Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Philipps-Universität Marburg
Direktor: Hr. Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Funktionelle Konsequenzen von Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen bei adipösen Kindern und Jugendlichen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin vorgelegt von

Sarah Hortense Hohmann
aus Frankfurt am Main

Marburg im Dezember 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am .....

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan:

Referent:

Coreferent:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **S. 4**

1.1 Die Gewichtsregulation **S. 8**

1.1.1 Der Hypothalamus **S. 9**

1.1.2 Insulin **S. 10**

1.1.3 Leptin **S. 11**

1.1.4 Neuropeptid Y **S. 13**

1.1.5 Melanin-Concentrating Hormon (MCH) **S. 15**

1.2 Das Melanocortin-System **S. 17**

1.2.1 α -MSH und Proopiomelanocortin (POMC) **S. 17**

1.2.2 Die Melanocortin-Rezeptor Familie **S. 19**

1.3 Der Melanocortin-4-Rezeptor **S. 21**

2 Material **S. 28**

2.1 Verbrauchschemikalien **S. 28**

2.2 Hormone / Liganden am MC4R **S. 28**

2.3 Radioaktive Substanzen **S. 29**

2.4 Enzyme, Kits und Größenstandards **S. 29**

2.5 Säulenmaterialien **S. 29**

2.6 Antikörper **S. 29**

2.7 Verbrauchsmaterialien **S. 30**

2.8 Geräte **S. 30**

2.9 Zelllinien und Nährmedien **S. 30**

2.10 Vektoren **S. 31**

2.11 Primer **S. 31**

3 Methoden **S. 31**

3.1 Molekularbiologische Methoden **S. 31**

3.1.1 Identifizierung von Mutationen im Genom der Indexpatienten **S. 31**

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) **S. 32**

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren **S. 34**

3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen **S. 34**
3.1.5 Einbringen des Gens in pcDNA3.1 (TOPO TA) **S. 35**
3.1.6 Verdau durch Restriktionsendonukleasen **S. 35**
3.1.7 Ligation der DNA in pSG5 **S. 36**
3.1.8 Sequenzierung **S. 37**
3.1.9 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren **S. 37**
3.1.10 Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden **S. 38**
3.1.10.1 Herstellung kompetenter DH5α *E.coli* -Bakterien **S. 38**
3.1.10.2 Transformation kompetenter DH5α *E.coli* durch Hitzeschock **S. 39**
3.1.10.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien **S. 39**
3.1.10.3.1 Mini-Präparation **S. 40**
3.1.10.3.2 Midi-Präparation **S. 41**
3.2 Zellkultur **S. 42**
3.2.1 Kultivierung von Zellen **S. 42**
3.2.2 Kryokonservierung kultivierter Zellen **S. 42**
3.2.3 Transiente Transfektion von COS7-Zellen **S. 43**
3.3 Funktionelle Charakterisierung der Rezeptormutanten **S. 44**
3.3.1 Der cAMP-Akkumulations-Assay **S. 44**
3.3.1.1 Inkubationsansatz **S. 45**
3.3.1.2 Säulentrennung **S. 45**
3.3.2 Immunologische Untersuchungen **S. 47**
3.3.2.1 Immunfluoreszenz an intakten Zellen zur Darstellung der Plasmamembraninsertion **S. 47**
3.3.2.2 Bestimmung der Zelloberflächenexpression ausgewählter Mutationen des MC4R mittels ELISA **S. 48**

