

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

DISSERTATION

Molekulargenetische Grundlagen der Adipositas:
Untersuchung der hypothalamus-spezifischen
Enhancerregion des Proopiomelanocortin-Gens und des
Melanocortins β -MSH hinsichtlich der neuroendokrinen
Regulation der Energiehomöostase

Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frederike Escher

aus Marl

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Grütters-Kieslich
2. Prof. Dr. med. J. Spranger
3. Priv.-Doz. Dr. A. Hinney

Datum der Promotion: 17.07.2009

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Definition Adipositas	1
1.2 Prävalenz der Adipositas	2
1.3 Pharmakologische Implikationen	4
1.4 Regelkreis der Energiehomöostase	5
1.5 Störungen im Leptin-Melanocortinweg: Befunde beim Menschen	9
1.6 Das POMC-Gen als Kandidatengen für die Entwicklung nicht-syndromaler Adipositas	11
1.7 Die Funktion der POMC-Peptide bei der Gewichtsregulation	14
2. HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG	16
2.1 Mutations-Screening der hypothalamischen POMC-Enhancerregion	16
2.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutane <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	18
3. MATERIALIEN UND METHODEN	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Chemikalien	20
3.1.2 Antibiotika	22

3.1.3 Hormone	23
3.1.4 Radioaktive Substanzen	23
3.1.5 Zellen	23
3.1.6 Zellkultur	23
3.1.7 Enzyme	24
3.1.8 Medien, Puffer und Lösungen	24
3.1.8.1 Medium für Zellkultur	24
3.1.8.2 Puffer	25
3.1.8.3 Lösungen	25
3.1.9 Kits	26
3.1.10 DNA-Größenmarker	27
3.1.11 Primer	27
3.1.12 Geräte	28
3.1.13 Verbrauchsmaterialien	30
3.2 Methoden	31
3.2.1 Mutations-Screening der hypothalamus-spezifischen Enhancerregion des POMC-Gens bei adipösen und normalgewichtigen Kindern	31
3.2.1.1 Patientenrekrutierung	31
3.2.1.2 DNA-Extraktion	31
3.2.1.3 Amplifikation des hypothalamus-spezifischen Enhancerbereiches	33
3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese	34

3.2.1.5 Aufreinigung des PCR-Produktes	34
3.2.1.6 Sequenzier-Reaktion	35
3.2.1.7 Präzipitation der sequenzierten DNA	35
3.2.1.8 Anlösen der Proben für den ABI Prism 1000	36
3.2.1.9 Auswertung der Sequenzen	36
3.2.1.10 Restriktionsenzym-Analyse des Kontrollkollektivs	36
3.2.1.11 Teststatistiken	38
3.2.2 Charakterisierung einer β -MSH-Mutante <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	40
3.2.2.1 <i>in vitro</i> -Experimente	40
3.2.2.3 <i>in vivo</i> -Experimente	44
4. ERGEBNISSE	46
4.1 Mutations-Screening der hypothalamus-spezifischen Enhancerregion des POMC-Gens bei adipösen und normalgewichtigen Kindern	46
4.1.1 Homologievergleiche und Untersuchung auf STAT-Bindungsstellen	46
4.1.2 Patientenrekrutierung für das Mutations-Screening	49
4.1.3 Sequenzierung der Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 bei adipösen und normalgewichtigen Kindern	51
4.1.4 Restriktionsenzym-Analyse des Polymorphismus an Position 310 in Fragment nPOMC1 bei adipösen und normalgewichtigen Kindern	54
4.1.5 Restriktionsenzym-Analyse der Position 310 im Fragment nPOMC1 bei adipösen Kindern und deren Eltern (TRIOS)	57

4.1.6 Statistische Auswertung	57
4.1.6.1 Fisher`s Exact Test	57
4.1.6.2 TD-Test: Familienbasierte Assoziationsstudie	58
4.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und β -MSH-Mutante	60
4.2.1 <i>in vitro</i> -Studien	60
4.2.1.1 Bindungsstudien	61
4.2.1.2 Rezeptoraktivierungsstudien	62
4.2.2 <i>in vivo</i> -Studien	64
4.2.2.1 Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante (100 μ M)	65
4.2.2.2 Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante (10 μ M)	67
5. DISKUSSION	73
5.1 Mutations-Screening des hypothalamus-spezifischen Enhancerbereichs bei adipösen und normalgewichtigen Kindern	73
5.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante	80
6. ZUSAMMENFASSUNG	90
7. LITERATURVERZEICHNIS	92

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µg Mikrogramm

µl Mikroliter

µM Mikromolar

A Adenin

ACTH Adreno-Cortico-Trophes-Hormon

AGA Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter

AGRP Agouti-Related-Protein

BMI Body-Mass-Index

BSA Bovines-Serum-Albumin

BP Basenpaare

CART Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript

°C Grad Celsius

C Cystein

C Cytosin

cAMP cyclisches Adenosin-Mono-Phosphat

CCK Cholecystokinin

CHO-Zellen Chinese Hamster Ovary-Zellen

Cl Chlorid

cpm counts per minute

dNTP Didesoxynucleotid

DAG Deutsche Adipositas Gesellschaft

DMEM Dulbecco's modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribo-Nucleid-Acid

EC₅₀ Molare Konzentration bei der ein Ligand 50% der maximal möglichen Rezeptorstimulation zeigt

EDTA Ethylene diamin tetraacetic acid

G Guanin

GPCR G-Protein gekoppelter Rezeptor

GRR Genotypisches Relatives Risiko

h Stunde

IBMX Methylxantinderivat

icv intracerebroventrikulär

ip intraperitoneal

K Kalium

K_i-Wert 50%tige Agonistenverdrängung eines Versuchspeptids

LHA Lateraler Hypothalamus

LOD-Score Maß für die Wahrscheinlichkeit der genetischen Kopplung zwischen zwei Loci

M Molar

MC4-R Melanocortin 4 Rezeptor

Mg Magnesium

MSH Melanozyten-stimulierendes-Hormon

LHA Lateraler Hypothalamus

LR Likelihood Ratio

NVS Nationale-Verzehr-Studie

NPY Neuropeptide Y

PC1 Prohormonkonvertase 1

PC2 Prohormonkonvertase 2

PCR Polymerase-Chain-Reaction

PFA Perifornikal Zone

POMC Proopiomelanocortin

PVN Nucleus Paraventricularis

QTL Quantitative Trait Locus

RIO Rimonabant in Obesity

RT Raumtemperatur

rpm revolutions per minute

SDS Standard Deviation Score

STAT Signal Transduction and Activators of Transcription

T Thymin

TAE Tris-Acetyl-EDTA

TBE Tris-Borat-EDTA

WHO World Health Organisation

V Volt

Y Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adipositasentwicklung 1960-2025	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuroendokrinen Energiehomöostase	8
Abbildung 3: POMC-Genstruktur und Prozessierung	12
Abbildung 4: POMC-Prozessierung in Hypothalamus, Hypophyse und Haut	13
Abbildung 5: A) Consensus-Sequenz, B) Familienstammbaum der Indexfamilie	15
Abbildung 6A: Schematische Darstellung des hypothalamus-spezifischen Enhancerbereichs	46
Abbildung 6B: Sequenzvergleich der Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 bei Mensch, Maus und Ratte	47
Abbildung 7: Gewichtsverteilung von adipösen und normalgewichtigen Mädchen aus Berlin	49
Abbildung 8: Gewichtsverteilung von adipösen und normalgewichtigen Jungen aus Berlin	50
Abbildung 9: A) Wildtyp-DNA; B) heterozygoter Nukleotidaustausch; C) homozygoter Nukleotidaustausch in Fragment nPOMC1 Position 310	52
Abbildung 10: heterozygote Mutation an Position 79 (C79T) im Fragment nPOMC1 bei einer adipösen Patientin	53
Abbildung 11: heterozygote Mutation an Position 166 (T116A) in Fragment nPOMC2 bei einer adipösen Patientin	53
Abbildung 12: Verdau der Wildtyp-DNA, der heterozygoten und homozygoten Allelvarianz im Fragment nPOMC1 mit dem Restriktionsenzym AluI	54
Abbildung 13: MC4-R Bindungsaffinität von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante	61
Abbildung 14: MC4-R-Aktivierung durch α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante	62
Abbildung 15: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -MSH, β -MSH und β -MSH -Mutante (100 μ M)	66
Abbildung 16: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -MSH (10 μ M)	68
Abbildung 17: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von β -MSH (10 μ M)	70
Abbildung 18: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation der β -MSH-Mutante (10 μ M)	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der BMI-Werte in Normal- und Übergewicht, Adipositas und morbide Adipositas bei Erwachsenen	1
Tabelle 2: Chemikalien	20
Tabelle 3: Antibiotika	22
Tabelle 4: Hormone	23
Tabelle 5: Radioaktive Substanzen	23
Tabelle 6: Zellkultur	23
Tabelle 7: Restriktionsenzyme	24
Tabelle 8: Polymerase	24
Tabelle 9: Medium für Zellkultur	24
Tabelle 10: Puffer für Gelelektrophorese	25
Tabelle 11: Loading-Dye	25
Tabelle 12: Lysislösung	25
Tabelle 13: Regenerationspuffer für Dowex-Säulen	25
Tabelle 14: Regenerationspuffer für Alumina-Säulen	26
Tabelle 15: Hank`s-Lösung	26
Tabelle 16: Kits	26
Tabelle 17: DNA-Größenmarker	27
Tabelle 18: Primer zur Amplifizierung von POMC-Fragmenten	27
Tabelle 19: Geräte	28
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 21: PCR-Ansatz	33
Tabelle 22: PCR-Programm	33

Tabelle 23: Sequenzier-Ansatz	35
Tabelle 24: Sequenzier-Programm	35
Tabelle 25: Verdau-Reaktionsansatz	37
Tabelle 26: Ergebnisse des Mutations-Screenings und der Restriktionsenzym-Analyse für das Fragment nPOMC1 Position 310	56
Tabelle 27: Auswertung Fisher's Exact Test	57
Tabelle 28: Ergebnisse der familienbasierten Assoziationsstudie	58
Tabelle 29 : Statistische Auswertung des genotypischen relativen Risikos (GRR) für den Genotypen 22	59
Tabelle 30: K_i -Werte (Bindungsstudien) und EC_{50} -Konzentrationen (cAMP-Assays)	60
Tabelle 31: Fütterungsexperimente von Abbot, Kask und Millington und der vorliegenden Arbeit im Vergleich	84

1. Einleitung

1.1 Adipositas: Definition

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist Adipositas ein Zustand, der durch eine übermäßige Ansammlung von Körperfettmasse gekennzeichnet ist und einhergeht mit einer deutlichen Vermehrung des Körpergewichts über das Idealgewicht hinaus, wobei das Idealgewicht das Körpergewicht ist, bei dem der Mensch die höchste Lebenserwartung hat (WHO 2000). Adipositas wird anhand des Body-Mass-Index ($BMI = \text{Körpergewicht} / \text{Körpergröße}^2$ [kg/m^2]) bestimmt. Werte ab 25 bis 29,9 werden bei Erwachsenen als Übergewicht bezeichnet. Ein BMI von 30 oder mehr bedeutet Adipositas (Koppelman 2000).

BMI (kg/m^2)	Bezeichnung
18,5-24,9	Normalgewicht
25,0-29,9	Übergewicht
30,0-39,9	Adipositas
≥ 40	morbide Adipositas

Tabelle 1: Einteilung der BMI-Werte in Normal- und Übergewicht, Adipositas und morbide Adipositas bei Erwachsenen (Koppelman 2000)

Um Übergewicht und Adipositas im Kindes- und Jugendalter festzustellen, bezieht man sich wegen der alters- und geschlechtsabhängigen unterschiedlichen Veränderungen der Körpermasse im Lauf der Entwicklung auf Referenzwerte, die von der Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) in Form von Perzentilkurven angegeben werden. Diese Referenzwerte für die geschlechts- und altersspezifische Entwicklung des Körpergewichts basieren auf einer Stichprobe von über 34.000 Kindern und Jugendlichen. Die Perzentilberechnung für den BMI erfolgt dabei aus den Körpergrößen- und Körpergewichtsdaten von Jungen und Mädchen im Altersbereich von 0-18 Jahren nach der LMS-Methode von Cole (Abbildung 7 und 8) (Cole et al. 1990). Die BMI-Perzentile geben an, wieviel Prozent der untersuchten

Personen einen kleineren BMI-Wert haben als der, der bei dem jeweiligen Perzentil angegeben ist. Ab einem BMI-Wert oberhalb der 90ten alters- und geschlechtsspezifischen Perzentile liegt Übergewicht vor, bei einem BMI-Wert oberhalb der 97ten Perzentile eine Adipositas. Von einer extremen/morbiden Adipositas wird gesprochen, wenn der BMI die 99,5ten Perzentile überschreitet. Die Abweichungen des im Einzelfall gemessenen BMI-Wertes von dem alters- und geschlechtsspezifischen Körpergewicht kann nach Cole in Standard Deviation Scores (SDS)-Werten ausgedrückt werden. SDS-Werte geben an, um ein Wievielfaches einer Standardabweichung ein individueller BMI bei gegebenem Alter und Geschlecht ober- oder unterhalb des BMI-Medianwertes liegt. Es kann somit eine Einordnung eines Individualwertes in die Verteilung der Referenzgruppe erfolgen. Die Berechnung des SDS-Wertes ist sinnvoll, wenn man die BMI-Werte extrem adipöser Kinder und Jugendlicher (alle oberhalb des 99,5ten BMI-Perzentils) vergleichen will. Während die Perzentilwerte bei extrem adipösen Kindern und Jugendlichen keine adäquate Vergleichsmöglichkeit bieten, ermöglichen die SDS-Werte eine genaue Zuordnung (Arbeitsgemeinschaft für Kinder und Jugendliche der Adipositasgesellschaft 2004).

1.2 Prävalenz der Adipositas

Bereits 1997 erklärte die WHO Adipositas zur globalen Epidemie und damit zu einem der größten Gesundheitsprobleme weltweit (WHO 2000). Folgeerkrankungen der Adipositas sind neben Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislaufkrankungen, auch Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Magen- und Darmkrebs (Koppelman 2000).

Die weltweite Prävalenz der Adipositas hat sich mit anhaltend steigender Tendenz in den beiden letzten Jahrzehnten nahezu verdoppelt (Roth et al. 2002). Derzeit leiden weltweit ca. 250 Millionen Erwachsene an Adipositas; das entspricht 7% der Gesamtbevölkerung. Mindestens weitere 500 Millionen Erwachsene sind übergewichtig (Gasbarini und Piscaglia 2005). Besonders auffällig sind die Zahlen aus den USA. Seit 1960 blieb über die folgenden Jahre bis zum Jahr 2000 der Prozentsatz übergewichtiger Männer konstant, während die Prävalenz übergewichtiger Frauen nur leicht anstieg. Kaum verändert war vorerst auch die Zahl der Adipösen, bis nach 1980 der massive Anstieg erfolgte, von auf 8% auf 27,7% bei den Männern und von 17,1%

auf 34% bei den Frauen. Im Jahr 1980 waren von den 20-74jährigen Männern und Frauen 47,4% übergewichtig oder adipös; 1994 waren es 56% und im Jahr 2000 bereits 64,5% (Ehram et al. 2004).

In Europa lässt sich eine ähnliche Tendenz beobachten. Während der prozentuale Anteil der Übergewichtigen relativ konstant bleibt, ist ein starker Anstieg der Adipositasbetroffenen seit den 80er Jahren zu vermerken. Derzeit sind über die Hälfte der Deutschen übergewichtig, und zwar 66% der Männer und 51% der Frauen. Jeder fünfte Deutsche ist adipös (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz 2008). Die direkten Folgekosten der Adipositas belaufen sich allein in der Bundesrepublik nach Schätzungen auf jährlich 15-17 Milliarden Euro. Das entspricht etwa 7-8% der Gesamtkosten im Gesundheitssystem (Oberender et al. 2006).

Weltweit ist in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der Adipositasprävalenz zu rechnen. Für das Jahr 2025 wird prognostiziert, dass jeder dritte Einwohner Englands adipös ist. In den USA wird erwartet, dass 2025 der Anteil allein an Adipösen an der Gesamtbevölkerung über 40% beträgt (Koppelman 2000).

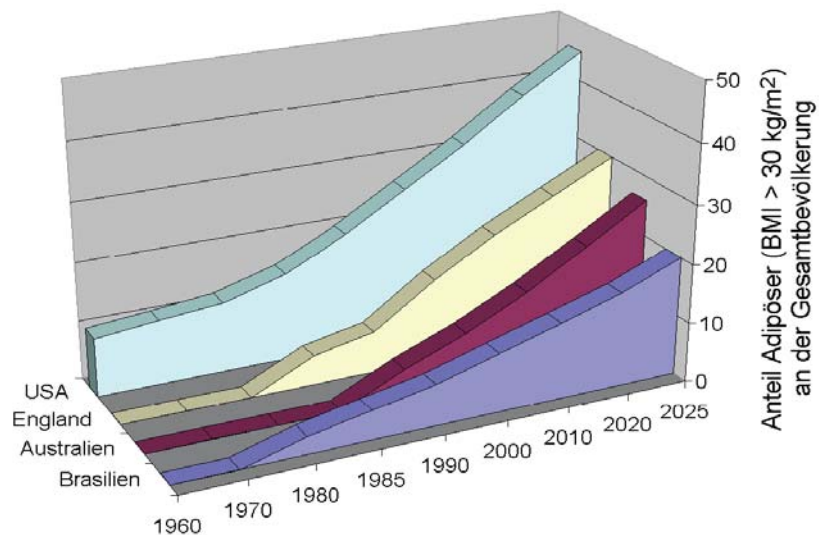


Abbildung 1: Adipositasentwicklung 1960-2025

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

Besorgniserregend ist die Zunahme der Kinder- und Jugendadipositas, da die Wahrscheinlichkeit, dass ein übergewichtiges Kind auch im Erwachsenenalter weiterhin übergewichtig bleibt oder eine Adipositas entwickelt, hoch ist (Kotani et al. 1997, Dietz 1994). Adipositasraten für Jugendliche zwischen dem 12ten bis 19ten Lebensjahr haben sich weltweit in den letzten 25 Jahren verdreifacht und sind von 5% auf 15% gestiegen (Gassbarini und Piscaglia 2005). In den USA ist der Anteil an übergewichtigen und adipösen Kindern und Jugendlichen in den letzten zehn Jahren auf 40% gestiegen (Kies et al. 2001). In Deutschland sind etwa 10-18% der Kinder und Jugendlichen übergewichtig. Eine Adipositas liegt bei etwa 4-8% vor. (Wabitsch und Kromeyer-Hauschild 2006).

1.3 Pharmakologische Implikationen

Trotz der beschriebenen Problematik ist es nicht gelungen, die Adipositas und ihre Folgen in den Griff zu bekommen. Vielmehr mangelt es, trotz aktueller Verlautbarungen der WHO, nach wie vor den meisten Patienten und Ärzten an der Einsicht, dass es sich bei der Adipositas um ein eigenständiges und komplexes Gesundheitsproblem handelt, das einer langfristigen und spezialisierten Behandlung bedarf.

Die Deutsche Adipositas Gesellschaft (DAG) definiert als Ziel der Adipositastherapie eine Verminderung der Adipositas bedingten Morbidität und Mortalität sowie eine Verbesserung der Lebensqualität. Erreicht werden sollen diese Ziele mit Hilfe eines Basisprogrammes, das heißt mit einer Änderung der Lebensweise hinsichtlich Ernährung und Bewegung. Führt die Basistherapie nach 3 bis 6 Monaten nicht zum vorher definierten Therapieziel, ist laut der DAG eine medikamentöse Therapie zu erwägen. Eine Indikation für eine medikamentöse Therapie besteht bei Patienten mit einem Body-Mass-Index über 30kg/m² und bei Patienten mit einem Body-Mass-Index über 27kg/m², die zusätzlich gravierende Risikofaktoren und/oder Komorbiditäten aufweisen (Deutsche Adipositasgesellschaft 2007).

Bei der herkömmlichen, nicht-medikamentösen Adipositastherapie, die ausschließlich Bewegungs- und Ernährungstherapie beinhaltet, ist die Erfolgsrate eher gering (Dansinger 2007). Vermutlich hat noch nicht einmal jeder zehnte Versuch der

Gewichtsreduktion dauerhaften Erfolg (Greten und Hamann 1999). Zur Unterstützung der herkömmlichen Therapie ist daher eine medikamentöse Behandlung oftmals begleitend notwendig, die in vielen Fällen jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen einhergeht (Bray und Tartaglia 2006).

Vor dem Hintergrund der bisher bekannten, aufgrund starker Nebenwirkung unbefriedigenden, medikamentösen Adipositas Therapie ist der Bedarf an neuen Entwicklungen in der Pharmakotherapie hoch. Große Hoffnung wird in das wachsende Verständnis komplexer Regelkreise gesetzt, die die Energiehomöostase des Organismus steuern. Um die Nebenwirkungen gering zu halten, wird nach Substanzen gesucht, die möglichst gezielt in diese Energiehomöostase eingreifen.

1.4 Der neuroendokrine Regelkreis der Energiehomöostase

Zum Verständnis der neuroendokrinen Energiehomöostase tragen die durch genetische Untersuchungen ermittelten Ergebnisse wesentlich bei. Mittels gezielter Mutagenese und *knock-out*-Tiermodellen konnten Gene identifiziert werden, die an der Determinierung des Körpergewichtes beteiligt sind: Das Leptin-Gen, das Proopiomelanocortin (POMC)-Gen, das Melanocortin-Gen, sowie das Neuropeptid Y (NPY)-Gen, das Agouti related Protein (AGRP)-Gen, das Cocaine and Amphetamine Regulated Transkript (CART)-Gen und deren Rezeptorgene (Barsh et al. 2000). Alle aufgeführten Gene codieren Proteine, die Komponenten im neuroendokrinen Regelkreis zur Regulierung des Körpergewichtes darstellen und somit zu direkten Zielen für die pharmakologische Therapieentwicklung werden.

Eine Schlüsselfunktion bei der neuroendokrinen Gewichtskontrolle stellt das Leptin-Gen dar. Die Adipozyten des weißen Fettgewebes exprimieren Leptin. Das Hormon gelangt über das Blut zum Hypothalamus, dem Sättigungszentrum des Gehirns (Badmann und Flier 2007). Unter den Kerngebieten des Hypothalamus kommt dem Nucleus Arcuatus (ARC) eine übergeordnete Rolle hinsichtlich der Gewichtsregulation zu. Tierversuche zeigen, dass Läsionen in diesem Kerngebiet eine Hyperphagie einhergehend mit einer starken Körpergewichtszunahme verursachen (Kalra et al. 1999).

Vergrößern sich die Fettdepots, wird mehr Leptin ins Blut abgegeben (Abbildung 2). Leptin bindet im Sättigungszentrum an Leptinrezeptoren, die vor allem im ARC in hoher Dichte auftreten (Woods und Stock 1996, Ahima et al. 2000). Bei dem Leptinrezeptor handelt es sich um eine klassische Rezeptortyrosinkinase mit einer extrazellulären Hormonbindestelle, einer Transmembrandomäne und einer phosphorylierbaren intrazellulären Domäne. Bindet Leptin an die extrazelluläre Domäne, führt dies zu einer Konformationsänderung des gesamten Rezeptors. Dadurch kann sich ein Element der Signaltransduktionskaskade, die so genannte Janus-Kinase, an die intrazelluläre Rezeptordomäne anlagern. Dies wiederum regt eine Kette von Phosphorylierungsreaktionen an, wodurch die Klasse der STAT (Signal Transduction and Activators of Transcription)-Transkriptionsfaktoren aktiviert wird. Derart aktivierte STAT-Proteine können in dimerisierter Form in den Zellkern wandern und dort die Transkription bestimmter Effektorproteine regulieren. Im ARC kommt es auf diesem Wege nach Leptinbindung an den Leptinrezeptor zur Bildung bestimmter Neuropeptide wie dem POMC und CART, die ihrerseits ausgeprägte Wirkungen auf die Nahrungsaufnahme haben (Porte et al. 1998, Ghilardi et al. 1996, Vaisse et al. 1996).

Beide Neuropeptide binden – nach Prozessierung – an den MC4-R, einem membranständigen Rezeptor nachgeschalteter Neurone im Nucleus Paraventricularis (PVN) und im lateralen Hypothalamus (LHA) bzw. in der perifornikalen Zone (PFA). Der MC4-R ist als Melanocortin-Rezeptor ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind die größte Familie der integralen Membranproteine. GPCRs leiten die Information extrazellulärer Signale in den Intrazellularraum, wo sie Effektorsysteme aktivieren, welche wiederum die Konzentrationen von „second messengern“ modulieren. Die Bindung von Agonisten an den MC4-R resultiert in einer Aktivierung des G-Proteins, was wiederum zur Bildung von cAMP als „second messenger“ führt (Neves 2002). Die Aktivierung des MC4-Rs in den oben genannten Gehirnarealen bewirkt über noch nicht vollständig verstandene Mechanismen erstens eine Verstärkung des Sättigungsgefühls und zweitens eine Anregung des Energieverbrauchs (Abbildung 2) (Cone 1999).

Zudem bewirkt Leptin eine Suppression der Neuropeptide Y (NPY) und Agouti-Related-Protein (AGRP) bildenden Neuronen, die ebenfalls im ARC lokalisiert sind. Die vom NPY-Gen und AGRP-Gen codierten Proteine steigern – u.a. durch inverse agonistische

Wirkung am MC4-R - die Nahrungsaufnahme durch Blockierung des Sättigungszentrums und senken den Energieverbrauch des Stoffwechsels. Leptin vermittelt somit im ARC eine Hochregulation der Anorexigene und eine Herabregulation der Orexigene, was wiederum eine Reduzierung der Fettdepots bewirkt (Schwartz et al. 2002).

Bei geringer Fettzellmasse und damit einhergehender verminderter Leptinkonzentration im Blut, wird der Signalweg reziprok ausgelöst. Die Suppression der NPY- und AgRP-bildenden Neuronen fällt weg, wodurch die hypothalamischen NPY- und AgRP-Spiegel ansteigen. Gleichzeitig fehlt die Stimulation der POMC-Neuronen und der CART-bildenden Neuronen. Die Konzentration der orexigen wirkenden Botenstoffe steigt an, die Wirkung der Anorexigene wird unterdrückt (Schwartz et al. 2002, Spiegelmann und Flier 2001).

Dieser Regelkreis erlaubt somit eine reziproke Kontrolle der Nahrungsaufnahme. Einhergehend mit einer Gewichtszu- oder abnahme sowie Erhöhung bzw. Verkleinerung der Körperfettmasse, steigt oder sinkt der Leptinspiegel im Blut, wodurch das Sättigungszentrum im Gehirn, der Hypothalamus, Informationen über das Ausmaß der Fettdepots erhält und damit die Steuerung der anorexigen und orexigen wirkenden Botenstoffe anpassen kann.

