.

Ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich für die freundliche Aufnahme in das Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie sowie die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit, die mir diese Promotion ermöglicht hat.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle für die Vermittlung endokrinologischen Grundwissens und die Aufnahme in das Graduierten Kolleg 1208 „Hormonal Regulation of Energy Metabolism, Body Weight and Growth“, was mir zahlreiche Möglichkeiten der Weiterbildung eröffnet und mich in meiner Forschung unterstützt hat. Vielen Dank auch an alle Mitglieder des Graduiertenkollegs 1208 für den aufbauenden und ergiebigen Erfahrungsaustausch mit Gleichgesinnten.

Wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben auch die zahlreichen Kooperationen im Rahmen meiner Finanzierung durch das vom BMBF geförderte NGFN Plus Netzwerk. Spezieller Dank geht hierbei an Prof. Dr. Thomas Illig und Dr. Harald Grallert aus München sowie PD Dr. Anke Hinney und Dr. André Scherag aus Essen, ohne deren experimentelle und fachliche Unterstützung, Bereitstellung der technischen Geräte und Patientenproben sowie fruchtbaren Diskussionen im Rahmen gemeinsamer Publikationen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie für die umfangreiche Unterstützung der letzten Jahre bedanken sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre, das immer offene Ohr und unsere kreativen Kaffeepausen.

Nicht zuletzt möchte ich meiner ganzen Familie danken, die mich stets unterstützt, immer an mich geglaubt und mir immer den nötigen Rückhalt gegeben hat, bei allem was ich angehen wollte, und mir immer ein zuverlässiger Berater war. Danke an Sven, dass er immer an mich glaubt und immer für mich da ist.