4 Ergebnisse **S. 51**
4.1 In der Studienpopulation entdeckte MC4-Rezeptormutationen **S. 51**
4.1.1 Kinder und Jugendliche mit extremer Adipositas **S. 51**
4.1.2 Erwachsene in der Kontrollgruppe **S. 52**
4.2 Funktionelle Charakterisierung der MC4-Mutationen

mit Hilfe des cAMP-Akummulations-Assays **S. 52**

4.2.1 Wildtyp und Polymorphismus V103I **S. 52**

4.2.2 Loss-of-Function Mutationen **S. 55**

4.2.3 Mutationen mit gegenüber dem Wildtyp reduzierter Funktion **S. 60**

4.2.4 Mutationen mit dem Wildtyp-Rezeptor vergleichbarer Funktion **S. 64**

4.2.5 Mutationen mit konstitutiv aktiver Rezeptorfunktion **S. 69**

4.3 Bestimmung der Zelloberflächenexpression mittels ELISA **S. 74**

4.4 Darstellung der Rezeptoren an der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz **S. 78**

5 Diskussion **S. 80**

5.1 Funktionelle Relevanz der Mutationen im MC4R-Gen **S. 81**

5.2 Verminderung der Zelloberflächenexpression der Mutationen als mögliche Ursache des Funktionsverlustes **S. 87**

5.3 Ein „major-gene-effect“? **S. 90**

5.4 Ausblick **S. 92**

6 Zusammenfassung **S. 95**

7 Literaturverzeichnis **S. 98**

8 Publikationsliste **S. 107**

9 Abkürzungen **S. 108**

10 Danksagung **S. 109**

11 Lebenslauf **S. 110**

12 Akademische Lehrer **S. 111**

13 Ehrenwörtliche Erklärung **S. 112**

1 Einleitung

Die Adipositas ist eine der großen Volkskrankheiten der Gesellschaften der ersten Welt und verursacht für die Gesundheitssysteme enorme Kosten. Man könnte sie sogar als Kostenverursacher Nr. 1 ansehen. Von einer Adipositas spricht man, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht einen Prozentsatz von 20 % (bei Männern) bzw. 30 % (bei Frauen) übersteigt. Dieser Anteil kann mit Hilfe des Body-Mass-Indexes abgeschätzt werde, welcher sich aus dem Körpergewicht des Individuums in Kilogramm geteilt durch seine Körpergröße in Metern zum Quadrat errechnen lässt (Körpergewicht (kg) / Körpergrösse $(m)^2$).

Gewichtsklassifikation (WHO)	**BMI (kg/m^2)**
Normalgewicht	**18,5 – 24,9**
Übergewicht	**> 25**
Praeadipositas	**25 – 29,9**
Adipositas Grad 1	**30 – 34,9**
Adipositas Grad 2	**35 – 39,9**
Adipositas Grad 3	**40 +**

Tabelle 1-1: Gewichtsklassifikation der WHO gerichtet nach dem Body-Mass-Index (BMI). Ein BMI unter 25 entspricht somit einem normalen Gewicht, die Bereiche darüber werden jeweils in Schritten von 5 BMI- Einheiten in leichtes Übergewicht und die drei Stadien der Fettsucht eingeteilt.

Der gesunde Gewichtsbereich liegt dabei zwischen 18,5 und 24,9 kg/m^2. Zwischen 25 und 29,9 kg/m^2 spricht man von Übergewicht. Ab einem BMI von 30 kg/m^2 ist die betroffene Person als fettsüchtig zu bezeichnen (wobei hier auch noch die Einteilung der Adipositas in die Stadien I-III möglich ist).

In den letzten Jahren hat die Prävalenz der Adipositas in den westlichen Industrienationen altersabhängig deutlich zugenommen. Ca. 20% der erwachsenen Bevölkerung dieser Länder hat einen BMI von über 30 kg/m^2. Infolgedessen ist auch der Anteil der durch die Fettsucht und ihre Folgen verursachten Todesfälle deutlich gestiegen und nimmt in den USA inzwischen

fast einen genauso großen Anteil ein, wie die durch den Konsum von Tabak hervorgerufene Mortalität.

Die Fettsucht an sich ist im eigentlichen Sinne keine Krankheit, erhält aber einen deutlichen Krankheitswert durch die mit ihr assoziierte Morbidität und Mortalität (so ist die Mortalität von Personen mit einem BMI über 35 kg/m ^{2} gegenüber der normalgewichtiger Personen verdoppelt).