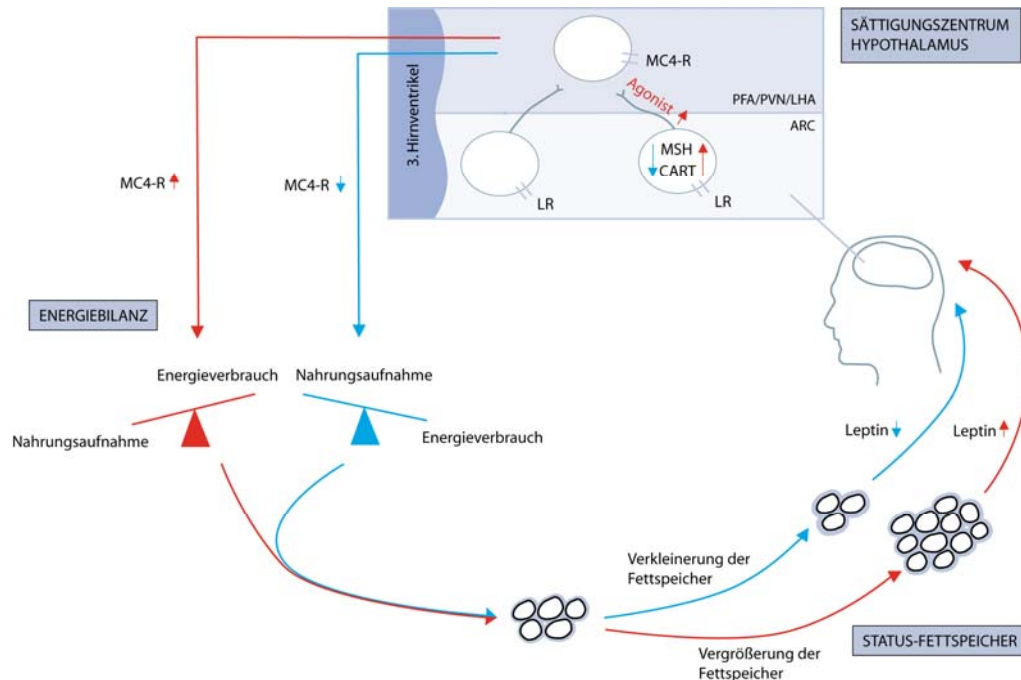


Abbildung 2: Schematische Darstellung der neuroendokrinen Energiehomöostase

Leptin zirkuliert in Proportion zu den Körperfettspiegeln im Blut und gelangt über die Blut-Hirn-Schranke in den Hypothalamus. Im Nucleus Arcuatus existieren u.a. zwei Arten von Neuronen, die AgRP/NPY- bildenden und die POMC bzw. MSH/CART- bildenden Neuronen. Beide werden durch Leptin reguliert. AgRP und NPY sind orexigene Neuropeptide, die als inverse Agonisten am MC4-R wirken. Im Gegensatz dazu sind die Melanocortine (post-translationales Produkt des POMC-Gens) und CART Neuropeptide anorexigene Neuropeptide, die u.a. agonistisch am MC4-R wirken. Bei Zunahme der Fettspeicher, bewirken hohe Leptinspiegel (rot) eine Hemmung der AgRP/NPY-Neuronen bzw. eine Stimulierung der POMC/CART-Neuronen. Die darauf folgende Stimulation des MC4-R bewirkt eine Verringerung der Nahrungsaufnahme bei gleichzeitiger Stimulation des Energieverbrauches. Die Folge: Die Fettspeicher werden kleiner. Bei einer Verringerung des Körpergewichtes, die mit Abnahme der Fettspeicher einher geht, sind die Leptinspiegel niedrig (blau). Bei niedrigen Leptinspiegeln fällt die Hemmung der AgRP/NPY-Neuronen und die Stimulierung der POMC/CART-Neuronen aus. Durch fehlende Stimulation des MC4-R wird die Nahrungsaufnahme nicht blockiert und der Energieverbrauch nicht stimuliert. Die Fettspeicher vergrößern sich. LR: Leptin-Rezeptor; MC4-R: Melanocortin 4-R (nach Barsh et al. 2000).

Mit Hilfe des beschriebenen Regelkreises versucht der Organismus ein bestimmtes Körpergewicht – das sogenannte set-point Gewicht – aufrecht zu erhalten. Ist diese körpereigene Energiehomöostase jedoch auf Dauer überlastet – durch hyperkalorische Ernährung und Bewegungsmangel – kann sie nicht ausreichend gegen regulieren und es entsteht Übergewicht (Wiedmer 2004). Considine et al. zeigten, dass adipöse Personen häufig einen sehr hohen Leptin-Spiegel aufweisen und mit zunehmender Fettmasse und weiter ansteigender Leptinproduktion eine Leptinresistenz entwickeln (Considine et al. 1996).

Das set-point Gewicht wird multifaktoriell bestimmt (Harris et al. 1990). Neben umweltbedingten und hormonellen Einflüssen spielen genetische Faktoren eine Rolle. In wie weit die genetische Komponente das Körpergewicht beeinflusst, wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert. Maes und Barsh folgern aus epidemiologischen Studien, Familienstudien und Adoptionsstudien, dass genetische Faktoren bis 80% der Varianz des BMI erklären (Barsh et al. 2000, Maes et al. 1997). Komplexen Modellberechnungen von Bourchard et al. zufolge sind nur 35% der Varianz des BMI genetisch festgelegt (Bourchard und Perusse 1993).

1.5 Störungen im Leptin-Melanocortinweg: Befunde beim Menschen

Die Bedeutung der Leptin-Melanocortin-Achse hinsichtlich der Energiehomöostase zeigt sich bei Patienten mit monogenen Defekten. Für das Leptin-Gen, das Leptinrezeptor-Gen, das POMC-Gen, das Prohormonkonvertase 1-Gen und das MC4-R-Gen sind Fallbeispiele in der Literatur beschrieben. Die meisten Betroffenen zeigen aufgrund der starken Beeinträchtigung in der neuroendokrinen Energiehomöostase eine ausgeprägte, frühmanifeste Adipositas (BMI > 40) (Barsh et al. 2000).

Mutationen des Leptin-Gens

1997 beschrieben Montague *et al.* erstmals eine monogene, autosomal rezessive Mutation im Leptin-Gen, deren Träger stark verminderte Leptinkonzentrationen aufwiesen. Die untersuchten Kinder hatten ein normales Geburtsgewicht, entwickelten aber bereits nach etwa 4 Monaten wegen ihres sehr stark ausgeprägten Hungergefühls und der daraus resultierenden Hyperphagie eine progressiv morbide Adipositas (Montague et al. 1997). Bislang wurden weitere 5 Träger mit dergleichen homozygoten Mutation im Leptin-Gen identifiziert (Strobel et al. 1998, Farooqi et al. 2002, Gibson et al. 2004, Farooqi und O`Rahilly 2006). 2001 konnte Farooqi et al. zeigen, dass auch ein heterozygoter Leptin-Gen-Defekt zu einer mit relativem Leptinmangel assoziierten Adipositas führen kann (Farooqi et al. 2001).

Mutationen des Leptinrezeptor-Gens

Clément et al. konnten 1998 bei drei Patienten als Ursache einer frühkindlichen morbidem Adipositas eine Mutation im Leptinrezeptor-Gen feststellen. In allen Fällen lag ein autosomal rezessiver Erbgang vor (Clement et al. 1998). Kürzlich berichteten Farooqi et al. von weiteren loss-of-function Mutationen im Leptinrezeptor-Gen bei adipösen Patienten (Farooqi et al. 2007).

Mutationen des Pro-Opiomelanocortin (POMC)-Gens

Inaktivierende Mutation im POMC-Gen mit früh beginnender Adipositas, roter Haarfarbe und Nebenniereninsuffizienz wurden weltweit bei weniger als 10 Patienten beschrieben. Dadurch, dass die vom POMC-Gen codierten Melanocortine nicht nur durch Bindung an den MC4-R die Nahrungsaufnahme regulieren, sondern durch Bindung an den Melanocortin 1-Rezeptor auch die Pigmentierung der Haare, sowie durch Bindung an den Melanocortin 2-Rezeptor die Cortisolsekretion in der Nebennierenrinde beeinflussen, führt ein Defekt des POMC-Gens zu Adipositas, einhergehend mit einer roten Haarfarbe und Nebennierenrindeninsuffizienz. Bei den beschriebenen Fällen des POMC-Defizienz-Syndroms waren die betroffenen Träger einer homozygoten Mutation oder compound heterozygoten Mutationen. Allerdings zeigten Krude et al. sowie Farooqi et al., dass Träger von heterozygoten POMC-Mutationen ebenfalls eine deutliche Prädisposition haben, an Adipositas zu erkranken (Krude et al. 1998, Krude et al. 2003, Farooqi et al. 2006, Creemers et al. 2008).

Mutationen im Prohormonkonvertsase 1(PC1)-Gen

Weltweit ist bisher ein Fall beschrieben, bei dem eine compound heterozygote Mutation im PC1-Gen zu einer manifesten, frühkindlichen Adipositas führte. Die Prohormonkonvertase prozessiert das Prohormon Proopiomelanocortin (Abbildung 3). Aufgrund des Funktionsverlustes der PC1 kann der Mutationsträger keine Melanocortine aus dem Prohormon prozessieren. In Folge fehlen die Liganden am MC4-R (Jackson et al. 1997).

Mutationen des Melanocortin 4-Rezeptor (MC4-R)-Gens

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Einzelfällen anderer Mutationen sind die des MC4-Rezeptors von höherer Prävalenz. Die MC4-R-Defizienz geht einher mit einer Hyperphagie ab dem ersten Lebensjahr und ist eine der häufigsten genetisch bedingten

Adipositas-Erkrankungen. 3-5 % der untersuchten adipösen Patienten mit einem BMI > 40 sind betroffen. Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben das Auftreten von MC4-R-Mutationen in Familien oder ethnischen Gruppen. Jedoch konnten wenige homozygote oder compound heterozygote MC4-R-Mutationsträger identifiziert werden. Vielmehr zeigen sich bei Patienten heterozygote Mutationen, so dass es sich um einen autosomal dominanten Erbgang handelt (Barsh et al. 2000, Larsen et al. 2005). Kürzlich konnten Hinney et al. zeigen, dass auch Normalgewichtige heterozygote Mutationen im MC4-R aufweisen. Dies verdeutlicht, dass MC4-R Mutationen zur Adipositas prädisponieren, aber nicht zwangsweise zur Ausbildung einer manifesten Adipositas führen müssen (Hinney et al. 2006).

Die in der Literatur beschriebenen monogenen Defekte unterstreichen die zentrale Bedeutung des Leptin-Melanocortin-Systems bezüglich der Gewichtskontrolle. Allerdings sind die erwähnten Fälle sehr selten und erklären nicht den zuvor beschriebenen, gewaltigen Anstieg der Adipositasinzidenz. Dennoch bestätigen die monogenen Defekte den beschriebenen Kreislauf als mögliches Ziel für die Adipositas-Therapie, wie zum Beispiel eine Leptin- oder Melanocortin-Ersatztherapie. In Genomweiten Assoziationsstudien wird zur Zeit nach weiteren Genen gesucht, die die Bedeutung des Regelkreises zusätzlich bestätigen (Hinney und Hebebrand 2008).

1. 6 Das POMC-Gen als Kandidatengen für die Entwicklung nicht-syndromaler Adipositas

Genomscan-Studien lassen die Vermutung zu, dass das POMC-Gen bei der Entstehung von gewöhnlicher Adipositas eine Rolle spielen könnte. Comuzzie et al. identifizierten bei 458 Amerikanern mexikanischer Herkunft aus zehn Familien über Kopplungsanalysen einen Quantitativen-Trait-Locus (QLT) im Bereich 2p21 (Comuzie et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Hager führte Kopplungsanalysen bei 158 französischen Familien durch. Aus diesen Analysen resultierten die Chromosomen 2,5 und 10 als mögliche Gen-Orte für Kandidatengene in Bezug auf Adipositasentwicklung einhergehend mit erhöhten Plasma-Leptin-Spiegeln (Hager et al. 1998). Hixson et al. bestätigten innerhalb einer Assoziationsstudie die Ergebnisse von Comuzzie und

Hager, dass eine Mutation im POMC-Gen mit hohen Serumleptinspiegeln assoziiert ist (Hixson et al. 1999).

Das menschliche POMC-Gen umfasst 7665 Basenpaare, ist auf Chromosom 2 (p23) lokalisiert und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Exon 1 enthält eine nicht-kodierende Region, Exon 2 kodiert hauptsächlich das für die zelluläre Translokation und Sekretion wichtige N-terminale Signalpeptid. Exon 3 ist kodierend für die bioaktiven Peptide (Abbildung 3) (Raffin-Sanson et al. 2003).

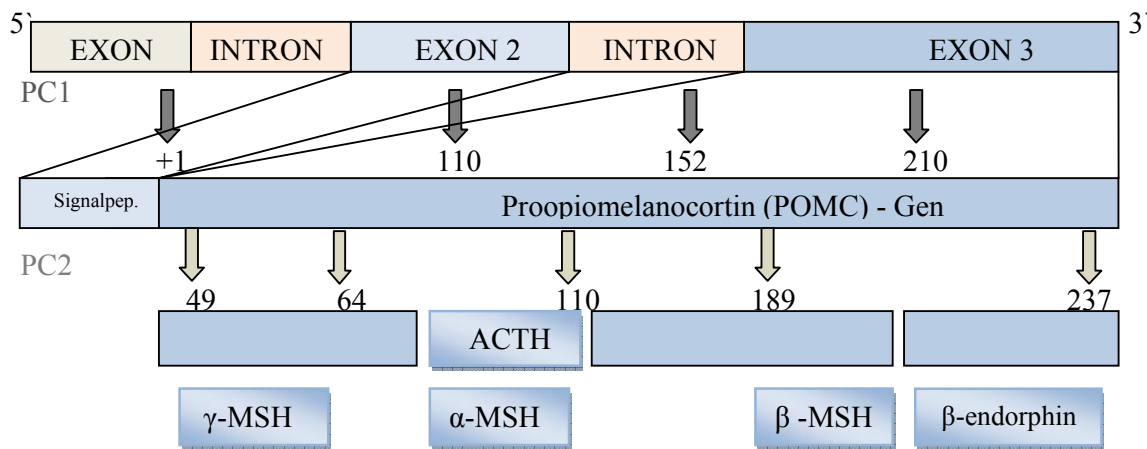


Abbildung 3: POMC-Genstruktur und Prozessierung

Das POMC-Gen besteht aus drei Exons und 2 Introns. Nach Translation wird das Prohormons durch Prohormonkonvertase 1 (PC1) und Prohormonkonvertase 2 (PC2) prozessiert (nach Raffin-Sanson et al. 2003).

Bei Transkription des POMC-Gens entsteht zunächst das POMC-Prohormon, was durch die Enzyme Prohormonkonvertase 1 (PC1) und Prohormonkonvertase 2 (PC2) in α -MSH, β -MSH, γ -MSH, ACTH und β -Endorphin prozessiert wird (Abbildung 3). Die Spezifität der Endonukleasen entscheidet über das gewebespezifische Muster der posttranslationalen Prozessierung. In der Hypophyse spaltet die PC1 Proopiomelanocortin in ACTH und β -Endorphin. Im Hypothalamus und in der Haut wird neben PC1 auch PC2 exprimiert, so dass ACTH und β -Endorphin weiter in α -MSH, β -MSH und γ -MSH gespalten werden (Abbildung 3 und 4) (Krude and Grüthers 2000).

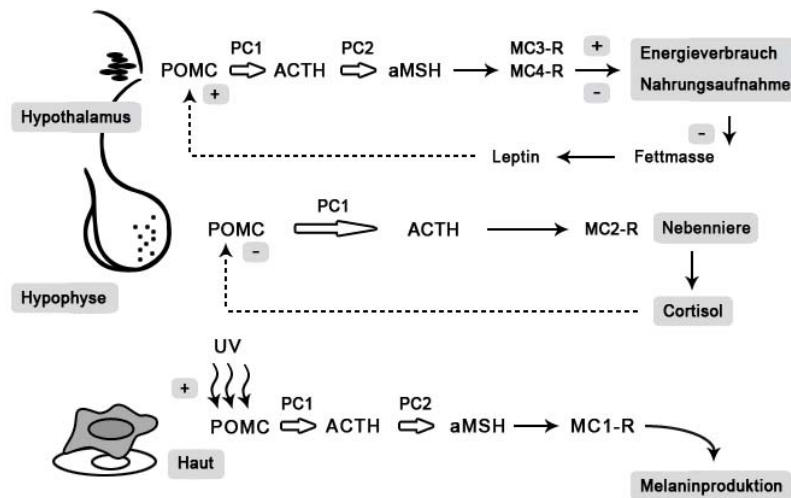


Abbildung 4: POMC-Regulation in Hypothalamus, Hypophyse und Haut

Im Hypothalamus und in der Haut wird das POMC von der PC1 und der PC2 gespalten; in der Hypophyse nur von der PC1 (nach Raffin-Sanson et al. 2003).

Insgesamt sind fünf G-Protein gekoppelte Rezeptoren bekannt, an die POMC-Peptide binden. Im ARC bewirkt die Bindung der POMC-Peptide an Melanocortinrezeptor 3 (MCR-3) und Melanocortinrezeptor 4 (MCR-4) als Antwort auf das Leptinsignal eine Verringerung der Energieaufnahme einhergehend mit einem gesteigerten Energieverbrauch. Das in der Hypophyse gebildete ACTH bindet in der Nebenniere an Melanocortinrezeptor 2 (MCR-2), was zur Cortisolsekretion führt. In der Haut regen α -MSH und β -MSH durch die Bindung an den Melanocortinrezeptor 1 (MC1-R) die Melaninbildung an (Schaffer und Bologna 2001). Bei Menschen ist die Funktion des MCR-5 bislang unbekannt. Bei Nagern spielt der MCR-5 eine Rolle bei der Funktion von exokrinen Drüsen (Boston 2001).

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen der POMC-Peptide führt ein kompletter Funktionsverlust des POMC-Gens zu einem Krankheitsbild mit verschiedenen Symptomen. Aufgrund der fehlenden Liganden der Melanocortinrezeptoren sind Sättigungssignal, Melaninbildung und Cortisolsekretion stark unterdrückt. Neben einer schweren Adipositas bereits im Kindesalter, haben die Betroffenen rote Haare und Nebenniereninsuffizienz. Bisher sind weltweit weniger als 10 Fälle diagnostiziert. Die inaktivierenden Mutationen im POMC-Gen zeigen jedoch deutlich, die zentrale Rolle der Melanocortine bei der Gewichtsregulation. Alle betroffenen Kinder zeigen homozygote

oder compound heterozygote Mutationen im POMC-Gen (Krude et al. 2003). Das POMC-Defizienz-Syndrom ist jedoch sehr selten und erklärt nicht den Befund der zuvor beschriebenen Genomscanstudien. Wodurch der hohe QTL-Wert entsteht, bleibt offen.

1.7 Die Funktion der POMC-Peptide bei der Gewichtsregulation

Im Sättigungszentrum des Gehirns – dem ARC – werden nach Prozessierung des Proopiomelanocortins äquimolare Mengen von α -, β -, und γ -MSH gebildet (Abbildung 3). Bisherige Untersuchungen haben die Bildung von α -MSH im Hypothalamus für die Weiterleitung des Leptinsignals verantwortlich gemacht. Yaswen et al. klonierten 1999 eine POMC-*knock-out*-Maus, die nicht in der Lage war, die Hormone ACTH, γ -Lipoprotein, α -MSH, β -MSH und β -Endorphin zu bilden. Die Maus zeigte als Phänotyp Adipositas, eine fehlerhafte Entwicklung der Nebennieren und Hautveränderungen. Eine Behandlung dieser *knock-out*-Mäuse mit intraperitoneal (ip) appliziertem α -MSH führte innerhalb von zwei Wochen zu einem Verlust von 40% des Ausgangsgewichtes (Yaswen et al. 1999). Die Fokussierung auf α -MSH ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass für die Forschung leicht zugängliche *in vivo*-Versuche an Nagetieren durchgeführt werden, die β -MSH nicht aus Proopiomelanocortin prozessieren können, da Nagern die N-terminale Schnittstelle für β -MSH fehlt (Benett 1986).

β -MSH und γ -MSH weisen jedoch ebenso wie α -MSH die Rezeptorbindungs-Sequenz His-Phe-Arg-Trp/H-F-R-W auf, so dass auch diese Melanocortine zur Bindung an den MC4-R fähig sind, der für die Weiterleitung des Sättigungssignals verantwortlich ist (Biebermann et al. 2006). Die starke phylogenetische Konservierung deutet auch eine Funktion von β -MSH und γ -MSH an (Abbildung 5A). Neue Forschungsergebnisse lassen vor allem für β -MSH eine Funktion bei der neuroendokrinen Regulation der Nahrungsaufnahme vermuten. Einige Studien zeigten, dass β -MSH die höchste Bindungsaffinität zum MC4-R aufweist und somit die Bindungsaffinität von α -MSH noch übersteigt (Schiöth et al. 1996). Fütterungsexperimente an Ratten nach intracerebroventrikulären (icv)-Injektion von Melanocortinen, zeigten für β -MSH, nicht aber γ -MSH,

den gleichen Konzentrations-Wirkungs-Effekt wie α -MSH (Kask et al. 2000, Abbot et al. 2000).

Lange konnten großangelegte Mutationsscreenings keine partielle loss-of-function Mutation im α - und β -kodierenden Bereich des POMC-Gens zeigen (Hinney et al. 1998, Echwald et al. 1999, Miraglia del Guidice et al. 2002, Challis et al. 2002). Kürzlich identifizierte die Arbeitsgruppe Grüters während eines Mutations-Screenings bei 15 adipösen Kindern, eine heterozygote POMC-Mutation in der kodierenden Region für β -MSH (A7362G), die einen Austausch eines hochkonservierten Tyrosinrestes gegen Cystein bewirkt (Y5C) (Abbildung 5A, Biebermann et al. 2006). Wie in Abbildung 5B dargestellt, zeigten weitere Familienmitglieder wie Bruder, Vater und Großmutter der Mutationsträgerin die gleiche Mutation. Das Körpergewicht der einzelnen Familienmitglieder ist in BMI-SDS-Werten ebenfalls in Abb. 5B dargestellt. Alle Familienmitglieder, Mutationsträger aber auch Nicht-Mutationsträger sind übergewichtig oder sogar adipös. Die gleiche β -MSH-Mutation konnten Lee et al. in einem Screening von 538 Adipösen in 5 Fällen nachweisen, wohingegen nur einer von 300 normalgewichtigen Probanden der Kontrollgruppe die Mutation zeigte (Lee et al. 2006). In wie weit die beschriebene β -MSH-Mutationen bei der Adipositasausbildung der Mutationsträger eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

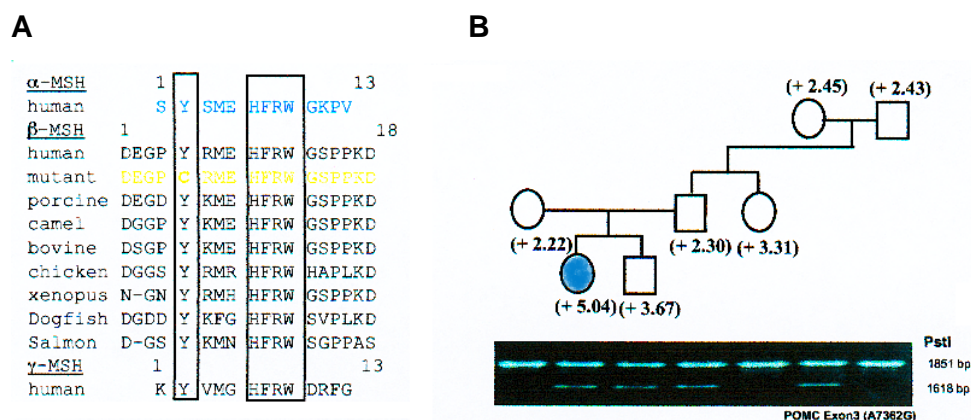


Abbildung 5: A) Consensus-Sequenz

B) Familienstammbaum der Indexfamilie

A) Alle drei Melanocortine α -, β - und γ -MSH zeigen die Rezeptorbindungs-Sequenz für den MC4-R.

B) Das Zeichen des Index-Mädchens ist blau gekennzeichnet. Neben der adipösen Patientin sind Bruder, Vater und Großmutter Mutationsträger. In Klammern ist der BMI-SDS Wert angegeben. Ein SDS-Wert von +1 bedeutet Übergewicht, ab einem Wert von +2 liegt Adipositas vor (Biebermann et al. 2006).

2. Herleitung der Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit umfasste zwei Aufgabenstellungen:

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein Mutations-Screening in einer geeigneten Stichprobe zeigen, ob der hypothalamus-spezifische Enhancer des POMC-Gens bei Adipösen genetische Unterschiede zu normalgewichtigen Personen aufweist (2.1). Im zweiten Teil sollte die Rolle von β -MSH bei der neuroendokrinen Gewichtsregulation genauer identifiziert und die beschriebene β -MSH-Mutante (A7362G) *in vitro* und *in vivo* funktionell charakterisiert werden (2.2).

2.1 Mutations-Screening der hypothalamischen POMC-Enhancerregion

Im Gegensatz zu den extremen Adipositasformen, die durch monogene Defekte hervorgerufen werden können, ist die genetische Ursache der viel häufiger auftretenden moderaten Adipositas nicht geklärt. Wie beschrieben nimmt die Prävalenz weltweit epidemieartige Züge an. Jedoch entwickeln nicht alle Menschen bei den vorherrschenden „ungünstigen Umweltbedingungen“ Übergewicht oder sogar eine Adipositas. Es gibt Menschen, bei denen die neuroendokrine Gewichtskontrolle besser greift, bei anderen schlechter. Einige scheinen sensibler auf das Leptinsignal zu reagieren als andere. Offen bleibt, durch welche Genotypen die Leptinsensitivität genetisch festgelegt wird (Münzberg und Meyers 2005). Um die genetische Ursache der viel häufiger auftretenden moderaten Adipositas zu erklären, ist es entscheidend, Allelkombinationen zu identifizieren, die zu einer geringeren Leptinsensitivität prädisponieren und daher den neuroendokrinen Regelkreis der Energiehomöostase schwächen.

Die Studien von Comuzzie und Hixson zeigen eine Assoziation von Übergewicht und Mikrosatellitenallele in einer Region auf Chromosom 2p21, die das POMC-Gen umfasst (Comuzzie et. al 1997, Hixson et al. 1999). Bedeutend ist, dass bei den in den Genomscan-Studien untersuchten Personen keine Mutationen im codierenden Bereich des POMC-Gens gefunden wurden. Eine mögliche Ursache für das Auftreten von

Adipositas könnten Mutationen nicht im codierenden Bereich, sondern im regulierenden – etwa im hypothalamus-spezifischen Enhancer des POMC-Gens – sein. Mutationen im hypo-thalamischen Enhancerbereich würden über eine Herabsetzung der Melanocortinbildung und damit bedingte geringe MC4-R-Aktivität im PVN eine Schwächung der Weitergabe des Leptinsignals und damit die Entstehung von Übergewicht begünstigen. Da bei diesen Allelvarianzen die POMC-Peptidbildung nur herabgesetzt und nicht völlig fehlen würde – wie bei den erwähnten loss-of-function-Mutationen im codierenden Bereich – könnte dies eine genetische Ursache für das Entstehen von gewöhnlicher Adipositas sein und die Prädisposition einiger Menschen erklären, eine Adipositas zu entwickeln. Da nur die Expression im Hypothalamus beeinträchtigt wäre, würden weitere Symptome des POMC-Defizienz-Syndroms ausbleiben.

Die Arbeitsgruppe Low/De Souza Portland USA konnte durch Deletionsversuche am 5`Ende des POMC-Gens bei transgenen Mäusen eine hypothalamus-spezifische Enhancerregion definieren (De Souza 2005). Die beschriebenen Daten wurden von der Arbeitsgruppe Low/De Souza zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung vertraulich zur Verfügung gestellt, um bei adipösen Kindern ein Mutations-Screening durchzuführen.

Hierfür waren in einem ersten Schritt über Speziesvergleiche von Mensch, Maus, Ratte innerhalb des von Low/DeSouza beschriebenen Bereiches homologe Abschnitte zu identifizieren, da eine starke phylogenetische Konservierung auf funktionell relevante Bereiche hindeutet. Weiter wurde der von Low postulierte hypothalamus-spezifische Enhancer auf leptinresponsive Sequenzen untersucht. Da Leptin die POMC-Expression auslöst und über die Jak-Stat-Kaskade vermittelt, wurde nach STAT-Bindungsstellen gesucht (Spiegelmann und Flier 2001).

Nach Definition der homologen Bereiche, sollte ein Mutations-Screening in einer geeigneten Stichprobe durchgeführt werden. Durch die Polymerase Chain Reaction (PCR) waren die Abschnitte zu vervielfältigen und im Anschluss zu sequenzieren. Fielen Mutationen auf, war das Kontrollkollektiv mittels Restriktionsenzym-Analyse auf diese genetischen Veränderungen hin zu untersuchen. Zudem sollten Proben von 50 normalgewichtigen Kindern aus dem Kontrollkollektiv sequenziert werden, um die inter-individuelle Variabilität der Enhancerregion zu testen.

2.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und einer β -MSH-Mutante *in vitro* und *in vivo*

Um geeignete Strategien zur Adipositasbehandlung zu entwickeln, ist es notwendig, die neuroendokrinen Mittler des Sättigungssignals zu identifizieren und deren Funktion zu beschreiben. Wie in der Einleitung erläutert, spielen die vom POMC-Gen exprimierten Melanocortine eine bedeutende Rolle bei der Regelung der Energiehomöostase.

Durch die posttranslationale Prozessierung von POMC entstehen beim Menschen im ARC equimolare Mengen an α -MSH und β -MSH. β -MSH zeigt bei Bindungs- und Rezeptoraktivierungsstudien *in vitro* und bei Injektionsexperimenten, die bei Nagern durchgeführt wurden, ähnliche Ergebnisse wie α -MSH. Das Ergebnis des Mutations-Screenings der Arbeitsgruppe Grüters, bei dem bei einer adipösen Patientin eine β -MSH-Mutation (A7362G \rightarrow Y5C) identifiziert wurde, lässt eine Funktion von β -MSH bei der neuroendokrinen Energiehomöostase vermuten.

Um die Rolle von β -MSH bei der Energiehomöostase näher zu identifizieren, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmals die biologische Aktivität der beschriebenen β -MSH-Mutante (A7362G \rightarrow Y5C) *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Des Weiteren sollten die Versuche nochmals die Aktivität von α -MSH und β -MSH vergleichen. Bisher sind hierfür in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse beschrieben.

In vitro sollten Bindungsstudien und cAMP-Assays an CHO-K1 Zellen, die zuvor mit dem humanen MC4-R stabil transfiziert worden waren, einen möglichen Funktionsverlust der β -MSH-Mutante gegenüber dem Wildtyp deutlich machen. Die Versuche sollten an mit dem MC4-R transfizierten Zelllinien durchgeführt werden, da die Melanocortine im Hypothalamus ihr Signal über die Bindung an diesen Rezeptor weitergeben (Abbildung 2). Neben den Rezeptorbindungsstudien, sollten cAMP-Assays Aufschluss über die Rezeptoraktivierung nach Ligandenbindung geben. Die *in vitro*-Versuche sollten mit der β -MSH-Mutante, β -MSH und α -MSH als Kontrollgröße durchgeführt werden. Während für α -MSH vergleichbare Ergebnisse bezüglich des Bindungs- und Aktivierungsvermögens am MC4-R nachgewiesen werden konnten, sind die Ergebnisse für β -MSH widersprüchlich. Einige Arbeitsgruppen zeigten niedrigere,

andere ähnliche Werte wie für α -MSH (Guo et al 2004, Abbot et al 2000). Die Messungen von Schiöth et al zeigten sogar eine höhere Bindungsaffinität und Rezeptoraktivierung für β -MSH (Schiöth 1996).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten bereits den Einfluss von α -MSH und β -MSH auf das Fressverhalten von Ratten nach intracerebroventrikulärer (icv) Applikation (Kask et al. 2000; Millington et al. 2001; Abbot et al. 2000). Für α -MSH konnte stets eine Hemmung der Futteraufnahme nachgewiesen werden. Für β -MSH waren die Ergebnisse bisher jedoch ebenfalls wie bei den *in vitro*-Untersuchungen nicht eindeutig. Daher sollte zunächst die Aktivität von β -MSH *in vivo* überprüft und zudem ein möglicher Funktionsverlust der β -MSH-Mutante gezeigt werden. Da für α -MSH eindeutig eine Hemmung des Fressverhaltens bei icv-Applikation gezeigt werden konnte, sollte α -MSH als positive Kontrollgröße mitgeführt werden.

Die *in vivo*-Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Tschöp/Potsdam durchgeführt. icv-Kanülierung von Ratten und *in vivo*-Futterexperimente sind dort gängige Arbeitsmethoden, wohingegen die Arbeit mit Melanocortinen etabliert werden musste.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Adenosin-5`-triphosphat	Böhringer Mannheim
Agarose	Gibco
Bromphenolblau	Merck,Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	Merck,Darmstadt
Desoxyribonukleotide	Amersham Pharmacia, Little Chalfont USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Biochrom, Berlin
Ethylendinitroetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 96% reinst	Merck Darmstadt
Ethanol 100% denaturiert mit Ethylmethylketon	Herbeta-Arzneimittel, Berlin
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen

Bezeichnung	Hersteller
Formaldehyd mind. 37%	Merck, Darmstadt
Fetal Calf Serum	PAA, Linz, Österreich
D(+)-Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200mM)	Biochrom, Berlin
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HCL, rauchend 37%	Merck, Darmstadt
Imidazol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	TSI, Zeven
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dodecahydrat	Merck, Darmstadt
PBS-Dulbecco w/o CA^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom, Berlin

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol (=Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	ICN, Aurora, USA
Trypsin/EDTA-Solution (0,5/0,2%) w/v in PBS	Biochrom, Berlin
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Zyklisches 3`-5`Adenosinmonophosphat (cAMP)	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2: Chemikalien

3.1.2 Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin

Tabelle 3: Antibiotika

3.1.3 Hormone

Bezeichnung	Hersteller
NDP- α -MSH	Peter Henklein, Biochemie Charite
α -MSH	Peter Henklein, Biochemie Charite
β -MSH	Peter Henklein, Biochemie Charite
ASP (87-132)	Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, USA

Tabelle 4: Hormone

3.1.4 Radioaktive Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
^{125}I -NDP- α -MSH 2000Ci/mmol	Amersham Pharmacia, little Chalfont, England
2,8- ^3H -Adenin 30Ci/mmol	Perkin Elmar, Boston, USA

Tabelle 5: Radioaktive Substanzen

3.1.5. Zellen

Die Bindungs- und cAMP-Studien wurden an chinese hamster ovary (CHO)-Zellen durchgeführt.

3.1.6. Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Fötales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Trypsinlösung	Biochrom AG, Berlin

Tabelle 6: Zellkultur

3.1.7 Enzyme

Enzym	Konzentration	Erkennungssequenz	Puffer	Hersteller
Alu I	10000 U/ml	5'AGCT.....3' 3'TCGA.....5'	NEB Puffer 2	New England Biolabs

Tabelle 7: Restriktionsenzyme

Enzym	Konzentration	Herkunft
TAQ Polymerase	4U/ μ l	MWG, Ebersberg

Tabelle 8: Polymerase

3.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

3.1.8.1 Medium für Zellkultur

Reagenz	Konzentration
Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM)	
Fötale Kälberserum	10%
Glukose	1g/l
L-Glutamin	2Mm
Penicillin	100U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

Tabelle 9: Medium für Zellkultur

3.1.8.2 Puffer

10XTBE: Laufpuffer für Gelelektrophorese

Reagenz	Konzentration
Tris	0,89M
H ₃ BO ₃	0,89M
EDTA	0,02M

Tabelle 10: Puffer für Gelelektrophorese

3.1.8.3 Lösungen

Loading-Dye für Agarosegele

Reagenz	Konzentration
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%
Glycerol	25%

Tabelle 11: Loading-Dye

Lösungen zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation

Lysislösung

Reagenz	Konzentration
Trichloressigsäure	5%
cAMP	1mM
ATP	1mM

Tabelle 12: Lysislösung

Regenerationspuffer für Dowex-Säulen

Reagenz	Konzentration
HCl	1mM

Tabelle 13: Regenerationspuffer für Dowex-Säulen

Regenerationspuffer für Alumina-Säulen

Reagenz	Konzentration
Tris/HCl	0,5M; pH 7,5
Imidazol/HCl	0,1 M; ph 7,5

Tabelle 14: Regenerationspuffer für Alumina-Säulen

Lösungen zur Durchführung von Bindungsassays

Hank`s Lösung (pH: 7,4)

Reagenz	Konzentration
KCl	5,36mM
KH ₂ PO ₄	0,44mM
MgSO ₄	0,40mM
Na ₂ HPO ₄	0,33mM
Glucose	5,55mM
CaCl ₂	1,30mM
Sucrose	280mM
BSA	0,2%
Magermilchpulver	2,5%

Tabelle 15: Hank`s-Lösung

3.1.9 Kits

Name	Hersteller	Funktion
QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden	DNA-Extraktion
BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt	Sequenzierung
QIAquick PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden	DNA-Purifikation

Tabelle 16: Kits

3.1.10 DNA-Größenmarker

Bezeichnung	Hersteller
1kb-DNA-Ladder	Progema, Mannheim

Tabelle 17: DNA-Größenmarker

3.1.11 Primer

Für die Amplifikation des POMC-Gens wurden entsprechende Oligonukleotid-Primer unter Berücksichtigung folgender Punkte angesetzt:

- Vermeidung von mehr als drei Guanosin-oder Cytosin-Nukleotiden am 3' Ende des Oligonukleotid-Primers
- Keine komplementären Sequenzen zwischen dem Primerpaar und innerhalb des Primers zur Vermeidung von Primerdimerbildung oder Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung
- Die Größe des Oligonukleotid-Primers sollte mindestens 19 BP betragen.
- Der G/C-Gehalt des Oligonukleotid-Primers sollte zwischen 40% und 60% liegen.

Sämtliche Primer wurden bei Molbiol, Berlin bezogen. Die Konzentration der Primer lag bei allen aufgeführten Primern bei 25pmol/μl.

Bezeichnung	Sequenz	Größe
POMC ges-F	5'-CAATGGGACTGAGGGCACAGT-3'	22 Bp
POMC 1a-F	5'-CACTCTCCCTACCTCAACTG-3'	20 Bp
POMC 1a-R	5'-GACCATTATGACCACCGCTG-3'	20 Bp
POMC 1-R	5'-GTGTCCCATGGAAGTGGCTC-3'	20 Bp
POMC 2-F	5'-CTTCCTCCACTCTTGACTCTG-3'	21 Bp
POMC ges-R	5'CATCAGGCTCCCCTCAGAGGGATG-3'	24 Bp

Tabelle 18: Primer zur Amplifizierung von POMC-Fragmenten

3.1.12 Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller	Funktion
Polaroid direct screen instant	Polaroid	Kamera
Biometra Agagel-Midi Wide	Biometra	Gelkammer
Mastercycler gradient	Eppendorf	DNA-Thermocycler
Genequant II	Pharmacia, Freiburg, D	Photometer
Horizontalelektrophorese GE-A2	AGS, Heidelberg, D	Agerose - Gelelektrophor.
Laborwaage SBA, SBC	Scaltec Instruments	Waage
ABI Sequencer 373	ABI, Weiterstadt, D	Sequenzierer
Labofuge 200	Heraeus	Kühlzentrifuge
Mighty Bright	Hoefer	UV-Lichtquelle
Mikrowelle	Siemens	Mikrowelle
Milli-RO 10 Milli Q Plus	Millipore, St Quentin, USA	Destillierungsanlage
Minishaker	IKA, Willington, USA	Schüttler

Gerätebezeichnung	Hersteller	Funktion
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, D	Wasserbad
Scotsman AF 10	Frimont, Mailand, Italien	Eismaschine
Finn-Pipetten	Labsystems, Helsinki Finnland	Pipette
Cold-Box	Neolab, Heidelberg, Deutschland	Kühlbox
Einmal-Spritzen Inject	B/Braun Melsungen AG, Melsungen, D	Spritze
22 gauge-cannulas	Plastics One, Roanoke,VA, USA	Kanüle
Drainageschläuche, glatte	International Medical Products GmbH, Kleeve, D	Drainage
Precisa XP 620 C	Neolab, Heidelberg, D	Futterwaage
Drinkink&Feeding Monitoring System	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, D	Online-Monitoring

Tabelle 19: Geräte

3.1.13 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Pasteur-Pipette	Falcon
Blue-Cab-Röhrchen	Falcon
Well-Platten	Falcon
PCR-Tubes	Falcon

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien

3.2 Methoden

3.2.1 Mutations-Screening der hypothalamus-spezifischen Enhancerregion des POMC-Gens bei adipösen und normalgewichtigen Kindern

3.2.1.1 Patientenrekrutierung

In einem Mutations-Screening sollte die von der Arbeitsgruppe Low/DeSouza postulierte Enhancerregion bei adipösen und normalgewichtigen Kindern auf genetische Veränderungen hin untersucht werden. Für die vorliegende Arbeit wurden aus der Patientenkohorte des Instituts Blutproben geeigneter Patientengruppen gewählt. Die Blutproben wurden im Rahmen des SFB-Projektes Adipositas (SFB-Projekt Nummer 557A9 mit Ethikantrag) gesammelt. Daten wie Alter, Körpergröße, Körpergewicht und BMI der Patienten wurden zusammengestellt. Durch die Arbeit im Otto-Heubner-Zentrum lagen ca. 200 Blutproben als EDTA-Blut von adipösen Kindern vor, aus denen DNA für die Untersuchungen gewonnen wurden.

Um im Verlauf der Arbeit das Untersuchungskollektiv zu vergrößern, ist auf einen weiteren Patientenpool in der Marburger Arbeitsgruppe Hebebrand zurück gegriffen worden.

3.2.1.2 DNA-Extraktion

Um bestimmte DNA-Fragmente mittels PCR amplifizieren zu können, musste die DNA zunächst aus dem EDTA-Blut extrahiert werden. In unserem Fall wurde die DNA aus Leukozyten gewonnen. Die DNA-Extraktion wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit / Blood and Body Fluid Spin Protocol durchgeführt. Mit diesem Kit lässt sich aus 300µl EDTA-Blut 3-12µg DNA gewinnen. Um eine möglichst hohe DNA-Ausbeute zu erzielen, wurde das Protokoll wie folgt abgeändert:

30µl Protease wurden in ein 1,5ml Eppendorfgefäß pipettiert. 300µl des EDTA-Bluts sowie 300µl Lysepuffer wurden hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 15sec gevortext und anschließend zur vollständigen Zellyse für 10min bei 56°C ins Wasserbad gegeben. Danach wurde das Eppendorfgefäß für 1min bei 8000rpm zentrifugiert, um Tropfen am Gefäßdeckel zu entfernen. Nach Zugabe von 300µl Ethanol wurde das Eppendorfgefäß wiederum zentrifugiert. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde auf eine Säule gegeben und erneut bei 8000rpm für 1min zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde das auf die Säule gegebene Lysat durch den Filter gepresst und die DNA dort gesammelt. Der Rückstand wurde verworfen und die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß gegeben. Es folgten zwei Waschgänge mit den zugehörigen Puffern. 500µl wurden jeweils auf die Säule gegeben und bei 8000rpm für 1min zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen. Anschließend wurden die im Filter gesammelte DNA ausgewaschen. Die Säule wurde hierfür auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und 75µl destilliertes Wasser auf die Säule gegeben. Das Eppendorfgefäß wurde 1min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 8000rpm für 1min. Der Waschgang wurde zweimal wiederholt.

Die Konzentration der gelösten DNA wurde photometrisch in Quarzküvetten mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dazu wurde die DNA zunächst 1:200 verdünnt und die Extinktion dieser Lösung mit Hilfe eines Photometers gemessen. Die DNA-Konzentration ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{Verdünnung} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Extinktion } 260 \text{ nm}$$

Um die DNA in der PCR einzusetzen, wurden Verdünnungen mit DNA-Konzentration von 20ng/µl hergestellt. Die DNA Proben wurden bei -20°C gelagert.

3.2.1.3 Amplifikation des hypothalamus-spezifischen Enhancerbereiches

Insgesamt umfasst der von der Arbeitsgruppe Low/De Souza postulierte hypothalamus-spezifische Enhancerbereich 1000 Basenpaare. Da bei einem Mutations-Screening mit dem zur Verfügung stehenden 16-Kapillarsequenzierer nur Fragmente mit einer Größe von höchstens 500 Basenpaaren untersucht werden können, wurden die 1kb in Teilfragmente aufgegliedert. Die Teilfragmente jeder Probe wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction/PCR) vervielfältigt. Das PCR-Verfahren für diese Amplifikationen war zu etablieren. Für die Amplifikation der POMC-Enhancer Abschnitte wurde folgender Standard-PCR-Ansatz (Tabelle 21) etabliert:

PCR-Ansatz:

10 x PCR-Puffer	5µl
Primer F (10pmol)	1µl
Primer R (10pmol)	1µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
Taq-Polymerase (5U/ul)	0,5µl
dH ₂ O	41µl
DNA	1µl

Tabelle 21: PCR-Ansatz

PCR-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	5min
Denaturierung	95°C	20sec
Annealing	65°C	30sec
Elongation	72°C	40sec
Elongation	72°C	10min
Zyklen	30	

Tabelle 22: PCR-Programm

3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation auf ihre korrekte Länge und Menge kontrolliert. Dazu wurden 2g Agarose mit 100ml 1xTBE-Puffer (2%iges Gel) versetzt, in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend 10µl Ethidiumbromid zugegeben. Nach Abkühlung wurde ein Gel in eine entsprechende Kammer gegossen und die Polymerisation bis zur Verwendbarkeit abgewartet. Zum anschließenden Auftragen der Proben wurden jeweils 5µl PCR-Amplifikat mit gleicher Menge Ladepuffer in die Geltaschen überführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 100V in ca. 20min. Ein 1 kb-Marker wurde als DNA-Längenstandard verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte auf einem UV-Flächenstrahler sichtbar gemacht und per Kameraaufnahme fotografisch dokumentiert.

3.2.1.5 Aufreinigung des PCR-Produktes

Vor der Sequenzier-Reaktion sind die PCR-Produkte von überschüssiger genomischer DNA, Nukleotiden, Primern, Polymerasen und Salzen zu trennen. Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits. Hierzu wurden 250µl Puffer zu 50µl PCR-Amplifikat gegeben. Die im Kit enthaltene Säule wurde auf ein 2ml Eppendorfgefäß gesteckt, das PCR-Produkt mit dem Puffer auf die Säule gegeben und dann bei 10000rpm für 30-60sec zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen und die Säule erneut auf dasselbe Eppendorfgefäß gesteckt. 750µl Waschpuffer wurden auf die Säule gegeben und es wurde erneut bei 10000rpm für 30-60sec zentrifugiert. Der Rückstand wurde verworfen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit für 5-6min. Die Säule wurde auf ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß gesteckt und bei Raumtemperatur eine Minute offen stehen gelassen, damit der restliche im Waschpuffer enthaltene Ethanol verdampft. Um die DNA zu eluieren wurde 25µl 50°C warmes Wasser hinzu gegeben und erneut bei Raumtemperatur für eine Minute stehen gelassen. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 10000rpm für 1min.

3.2.1.6 Sequenzier-Reaktion

Die Sequenzier-Reaktion der aufgereinigten PCR-Produkte wurde mittels des Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kits 3.1 durchgeführt. 1 µl des gereinigten PCR-Produktes wurde dem folgenden Reaktionsansatz (Tabelle 23) zugegeben und bei entsprechender Annealing-Temperatur der Sequenzreaktion im Thermocycler unterzogen. Die Primerstammlösung wurde vor jeder Sequenzierungsreaktion frisch verdünnt.

Sequenzierbedingungen für alle Enhancerabschnitte

Sequenzierungs-Reaktionsansatz:

dH ₂ O	5 µl
Big Dye	1 µl
Primer F (5µM)	1 µl
Gereinigtes PCR-Produkt	0,5 µl

Tabelle 23: Sequenzier-Ansatz

Sequenzier-Programm:

Initiale Denaturierung	95°C	1min
Denaturierung	95°C	30sec
Annealing	55°C	15sec
Elongation	55°C	4min
Zyklen	29	

Tabelle 24: Sequenzier-Programm

3.2.1.7 Präzipitation der sequenzierten DNA

Nach der Sequenz-Reaktion wurden die DNA-Sequenzen mittels Ethanolfällung präzipitiert. Hierzu wurden 2µl Natriumacetat (1,5M) in 1,5ml Eppendorfgefäße pipettiert. Zu den Sequenzier-PCR-Produkten wurden 20µl absoluter Alkohol gegeben. Dieser Mix wurde in die mit NaAcetat gefüllten Eppendorfgefäße überführt und 30min bei 13000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hierdurch bildet sich ein Pellet, das die DNA enthält. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das Pellet wurde zweimal mit

70%tigem Ethanol gewaschen. Hierzu wurden jeweils 100µl Ethanol zu dem Pellet gegeben und für 10min ebenfalls bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird erneut abgesaugt. Um den Ethanol vollständig zu entfernen, wurden die Pellets bei 50°C für 30min im Thermocycler getrocknet. Die getrockneten Pellets waren so für mindestens 6 Wochen bei -20°C haltbar.

3.2.1.8 Anlösen der Proben für den ABI Prism 1000

Die getrockneten Proben wurden mit 16µl H₂O angelöst. Davon wurden 4µl entnommen und auf 96 Well-Platten aufgetragen, in die bereits 16µl H₂O vorgelegt waren. Anschließend wurde die Platte bis zur Eingabe in den Kapillarsequenzierer mit einer Gummiabdeckung verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

3.2.1.9 Auswertung der Sequenzen

Die Enhancer-Sequenzen der adipösen Kinder wurden mit dem Wildtyp-Sequenzen verglichen. Wurden bei der Auswertung der Sequenzen genetische Veränderungen gefunden, war das Kontrollkollektiv mittels Restriktionsenzymanalyse auf diese genetische Veränderung hin zu untersuchen.

3.2.1.10 Restriktionsenzym-Analyse des Kontrollkollektivs

Für die Restriktionsenzym-Analyse wurde der von der Mutation betroffene Enhancerbereich zunächst mittels PCR amplifiziert (s.o.). Dieser Bereich wurde anschließend durch ein geeignetes Restriktionsenzym (ALU I) verdaut. Dabei wurde das Restriktionsenzym so gewählt, dass das Wildtyp-Allel eine ALU I-Schnittstelle aufwies und das von der Mutation betroffene Allel nicht geschnitten wurde.

Für den Verdau des mutationstragenden Enhancerabschnittes wurde folgender Standard-Ansatz mit ALU I als Restriktionsenzym etabliert:

Verdau-Reaktionsansatz:

dH ₂ O	3 µl
Alu I (10.000U/ml)	1 µl
dH ₂ O	10 µl
PCR-Produkt	15 µl

Tabelle 25: Verdau-Reaktionsansatz

Der Verdau erfolgte bei 37°C im Wasserbad oder im Thermocycler für mindestens 4h.

Nach dem Verdau wurden die Teilfragmente auf ein Agerosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, um eine bzw. keine Restriktion des Enzyms sichtbar zu machen.

3.2.1.11 Teststatistiken

Die statistische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Andre Scherag, Institut für Biometrie der Philipps Universität Marburg.

3.2.1.11a Fisher`s Exact Test

Zur Auswertung des Polymorphismus im Fragment nPOMC1 wurde ein rezessives Modell angenommen. Die Auswertung der Genotypen von Fällen und Kontrollen erfolgte mit Hilfe des Fisher`s Exact Tests. Die Herleitung des Fisher` Exact Tests findet sich bei Sachs (Sachs 2000).

Geprüft wurden die Hypothesen:

Nullhypothese H_0 = Die Verteilung des Genotyps ist **unabhängig** vom Phänotyp.

Alternativhypothese H_1 = Die Verteilung des Genotyps ist **abhängig** vom Phänotyp, d.h. es liegt eine Assoziation vor.

Ein **p-Wert < 0,05** wurde als signifikant angegeben, d.h. ist der p-Wert < 0,05 liegt eine statistisch signifikante Assoziation von Genotyp und Phänotyp vor. Hierbei wäre folglich die Nullhypothese abzulehnen und die Alternativhypothese bestätigt. Alle berichteten p-Werte sind zweiseitig. Es erfolgte keine Korrektur für multiples Testen. Als Alphaniveau wurde **$\alpha = 0,05$** (nominell) gewählt.

3.2.1.11b Transmissions-Disequilibriums-Test (TD-Test)

Für die familienbasierte Assoziationsstudie wurde der Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT; Spielman et al. 1993) verwendet. Hierfür werden sogenannte Trios, bestehend aus einem betroffenen Probanden und dessen biologischen Eltern, an den interessierenden Genorten genotypisiert. Für die Teststatistik des TDT werden die Häufigkeiten transmittierter und nichttransmittierter Markerallele heterozygoter Elternteile verglichen. Wenn keine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp vorliegt (H_0) wird ein 1:1 Verhältnis von Transmission zu Nichttransmissionen des Markerallels gemäß des zweiten Mendelschen Gesetzes erwartet.

Da im vorliegenden Fall ein rezessives genetisches Modell angenommen wurde, erfolgte die Anwendung des TDT im Rahmen des sogenannten bedingten logistischen Modells (Cordell und Clayton 2005). Dabei wird die Trio-Anordnung wie ein gematchtes Fall-Kontroll Design aufgefasst. Hierfür werden drei sogenannte Pseudokontrollen aus den nicht transmittierten Allelen der Eltern konstruiert; wohingegen das adipöse Kind als Fall betrachtet wird.