Die Adipositas gilt als Risikofaktor für mannigfaltige Erkrankungen, so z.B. für die koronare Herzkrankheit bzw. den Schlaganfall, Beinvenenthrombosen und thrombembolische Komplikationen, das obstruktive Schlafapnoe-Syndrom, Cholezystolithiasis, EPH-Gestose, Arthrosen (v.a. der Hüft- und Kniegelenke), etc. Dicke Menschen entwickeln oft ein so genanntes metabolisches Syndrom, welches sich durch das gleichzeitige Auftreten einer stammbetonten Fettsucht, einer Hypertriglycerid- und Hypercholesterinämie (Dyslipoproteinämie), sowie einer Hyperurikämie, einer essentiellen Hypertonie und einer Glucose-toleranzstörung auszeichnet.

Aber nicht nur die Zahl der fettleibigen Erwachsenen ist (vor allem in den USA, aber auch in der europäischen Union und der Bundesrepublik) seit Jahren kontinuierlich angestiegen. Auch der Anteil adipöser Kinder und Jugendlicher hat in den letzten Jahrzehnten deutlich zugenommen. Eine Folge davon ist beispielsweise das Auftreten des Diabetes mellitus Typ 2 (des so genannten „Alters-Diabetes“) in immer jüngeren Patientenkollektiven.

Die Ursache hierfür ist in der zunehmend fett- und kohlehydratreichen Ernährung bei gleichzeitigem Bewegungsmangel zu suchen. Einen Grund stellt dabei unter anderem auch die Verlagerung des Schwerpunktes der beruflichen Tätigkeiten von schwerer körperlicher Arbeit hin zu Büroarbeit im Dienst-leistungssektor dar. Dadurch ergibt sich ein deutlicher Energieüberschuss, der nach und nach vom Körper in den Depots des Fettgewebes abgelagert wird. Auch werden bei vollen Terminkalendern immer öfter kalorienreiche Schnellgerichte und Süßigkeiten einer ordentlichen Mahlzeit vorgezogen. So spielt sich in den meisten Familien das gemeinsame Essen (wenn es überhaupt stattfindet) vor dem Fernseher ab.

Neben der oben genannten Ursache (Bewegungsmangel und hyperkalorische Ernährung) können auch einige andere Grundlagen für die Adipositas genannt werden: Psychische Probleme, Stress und Einsamkeit führen oft zu einer

vermehrten Nahrungsaufnahme (Essen kann hier als eine Kompensation für andere nicht befriedigte Bedürfnisse angenommen werden), aber auch sekundäre Fettsucht auf dem Boden einer anderweitigen somatischen Grunderkrankung kommt vor (z.B. im Rahmen eines M. Cushing, bei Hypothyreose oder in seltenen Fällen männlichen Testosteronmangels, evtl. auch bedingt durch diverse Tumoren des ZNS).

Seit längerer Zeit werden genetische Faktoren in der Genese der Adipositas diskutiert. Es konnten inzwischen verschiedene zusammenhängende, sich gegenseitig beeinflussende Regelkreise (so z.B. das Leptin/Melanocortin System oder NPY/AGRP) der Gewichtsregulation identifiziert werden. Mutationen der Gene, welche für die Hormone und Transmitter selbst bzw. für ihre Rezeptoren kodieren, könnten die bei den betroffenen Individuen beobachtete extreme Fettsucht erklären.