Alle berichteten p-Werte sind zweiseitig. Es erfolgte keine Korrektur für multiples Testen. Als Alphaniveau wurde $\alpha = 0,05$ (nominell) gewählt.

Eine weitere statistische Auswertung der so ermittelten Ergebnisse erfolgte mittels eines Likelihood Ratio (LR)-Tests, dessen asymptotische Verteilung unter der Nullhypothese (H_0 = keine Assoziation und keine Kopplung) einer Chi-Quadratverteilung folgt (Felsenstein 1981). Kann die so getestete globale Nullhypothese auf dem 5%-Niveau ($\alpha = 0,05$) verworfen werden, so darf eine post-hoc Testung der Effekte der sogenannten genotypischen relativen Risiken (GRR) erfolgen. Falls der $GRR > 1$ ist, kann die Alternativhypothese (H_1 = eine Assoziation zwischen untersuchtem Genotyp und Phänotyp) statistisch nachgewiesen werden.

3.2.2. Charakterisierung einer β -MSH-Mutante *in vitro* und *in vivo*

Um geeignete Strategien zur Adipositasbehandlung zu entwickeln, ist es notwendig die neuroendokrinen Mittler des Sättigungssignals zu identifizieren, sowie deren Funktion zu beschreiben. Wie bereits erläutert, spielen die vom POMC-Gen exprimierten Melanocortine eine bedeutende Rolle bei der Regelung der Energiehomöostase. Um die Rolle von β -MSH bei der Energiehomöostase zu beschreiben, sollte erstmalig die biologische Aktivität β -MSH-Mutante (A7362G) *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Weiterhin sollten in dieser Versuchsreihe erneut die Aktivitäten der Wildtyp-Peptide α -MSH und β -MSH verglichen werden.

3.2.2.1 *in vitro*-Experimente

Da α -MSH und β -MSH im ARC hauptsächlich durch Bindung und Aktivierung des MC4-R das Leptin-Signal weitergeben, wurden für die *in vitro*-Versuche Zellen verwendet, die mit humanem Melanocortin 4-Rezeptor (hMC4-R) stabil transfiziert worden sind. Der MC4-R ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und gehört zur Unterfamilie der Melanocortin-Rezeptoren. Durch Aktivierung des MC4-R wird die GTP-bindende Untereinheit des Rezeptors freigesetzt. Diese stimuliert die Adenylat-Cyclase, so dass es zu einem intrazellulären Anstieg des cAMP-Spiegels kommt.

Rezeptorbindungs- und Rezeptoraktivierungsstudien wurden an mit humanem Mc4-R transfizierten Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) Zellen nach Inkubation mit α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante durchgeführt.

3.2.2.1a Passagieren der Zellkulturen

Die hMC4RCHO-K1 Zellen wurden in 50ml Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5%igem CO₂-Gehalt kultiviert. Ein bis zweimal in der Woche waren die Zellen zu passagieren. Hierzu wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 5ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Abziehen des Mediums wurden 3ml Trypsin/EDTA-Lösung zu den

Zellen gegeben, um ein Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflaschen zu ermöglichen. Die Trypsinlösung wurde nach einer Inkubationszeit von 2-5min abgezogen und die Kulturflasche erneut für 5min in den Brutschrank gelegt. Danach konnte durch Klopfen gegen die Kulturflasche eine vollständige Ablösung der Zellen erreicht werden. Der Verlauf der Ablösung der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und die Inkubationszeit gegebenenfalls variiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen, wurde 10ml frisches Medium in die Kulturflasche gegeben und ca. 10mal durch Auf- und Abpipettieren mit der Pasteurpipette dispergiert, um noch bestehende Zellverbände aufzulösen. Zum Weiterkultivieren wurden die Zellen 1:10 umgesetzt.

3.2.2.1b Bindungsstudien

Die rezeptorexprimierenden Zellen wurden jeweils mit aufsteigenden Konzentrationen der zu testenden Liganden und einer konstanten Konzentration eines radioaktiv markierten Agonisten ^{125}I -NDP- α -MSH inkubiert. Dabei konkurrieren Liganden um MC4-R-Bindung. Abhängig von der Bindungsfähigkeit des Rezeptors, des Liganden und dessen Konzentration ist nach der Inkubationszeit eine bestimmte Menge des radioaktiv markierten Kompetitors an den Rezeptoren und somit an der Zelle gebunden.

Für die Durchführung der Bindungsstudien wurden die Zellen in 48-Wellplatten gesät. Die Zellen wurden zunächst mit 200 μl /Well Bindungspuffer (Hank's Lösung) gewaschen. Dann wurden 100 μl /Well einer entsprechenden „kalten“ Ligandenverdünnung (α -, β -MSH und der β -MSH-Mutante) in Hank's Lösung auf die Zellen pipettiert. Zusätzlich wurde in jedes Well 100 μl ^{125}I -NDP- α -MSH in Hank's Lösung gegeben, so dass die Endkonzentration des radioaktiv markierten Liganden 200pM betrug. Der gesamte Ansatz wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit je 200ml eiskalter Hank's Lösung gewaschen und mit 0,1N NaOH aufgeschlossen. Die radioaktive Strahlung des gesamten Zelllysates wurde dann im γ -Counter (1470 WizardTM, Perkin Elmer Wallc GmbH, Freiburg) für eine Minute gemessen.

3.2.2.1c Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften nach Stimulation mit α -MSH und β -MSH / cyclisches AMP-Assay (cAMP-Assay)

Da der MC4-R ein G-Protein gekoppelter Rezeptor ist, führt Ligandenbindung zur Konformationsänderung des G-Proteins und somit zur Aktivierung des Adenylat-Zyklase-Systems, das ATP zu cAMP zyklisiert. Veränderungen der intrazellulären cAMP-Akkumulation durch Ligandenaktivierung können im Vergleich zur cAMP-Akkumulation nicht aktivierter Zellen (Basalwert) mittels eines Akkumulationsassays bestimmt werden. Hierfür wurden mit dem hMC4-R stabil transfizierte CHO-Zellen mit Tritium markiertem Adenin (^3H -Adenin) inkubiert. Nach Aktivierung durch den entsprechenden Liganden (α -, β -MSH, β -MSH-Mutante) wurde über das G_s -Protein die Adenyl-Zyklase aktiviert. Mittels Methylxanthinderivaten (IBMX) wird der Abbau des cAMPs gehemmt, wodurch eine Akkumulation des second messengers erreicht wird. Zyklische Nukleotide können dann nach Aufschluss der Zellen selektiv an Aluminiumoxyd gebunden und so säulenchromatographisch von Adenin, Adenosin, ATP, ADP und AMP getrennt werden. Das ^3H markierte cAMP konnte im Scintillationszähler gemessen werden.

Stimulationsansatz pro Well einer 12-Well-Platte

Die Zellen wurden 24h nach der Transfektion über Nacht mit 500 μl CHO-Zellmedium, das 2 $\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Adenin enthielt, bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit 1ml DMEM Medium, das mit 1mM IBMX enthielt, gewaschen. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Peptidhormone zwischen 1000nM-0,1nM angelegt. Pro Well wurden 500 μl Medium mit IBMX und Ligand eingesetzt. Die Zellen wurden 1h im 37°C Brutschrank bei 5% CO_2 stimuliert. Der darauffolgende Zellaufschluss mit 1ml 5% Trichloressigsäure, die 1mM ATP und 1mM cAMP enthielt, wurde 1 Stunde lang bei 4°C durchgeführt.

Säulenchromatographie

Das in den Zellen angereicherte cAMP wurde über 2ml Dowex AG[®]50W-X8-Säulen und 2ml Aluminiumoxid-Säulen aufgereinigt. Der Überstand der Zellyse wurde auf die Dowex 50-Säulen aufgetragen, danach wurde mit 2ml Aquadest gewaschen. Die

Dowex 50-Säulen wurden dann über die Aluminiumoxidsäulen platziert, um die Nukleotide mit 2x 5ml Aquadest von den Kationenaustauschern in die Alumina-Säulen zu waschen. Anschliessend wurden letztere noch einmal mit 5ml H₂O gespült. Dann wurde das cAMP mit 5ml Imidazol-Puffer (0,1M; pH7,4) von den Säulen in ein Scintillationsgefäß mit 15ml Scintillationscocktail eluiert. Die Messung im Scintillationszähler wurde für 3min pro Probe ausgeführt.

Regeneration der Säulen

Die Dowex 50-Säulen wurden vor der Probenaufgabe mit je 10ml HCl (1M) und 2mal mit 10ml H₂O, die Alumina-Säulen mit 10 ml Tris/HCl (0,5M; pH7,4), mit 10ml H₂O und schließlich mit 3ml Imidazol-Puffer (0,1M; pH7,4) regeneriert.

3.2.2.3 *in vivo*-Experimente

3.2.2.3a Ratten

Die *in vivo*-Versuch wurden an „Male Wistar“-Ratten mit einem Körpergewicht von 250-300g durchgeführt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen mit einer 12h:12h Hell-/Dunkelphase und unter ad libitum Zugang zu Futter und Wasser gehalten.

3.2.2.3b icv-Kanülierung

Nach einer einwöchigen Adaptionphase wurde den Ratten eine 22-Gauge Kanüle durch die Schädeldecke in den Hirnventrikel gelegt (2,2mm posterior to Bregma und 7,5mm ventral to dura). Nach Ausheilung der Wunde wurde ein Angiotensin-Trinktest durchgeführt, um zu testen, ob die Kanüle richtig platziert wurde.

Die icv-Kanülierung der Ratten und der anschließende Angiotensin-Trinktest wurde von der Arbeitsgruppe Tschöp durchgeführt.

3.2.2.3c Futterexperiment nach icv-Applikation von Melanocortinen

Nach einer zweiwöchigen Adaptionphase konnten die Ratten zur Durchführung des Futterexperiments herangezogen werden. Die Adaptionphase wurde als abgeschlossen angesehen, wenn die Ratten ein normales Essverhalten von ca. 25g/24h und keine Anzeichen von Stress oder Krankheit zeigten.

Für das Futterexperiment wurden die Ratten von den herkömmlichen Einzelkäfigen in die Einzelkäfige der online-Monitoring Installation überführt. Die Ratten verbrachten mindestens 48h in diesen Käfigen, bevor die Injektion vorgenommen wurde. Per Zufallsverfahren wurden die Ratten in vier Gruppen unterteilt. Den Gruppen wurde jeweils Kochsalz, α -MSH, β -MSH oder β -MSH-Mutante icv. appliziert. Das Injektionsvolumen entsprach stets 5 μ l.

Da Ratten nachtaktiv sind, wurden die Peptide bzw. die Kochsalzlösung zu Beginn der Dunkelphase injiziert. Die Futteraufnahme wurde online jede 5min erfasst und erfolgte über Wiegung des Futternapfes in den einzelnen Käfigen.

Um einen Konzentrations-Wirkungs-Effekt der Peptide auf das Sättigungssignal zu erzielen, wurden die Versuchsreihen mit verschiedenen Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) der Peptide durchgeführt. Bei der Wahl der Peptidkonzentrationen dienten die Versuchsreihen von Abbot, Kask und Millington als Orientierung (Abbot et al. 2000, Kask et al. 2000, Millington et al. 2001). Die Peptide wurden von Peter Henklein, Institut für Biochemie Charité gestellt. Bevor die Peptide icv appliziert wurden, wurde die Funktionalität der Peptide durch cAMP-Assays und Bindungsstudien *in vitro* nachgewiesen.

B

nPOMC 1(5'-Abschnitt)

Position 1 Position 79

Mensch **GGAGACTGAGCTGAGTGCCTGT-AAAAAGGCCACTTCAAGCCCCCTCCACGACGCCATTGTTGGCTCGAGCAAGGAGGACCGCTC**

Maus **TGGGACTGAGCTGAGTGCCTGT-AAAAAGGCCACTTCAAGCCCCCTT-GTGGGCACGACGACGGTGGCAGTTTGGAG---CTT**

Ratte **AGGACTGAGCTGAGTGCCTGT-AAAAAGGCCACTTCAAGCCCCCTT-GTGGGCACGACGACGGTGGCAGTTTGGAG---CTT**

-GCAGCTTCTGAATCCGCCCTGTGATGCACT-CACTAATGGATGTGCATTAGTGGGTCCCTCCGGCCACACCT-CACTCTCC

TGAATGCCTCTTCCCTT-----GATGCACTTCCCTAATGGATGTGCATTAACTGTCCCTTCCGGCCACCGCTCG-CTGGCC

TGAATGCCTCTTCCCAT-----GATGCATTCCTAATGGATGTGCATTAACTGTCCCTTCCCT-CCATTGC-TCT-CT---

CTACCTCACTGCTGCTGGAGAACTCCGCATTG

TTCCTCAGGCCCTG-CTGGAGAACTCGCATTG

TTCCTTAGACCCCTG-CTGGAGAACTCGCATTG

nPOMC 1(3'-Abschnitt)

Mensch **TTCTTGGAAAGTACAGTCA-TGCTCGAGCCCTTACAAAGCCCTGTCCGACAAAGGACCATTTAGACAGCCCTGAGTCAGA**

Maus **CCTGAGGAAGGGACAGTCACTG-----CTTAA-AGG-----CCGACAAATGGGGCCATTGTGTCTACTACTGAGTCAAA**

Ratte **CCTGAGGAAGGACAGTCACTG-----CTTCA-AGG-----CCGACAAAGGGCCCATTTGTGTCTCTACTGAGTCAAA**

Position 310

ATGGTGCCTGCTGGCACCTGAGC-CTGTCTGGAAAGAGCGGCAGCAGGGACGTCACTAGCAGAGCTGGTCTGTCTGTTATGTCCA

CTACTGACTACTGGCACCTGAGCTCAGTCTGGAGTACGTGGTTTCAGGGACGTCACTGGGAGAGCTGGTCCAGTCTTACGTCCA

CTGGTACTCTGGCACCTGAGCTCAGTCTGGAGTACGTGGTTTCAGGGACGTCACTGGGAGAGCTGGTCTGACTCTAATATCCA

CAACATCTTCAGCAAAGACACTACTTCCAGGAAGTCTACTTGGATTCGACAGGCGCAAGCCCTTCAATTGTAAGAAAGGGCTTGGGAT

GGACATTTTCAGCAAAGACTGGACTTCCAGGAAGTCTACTTGGATTCGACAGGCGCAAGCCCTTCAATTGTAAGAAAGGGCTTGGGAT

GGACATCTTCAGCAAAGACTGGACTTCCAGGAAGTCTACTTGGATTCGACAGGCGCAAGCCCTTCAATTGTAAGAAAGGGCTTGGGAT

AAGCAGTGGTTCTTAAAGAAATACATGTGGCTCCACATGGCAATATACCAGTCTAATACCTCAGGGTACAGAGAACCCTGCCAT-

AAGCAAGCTTGGAAAGGGACAAAGGCTCTGCGGAGGAAAGACCCATAGCCCT--TGATC-CAGGACACAGAGT----GGGATG

AAGCAAGCTTGGAAAGGGACAAAGGCTCTGCGGAGGAAAGACCCATAGCCCT--TGATC-CAGGACACAGAGC----GTGATG

TGCTGATGCAGGACTGTGCACACAAACTTACAGGCTCTCTACTGGGGT--GTCCATGGAAGTGG

TTCATACAGCCTTGCACCACGGCAGCCACGCCATTGCG--ATGGCATAGTGTGCGTGTAGGA

TTCATACGACAGG-GCCCTGCGTCACAC---GGCCTTGCACCACCCATTCATCATGATGCAATG

nPOMC 2

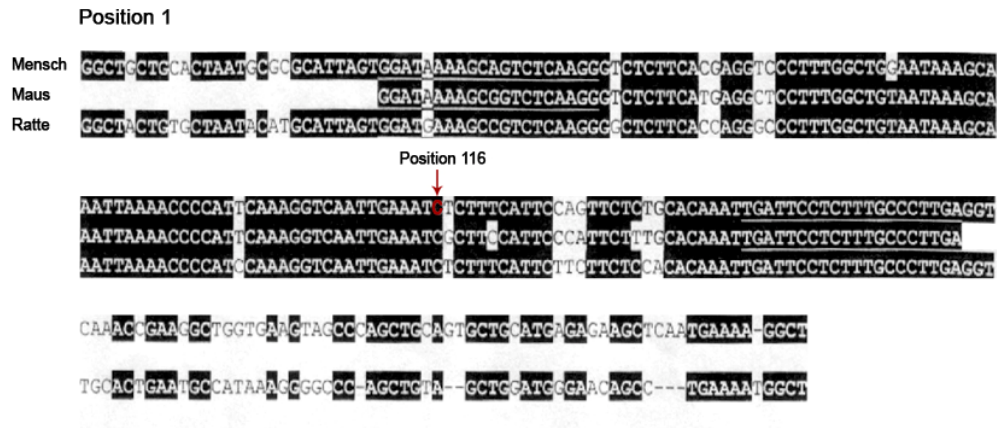


Abbildung 6B: Sequenzvergleich der Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 bei Mensch, Maus und Ratte

Die schwarz unterlegten Basen geben die homologen Bereiche an. Die Lokation der bei dem Mutationsscreening gefundenen Sequenzvariationen sind rot gekennzeichnet. Im Fragment nPOMC 1 wurden an Position 79 in der Untersuchungsgruppe und an Position 310 in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe Nukleotidvariationen gefunden. Im Fragment nPOMC2 wurde in der Untersuchungsgruppe an Position 116 ein Nukleotidaustausch festgestellt. Die STAT3- Bindungsstelle ist rot markiert.

Das erste Fragment nPOMC1 umfasst 473 Basenpaare. Es liegt ca. -12kb vor dem POMC-Gen. Das zweite Fragment POMC2 umfasst 232 Basenpaare. Es liegt ca. -10kb vor dem POMC-Gen. Nach genauer Betrachtung der DNA-Sequenz beider Fragmente konnte im ersten Fragment eine STAT3-Bindungsstelle gefunden werden. Wie Spiegelmann und Flier zeigten, bindet STAT3 an die in Abbildung 6A dargestellte DNA-Basensequenz (Spiegelmann und Flier 2001). Leptin löst die POMC- Expression über die Jak-Stat-Kaskade aus.

4.1.2 Patientenrekrutierung für das Mutations-Screening

Über die Adipositasprechstunde des Otto-Heubner-Zentrums Charité Berlin standen insgesamt 216 DNA-Proben von adipösen Kindern und Jugendlichen für das Screening zur Verfügung. Es handelte sich um 104 Proben adipöser Mädchen und 112 Proben adipöser Jungen. Für die Kontrollgruppe standen weitere Proben von 87 normalgewichtigen Mädchen und 58 normalgewichtigen Jungen zur Verfügung. Wie in den Abbildung 7 und 8 zu erkennen ist, lag bei der Anamnese bzw. Blutentnahme der BMI der Patienten aus der Kontrollgruppe um die 50te Perzentile gestreut. Der BMI der Patienten aus der Untersuchungsgruppe lag – bis auf wenige Ausnahmen – über der 97ten Perzentile.

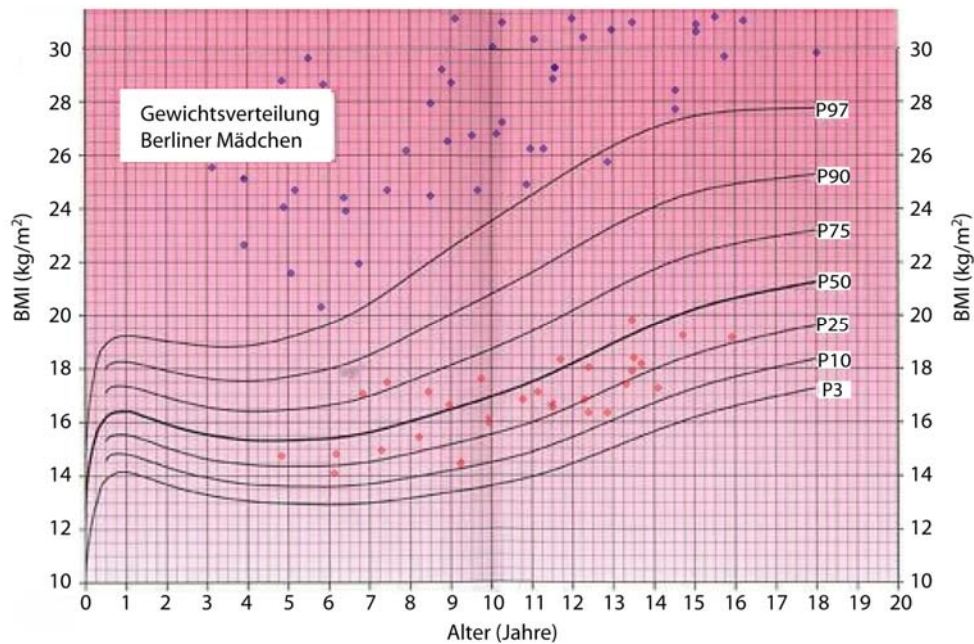


Abbildung 7: Gewichtsverteilung adipöser und normalgewichtiger Mädchen aus Berlin

Dargestellt sind die BMI-Werte in Abhängigkeit vom Alter. Als Grenzwert für Übergewicht bzw. Adipositas wird die 90. bzw. 97. alters- und geschlechtsspezifische Perzentile verwendet. Die BMI-Werte der Untersuchungsgruppe sind blau, die der Kontrollgruppe rot dargestellt. (Perzentilenkurven wurden übernommen von Kronmayer-Hausschlid et al. 2001.)

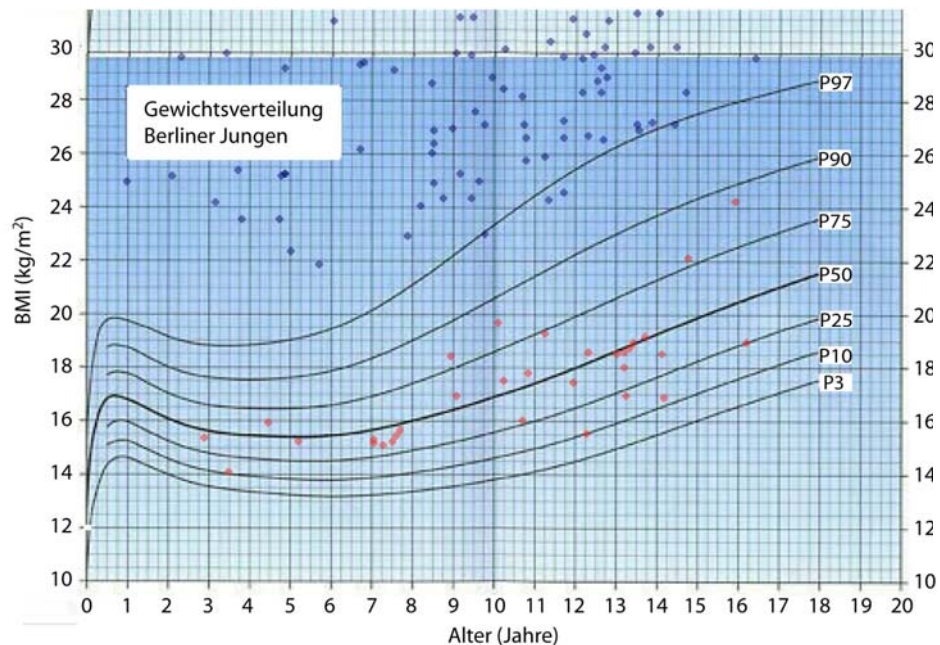


Abbildung 8: Gewichtsverteilung adipöser und normalgewichtiger Jungen aus Berlin

Dargestellt sind die BMI-Werte in Abhängigkeit vom Alter. Als Grenzwert für Übergewicht bzw. Adipositas wird die 90. bzw. 97. alters- und geschlechtsspezifische Perzentile verwendet. Die BMI-Werte der Untersuchungsgruppe sind blau, die der Kontrollgruppe rot dargestellt. (Perzentilenkurven wurden übernommen von Kronmayer-Hausschlid et al. 2001.)

Die Arbeitsgruppe Prof. Hebebrand Kinder- und Jugendpsychiatrie Universität Marburg stellte weitere 152 DNA-Proben adipöser Kinder, sowie 119 Proben normalgewichtiger Kinder für ein zweites Mutations-Screening zur Verfügung. Die adipösen Kinder der Marburger Untersuchungsgruppe zeigten – ebenso wie die Kinder der Berliner Untersuchungsgruppe – einen BMI, der über der 97ten Perzentile lag. Die Kinder der Kontrollgruppe wiesen BMI-Werte auf, die um die 50te Perzentile gestreut waren.

Desweiteren lagen durch die Zusammenarbeit mit der Marburger Arbeitsgruppe DNA-Proben von sogenannten Eltern-Kind-Trios vor. Die DNA-Proben von 380 Elternpaaren und deren adipösen Kindern konnten somit ebenfalls bei dem Screening untersucht werden.

4.1.3 Sequenzierung der Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 in einer Kohorte aus adipösen Kindern und normalgewichtigen Kindern aus Berlin

Bei dem Mutations-Screening wurden zunächst – wie unter 2.1 erläutert – die Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 von 216 DNA-Proben aus der Berliner Untersuchungsgruppe, sowie von 50 Proben aus der Berliner Kontrollgruppe sequenziert. Vor der Sequenzierung wurde – wie unter 3.1 beschrieben – die DNA aus den Blutproben präpariert und die entsprechenden DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert.

Bei dem Screening wurden ein Polymorphismus und zwei heterozygote Nukleotidaustausche bei adipösen Patienten festgestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildungen 9-11 dargestellt.

In Fragment nPOMC1 konnten Basenunterschiede an Position 310 nachgewiesen werden, bei dem ein Thymin gegen Cytosin Austausch vorliegt. Der Nukleotidaustausch zeigte sich sowohl in der Untersuchungsgruppe, als auch in der Kontrollgruppe. In der Untersuchungsgruppe konnten folgende Genotypen nachgewiesen werden: 116 Proben aus der Untersuchungsgruppe zeigten eine dem Wildtyp entsprechende DNA-Sequenz. 89 der adipösen Patienten wiesen einen heterozygoten Nukleotidaustausch auf. 11 adipöse Kinder zeigten einen homozygoten Nukleotidaustausch, bei dem Thyminrest in beiden Allelen gegen ein Cytosinrest ersetzt wurde (Tabelle 26).

In der Kontrollgruppe zeigten 24 Kinder eine dem Wildtyp entsprechende DNA-Sequenz. Bei 26 Kindern konnte ein heterozygoter T→C Basenaustausch nachgewiesen werden. Ein homozygoter Basenaustausch konnte bei keinem normalgewichtigen Kind nachgewiesen werden (Tabelle 26).

In der Kontrollgruppe ist der hier beschriebene Polymorphismus die einzige genetische Veränderung, die durch die Sequenzierungsversuche gezeigt werden konnte.

1.) Basenaustausch an Position 310 (T310C) im Fragment nPOMC1 in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe

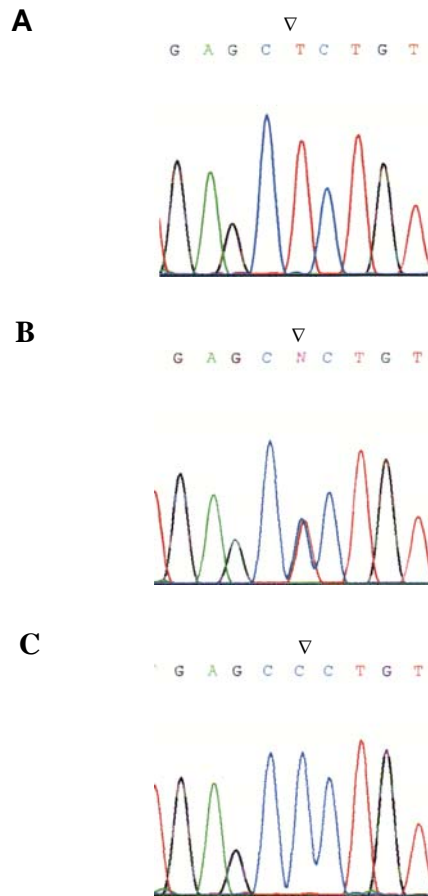


Abbildung 9: A) Wildtyp-DNA; B) heterozygoter Träger eines Basenaustausches; C) homozygoter Träger eines Basenaustausch in Fragment nPOMC1 Position 310

2.) heterozygoter Basenaustausch an Position 79 (C79T) im Fragment nPOMC1 bei einer adipösen Patientin

Bei einer adipösen Patientin konnte ein heterozygoter Basenaustausch in Fragment nPOMC1 nachgewiesen werden. An Position 79 liegt ein Austausch von Cytosin- gegen ein Thyminrest vor.

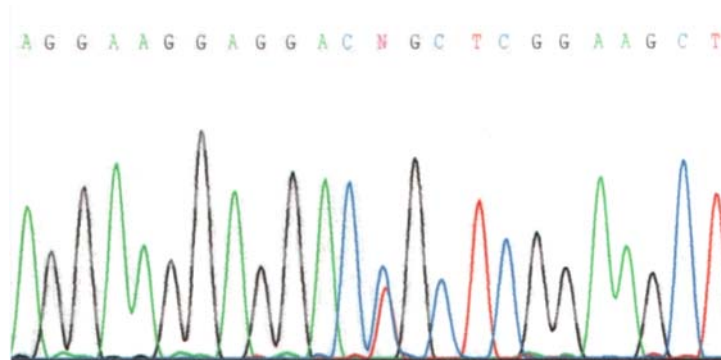


Abbildung 10: heterozygoter Basenaustausch an Position 79 (C79T) im Fragment nPOMC1 bei einer adipösen Patientin

3.) heterozygoter Basenaustausch an Position 116 (A116C) in Fragment nPOMC2 bei einer adipösen Patientin

Bei einer adipösen Patientin liegt eine heterozygoter Basenaustausch im Fragment nPOMC2 vor. Hier wird ein Adeninrest gegen ein Thyminrest an Position 116 ausgetauscht.

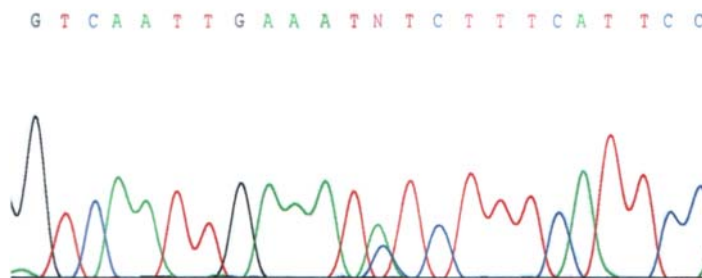


Abbildung 11: heterozygoter Basenaustausch an Position 166 (A116C) in Fragment nPOMC2 bei einer adipösen Patientin

4.1.4 Restriktionsenzym-Analyse des Basenaustausches an Position 310 in Fragment nPOMC1 bei adipösen und normalgewichtigen Kindern

Da bei den Sequenzierungen in der Berliner-Kontrollgruppe keine homozygote Form des Basenaustausches identifiziert wurde, sollte mittels der Restriktionsenzym-Analyse der Polymorphismus weiterhin untersucht werden.

Für die Restriktionsenzym-Analyse wurde das Fragment nPOMC1 mittels PCR amplifiziert. Für die Restriktion des PCR-Produkts an Position 310 wurde das Restriktionsenzym ALU I verwendet (3.1.). Das Enzym schneidet bei Wildtyp-DNA beide Allele einmal. Liegt ein heterozygoter Basenaustausch vor, wird nur ein Allel geschnitten. Liegt ein homozygoter Basenaustausch vor, enthält das PCR-Produkt keine Schnittstelle für das Enzym. Die Ergebnisse des Restriktionsenzym-Verdau für den Wildtyp, einen heterozygoten Nukleotidwechsel und einen homozygoten Nukleotidwechsel sind in Abbildung 12 dargestellt.

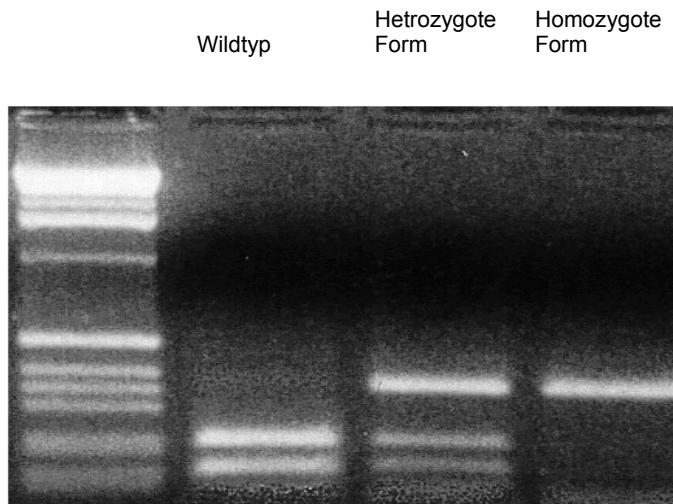


Abbildung 12: Verdau der Wildtyp-DNA, der heterozygoten und homozygoten Mutation im Fragment nPOMC1 mit dem Restriktionsenzym AluI Die Wildtyp-DNA enthält auf beiden Allelen eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym. Auf dem Gel sind zwei Banden erkennbar (150kb + 300 kb). Bei einer heterozygoten Mutation liegt nur auf einem Allel eine Schnittstelle vor. Durch die Mutation auf dem zweiten Allel wird dieses nicht geschnitten (450 kb, 150 kb + 300 kb). Auf dem Gel sind drei Banden erkennbar. Bei einer homozygoten Mutation wird kein Allel geschnitten. Auf dem Gel ist nur eine Bande erkennbar (450 kb).

Die Restriktionsenzym-Analyse der Position 310 im Fragment nPOMC1 wurde in der Berliner Untersuchungsgruppe bei weiteren 95 normalgewichtigen Kindern durchgeführt. Zusammen mit den Ergebnissen aus den Sequenzierungen wurden insgesamt 145 normalgewichtige Berliner Kinder untersucht. In der Berliner Gruppe normalgewichtiger Kinder konnte bei 57 Kindern der Wildtyp und bei 38 Kindern ein heterozygoter Genotyp nachgewiesen werden. Ein homozygoter Nukleotidaustausch konnte auch bei der Restriktionsenzym-Analyse in der Gruppe der normalgewichtigen Kinder aus Berlin nicht gefunden werden. Insgesamt zeigten 56% der Berliner Kontrollgruppe einen dem Wildtyp entsprechenden Genotyp und 44% einen heterozygoten Nukleotidaustausch (Tabelle 26).

Weiterhin wurden mittels Restriktionsenzym-Analyse die DNA-Proben der Marburger Untersuchungsgruppe von 152 adipösen und 119 normalgewichtigen Kindern auf Veränderungen an der genannten Position hin untersucht. Bei der Marburger Untersuchungsgruppe wiesen 96 Kinder (63,16%) den Wildtyp, 47 Kinder (30,92%) einen heterozygoten Genotyp und 9 Kinder (5,92%) einen homozygoten Nukleotidaustausch an der Position 310 im ersten Teilfragment des hypothalamus-spezifischen Enhancers auf. In der Gruppe normalgewichtiger Kinder aus Marburg konnte mittels des Enzymverdau bei 64 Kindern (53,78%) der Wildtyp und bei 52 (43,70%) der Kinder ein heterozygoter Basentausch nachgewiesen werden. Bei 3 normalgewichtigen Marburger Kindern wurden hier erstmals auch in der Kontrollgruppe homozygote Nukleotidwechsel gefunden (Tabelle 26).

Gen	Genotypen						
	Genotypenhäufigkeit						
POMC-Enhancer	11	12	22	Summe	%11	%12	%22
Adipositas Berlin	116	89	11	216	53,70	41,20	5,09
Kontrolle Berlin	81	64	0	145	55,86	44,14	0,00
Adipositas Marburg	96	47	9	152	63,16	30,92	5,92
Kontrolle Marburg	64	52	3	119	53,78	43,70	2,52
Adipositas Gesamt	212	136	20	368	57,61	36,96	5,43
Kontrollen Gesamt	145	116	3	264	54,92	43,94	1,14

Tabelle 26: Ergebnisse des Mutations-Screenings und der Restriktionsenzym-Analyse für das Fragment nPOMC1 Position 310

Dargestellt sind die Ergebnisse für das gesamte Untersuchungs- und Kontrollkollektiv, sowie Teilergebnisse aus der Berliner und Marburger Gruppe. 1=Wildtyp-Allel, 2=Allel mit T310C Nukleotidaustausch; 11=Wildtyp, 12=heterozygoter Nukleotidaustausch, 22=homozygoter Nukleotidaustausch.

Insgesamt wurde die Position 310 in Fragment nPOMC1 bei 368 adipösen Kindern und bei 264 normalgewichtigen Kindern untersucht. 212 der adipösen Kinder (57,61%) zeigten eine dem Wildtyp entsprechende DNA-Sequenz. In der Gruppe der normalgewichtigen Kinder konnte der Wildtyp bei 145 Kindern (54,92%) nachgewiesen werden. 136 Adipöse (36,96%) zeigten einen heterozygoten Genotyp. Bei Normalgewichtigen konnte der heterozygote Nukleotidwechsel bei 116 Kindern (43,94%) nachgewiesen werden. Eine homozygoter Nukleotidwechsel wurde bei 20 adipösen Kindern (5,43%) und bei 3 normalgewichtigen Kindern (1,14%) gefunden.

4.1.5 Restriktionsenzym-Analyse der Position 310 im Fragment nPOMC1 bei adipösen Kindern und deren Eltern (TRIOS)

Da die bisherige Restriktionsenzym-Analyse keine eindeutige Aussage zuließ, wurde die Analyse bei weiteren 380 Trios durchgeführt. Bei der Trio-Analyse wurden die DNA-Proben von beiden Elternteilen und von deren adipösen Kind untersucht. 251 Trios wiesen mindestens einen heterozygoten Elternteil auf. Diese 251 Trios wurden im Rahmen des TD-Tests ausgewertet.

4.1.6 Statistische Auswertung

4.1.6.1 Fisher`s Exact Test

Die in Tabelle 26 dargestellten Daten wurden – wie unter 3.2.1.11 erläutert – mit dem Fisher`s Exact Test ausgewertet (Sachs 2000). Es sollte in einem rezessiven Modell geprüft werden, ob der Genotyp 22 (homozygote Form des Nukleotidaustausches) gehäuft bei Adipositasfällen auftritt. Hierzu wurden die Fälle der Genotypen 11 und 12 zusammengefasst und den Fällen mit dem Genotyp 22 gegenübergestellt. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ gewählt. Ein Ergebnis ist als statistisch signifikant zu betrachten, wenn der errechnete p-Wert $< 0,05$ ist.

	Genotyp 11 und 12	Genotyp 22	p-Wert*
Adipositas Berlin	205	11	0,0038
Kontrollen Berlin	145	0	
Adipositas Marburg	143	9	0,2386
Kontrollen Marburg	116	3	
Adipositas Gesamt	348	20	0,0043
Kontrollen Gesamt	261	3	

Tabelle 27: Auswertung Fisher`s Exact Test

Dargestellt ist die Genotypverteilung des homozygoten Nukleotidaustausches im Vergleich zu Wildtyp- und heterozygotem Genotyp in den Untersuchungs- und Kontroll Stichproben, sowie der nach Fisher errechnete p-Wert (1= Wildtypallel, 2= Allel mit T310C Nukleotidaustausch; Genotypen: 11= Wildtyp, 12=heterozygoter Nukleotidaustausch, 22= homozygoter Nukleotidaustausch).

Aus Tabelle 27 ist zu entnehmen, dass sich im Berliner Untersuchungskollektiv und im Gesamtkollektiv eine signifikante Häufung des Genotyps 22 bei adipösen Patienten im Vergleich zur nicht-adipösen Kontrollgruppe feststellen lässt ($p < 0.05$). Folglich ist die unter 3.2.1.11a formulierte Nullhypothese H_0 abzulehnen und die Alternativhypothese H_1 - eine Assoziation zwischen Phänotyp und Genotyp liegt vor - anzunehmen. Die Daten legen eine Assoziation des Genotyps 22 mit dem Phänotyp „adipös“ nahe. Betrachtet man die Berliner Gruppe und die Marburger Gruppe einzeln, zeigt sich nur bei der Berliner Gruppe eine Signifikanz. Kritisch sollte beachtet werden, dass sich eine solches Ergebnis nicht im Marburger Kollektiv beobachten lässt ($p = 0,2386$).

4.1.6.2 TD-Test: Familienbasierte Assoziationsstudie

Die Auswertung der familienbasierten Assoziationsstudie wurde wie unter 3.2.1.11b mittels des TD-Tests erläutert (Cordell und Clayton 2005). Die Auswertung der familienbasierten Genotypen erfolgte an 251 Fällen, für die mindestens ein heterozygoter Elternteil vorlag. Die Ergebnisse der Genotypisierung sowie der konstruierten Pseudokontrollen (3.2.2.11b) sind in Tabelle 28 dargestellt.

Genotyp	Pseudokontrolle (konstruierte Fälle)	Fälle (adipöse Kinder)	Gesamt
11 (Referenzgenotyp)	315 (41,83%)	91 (36,25%)	406 (40,44%)
12 (Referenzgenotyp)	353 (46,88%)	149 (59,36%)	502 (50,00%)
22	85 (11,29%)	11 (4,38%)	96 (9,56%)
Gesamt	753 (100,00%)	251 (100,00%)	1004 (100,00%)

Tabelle 28: Ergebnisse der familienbasierten Assoziationsstudie

Dargestellt ist die Genotypenverteilung in Pseudokontrollen (konstruierte Fälle) und Fällen (Kinder aus Trio-Scan). Bei einem rezessiven Erbmodell – was hier zugrunde gelegt wird – werden die Genotypen 11 und 12 als Referenzgenotypen in die Auswertung einbezogen (1=Wildtypallel, 2=Allel mit T310C Nukleotidaustausch; 11=Wildtyp, 12=heterozygoter Nukleotidaustausch, 22= homozygoter Nukleotidaustausch).

Eine statistische Auswertung der in Tabelle 28 dargestellten Ergebnisse erfolgte mittels eines Likelihood Ratio (LR)-Tests, dessen asymptotische Verteilung unter der Nullhypothese (H_0 = keine Assoziation und keine Kopplung) einer Chi-Quadratverteilung

folgt. Kann die so getestete globale Nullhypothese auf dem 5%-Niveau verworfen werden, so darf eine post-hoc Testung der Effekte der sogenannten genotypischen relativen Risiken (GRR) erfolgen (3.2.1.11).

Die Berechnungen ergaben:

1. globale Nullhypothese → $p = 0.000543$
2. genotypisches relatives Risiko (GRR) → $GRR = 0,362$ mit $p = 0,002$

Genotyp	GRR	p-Wert	(95% Konf.Intervall)
2/2	0,362	0,002	0.19/0.69

Tabelle 29: Statistische Auswertung des genotypischen relativen Risikos (GRR) für den Genotypen 22

Die Berechnung erfolgte nach Clayton und Cordell / LR Chi-Squared test= 12.0 on 1 df (Clayton und Cordell 1996).

Für die Auswertung wurde weiterhin ein rezessives Modell angenommen, d.h. im Gegensatz zu den Genotypen 11 und 12 (Referenzgenotypen) sollte der Genotyp 22 zur Ausbildung von Adipositas beitragen. Hierbei wird das genotypische relative Risiko (GRR) für den Genotyp 2/2 ermittelt, welches beschreibt, wie hoch das Risiko für eine Adipositasentwicklung für Träger dieses Genotyps im Vergleich zu Trägern der Referenzgenotypen ist. Für den globalen Test ergab sich ein p-Wert von $p=0.000543$ (zweiseitig). Die globale Nullhypothese H_0 kann somit verworfen werden und es kann eine Nachtestung des Effektes für das rezessive Modell erfolgen. Für diesen ergab sich ein p-Wert von $p=0.002$ (zweiseitig), welcher ebenfalls kleiner als das zuvor festgelegte α -Niveau von 0.05 ist – d.h. auch in diesem Fall kann die Nullhypothese verworfen werden (Tabelle 29). Die Daten eignen sich folglich für die weitere statistische Auswertung mit einer Ermittlung eines genotypisch relevanten Risikos, die eine möglicherweise vorliegende Kopplung oder Assoziation des Genotyps 2/2 mit Adipositas feststellt. Im vorliegenden Fall war für Träger des Genotyps 2/2 im Vergleich zu Trägern des Genotyps 1/1 oder 1/2 ein GRR von 0,362 festzustellen. Dieser GRR weist keine Assoziation von Adipositas und dem Genotyp 2/2 aus. Hierfür müsste entsprechend des vorliegenden statistischen Tests ein $GRR > 1$ vorliegen. Die Alternativhypothese H_1 kann nicht bestätigt werden.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und β -MSH-Mutante

Um die Rolle von β -MSH bei der Energiehomöostase zu beschreiben, sollte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die biologische Aktivität der beschriebenen β -MSH-Mutante (A7362G \rightarrow Y5C) *in vitro* und *in vivo* untersucht werden (Biebermann et al. 2006). Des Weiteren sollten die Versuche die Aktivität von α -MSH und β -MSH vergleichen.

4.2.1 *in vitro*-Studien

Mittels Bindungsstudien und Rezeptoraktivierungsstudien, die an h_{MC4R} CHO-K1 Zellen durchgeführt wurden, sollte die Aktivität der Wildtyppeptide α -MSH und β -MSH, sowie der β -MSH-Mutante verglichen werden.

	<i>Bindungsstudien</i> K_i (nM)	<i>cAMP – Akkumulation</i> EC_{50} (nM)
α -MSH	122,5 +- 46	8,9 +- 2,1
β -MSH	89,3 +- 35	14,1 +- 6,7
β -MSH-Mutante	15524,5 +- 188	552,1 +- 107

Tabelle 30: K_i -Werte (Bindungsstudien) und EC_{50} -Konzentrationen (cAMP-Assays)

Dargestellt sind die ermittelten K_i -Werte (Bindungsstudien) und EC_{50} -Konzentrationen (cAMP-Assays) für α -MSH, β -MSH, β -MSH-Mutante. Die Versuche wurden an mit humanem MC4-R transfizierten CHO-Zellen durchgeführt.

In Tabelle 30 sind die K_i -Werte für die Bindungsstudien sowie die EC_{50} -Konzentrationen der cAMP-Assays zusammengefasst. Der K_i -Wert ist ein Maß für die Bindungsfähigkeit eines Liganden. Hier gibt der K_i -Wert an, bei welcher Konzentration des Versuchspeptids eine 50%ige Verdrängung des MC4-Rezeptoragonisten ^{125}I -NDP- α -MSH erreicht wurde. Je kleiner der K_i -Wert ist, desto größer ist die Rezeptoraffinität des jeweiligen Versuchspeptids. Der EC_{50} -Wert gibt hier die Konzentration eines Agonisten an, bei der 50% der maximal messbaren cAMP-Konzentration erreicht ist. Der MC4-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Ligandenbindung führt zur

Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Aktivierung des Adenylat-Zyklase-Systems, das ATP zu cAMP umsetzt. Je kleiner die EC₅₀-Konzentration ist, desto höher ist die Rezeptoraktivierungsfähigkeit des Liganden

4.2.1.1 Bindungsstudien

Die Bindungsstudien erfolgten – wie unter 3.2 beschrieben – als Kompetitionsassay an CHO-Zellen, die mit dem humanen MC4-R stabil transfiziert wurden. Die Messungen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante durchgeführt (10^{-9} - 10^{-4} M). Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Bindungsaffinität der Versuchspeptide ist indirekt über die Verdrängung des radioaktiv markierten, an den MC4-Rezeptor gebundenen Agonisten ¹²⁵I-NDP- α -MSH abzuleiten. Die Kurvenverläufe von α -MSH und β -MSH sind nahezu identisch (K_i für α -MSH: 122,5 nM; K_i für β -MSH: 89,3 nM).

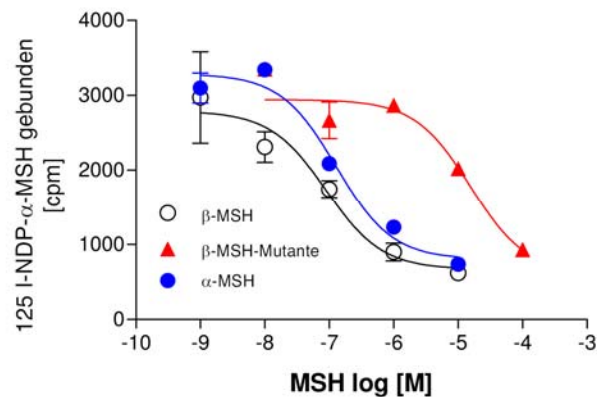


Abbildung 13: MC4-R-Bindungsaffinität von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante

In der Abbildung ist die spezifisch gebundene Menge des Rezeptoragonisten ¹²⁵I-NDP- α -MSH in Abhängigkeit der eingesetzten Ligandenkonzentration dargestellt. Die Studien wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben an hMCR-4 transfizierten CHO-Zellen durchgeführt.

Im Gegensatz zu den beiden Wildtyp-Peptiden ist die Bindungsaffinität der Mutante stark herabgesetzt (K_i für β -MSH-Mutante 15524,5nM). Die Bindungsaffinität der β -MSH-Mutante zeigt im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Peptiden eine um das 100-fache reduzierte Rezeptorbindungs-fähigkeit. Die Mutante weist bei den Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-6} M in etwa die Bindungsaffinität auf, die die Wildtyp- Peptide bereits bei Konzentrationen von 10^{-7} bzw. 10^{-8} M zeigen.

4.2.1.2 Rezeptoraktivierungsstudien mittels des cAMP-Assays

Die Rezeptoraktivierungsstudien wurden ebenfalls wie die Bindungsstudien an den stabil mit dem MC4-R transfizierten CHO-Zellen durchgeführt (3.2). Zusätzlich zur Rezeptorbindung konnte so getestet werden, ob das jeweilige Versuchspeptid den Rezeptor nach Bindung auch aktiviert. In Abbildung 14 ist die cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit der Konzentration von α -MSH, β -MSH und β -MSH-Mutante zu entnehmen.

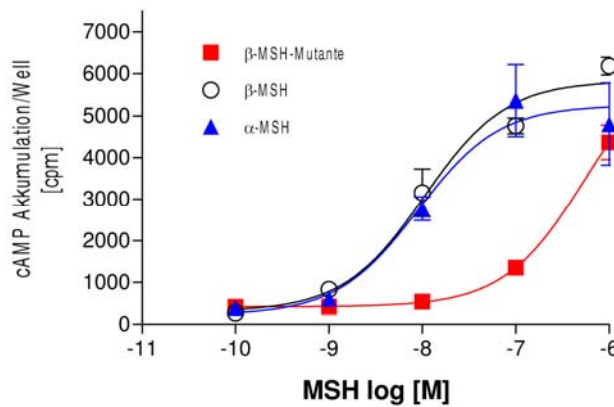


Abbildung 14: MC4-R-Aktivierung durch α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante

Dargestellt ist die nach Rezeptorbindung und Aktivierung ausgelöste cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante. Die Rezeptoraktivierungsstudien wurden wie unter 3.2.2.1 beschrieben durchgeführt.

Die Kurvenverläufe der Wildtyp-Peptide sind – ebenso wie bei den Bindungsstudien – nahezu identisch (EC_{50} -Werte α -MSH= 8,9nM; β -MSH=14,1nM). Die Mutante zeigt eine um das 50-fach reduzierte Rezeptoraktivierung (β -MSH-Mutante= 552,1nM). Erst bei einer Konzentration von 10^{-6} M nähert sich die Rezeptoraktivierung der Mutante dem Wert der Wildtyp-Peptide.

4.2.2 *in vivo*-Studien

In der vorliegenden Versuchsreihe sollte zunächst die Aktivität von β -MSH *in vivo* überprüft und zudem ein möglicher Funktionsverlust der β -MSH-Mutante gezeigt werden. Da für α -MSH eindeutig eine Hemmung des Fressverhaltens bei icv-Applikation gezeigt werden konnte, sollte α -MSH als positive Kontrollgröße mitgeführt werden.

Zur Durchführung der Fütterungsversuche wurde den Ratten mindestens zwei Wochen vor Beginn des Fütterungsexperiments Kanülen operativ in die Schädeldecke eingebracht. Nach Ausheilung der Wunde wurde durch einen Angiotensin-Trinktest die korrekte Platzierung der Kanüle im Hirnventrikel geprüft. Die operative Einbringung der Kanüle sowie der Angiotensin-Trinktest wurden von der Arbeitsgruppe Tschöp durchgeführt. Die Fütterungsversuche folgten nach einer Adaptionsphase von ca. zwei Wochen. Zu den Fütterungsexperimenten wurden nur Tiere herangezogen, die ein normales Fressverhalten von 25g Futter/24h vorwiesen (3.2.2.3).

Bei den Fütterungsversuchen diente Kochsalz als Negativ-Kontrolle und wie bei den *in vitro*-Versuchen α -MSH als Positiv-Kontrolle. Um die Funktionalität der Peptid-Stammlösungen vor den *in vivo*-Versuchen sicher zu stellen, wurden Bindungsstudien und cAMP-Assays mit den jeweiligen Lösungen, wie unter 3.2 beschrieben, durchgeführt. Die Peptid-Stammlösungen wurden direkt vor dem *in vivo*-Versuch auf die im Weiteren angegebenen Konzentrationen verdünnt.

Die Ratten wurden 24h vor Versuchsbeginn in die Einzelkäfige des online-Monitoring Systems gesetzt, um eine Adaptionsphase zu gewährleisten. Vor und nach dem Fütterungsversuch wurde die Futtermenge durch manuelles Wiegen gemessen, um eine korrekte automatisierte Messung sicher zu stellen. Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Ratten in Gruppen aufgeteilt und entsprechend 5 μ l Kochsalz oder 5 μ l Lösungen von α -MSH, β -MSH oder der β -MSH-Mutante injiziert. Nach Injektion der Versuchslösungen startete die online-Wiegung des Futternapfes. Die Messung erfolgte jede fünf Minuten.

Generell ist vorzuschicken, dass die Standardabweichungen bei *in vivo*-Versuchen hoch sind und nicht mit denen von *in vitro*-Versuchen zu vergleichen sind.

4.2.2.1 Fütterungsexperiment nach icv-Applikation einer 100 μ M konzentrierten Lösung von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante

In Abbildung 15 ist das Ergebnis des Fütterungsversuches dargestellt, bei dem die Konzentrationen der Versuchslösungen 100 μ M entsprach. Jeweils drei Ratten wurde Kochsalz icv appliziert, jeweils weiteren drei Ratten α -MSH, β -MSH oder die β -MSH-Mutante. Die online-Futtermessung erfolgte über 24h. In Abbildung 15 ist die akkumulierte Futtermenge in Abhängigkeit der Zeit dargestellt.

Die Tiere, bei denen die Kochsalzlösung injiziert wurde, zeigten einen deutlich höheren Futterverbrauch als die Tiere, die eine Peptidlösung injiziert bekamen. Ratten der Kochsalzgruppe zeigten einen konstanten Anstieg der verzehrten Futtermenge bis zur 5ten Stunde. Hier lag die durchschnittlich verzehrte Futtermenge pro Ratte bei ca. 10g.

Im Gegensatz hierzu, stieg bei Ratten, die mit einer Peptidlösung behandelt wurden, in den ersten 60 Minuten der Futterverbrauch zwar bis auf ca. 2,5g an, in den folgenden Stunden der Messung war bei Ratten, die α -MSH, β -MSH oder die β -MSH-Mutante icv appliziert bekamen, kein weiterer Futterverzehr messbar.

In allen drei Fällen lag der Futterverbrauch der Versuchsgruppen signifikant unter dem Verbrauch der Kontrollgruppe. Insgesamt verzehrten die Ratten der Kontrollgruppe durchschnittlich 10g Futter innerhalb von 5h. Tiere, denen Peptidlösungen appliziert wurden, verbrauchten ca. 5g.

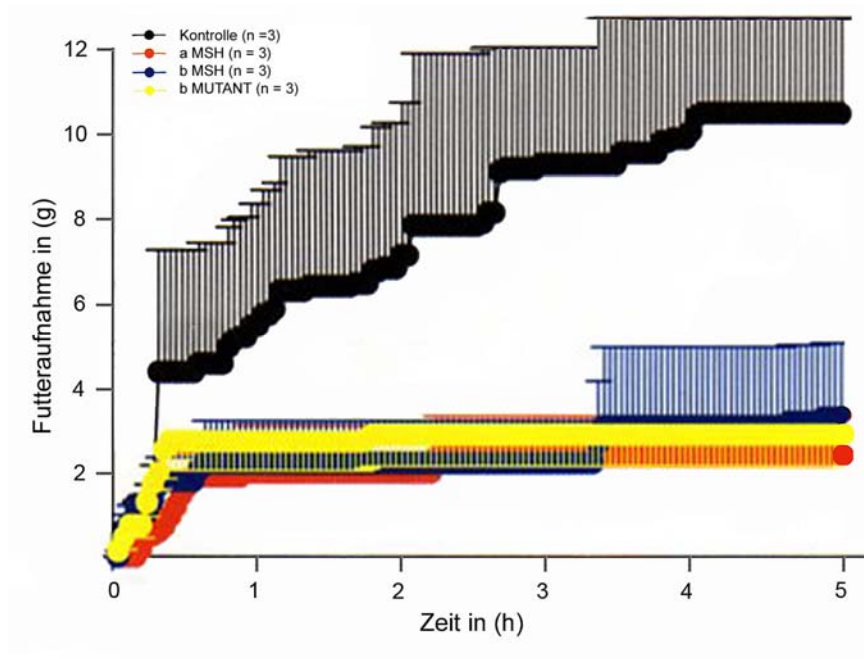


Abbildung 15: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -, β -MSH und β -MSH-Mutante (100 μ M)

Die Versuche wurden an „Male-Wistar“-Ratten durchgeführt. Dargestellt ist die Futtermittelaufnahme in (g) in Abhängigkeit der Zeit in (h). Die Ergebnisse für die Kontrollgruppe sind schwarz, die der α -MSH-Gruppe rot, die der β -MSH-Gruppe blau und die der β -MSH-Mutanten-Gruppe gelb dargestellt. Die Fütterungsversuche wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

4.2.2.2 Fütterungsexperiment nach icv-Applikation einer $10\mu\text{M}$ konzentrierten Lösung α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante

Um eine Erhöhung der Tierzahl pro Versuchsgruppe zu erzielen und somit die hohen Standardabweichungen bei *in vivo*-Experimenten zu verringern, wurde im Folgenden pro Fütterungsexperiment ausschließlich ein Peptid getestet. Die hintereinander angelegten Versuche wurden mit denselben Ratten durchgeführt. Zwischen den Versuchen lag ein Zeitraum von einer Woche. Den Ratten wurde innerhalb dieser Zeit täglich Kochsalz injiziert.

4.2.2.2a icv-Injektion einer α -MSH-Lösung ($10\mu\text{M}$)

In Abbildung 16 ist das Ergebnis des Fütterungsversuches nach Injektion von α -MSH ($10\mu\text{M}$) dargestellt. Die Peptidkonzentration wurde herabgesetzt, um einen möglichen Sättigungseffekt der Peptide in der vorangegangenen Versuchsreihe zu überprüfen. Für das folgende Fütterungsexperiment standen acht Ratten zur Verfügung, die ein normales Fressverhalten zeigten. Insgesamt wurde die Peptidlösung fünf Ratten icv appliziert. Die Kontrollgruppe bestand bei diesem Experiment aus drei Ratten.

In den ersten 1,5h nach Injektion zeigten alle acht Ratten nahezu das gleiche Fressverhalten. In beiden Gruppen stieg der Futtermittelverzehr bis zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich bis zu 2g an. Im weiteren Verlauf verbrauchten die Ratten in der Kontrollgruppe gleichbleibend 2g/h. Im Gegensatz hierzu flacht nach den ersten 1,5h die Kurve des akkumulierten Futtermittelverbrauchs der α -MSH-Gruppe stark ab. Innerhalb der folgenden 4h nahmen die Ratten, die mit α -MSH behandelt wurden insgesamt nur weitere 2g Futter auf. Erst nach ca. 5,5h war ein erneuter Futtermittelverbrauch messbar.

Nach 6h der online-Futtermessung nahmen die Ratten der Kochsalz-Gruppe insgesamt ca. 9g Futter zu sich, die Ratten der α -MSH-Gruppe 4g. Die signifikante Hemmung der Futtermittelaufnahme nach Behandlung der Ratten mit α -MSH ($10\mu\text{M}$) liegt nach 6h durchschnittlich bei 55%.

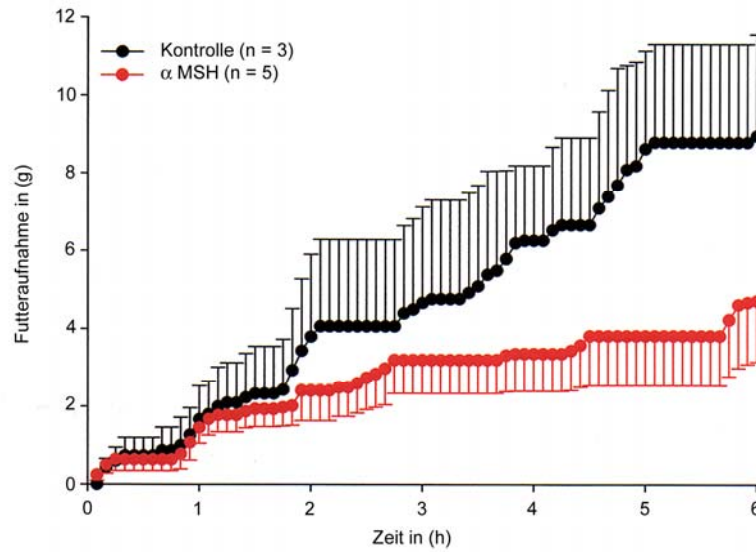


Abbildung 16: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von α -MSH (10 μ M)

Die Versuche wurden an „Male-Wistar“-Ratten durchgeführt. Dargestellt ist die Futteraufnahme in (g) in Abhängigkeit der Zeit in (h). Die Ergebnisse für die Kontrollgruppe sind schwarz, die der α -MSH-Gruppe rot dargestellt. Die Fütterungsversuche wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

4.2.2.2b icv–Injektion einer β -MSH-Lösung (10 μ M)

Dergleiche Versuch wurde eine Woche später mit β -MSH (10 μ M) als Testpeptid durchgeführt. Insgesamt standen für den Versuch 10 Ratten zur Verfügung. Die β -MSH-Lösung wurde sechs Ratten injiziert. Die Kontrollgruppe bestand aus vier Ratten.

Abbildung 17 ist zu entnehmen, dass in der 1sten h nach Injektion das Fressverhalten der beiden Gruppen ähnlich war. Die Futteraufnahme der β -MSH-Gruppe lag nur knapp unter der der Kontrollgruppe. Nach der 1sten h nahmen die Ratten der Kontrollgruppe weiter konstant bis zu 2g Futter/h zu sich. Nach 6h haben die Ratten der Kontrollgruppe durchschnittlich insgesamt eine Futteraufnahme von ca. 10g erreicht, was der Kontrollgruppe der α -MSH-Versuchsreihe entsprach.

Bei der β -MSH-Gruppe konnte in der 2ten und 3ten h des Versuchs keine weitere Futteraufnahme gemessen werden. Nach 3h lag der durchschnittliche Futtermittelverbrauch weiterhin bei 2g. Nach diesen ersten 3h stieg der Futtermittelverbrauch auch in der Peptidgruppe erneut um 1-2g/h, so dass nach 6h der durchschnittliche Futtermittelverbrauch pro Ratte bei ca. 6g lag. Die signifikante Hemmung der Futteraufnahme nach Injektion von β -MSH liegt insgesamt bei 40%. Zwischen der 2ten und 3ten h konnte eine um 50% verringerte Futteraufnahme gemessen werden.

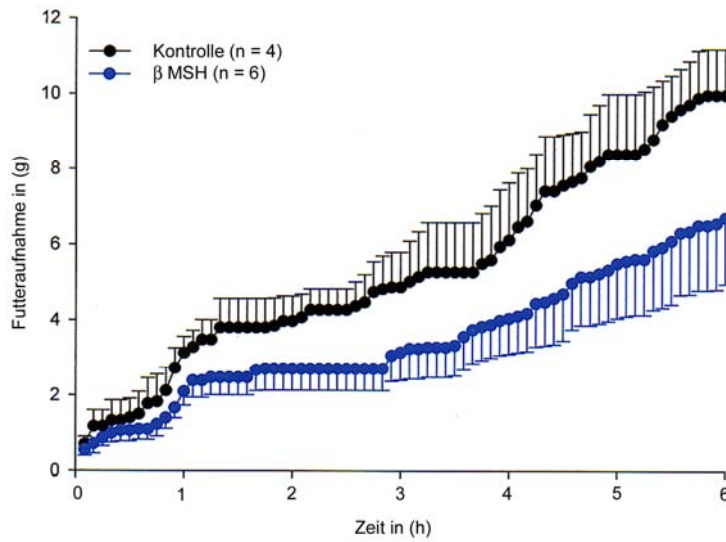


Abbildung 17: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation von β -MSH (10 μ M)

Die Versuche wurden an „Male Wistar“-Ratten durchgeführt. Dargestellt ist die Futteraufnahme in (g) in Abhängigkeit der Zeit in (h). Die Ergebnisse für die Kontrollgruppe sind schwarz, die der β -MSH-Gruppe blau dargestellt. Die Fütterungsversuche wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

4.2.2.2c icv–Injektion der β -MSH-Mutante (10 μ M)

Das Futterexperiment mit der β -MSH-Mutante (10 μ M) wurde mit insgesamt zehn Versuchstieren durchgeführt. Sieben Ratten wurde die Lösung der β -MSH-Mutante injiziert. Drei Ratten wurden ausschließlich mit Kochsalzlösung behandelt.

Die online-Messung erfolgte jede 30 Minuten über einen Gesamtverlauf von 13h und nicht wie bei den voran gegangenen Experimenten jede fünf Minuten über sechs Stunden.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass beide Gruppen ein nahezu identisches Fressverhalten zeigten. Im Gegensatz zu α -MSH und β -MSH konnte für die β -MSH-Mutante keine Hemmung der Futteraufnahme gemessen werden. Die durchschnittliche Futteraufnahme pro Ratte lag konstant über den gesamten Versuchsverlauf bei 1-1,2g pro Stunde. Nach 13h erreichte die Kontrollgruppe einen Futterverzehr von ca. 16g. Die mit der β -MSH-Mutante behandelten Ratten wiesen einen durchschnittlichen Gesamtverzehr von 17g auf.

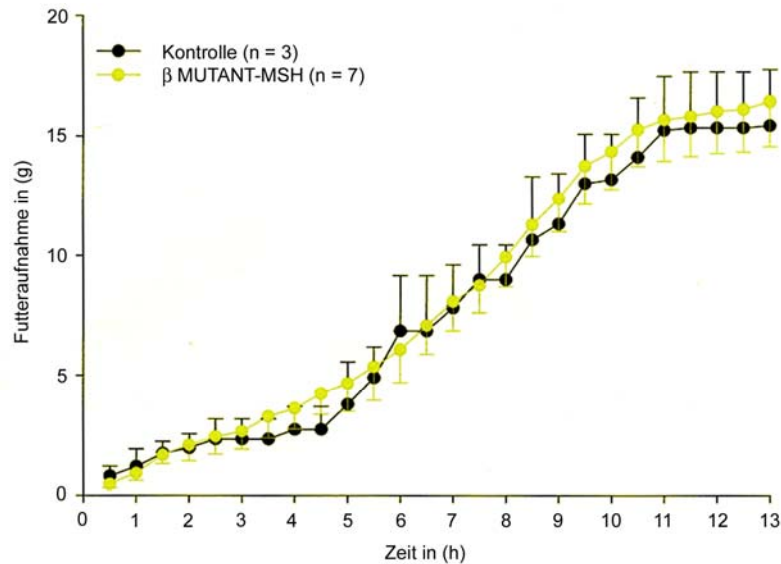


Abbildung 18: Fütterungsexperiment nach icv-Applikation der β -MSH-Mutante ($10\mu\text{M}$)

Die Versuche wurden an „Male Wistar“-Ratten durchgeführt. Dargestellt ist die Futtermittelaufnahme in (g) in Abhängigkeit der Zeit in (h). Die Ergebnisse für die Kontrollgruppe sind schwarz, die der β -MSH-Mutanten-Gruppe gelb dargestellt. Die Fütterungsversuche wurden wie unter 3.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

Die unter 4.2.2 vorliegenden Versuchsergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe Tschöp und Castaneda Cincinatti wiederholt und bestätigt. Da hier eine online-Messung mit höherer Kapazität vorliegt, konnte eine Messung der Futtermittelaufnahme von allen drei Testpeptiden gleichzeitig erfolgen (Biebermann et al. 2006).

5. Diskussion

5.1 Mutations-Screening des hypothalamus-spezifischen Enhancerbereichs in einer Kohorte adipöser und normalgewichtiger Kinder

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein Mutations-Screening des hypothalamischen Enhancerbereiches des POMC-Gens mögliche genetische Varianzen zwischen Adipösen und Normalgewichtigen aufdecken.

Loss-of-function Mutationen im codierenden Bereich des POMC-Gens führen durch die fehlenden Liganden der Melanocortinrezeptoren im Hypothalamus, der Hypophyse und in der Haut zu einem POMC-Defizienz-Syndrom. Neben einer schweren Adipositas im Kindesalter, haben die Betroffenen rote Haare und Nebenniereninsuffizienz. Da herkömmliche Adipositas nicht mit Rothaarigkeit und Hypercortisolismus einhergeht, sollte geklärt werden, ob bei adipösen Mutationen in regulierenden Bereichen Mutationen zu finden sind, die ausschließlich für die hypothalamische Expression des POMC-Gens verantwortlich sind – etwa der hypothalamischen Enhancerregion.

Im Unterschied zu den sehr seltenen monogenen Defekten, die mit extremen Adipositasformen (BMI > 40) einhergehen können, ist die molekulare Pathogenese der bedeutend häufiger auftretenden gewöhnlichen, nicht-syndromalen Adipositas (BMI \geq 30) nicht geklärt. Obwohl genetisch bedingte Ursachen der Adipositas nicht abzustreiten sind, ist der zuvor beschriebene markante Anstieg der Adipositasprävalenz in den vergangenen zwei Jahrzehnten hierdurch nicht zu erklären, da sich der Genpool innerhalb dieser kurzen Zeit nicht wesentlich verändert hat. Vielmehr scheint der Mensch zwar ein genetisch festgelegtes Körpergewicht zu haben, das der Organismus versucht mit Hilfe des beschriebenen Regelkreises zu verteidigen, jedoch scheint dieser bei länger anhaltenden „ungünstigen“ Umweltbedingungen – Verzehr von Nahrungsmitteln mit hoher Kaloriendichte bei gleichzeitig geringer körperlicher Betätigung – überlastet (Koppelman 2000). Allerdings entwickeln nicht alle Menschen bei den vorherrschenden „ungünstigen“ Umweltbedingungen Übergewicht oder sogar eine Adipositas. Es scheint Menschen zu geben, bei denen die neuroendokrine Gewichtskontrolle besser greift, bei anderen schlechter. Es ist wahrscheinlich, dass in den meisten Fällen nicht ein bestimmter monogener Erbdefekt zur Adipositasentstehung

führt, sondern ganze Genkonstellationen, also eine polygene Veranlagung, dazu beitragen kann, die Funktionalität des beschriebenen Regelkreises einzuschränken (Joost 2006). Erst ungünstige Umweltbedingungen, wie hyperkalorische Ernährung einhergehend mit Bewegungsmangel, würden diesen polygenen Defekt demaskieren und über die eingeschränkte Funktionalität des beschriebenen neuroendokrinen Netzwerkes die phänotypische Ausprägung einer Adipositas begünstigen (Barsh et al. 2000). Zu klären bleibt durch welche Genkonstellationen die Leptinsensitivität genetisch festgelegt wird (Münzberg und Meyers 2005). Um die genetische Ursache der viel häufiger auftretenden moderaten Adipositas zu klären, ist es daher entscheidend, Allelkombinationen aufzudecken, die zu einer geringen Leptinsensitivität prädisponieren und daher den neuroendokrinen Regelkreis der Energiehomöostase schwächen. Im Prinzip ist eine Schwächung des Leptinsignals durch genetische Varianzen an beliebiger Stelle im Regelkreises möglich.

Einen Hinweis für eine mögliche Sonderfunktion des POMC-Gens liefern die Genomscanstudien, die bei Übergewichtigen/Adipösen einen hohen QTL-Wert im Bereich des Gens belegen und somit eine Assoziation von genetischen Varianzen im Bereich des POMC-Gens und Adipositas vermuten lassen. Bedeutend ist, dass die genetischen Varianzen im Bereich des POMC-Gens nicht im codierenden Teil des Gens auftraten (Comuzzie et al. 1997, Hixson et al. 1999).

Mögliche Varianzen im hypothalamischen Enhancerbereich des POMC-Gens könnten über eine herabgesetzte Melanocortinbildung und damit einhergehende herabgesetzte MC4-R Aktivierung eine Schwächung des Leptinsignals hervorrufen. Da bei potentiellen Mutationen im hypothalamus-spezifischen Enhancerbereich die POMC-Peptidbildung nur herabgesetzt sein würde und nicht völlig ausfällt – wie beim POMC-Defizienz-Syndrom – könnten diese genetischen Varianzen eine Allelkombination für die Prädisponierung einer phänotypischen Adipositas darstellen. Da hierbei nur die Expression im Hypothalamus eingeschränkt wäre, würden weitere Symptome des POMC-Defizienz-Syndroms fehlen. Die POMC-Bildung in der Hypophyse und in der Haut wären nicht betroffen.

Durch Deletionsversuche am 5'-Ende des POMC-Gens konnte die Arbeitsgruppe Low/DeSouza Portland USA bei transgenen Mäusen eine hypothalamus-spezifische

Enhancerregion definieren (De Souza 2005). Die beschriebenen Daten wurden von der Arbeitsgruppe Low/DeSouza zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung vertraulich zur Verfügung gestellt, um bei Adipösen ein Mutations-Screening durchzuführen.

Über Speziesvergleiche von Mensch, Maus und Ratte konnten homologe Abschnitte innerhalb des von Low/DeSouza beschriebenen hypothalamus-spezifischen Enhancerbereiches identifiziert werden. Bei den so ermittelten zwei homologen Abschnitten nPOMC1 und nPOMC2 lässt sich aufgrund der starken phylogenetischen Konservierung eine funktionelle Relevanz vermuten (Abbildung 6B).

Desweiteren zeigte sich im ersten Fragment eine Consensus-Sequenz für eine STAT3-Bindungsstelle (Abbildung 6A). Spiegelmann und Flier zeigten, dass Leptin nach Bindung an den Leptinrezeptor über die Jak-Stat Kaskade die Expression des Zielgens auslöst (Spiegelmann und Flier 2001). Wie in der Einleitung beschrieben hat Leptin eine bedeutende Funktion bei der neuroendokrinen Energiehomöostase. Aufgrund ansteigender Fettspeicher wird es vermehrt von den Adipozyten gebildet und gelangt über das Blut ins Gehirn, wo es das Sättigungssignal über eine Verstärkung der POMC-Genexpression weitergibt. Das Auftreten einer STAT-Bindungsstelle in einem homologen Bereich des von Low/De Souza beschriebenen DNA-Abschnittes unterstützt die These einer POMC-Enhancerfunktion dieses Bereiches, die nach Bindung des Leptins an den Leptinrezeptor aktiviert wird und so das Sättigungssignal weitervermittelt.

Ein Mutations-Screening in beiden homologen Fragmenten sollte eventuelle genetische Varianten bei adipösen Personen feststellen. Über die Adipositassprechstunde des Otto-Heubner-Zentrums Charité Berlin standen in einer ersten Stichprobe insgesamt 216 DNA-Proben für das Screening zur Verfügung. Beide homologen Fragmente nPOMC1 und nPOMC2 wurden zunächst bei 216 Berliner adipösen Kindern, sowie bei 50 normalgewichtigen Kindern sequenziert. Die Sequenzierung der normalgewichtigen Probanden wurde durchgeführt, um eventuelle inter-individuelle Variabilitäten innerhalb der Kontrollgruppe zu klären.

In der Gruppe der Adipösen konnten an drei Stellen genetische Veränderungen festgestellt werden:

1. Polymorphismus in Fragment nPOMC Position 310: 11 Kinder zeigten einen homozygoten Basenaustausch (Genotyp 22), 89 Kinder zeigten einen heterozygoten Basenaustausch (Genotyp 12) und 116 Kinder zeigten eine dem Wildtyp (Genotyp 11) entsprechende DNA-Sequenz (Abbildung 9; Tabelle 26).
2. Heterozygoter Nukleotidaustausch in Fragment nPOMC1 an Position 79 bei einer adipösen Patientin (Abbildung 10).
3. Heterozygoter Nukleotidaustausch in Fragment nPOMC2 an Position 116 bei einer adipösen Patientin (Abbildung 11).

Die 50 normalgewichtigen Kinder zeigten ausschließlich genetische Veränderungen an Position 310 im Fragment nPOMC1, an der Stelle des Polymorphismus, der auch in der Untersuchungsgruppe beschrieben wurde. In der Kontrollgruppe zeigten hier 26 Kinder einen heterozygoten Basenaustausch (Genotyp 12); 26 Kinder eine dem Wildtyp-entsprechende DNA-Sequenz (Genotyp 11). Während die Häufigkeit der heterozygoten und dem Wildtyp entsprechenden Sequenzvarianten an Position 310 in Fragment nPOMC1 bei der Untersuchungs- und Kontrollgruppe ähnlich ist, ist auffällig, dass kein Kind in der Berliner Kontrollgruppe eine homozygote Sequenzvariante zeigt. In der Gruppe der übergewichtigen und adipösen Kinder sind es hingegen über 5%. Daher wurde der Polymorphismus an Position 310 im ersten Fragment weiter mittels Restriktionsenzym-Analyse untersucht, um einer möglichen Bedeutung des homozygoten Genotyps in Bezug auf eine eingeschränkte hypothalamische Enhancerfunktion nach zu gehen (12).

Eine erste Restriktionsenzym-Analyse der Position 310 wurde bei weiteren 95 Berliner normalgewichtigen Kindern durchgeführt. Zusammen mit den Ergebnissen aus dem Mutations-Screening wurde die DNA im Fragment nPOMC1 Position 310 bei insgesamt 145 normalgewichtigen Berliner Kindern analysiert. Zwar zeigten sich neben dem Wildtyp entsprechenden DNA-Sequenzen erneut heterozygote Nukleotidaustausche, allerdings konnte wiederum kein homozygoter Basenaustausch bei normalgewichtigen Kindern festgestellt werden. Insgesamt zeigte die Berliner Kontrollgruppe bei 55,8% der untersuchten Proben eine dem Wildtyp entsprechende DNA-Sequenz (i.Vgl. Untersuchungsgruppe 53,7%) und bei 44,1 % heterozygote Basenaustausche (i.Vgl. Untersuchungsgruppe 41,2%) (Tabelle 26). Die statistische Auswertung mittels des Fisher's Exact Tests bestätigt die Alternativhypothese, dass der homozygote Genotyp

mit dem Phänotyp Adipositas assoziiert auftritt (3.2.1.11 und 4.1.6.1). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass die homozygote Ausprägung der Mutation über eine herabgesetzte hypothalamische Enhancerfunktion zu einer verminderten POMC-Genexpression führt und somit für die Entwicklung einer Adipositas prädisponiert.

Eine zweite Restriktionsenzym-Analyse bei 152 adipösen Kindern, sowie bei 119 normalgewichtigen Kindern aus Marburg, zeigte ähnliche Häufigkeiten für das Auftreten des Wildtyps und der heterozygoten Mutation in Untersuchungs- und Kontrollgruppe wie bei den Berliner Kindern (Tabelle 26). Allerdings zeigten sich erstmals homozygote Basenaustausche in der Kontrollgruppe (homozygoter Genotyp in Kontrollgruppe 2,5%), wenn auch mit deutlich geringer Häufigkeit als in der Untersuchungsgruppe (homozygoter Genotyp in Untersuchungsgruppe 5,9%).

Bei Zusammenlegung der Analysen aus Berlin und Marburg zeigt die statistische Auswertung eine Bestätigung der Alternativhypothese (eine Assoziation liegt vor/4.1.6.1), dass der homozygote Genotyp in Fragment nPOMC1 an Position 310 gehäuft mit dem Phänotyp Adipositas auftritt. Kritisch zu vermerken ist, dass diese Hypothese ausschließlich durch die Berliner, jedoch nicht durch die Marburger Ergebnisse gestützt wird (Tabelle 26). In der Marburger Gruppe ist das Auftreten des Genotyps 22 zusammen mit einem adipösen Phänotyp als nicht signifikant einzustufen.

Um die Hypothese, der homozygote Genotyp prädisponiere für die Entwicklung von Adipositas, noch genauer zu untersuchen, wurde eine familienbasierte Assoziationsstudie (bzw. Trio-Screen) durchgeführt. Hierfür werden sogenannte Trios, bestehend aus einem betroffenen Probanden (hier adipöses Kind) und dessen biologischen Eltern, an dem interessierenden Genort genotypisiert. Wenn keine Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp vorliegt, wird ein 1:1 Verhältnis von Transmission und Nichttransmission des Markerallels von den Eltern in die Probandengruppe, gemäß des zweiten Mendelschen-Gesetzes, erwartet. Besteht allerdings eine Assoziation, müsste der homozygote Genotyp in der vorliegenden Untersuchungsgruppe, die aus adipösen Kindern gestellt wird, überdurchschnittlich oft vorkommen bzw. das mutierte Allel müsste überdurchschnittlich oft von den Eltern in die Untersuchungsgruppe transmittiert worden sein.

Bei dem Screening wurden 380 Paare, sowie deren adipöse Kinder mittels Restriktionsenzym-Analyse auf Veränderungen im Fragment nPOMC1 Position 310 untersucht. Hiervon wurden 129 Paare nicht in die Untersuchung einbezogen, da bei keinem Elternteil ein Basenaustausch an dem untersuchten Genort festzustellen war. 251 Paare bei denen mindestens ein Elternteil Träger eines mutierten Allels war, wurden in den Trio-Screen einbezogen. 11 Kinder zeigten einen homozygoten, 149 Kinder einen heterozygoten, 91 Kinder einen dem Wildtyp entsprechenden Genotyp. Aus diesen Fällen und aus den Allelen der Eltern wurde die Kontrollgruppe (Pseudokontrollen) konstruiert (Tabelle 28). Mittels des TD-Tests wurde ermittelt, ob ein Transmission-Disequilibrium zwischen Fällen und Pseudokontrollen vorliegt (3.2.1.11).

Die Auswertung des TD-Tests konnte die Hypothese, der Genotyp 22 ist mit dem Phänotyp Adipositas assoziiert, nicht bestätigen. Im Gegensatz zu der Annahme, dass der Genotyp 22 hier überdurchschnittlich oft vorkomme, deutet das Trio-Screening eher darauf hin, dass der Genotyp 22 hier unterdurchschnittlich repräsentiert ist ($GRR < 1$). Eine signifikante Assoziation zwischen homozygoten Genotyp und einem adipösen Phänotyp konnte in der vorliegenden Versuchsreihe folglich nicht nachgewiesen werden (4.1.6.2).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass anhand der widersprüchlichen Ergebnisse aus den herkömmlichen Restriktionsenzym-Analysen und der familienbasierten Assoziationsstudie, keine eindeutige Aussage über Assoziation des homozygoten Genotyps im Fragment nPOMC1 an Position 310 und einem adipösen Phänotyp möglich ist.

Die beiden heterozygoten Mutationen in der Berliner Untersuchungsgruppe nPOMC1 C79T (Abbildung 10) und nPOMC2 A116C (Abbildung 11) wurden nicht weiter verfolgt. Zwar ist in beiden Einzelfällen nicht auszuschließen, dass die identifizierten Allelvarianzen zur Ausprägung einer Adipositas beitragen könnten, allerdings lässt sich aufgrund der Einmaligkeit der Basenaustausche hieraus keine Vermutung ableiten, dass es sich um häufige Allelvarianzen handelt, die zur Ausprägung des Phänotyps Adipositas führen könnten. Erst ein sehr groß angelegtes Mutations-Screening oder funktionelle Studien könnten einen Hinweis auf eine mögliche Assoziation von hier identifizierten Allelvarianzen und Adipositas aufzeigen. Genom-weite Assoziationsstudien konnten bisher keinen Zusammenhang zwischen Allelvarianzen im

hypothalamus-spezifischen Enhancerbereich feststellen (Nationales Genomforschungsnetz 2008).

Abschließend ist herauszustellen, dass die vorliegenden Daten eine sehr geringe interindividuelle Variabilität der DNA-Sequenz in beiden Fragmenten - sowohl in der Untersuchungsgruppe als auch Kontrollgruppe - zeigten, was in starkem Maße auf eine biologische Funktion beider Abschnitte hindeutet (Strachan und Read 1996). Insgesamt wurden mehr als 700 Basenpaare in der Berliner Stichprobe 276 mal sequenziert. In der Untersuchungsgruppe zeigten sich neben dem Polymorphismus ausschließlich weitere heterozygote Nukleotidaustausche bei nur zwei Patienten. In den 50 Proben der Kontrollgruppe konnte nur der beschriebene Polymorphismus identifiziert werden. Die geringe Varianz der Sequenzen steht im Einklang mit den von Low/De Souza durchgeführten Deletionsversuchen, die eine Enhancerfunktion der beiden Bereiche belegen. Eine Bedeutung für die hypothalamische POMC-Regulation ist aufgrund der vorliegenden Daten somit verstärkt anzunehmen.

5.2 Funktionelle Charakterisierung von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante

Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen die Rolle des Melanocortin-Systems bei der neuroendokrinen Gewichtsregulation. Seitdem wurde α -MSH die hauptsächliche Funktion bei der neuroendokrinen Weiterleitung des Sättigungssignals zugesprochen. Für die Bedeutung von β -MSH sind die Ergebnisse bisher widersprüchlich (Harrold und Williams 2005).

Bei einem Screening nach partiellen loss-of-function Mutationen im POMC-Gen wurde eine adipöse Patientin mit einer POMC-Mutation in der codierenden Region für β -MSH (A7362G) identifiziert, die an Position 5 des Peptids zu einem Austausch eines hoch konservierten Tyrosin- durch einen Cysteinrest führt (Abbildung 5, Biebermann et al. 2006). Bei weiteren Untersuchung zeigte sich, dass mehrere Familienangehörige die gleiche Mutation aufweisen. Alle Familienmitglieder – Mutationsträger und Nichtmutationsträger – waren übergewichtig bis adipös. Inwieweit die β -MSH-Mutante die Gewichtsregulation beeinträchtigt, sollte im zweiten Teil der Arbeit durch *in vitro*- und *in vivo*- Studien aufgedeckt werden.

Ziel der zweiten Aufgabenstellung war es erstens erneut die Aktivität von α -MSH und β -MSH zu vergleichen und zweitens einen Verlust der biologischen Aktivität für das mutierte Peptid zu überprüfen.

Da die Melanocortine im Hypothalamus ihr Signal über Bindung an den MC4-R weitergeben, wurden Bindungs- und Aktivierungsstudien an Zelllinien (CHO-Zellen) durchgeführt, die zuvor mit humanem MC4-R stabil transfiziert wurden.

Die Bindungsstudien erfolgten als Kompetitionsassays. Messungen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH, β -MSH und der β -MSH-Mutante durchgeführt. Die Bindungsaffinität der Peptide war indirekt über die Verdrängung des radioaktiv markierten, an den MC4-R gebundenen Agonisten ^{125}I -NDP- α -MSH abzuleiten. Bei allen untersuchten Konzentrationen zeigten α -MSH und β -MSH nahezu identische MC4-R Bindungsaktivität (K_i für α -MSH: 122,5nM; K_i für β -MSH: 89,3nM; Tabelle 30). Während beide Melanocortine bei der kleinsteingesetzten Konzentration

von 10^{-10} M eine geringfügige Rezeptorbindung zeigten, erreichten sie bei einer Konzentration von 10^{-7} M einen Sättigungswert. Damit entsprechen die Ergebnisse Studien von Abbot (Abbott et al. 2000). Einige Studien konnten bei Bindungsstudien an mit dem MC4-R transzfizierten Zellen sogar einen deutlich stärkeren Effekt für β -MSH als für α -MSH messen (Shiöth et al. 1996, Harrold 2003). In den Untersuchungen von Harrolds zeigte sich beispielsweise ein um das 30fache erhöhter K_i -Wert für α -MSH gegenüber β -MSH (K_i : β -MSH, 11,4nM versus α -MSH, 324nM). Dies konnte in den vorliegenden Versuchsreihen nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu den beiden Wildtyp-Peptiden war die Rezeptorbindung der Mutante stark eingeschränkt. Nur bei sehr hohen Konzentrationen war eine Funktion der Mutante messbar (K_i β -MSH-Mutante: 15524,5 nM) (Tabelle 30, Abbildung 13).

Die Rezeptoraktivierungs-Assays zeigten, ob und in welchem Ausmaß das jeweilige Versuchspeptid den Rezeptor nach Bindung aktiviert. Der MC4-R ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor. Ligandenbindung führt zur Konformationsänderung des Rezeptors und damit zur Aktivierung des Adenylat-Zyklase-Systems, das ATP zu cAMP umsetzt. Während die beiden Wildtyp-Peptide nahezu die gleiche Rezeptoraktivierungsfähigkeit zeigten, ist die EC_{50} -Konzentration für die Mutante um den Faktor 50 erhöht (EC_{50} -Werte für α -MSH: 8,9nM; β -MSH: 14,1nM; β -MSH-Mutante: 552,1nM) (Tabelle 30; Abbildung 14).

In den beschriebenen *in vitro*-Versuchsreihen zeigten die Bindungs- und Aktivierungsstudien eine vergleichbare Wirkung von α -MSH und β -MSH. Im Gegensatz zu den beiden Wildtyp-Peptiden war die Rezeptorbindung- und aktivierung durch die Mutante sehr eingeschränkt. Nur bei sehr hohen Konzentrationen war eine Funktion der Mutante messbar. Die *in vitro*-Tests deuten somit bereits einen deutlichen Funktionsverlust der Mutante gegenüber dem Wildtyp-Peptid an. Damit stehen die hier vorliegenden Ergebnisse mit den Studien von Lee et al. in Einklang. Auch Lee et al., die bei der einleitend erwähnten Mutationsstudie die gleiche β -MSH Mutation bei Adipösen identifizierten wie Biebermann et al., testeten die gleiche Mutante ebenfalls bezüglich MC4-R Bindung und Aktivierung. Auch hier wurde ein deutlicher Funktionsverlust der Mutante gegenüber dem Wildtyp-Peptid gezeigt (Lee et al 2006).

Zusätzlich wurde die Mutante *in vivo* getestet. Die Fütterungsexperimente wurden an Ratten („Male Wistar“-Ratten) durchgeführt. Über eine Dauerkanüle, die direkt in den dritten Hirnventrikel mündete, wurden die Versuchspeptide in das Sättigungszentrum eingebracht. Über ein online-Monitoring-System wurde das Futterverhalten der Ratten protokolliert.

In den Fütterungsexperimenten konnte ein ähnliches Konzentrations-Wirkungsmuster wie in den *in vitro* Versuchen gemessen werden. Beide Wildtyp-Peptide, sowie auch die Mutante hemmten die Futteraufnahme der Ratten bei Einsatz von sehr hohen Konzentrationen (100 μ M). Dies deutet darauf hin, dass eine Konzentration von 100 μ M für alle drei Testpeptide im Sättigungsbereich liegt. Bei Einsatz von niedrigen Konzentrationen (10 μ M) hingegen hemmten α -MSH und β -MSH die Futteraufnahme gleichermaßen, wohingegen bei der Mutante ein deutlicher Funktionsverlust zu beobachten war.

α -MSH zeigte nach einer icv-Injektion sowohl bei der höheren Konzentration von 100 μ M als auch bei der niedrigen Konzentration von 10 μ M eine signifikante Hemmung der Futteraufnahme. Die hier vorliegenden Versuchsergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppen Abbot und Kask überein (Tabelle 31). Abbot injizierte 0,2 μ g α -MSH in einem Volumen von 5 μ l, was einer Konzentration von 24 μ M entspricht. Kask applizierte 1nMol α -MSH in einem Volumen von 5 μ l, was einer Konzentration von 190 μ M entspricht. Beide erzielten eine Verminderung der Futteraufnahme von ca. 50% (Abbot 55%; Kask 45%). In den vorliegenden Versuchsreihen war bei Einsatz von vergleichbaren Konzentrationen (gleiche 10er Potenz) eine Hemmung der Futteraufnahme von 50% (10 μ M) bzw. 60% (100 μ M) messbar.

Für β -MSH konnte in der vorliegenden Fütterungsexperimenten ebenfalls eine signifikante Hemmung der Futteraufnahme nach icv-Gabe gemessen werden. Bei beiden eingesetzten Konzentrationen (10 μ M und 100 μ M) entsprach die Hemmung der Futteraufnahme in etwa der Wirkung, die bei α -MSH beobachtet werden konnte. Nach Injektion einer höheren Konzentration (100 μ M) zeigte sich eine um 60% verringerte Futteraufnahme der Ratten, nach Injektion der niedrigeren Konzentration (10 μ M) zeigte sich in den ersten 4h eine 50%ige Hemmung, nach 6h noch eine 40%ige Hemmung der

Futteraufnahme. Ob dies durch die nachlassende Wirkung von β -MSH bedingt ist oder auf die eher typische starke Schwankung der individuellen Futteraufnahme bei *in vivo*-Versuchen zurückzuführen ist, bleibt offen.

Bislang ist die Rolle von β -MSH in der Appetitregulations-Forschung nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert. Die Arbeitsgruppen Abbot, Kask und Millington führten erste Fütterungsversuche nach *icv*-Applikation von β -MSH an Ratten durch. Während Abbot und Kask eine Hemmung der Futteraufnahme nach der β -MSH Injektion zeigen konnten, die der Hemmung nach der α -MSH Gabe entsprach oder diese sogar übertraf, konnte die Arbeitsgruppe Millington zwar für α -MSH eine Wirkung feststellen, nicht aber für β -MSH (Tabelle 31).

Abbot injizierte 0,2 μ g/5 μ l Injektionsvolumen β -MSH, was einer Konzentration von 15 μ M entspricht, und erreichte damit eine um 50%ige Reduzierung der Futteraufnahme. Kask injizierte 1nMol/5 μ l β -MSH, was einer Konzentration von 190 μ M entspricht, und maß dafür eine Hemmung der Futteraufnahme von 55%. Die Hemmung durch β -MSH übertraf hier sogar die durch α -MSH hervorgerufene Reduzierung der Futteraufnahme. Dem hingegen konnte Millington zwar für α -MSH eine Hemmung der Futteraufnahme von 60%, jedoch keine Hemmung für β -MSH auf das Futterverhalten der Ratten zeigen (Tabelle 31).

Wie Tabelle 31 zu entnehmen ist, konnten die vorliegenden Ergebnisse der Fütterungsversuche die Ergebnisse der Arbeitsgruppen Abbot und Kask bestätigen. Bei Einsatz von ähnlichen Konzentrationen, die bei Abbot und Kask herangezogen wurden, konnte einmal mehr gezeigt werden, dass β -MSH eine ähnliche Hemmung der Futteraufnahme hervorruft wie α -MSH. Die fehlende Hemmung der Futteraufnahme durch β -MSH in der von Millington beschriebenen Arbeit könnte durch die sehr geringe Konzentration der Testpeptide erklärt werden. Zudem beinhaltete das Studiendesign bei Millington et al. als einzige der aufgezeigten Arbeiten eine Fastenphase von 48h vor Peptid-Injektion. Eine Abweichung der eigentlichen Sättigungswirkung der in ohnehin sehr geringen Konzentrationen eingesetzten Versuchspeptide könnte hierdurch hervorgerufen worden sein.

Peptid	Applizierte Peptid-Menge	Konz/5 μ l	Hemmung der Futteraufnahme *	Autor
α -MSH	1nMol	190 μ M	45%	Abbot
β -MSH	1nMol	190 μ M	55%	
α -MSH	0,2 μ g	24 μ M	50%	Kask
β -MSH	0,2 μ g	15 μ M	50%	
α -MSH		1 μ M	60%	Millington
β -MSH		1 μ M	-----	
α -MSH		10 μ M	50%	Vorliegende Arbeit
β -MSH		10 μ M	50%	
α -MSH		100 μ M	60%	Vorliegende Arbeit
β -MSH		100 μ M	60%	

Tabelle 31: Fütterungsexperimente von Abbot, Kask und Millington und der vorliegenden Arbeit im Vergleich
Um die Ergebnisse miteinander zu vergleichen wurde die Hemmung der Futteraufnahme nach 5 Stunden aufgeführt. Im Falle der Studien von Abbot und Kask wurde die absolut applizierte Peptidmenge in Molaritäten umgerechnet (Abbot et al. 2000, Kask et al. 2000, Millington et al.2001).

Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die icv-Applikation einer β -MSH-Mutante *in vivo* untersucht, die bei einer Patientin mit adipösem Phänotyp beschrieben wurde. Im Vergleich zu dem β -MSH Wildtyp, konnte eine Hemmung der Futteraufnahme ausschließlich bei einer icv-Applikation mit einer Peptid-Konzentration von 100 μ M nachgewiesen werden. Die Hemmung der Futteraufnahme entsprach der Hemmung, die auch die Injektion des Wildtyp-Peptids hervorrief.

Bei einer Konzentration von 10 μ M war bei der Mutanten-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe keine geringere Nahrungszufuhr messbar. Sowohl α -MSH als auch β -MSH hemmten die Futteraufnahme bei einer Konzentration von 10 μ M signifikant.

Somit zeigt sich bei den *in vivo*-Experimenten ähnliche Ergebnisse wie bei den *in vitro*-Versuchen. Erst bei sehr hohen Konzentrationen zeigte die Mutante *in vitro* und *in vivo* Effekte. Die fehlende Hemmung der Futteraufnahme *in vivo*, wahrscheinlich bedingt durch die *in vitro* messbare verminderte Rezeptorbindung und Aktivierung der Mutante (bei niedrigen Konzentrationen), zeigte eine durch die Mutation bedingte Funktionseinschränkung des Hormons.

Zusammenfassend belegen die Daten eine ebenso potente Wirkung für β -MSH wie für α -MSH in Bezug auf die MC4-R Bindung und Aktivierung *in vitro* und die Hemmung der Futterraufnahme *in vivo*. Zudem zeigten die hier vorgestellten Ergebnisse einen durch eine β -MSH-Mutation bedingten Funktionsverlust des β -MSH Peptids. Die Identifizierung einer partiellen loss-of-function Mutation im POMC-Gen durch *in vitro*- und *in vivo*-Charakterisierung bieten somit einen Hinweis für die Auswirkung eines β -MSH Funktionsverlustes in der menschlichen Gewichtsreduktion. Es ist anzunehmen, dass die loss-of-function Mutation zumindest an der Ausprägung eines adipösen Phänotyps bei den Mutationsträgern in der Berliner Indexfamilie beteiligt ist. Dafür sprechen auch Mutations-Screenings, die zeigen, dass die beschriebene heterozygote Mutationen im β -MSH codierenden Bereich verstärkt bei Adipösen zu finden sind. In einer Mutations-Studie wurden 2 von 722 untersuchten Adipösen als Mutationsträger identifiziert. In der Kontrollgruppe von 1270 Probanden, konnte kein Träger der beschriebenen Mutation entdeckt werden (Biebermann et al 2006). Lee et al. identifizierte in einer Gruppe aus 538 Adipösen 5 Mutationsträger, in der Kontrollgruppe zeigte sich nur 1 Mutationsträger (Lee et. al 2006).

Lee et al. untersuchte ebenfalls Eltern und Angehörige der Mutationsträger im Hinblick auf die β -MSH-Mutation. Insgesamt zeigten 20 von 25 Familienmitgliedern die β -MSH-Mutation (alle heterozygot). Alle Mutationsträger waren, ebenso wie in der Berliner Indexfamilie, übergewichtig bis adipös. Von den 5 Nichtmutationsträgern waren zwei normalgewichtig. Des Weiteren konnten Lee et al. nachweisen, dass das Essverhalten der Kinder, die Träger der heterozygoten β -MSH-Mutation sind, durch überdurchschnittliche Kalorienaufnahme gekennzeichnet ist. Ursache hierfür könnte eine Schwächung des Sättigungsgefühls aufgrund mangelnder MC4-R Liganden und einer damit verbundenen herabgesetzten MC4-R Stimulierung sein (Lee et al 2006).

Insgesamt lassen die vorliegenden Ergebnisse die Vermutung zu, dass β -MSH der Hauptligand für den MC4-R im menschlichen Hypothalamus ist und für die Weiterleitung des Leptinsignals und die damit verbundene Auslösung des Sättigungssignals verantwortlich ist. α -MSH konnte zwar von allen Mutationsträgern ausgebildet werden, die fehlende Funktion von β -MSH aber vermutlich nicht kompensieren.

Die anfängliche Unterschätzung der Funktion von β -MSH bei der menschlichen Gewichtsregulation ist darauf zurückzuführen, dass für die Forschung leicht zugängliche *in vivo*-Versuche an Ratten oder Mäusen durchgeführt werden, die β -MSH jedoch nicht aus dem Proopiomelanocortin prozessieren können (Bennet et al. 1986). Obwohl Ratten kein β -MSH aus dem Proopiomelanocortin bilden können, zeigten die Ergebnisse klar, dass humanes β -MSH bei Ratten nach icv-Applikation die Futteraufnahme reduzieren kann. Dies ist darauf zurück zu führen, dass der MC4-R bei Ratten und Menschen homolog ist und dieser aufgrund der Homologie ebenso von humanem β -MSH aktiviert werden kann, wodurch die *in vivo*-Versuche überhaupt möglich waren (Biebermann et al. 2006).

Die These, dass β -MSH den Hauptliganden des MC4-R beim Menschen darstellt, wurde in weiterführenden immunhistochemischen Untersuchungen an menschlichen Hypothalamusschnitten unterstützt (Biebermann et al. 2006). Die Studien zeigten, dass in humanen POMC-exprimierenden Neuronen im ARC, obwohl hier zunächst equimolare Mengen an α -MSH und β -MSH gebildet werden, vornehmlich β -MSH und nur geringe Mengen an α -MSH zu finden sind. Ein Grund hierfür könnte in den unterschiedlichen posttranslationalen Prozessierungswegen der beiden Melanocortine liegen. Bei Nagetieren ist bekannt, dass α -MSH nach Expression acetyliert wird. Da Nagetiere kein β -MSH bilden können, muss α -MSH die Ligandenfunktion am MC4-R übernehmen. Durch die Acetylgruppe wird das Peptid vor schneller Degradierung durch Peptidasen geschützt (Guo et al. 2004). Beim Menschen könnte aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse vermutet werden, dass α -MSH posttranslational nicht acetyliert und daher im menschlichen Hypothalamus schneller abgebaut wird; β -MSH allerdings nach der Prozessierung aus dem Prohormon beständiger ist. Ein schneller Abbau des α -MSH im menschlichen Hypothalamus würde erklären, dass α -MSH die Funktion von β -MSH bei den Mutationsträgern nicht kompensieren konnte. Der genaue Prozessierungsweg der Melanocortine im menschlichen Hypothalamus ist noch zu klären.

Weiterhin zeigten Studien von Harrold et al., dass der hypothalamische Spiegel von β -MSH vom Ernährungsstatus beeinflussbar ist. Die α -MSH Konzentration zeigte jedoch keine Veränderung in Abhängigkeit vom Essverhalten (Harrold et al. 2003).

Wie in der Einleitung beschrieben, sind die monogenen Defekte und auch die hier beschriebene partielle-loss-of-function Mutation im β -MSH codierenden Bereich des POMC-Gens sehr selten und erklären nicht die molekulare Pathogenese der immer häufiger auftretenden moderaten Adipositas (BMI \geq 30). Dennoch bestätigen sie das Leptin-Melanocortin-System als Ziel für neue pharmakologische Behandlungsmethoden in der Adipositas-therapie. Bei sehr seltenen Patienten mit Leptindefizienz, konnte eine Leptin-Ersatztherapie bereits erfolgreich durchgeführt werden. Den Patienten wurde Leptin subkutan appliziert, wodurch eine Reduktion von Appetit und Körpergewicht erzielt werden konnte (Farooqi et al. 1999, Farooqi et al. 2001). Eine Therapie, die auf eine Leptinsubstitution abzielt, erscheint allerdings nur bei sehr seltenen Leptinmangelzuständen sinnvoll. Heymsfeld et al. applizierten supraphysiologische Leptinmengen stark adipösen, nicht von einer Leptindefizienz betroffenen Patienten. Eine signifikante Gewichtsreduzierung konnte nur vereinzelt gemessen werden. Die Mehrzahl der Adipösen haben einen ohnehin schon hohen Leptinspiegel im Blut und entwickeln eine Leptinresistenz. Eine zusätzliche Leptingabe führte daher in mehreren Studien nicht zu einer signifikanten Gewichtsreduzierung (Heymsfeld et al. 1999, Zelissen et al. 2005).

Eine neue Möglichkeit stellt die Behandlung von Adipösen mit Melanocortin-Analoga dar. Die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien scheinen dringend notwendig. Bisherige medikamentöse Therapiemöglichkeiten wie Sibutramin – in Deutschland als Reductil® bekannt – und Orlistat, der Wirkstoff von Xenical zeichnen sich durch zum Teil extreme Nebenwirkungen und hiermit verbundene hohe Abbruchraten aus (Gysling et al. 1999).

Sibutramin ist ein indirektes Sympathikomimentikum. Es hemmt die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin in die Nervenzelle, was eine Appetitminderung zur Folge hat. Die Nebenwirkungen von Sibutramin – wie Kopfschmerzen, Mundtrockenheit, Übelkeit und Erbrechen bis hin zu Taubheitsgefühlen, Bluthochdruck und Herzrhythmusstörungen – sind erheblich. Aus

diesem Grund ist die Anwendung des Wirkstoffs stark eingeschränkt. Nach Studien führt Sibutramin vor allem für Herz-Kreislauf-Patienten zu einem deutlich erhöhten Herzinfarkt-Risiko. In einer großangelegten Doppelblindstudie wurden 485 Übergewichtigen 10mg Sibutramin, 15mg Sibutramin, oder Placebo über einen Zeitraum von einem Jahr gegeben. Der durchschnittliche Gewichtsverlust unter Einnahme von Sibutramin in einem Zeitraum von einem Jahr betrug 4,8kg (10mg Sibutramin/Tag) und 6,1kg (15mg Sibutramin/Tag) bzw. 1,8kg in der Placebogruppe (Mc Neely und Goa 1998).

Orlistat hemmt als Lipase-Inhibitor die Fettresorption im Darm, wodurch die Energieaufnahme des Körpers aus der Nahrung vermindert wird. Der Appetit wird jedoch nicht gezügelt. Die bisherigen Daten zeigen, dass Orlistat eine ähnliche Reduktion des Körpergewichtes erreicht, wie dies auch für Anorektika mit zentraler Wirkung beschrieben ist. Die Nebenwirkungen betreffen hauptsächlich den Magen-Darm-Trakt, wie Fettstühle, vermehrte Darmperistaltik und vermehrter Stuhlgang. In einer europäischen, multizentrischen Studie wurde Orlistat in einer Dosis von 120mg 3mal täglich doppelblind gegen Placebo getestet. Allen 688 Übergewichtigen wurden leicht hypokalorisch ernährt. Nach einem Jahr hatten die mit Orlistat behandelten Probanden 10,3 kg abgenommen; die Probanden der Placebogruppe 6,1 kg (Mc Neely und Benefield 1998).

Relativ neu (Juli 2006) ist der Einsatz des Wirkstoffes Rimonabant (Acomplia®) in der Adipositas-therapie (EMA 2007). Rimonabant wirkt als selektiver Cannabinoidrezeptor-Blocker (CB1-Blocker) appetithemmend. Die Wirkung von Rimonabant wurde in den RIO (Rimonabant in Obesity)-Zulassungsstudien überprüft. Insgesamt wurden ca. 7000 Patienten in den Studien untersucht. Zusätzlich zu einer einmal täglichen Gabe von 20mg Rimonabant erhielten die Patienten während der Studien eine kalorienreduzierte Diät und eine Bewegungstherapie. Zu Studienbeginn wiesen die Patienten einen BMI von 27-30 kg/m² bei gleichzeitig bestehender Hypertonie und/oder Fettstoffwechselstörung auf. Insgesamt zeigte sich – entgegen der anfänglich großen Hoffnung, die in Rimonabant gesetzt wurde – ein im Verhältnis zu den Nebenwirkungen nur mäßiger Erfolg des neuen Wirkstoffs. In der größten RIO-Zulassungsstudie, der RIO-North-America-Studie, betrug die durchschnittliche Gewichtsreduktion nach einem

Jahr 6,3 kg in der Probandengruppe gegenüber 1,6 kg in der Placebogruppe – hier ausschließlich über Diät und Bewegung erzielt. Der Taillenumfang verringerte sich in der Rimonabant-Gruppe um ca. 6 cm, in der Placebogruppe um 2,5 cm. Neben dem Gewicht wurde in der Rimonabant-Gruppe eine Verringerung der Triglyceridwerte und ein Anstieg des HDL-Cholesterins erzielt. Auf den LDL-Cholesterin-Wert hatte Rimonabant keinen Einfluss. Die Patienten aus der Rimonabant-Gruppe, die im zweiten Studienjahr kein Medikament bekamen, konnten die Gewichtsreduktion nicht halten und nahmen erneut zu. Ebenso hob sich die Besserung der Stoffwechsellage auf. Weiterhin enttäuschend war die hohe Abbruchrate. Die Hälfte der Teilnehmer in der Rimonabant-Gruppe mussten aufgrund von starker Übelkeit die Studie beenden. Herz-Kreislauf-Nebenwirkungen wie bei Sibutramin und Orlistat wurden nicht beobachtet (Banerji und Tiewala 2006). Der weitere Einsatz dieses zunächst vielversprechenden Medikaments ist kürzlich durch eine Metaanalyse zur Häufigkeit von psychiatrischen Nebenwirkungen wie Depression bis hin zu Suizidgedanken und Angstzuständen nochmals in Frage gestellt worden (Mitchel und Morrison 2007, Christensen et al 2007).

Gerade vor dem Hintergrund der epidemieartigen Ausbreitung der Adipositas und der erheblichen Nebenwirkungen der bekannten Therapiemöglichkeiten, ist der Bedarf an neuen Entwicklungen in der Pharmakotherapie hoch.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten neben anderen beschriebenen Forschungsergebnissen darauf hin, dass β -MSH beim Menschen einen Hauptliganden des MC4-R darstellt. β -MSH-ähnliche Substanzen zum Beispiel in Form einer MC4-R-Agonistentherapie könnten zumindest bei Patienten mit verringerter oder fehlender Melanocortinaktivität eine neue Möglichkeit in der Adipositas therapie darstellen. Bislang wurden anfängliche klinische Studien ausschließlich mit α -MSH-Agonisten durchgeführt (Seeley et al 2004). Allerdings zeigten diese unerwünschte Nebenwirkungen, was dazu führte, dass die α -MSH-Agonisten Therapie heutzutage vor allem für die Problematik der erektilen Dysfunktion erforscht wird (Wessels et al.2000).

Die Prüfung einer langfristigen Gewichtsreduzierung beim Menschen und die Abklärung von Nebenwirkungen möglicher β -MSH-Analoga stehen aus. Unter der Annahme eines Gleichgewichts von Agonisten und Antagonisten am MC4-R ist nicht nur der Einsatz

von Agonisten, sondern auch die Blockade von antagonistisch wirkenden Peptiden für die Behandlung von Adipositas denkbar.

6. Zusammenfassung

Die vom Proopiomelanocortin-Gen (POMC-Gen) codierten Melanocortine spielen eine zentrale Rolle bei der neuroendokrinen Regelung der Energiehomöostase im Hypothalamus. Aufgrund der unterschiedlichen Funktion der POMC-Peptide führt ein kompletter Funktionsverlust des POMC-Gens zu einem sogenannten POMC-Defizienz-Syndrom, das jedoch nur sehr selten auftritt. Durch die fehlenden Liganden der Melanocortin-Rezeptoren im Hypothalamus, der Hypophyse und in der Haut sind neben dem Sättigungssignal, auch die Cortisolbildung und die Melanotoninbildung stark unterdrückt. Neben einer schweren Adipositas im Kindesalter, haben die Betroffenen rote Haare und Nebenniereninsuffizienz.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte ein Mutations-Screening klären, ob bei Adipösen Mutationen in regulierenden Bereichen zu finden sind, die ausschließlich für die hypothalamische Expression des POMC-Gens verantwortlich sind – etwa der hypothalamischen Enhancerregion. Mutationen innerhalb dieses Bereiches könnten die genetische Prädisposition einiger Menschen erklären, eine Adipositas zu entwickeln ohne einhergehende Rothaarigkeit und Nebenniereninsuffizienz hervorzurufen. Das Mutations-Screening in einer Berliner Gruppe adipöser Kinder identifizierte einen Polymorphismus im ersten Fragment des Enhancerbereiches (nPOMC1/Position 310). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe zeigten ausschließlich Adipöse homozygote Formen des Polymorphismus. Ein zweites Screening in einem Marburger Patientenkollektiv, konnte die statistisch signifikante Häufung des homozygoten Nukleotidaustausches bei Adipösen nicht bestätigen. Eine folgende familienbasierte Assoziationsstudie zeigte ebenfalls keine statistisch signifikante Häufung der homozygoten Nukleotidwechsels bei Adipösen. Obwohl die vorliegenden Daten keine eindeutige Assoziation zwischen Mutationen im hypothalamischen Enhancerbereich des POMC-Gens und Adipositas nachweisen konnte, zeigte sich eine starke phylogenetische Konservierung der untersuchten Bereiche. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von Low durchgeführten Deletionsversuchen, die eine Enhancerfunktion der beiden Bereiche postulierten. Eine Bedeutung für die hypothalamische POMC-Regulation ist somit weiterhin anzunehmen.

Im Hypothalamus werden die vom POMC-Gen codierten Melanocortine α -, β -, und γ -MSH exprimiert. Um geeignete Strategien für die medikamentöse Adipositas therapie zu entwickeln, ist es notwendig aufzuklären, welches der Melanocortine die zentrale Funktion bei der neuroendokrinen Gewichtsregulation zukommt. Bisher wurde ausschließlich α -MSH eine Funktion zugesprochen. Die Funktion von β -MSH wurde bislang kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen konnten für β -MSH einen α -MSH entsprechenden Konzentration-Wirkungseffekt nachweisen, andere nicht. Jedoch konnten Mutations-Studien Mutationen bei Adipösen in der β -MSH codierenden Region von POMC, nicht aber in der α -MSH codierenden Region, aufweisen. Dies wirft die Frage auf, ob auch β -MSH bei der Vermittlung des Sättigungsgefühls von Bedeutung ist.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion von α -MSH und β -MSH erneut *in vitro* und *in vivo* verglichen werden. Erstmals wurde eine bei einer adipösen Patientin entdeckte β -MSH-Mutation *in vitro* und *in vivo* funktionell charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten eine ebenso potente Wirkung von β -MSH in Bindungs- und cAMP-Assays. Die Ergebnisse konnten in *in vivo* Versuchen bestätigt werden, bei denen verschiedene Konzentrationen von α -MSH und β -MSH Ratten icv appliziert wurden. Beide Wildtyp-Peptide hemmten die Futteraufnahme der Ratten im gleichen Maße. Die β -MSH-Mutante zeigte einen Funktionsverlust *in vitro*- und *in vivo*.

Somit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein Funktionsverlust einer heterozygoten Mutation im β -MSH codierenden Bereich des POMC-Gens gezeigt, die mit einem adipösen Phänotyp einhergeht. Die Ergebnisse der Arbeit deuten neben anderen beschriebenen Forschungsergebnissen darauf hin, dass β -MSH beim Menschen ein Hauptligand des MC4-R sein könnte. Substanzen mit β -MSH ähnlicher Struktur könnten somit ein vielversprechender, neuer Ansatz in der pharmakologischen Adipositas therapie darstellen.

7. Literaturverzeichnis

Abbot CR, Rossi M, Kim M, Al Ahamed SH Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake: Lack of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor, *Brain research* 2000; 869:203-10

Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK Leptin regulation of neuroendocrine systems, *Front. Neuroendocrinol* 2000; 21:263 – 307

Arbeitsgemeinschaft für Kinder und Jugendliche der Adipositasgesellschaft Leitlinien 2004, einsehbar unter: <http://www.adipositas-gesellschaft.de/daten/Leitlinie-AGA-2004-09-10.pdf>

Badman MK and Flier JS The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism, *Gastroenterology*. 2007; 132 (6): 2103-15

Banerji MA and Tiewala M Rimonabant – the RIO North America trial: a new strategy to sustaining weight loss and related morbidity, *Curr Diab Rep* 2006; 6 (3): 228-9

Barsh G, Farooqi S, O`Rahilly S Genetics of body-weight regulation, *Nature* 2000; 404:644-651

Bell-Anderson KS and Bryson JM Leptin as a Potential Treatment of obesity, *Treat Endocrinol* 2004; 3 (1): 11-18

Bennett HP Biosynthetic fate of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin within the intermediate lobe of the mouse pituitary, *Peptides* 1986; 7:615-22

Bertagna X, Lenne F, Comar D, et al. Human β -melanocyte-stimulating hormone revisited, *Natl. Acad. Sci Usa* 1986; 83: 9719-9723

Bickeböller H, Das nationale Genomforschungsnetz *Bundesgesundheitsblatt* 2007; 50:168

Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Grüters A Autosomal-Dominant Mode of Inheritance of a Melanocortin-4 Receptor Mutation in a Patient with Severe Early-Onset Obesity is Due to a Dominant-Negative Effect Caused by Receptor Dimerization, *Diabetes* 2003; 52:2984-2988

Biebermann H, Castaneda TR, van Landeghem F, et al. A role for β -melanocortin stimulation hormone in human body weight regulation, *Cell Metab* 2006; 3:141-146

Bourchard C and Perusse L Genetic aspects of obesity, *Ann N Y Acad Sci*. 1993, 699: 26-35

Bosten BA Proopiomelanocortin and Weight Regulation: From Mice to Men, *J of Ped Endocrinology & Metabolism* 2001; 14:6 1409-16

Bray GA and Tartaglia LA Medical strategies in treatment of obesity, *Nature* 2006; 404:672-677

Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz Die Nationale Verzehrsstudie II 2008; einsehbar unter www.was-ich-esse.de

Challis BG, Pritchard LE, Creemers JWM, Delplanque J A missense mutation disrupting a dibasic prohormon processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset-obesity through a novel molecular mechanism, *Human Molecular Genetics* 2002; 11(17):1997-2004

Christensen R, Kristensen PK, Bartels EM, Bliddal H, Astrup A Efficiency and safety of the weight-loss drug rimonabant meta-analysis of randomised trials, *Lancet* 2007; 17(370):1706-13.

Clement K, Vaisse C, lahlou N, Cabrol S A mutation in human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction, *Nature* 1998; 392:398-401

Comuzzie AG, Hixson JE, Almasy I A major quantitative trait locus determining serum leptin levels and fat mass is located on chromosome 2, *Nat.Genet.* 1997; 15: 273-5

Cone R The central melanocortin system and energy homeostasis, *Trends Endocrinol Metab* 1999; 10: 211-6

Cone R *The Melanocortin Receptors*, Humana Press Inc 2000; 33: 88-95

Considine RV, Sinah MK, Heiman ML, Kriauciunas A Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 324-5

Cole TJ The LMS method for constructing normalized growth standards, *Eur J Clin Nutr* 1990 Jan; 44(1):45-60

Cordell HJ and Clayton DG Genetic association studies, *Lancet* 2005; Sep 24-30;366(9491):1121-31.

Creemers JWM, Lee YS, Robert LO, et al. Mutations in the Amino-Terminal Region of Proopiomelanocortin (POMC) in Patients with Early-Onset Obesity Impair POMC Sorting to the Regulates Secretory Pathway, *J Clin Metab.* 2008; 93(11):4494-99

Csabi G, Torok K, Jeges S, Molnar D Presence of metabolic cardiovascular syndrome in obese children, *Eur J Pediatr* 2000; 159: 91 – 94

De Souza FS, Santangelo AM, Bumachny V, et al. Identification of neuronal enhancers of proopiomelanocortin gene by transgenic mouse analysis and phylogenetic footprinting, *Mol Cell Biol* 2005; 25 (8): 3076-80

Dansinger ML Meta-analysis: the effect of dietary counseling for weight loss, *Ann Intern Med* 2007; 147(1):41-50

Deutsche Adipositas Gesellschaft Evidenzbasierte Leitlinie: Prävention und Therapie von Adipositas Version 2007; einsehbar unter www.adipositas-gesellschaft.de

Dietz WH critical periods in childhood for the development of obesity, *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 829-840

Echwald SM, Sørensen TI, Andersen T, et al. Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity, *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999; 23(3):293-8.

Ehram R, Staffel S, Mensink G, Melges T Übergewicht und Adipositas in den USA, Deutschland, Österreich und der Schweiz, *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin* 2004; 11:278-85

EMA European Public Assessment Report - Acomplia 2007

Emeson RB und Eipper B Characterization of Pro-ACHTH/Endorphin-Derives Peptides in Rat Hypothalamus, *J Neurosci* 1986; 6(3):837-849

Farooqi IS, Drop S, Clements A, et al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risks in humans, *Diabetes* 2006; 55:2549-2553

Farooqi IS, Jepp SA, Langmack G, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency, *N Engl J Med* 1999; 341:879-884

Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, et al. Partial Leptin Deficiency and human adiposity, *Nature* 2001; 414:34-35

Farooqi IS and O`Rahilly S Genetics of Obesity in Humans, *Endocrine Reviews* 2006; 27(7): 710-718

Farooqi IS, Wangenstein T, Collins S, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor, *N Engl J Med* 2007; 356: 237-247

Felsenstein J Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach, *J. Mol. Evol.* 1981; 17:368-376

Gadde KM and Allison DB Cannabinoid-1 Receptor Antagonist, Rimonabant, for Management of obesity and related risks, *Circulation* 2006; 114:974-984

Gasbarini A, Piscaglia AC A natural diet versus modern western diets? A new approach to prevent "well-being syndromes", *Digestive Diseases and Sciences* 2005; 50 (1):1-6

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 6231 - 6235.

Gibson WT, Farooqi IS, Moreau M, et al. Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the $\Delta 133G$ mutation: report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy, *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4821-4826

Greten H und Hamann A Neue Optionen für die Adipositas-Therapie, Deutsches Ärzteblatt 1999; 96 (50) Seite A-3240/B-2740/C-2548

Guo L, Münzberg H, Stuart RC, Nillni EA, Bjorbaek C N-Acetylation of hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and regulation by leptin, Proc Natl Acad Sci 2004; 101: 11797-11802

Gysling E Pharmakotherapie der Adipositas, pharma-kritik 1999; 20 Nr. 08

Hager J, Dina C, Francke S, et al. A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10, Nat Genet. 1998; 20(3): 304-8.

Harrold JA, Williams G, Widdoson PS Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP) but not α -MSH or pro-opiomelanocortin concentrations in dietary obese and food-restricted rats, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999; 258: 574-577

Harrold JA, Widdowson PS, Williams G β -MSH: a functional ligand that regulated energy homeostasis via hypothalamic MC4-R? Peptides 2003; 24: 397-405

Harrold JA, Williams G Melanocortin-4 receptors, β -MSH and leptin: Key elements in the satiety pathway, Peptides 2005; 30: 1-7

Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, et al. Recombinant Leptin for Weight Loss in Obese and Lean Adults a Randomized Controlled Dose-Escalation, JAMA 1999; 282 (16): 1568-1575

Hinney A, Becker I, Heibult O, Nottebom K Systematic mutation screening of 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 Endocrinol Metab. 1998; 83 (10): 3737-41

Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O Several mutations in the melanocortin-4-receptor gene including a nonsense and a frame-shift mutation associated with a dominantly inherited obesity in humans, J. Clin. Endocr. Metab. 1999; 84: 1483-6

Hinney A., Bettecken T. et al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany, J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91 (5): 1761-9

Hixson JE, Almasy L, Cole S, Birnbaum S Normal Leptin Levels is associated with polymorphism in the Proopiomelanocortin Gene, J Clin endocrin Metab 1999; 84:3187-91

Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene, Nature Genet 1997; 16: 303-306

Joost H.G. Nutrigenomics: Grundlagen, Stand der Forschung, Anwendungen, Nutrigenomics 2006; 49 (10) 961-1074

Kask A, Rågo L, Wikberg J, Schiöth HB Differential effects of melanocortin peptides on ingestive behaviour on rats: evidence against the involvement of MC3 receptor in the regulation of food intake, *Neuroscience Letters* 2000; 283: 1-4

Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS Interacting appetite pathways in the hypothalamic regulation of body weight, *Endocr Rev.* 1999; 20 (1): 68-100

Kies W, Galler A, Reich A, et al. Clinical Aspects of obesity in childhood and adolescence, *Obesity Reviews* 2001; 2: 29-36

Krude H, Biebermann H, Luck W, Brabant G, Gruters A Severe early onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans, *Nat. Genet.* 1998; 19: 155-7

Krude H, Biebermann H, Grüters A Mutations in the human Proopiomelanocortin Gene, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003; 994:1-7

Krude H, Grüters A Implications of Proopiomelanocortin (POMC) Mutations in Humans: The POMC deficiency syndrome, *TEM* 2000; 11:15-21

Koppelman P Obesity as a medical problem, *Nature* 2000; 404:635 – 643

Kotani K Two decades of annual medical examinations in Japanese obese children: Do obese children grow into obese adults? *Int J Obesity* 1997; 19 (Suppl6):13-16

Larsen L.H., Echwald S.M. et al. Prevalance of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity, *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:219-224

Lauderdale DS, Rathouz PJ Body mass index in a US national sample of Asian Americans: effects of nativity, years since immigration and socioeconomic status, *Int J Obes Relat Disord* 2000; 24 (9): 1188-94

Lee S.Y., Challis B.G., Thompson DA, et al. A POMC variant implicates β -melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance, *Cell Metab* 2006; 3:135-140

Leibel R Is obesity due to a heritable difference in set-point adiposity? *West J Med* 1991; 153: 429-31

Leibel R Yellow mice, red hair, and childhood obesity: The melanocortinergic pathway in energy homeostasis, *J Pediatr* 2001; 139: 177-81

Lewin B *Molekularbiologie der Gene*, Spektrum-Verlag 2002

MacNeil DJ, Howard AD, Guan X, Fong TM The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity, *Eu J Pharmacol* 2002; 450: 93-109

Maes H, Neale M, Eaves L Genetics and environmental factors in relative body weight and human adiposity, *Behav Genet* 1997; 27: 325-31

Mantzoros CS The role of leptin and hypothalamic neuropeptides in energy homeostasis: update on leptin in obesity, *Growth Horm IGF Res* 2001; 11(A): 85-89

Mc Neely W und Benefield P Orlistat, *Drugs* 1998; 56: 214-9

Mc Neely W und Goa KI Sibutramine. A review of its contribution to the management of obesity, *Drugs* 1998; 56: 1093-1124

Millington G W, Tung YC , Hewson AK, O`Rahilly S Differential effects of α -, β - and γ -Melanocyte-Stimulating hormones on the hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat, *Neuroscience* 2001; 108: 437-45

Mitchell BP und Morrison MJ Depression and anxiety with rimonabant, *Lancet* 2007; 17 (370): 1671-2

Miraglia del GE, Santoro N, Marotta A, et al Inadequate leptin level negatively affects body fat loss during a weight reduction programme for childhood obesity, *Acta Paediatr.* 2002;91(2): 132-5

Mokadad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalance of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, *JAMA* 2003; 289 (1): 76-9

Montague C T, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset-obesity in humans, *Nature* 1997; 387: 903-8, 1997

Mountjoy KG, Mortrud MD, Low MJ, Simerly RD, Cone RD Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain, *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 1298-1308

Münzberg H und Meyers MG Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance, *Nature Neuroscience* 2005; 8 (5): 566-70

Mynard V, Guignat L, Decin-Leclerc J, Bertagna X Different Mechanisms for Leukemia Inhibitory factor-dependent activation of two proopiomelanocortin Promoter Regions, *Endocrinology* 2002; 143(10): 3916-24

Nationales Genomforschungsnetz Science Inside 2 einsehbar unter: www.ngfn.de

Neves SR, Ram PT, Iyengar R G-Protein Pathways, *Science* 2002; 296: 1636-1639

Oberender P, Zerth J Adipositas aus gesundheitsökonomischer Sicht: Herausforderung für das Gesundheitssystem, *Pharmazie in unserer Zeit* 2006; 6:536-541

Porte D, Seely RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW Obesity, diabetes and the central nervous system, *Diabetologia* 1998; 41: 863 - 881

Raffin-Sanson M.L., De Keyser Y. et al. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: from physiology to pathological conditions, *Eur J Endocrinol* 2003; 149 (2): 79-90

Rosenbaum M und Leibel R The physiology of body weight regulation: relevance to the etiology of obesity in children, *Pediatrics* 1998; 101: 525-39

Roth C, Lakomek M, Müller H, Harz KJ Adipositas im Kindesalter, *Monatsschr Kinderheilkd* 2002; 150: 329 - 336

Sachs L *Angewandte Statistik*, Springer-Verlag 2000 (10te Auflage)

Schaffer JV und Bologna JL The melanocortin-1 receptor, red hair and beyond, *Arch Dermatol* 2001; 137: 1477-1485

Schiöth HB, Muceniece R, Wikberg JE Charakterisation of the melanocortin-4 receptor by radioligand binding, *Pharmacol Toxicol* 1996; 79: 161-5

Schwartz MW, Woods SC, Porte DJ, Seeley RJ, Baskin DG Central nervous system control of food intake, *Nature* 2002; 404: 661 - 671

Seeley RJ, Burklow ML, Wilmer KA, et al. The Effect of the Melanocortin Agonist, MT-II, on the defended level of body adiposity, *Endocrinology* 2005; 146 (9): 3732-38

Spiegelman BM und Flier JS Obesity and the Regulation of Energy Balance, *Cell* 2001; 104: 531-543

Strachan T und Read AP *Molekulare Humangenetik* 1996; Spektrum Akademischer Verlag

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Gruppe VIII A: Mikrozensus 2003 – Fragen zur Gesundheit, Persönliche Mitteilung, Wiesbaden 2004

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity, *Nat Genet* 1998; 18: 213-215.

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), *Am J Hum Genet.* 1993 Mar;52(3): 506-16

Tsujii S und Bray GA Acetylation alters the feeding responses to MSH and beta-endorphin, *Brain Res Bull* 1989, 23: 165-169

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE, Stoffel M, Friedmann JM Leptin activation of STAT3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice, *Nature Genet.* 1996; 14: 95 - 97.

Wabitsch M und Kromeyer-Hauschild K Aktuelle Sicht der Prävalenz und Epidemiologie von Übergewicht und Adipositas bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland, Arbeitsgemeinschaft Adipositas im Kindes- und Jugendalter (AGA) der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin (DGKJ) 2006

Wadden TA Treatment of obesity by moderate and severe caloric restriction. Results of clinical research trials, *Ann Intern Med* 1993; 119: 688-93

Wiedmer P Geschlechtsspezifische Körpergewichtsregulation bei Mäusen. Dissertation 2004; mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät/ Universität Potsdam

Wiks R The Origins and consequences of Obesity, Obesity 1996; 11: 37- 53

Wessels H, Gralnek D, Dorr R, Hruby VJ, Hadley ME, Levine N Melanocortin receptor agonists, penile erection, and sexual motivation: human studies with Melanotan II, Int. J. Impotence Res 2000 12 (2): 74-79

WHO Obesity: preventing and managing the global epidemic, WHO Technical Report Series 894, Genf 2000

Woods AJ und Stock MJ Leptin activation in hypothalamus, Nature 1996; 381: 745

Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency respnds to peripheral melanocortin, Nat Med 1999; 5 (9): 1066-70

Zelissen PMJ, Stenlof K, Lean ME, et al. Effect of three treatment schedules of recombinant methionyl human leptin on body weight in obese adults: a randomized, placebo-controlled trial, Diabetes Obes Metab. 2005; 7(6): 755-61

Eigene Publikationen

Escher F, Biebermann H., Krude H., Grüters A. Genetik zeigt neue Ansätze in der Adipositas therapie: β -MSH, ein Hormon mit zentraler Rolle bei der neuroendokrinen Gewichtskontrolle des Menschen, Aktuelle Ernährungsmedizin 2008; 33: 201-207

Biebermann H, Castañeda TR, van Landeghem F, von Deimling A, Escher F, Brabant G, Hebebrand J, Hinney A, Tschöp MH, Grüters A, Krude H A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation, Cell Metab. 2006; Feb;3(2):141-6

Melzig MF, Escher F Introduction of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme of SK-N-SH cells in vitro by quercetin and resveratrol, Pharmazie 2002 Aug;57(8):556-8

Lebenslauf

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

Danksagung

Hiermit danke ich vor allem Frau Prof. Dr. Grüters für die interessante Aufgabenstellung. Ganz besonders möchte ich PD Dr. Heike Biebermann und Prof. Dr. Heiko Krude danken, die mich beide tatkräftig unterstützten und mich stets mit der Bereitschaft zur Diskussion und Offenheit für anstehende Fragen begleitet haben.

Insbesondere dankbar bin ich Tamara Castanda für die freundschaftliche Zusammenarbeit bei der Erstellung der *in vivo* Experimente. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Anke Hinney und Andre Scherag für ihre vielen Ratschläge und Tipps bei der Ausführung und Auswertung des Mutations-Screenings. Abschließend möchte ich Frau Ingeborg Gläser danken, die mir bei der Laborarbeit stets zur Seite stand.

Allen übrigen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts möchte ich für die kollegiale Zusammenarbeit und schöne Zeit meinen Dank aussprechen.

Erklärung

„Ich, Frederike Escher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: “Molekulargenetische Grundlagen der Adipositas: Untersuchung der hypothalamus-spezifischen Enhancerregion des Proopiomelanocortin-Gens und des Melanocortins β -MSH hinsichtlich der neuroendokrinen Regulation der Energiehomöostase“ 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.“

Datum

Unterschrift