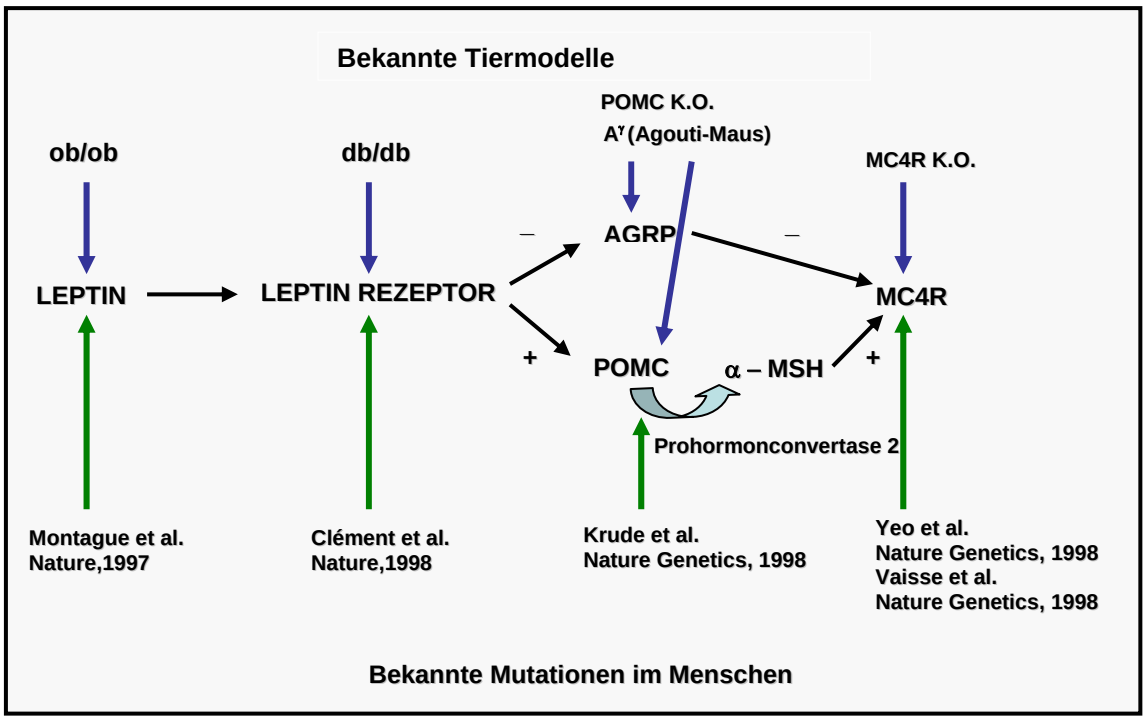

Abbildung 1: Die wichtigsten Tiermodelle der Adipositas, ihre genetischen Grundlagen und die Erstbeschreibungen entsprechender Mutationen im Menschen. So beruht der Phänotyp der ob/ob-Maus auf einer Mutation im Bereich des Leptin-Gens, welche zu einem deutlichen Leptin-Defizit führt. Bei der db/db-Maus führt eine Mutation im Gen des Leptin-Rezeptors zu der beschriebenen Adipositas. Die Agouti-Maus produziert vermehrt ein verändertes Agouti-Protein, welches als Antagonist am MC4R wirkt. Sie weist einen adipösen Phänotyp mit gelber Fellfarbe auf. Sehr ähnlich (aber ohne Farbveränderungen) präsentiert sich die MC4R „Knock out“-Maus.

Diese genetischen sowie funktionellen Ursachen der Fettsucht sind deswegen für die pharmakologische Forschung von solchem Interesse, da man sich erhofft, auf diesem Wege einen Angriffspunkt für Medikamente gegen die Volkskrankheit Adipositas zu entdecken. Bei unserer Studie wird auf die funktionellen Konsequenzen von Mutationen des Gens einer der Schaltstellen in der Gewichtsregulation, des Melanocortin-4-Rezeptors, näher eingegangen. Dafür wurde im Vorfeld eine Patientenpopulation von 808 übergewichtigen Kindern und Jugendlichen (davon 456 Mädchen) mit einem durchschnittlichen Body-mass-Index von 32,5 +/- 6,3 kg/m^2 bei einem durchschnittlichen Alter von 13,9 +/- 2,7 Jahren auf Mutationen im MC4R Gen hin überprüft. Mehr als 65% der untersuchten Kinder lagen über der 99. Perzentilenkurve für ihren Altersbereich. Die normal- und untergewichtige Kontrollgruppe umfasste 96 bzw. 231 Personen, die durchschnittlichen BMI-Werte für beide Gruppen lagen bei 21,9 $\pm$ 1,1 kg/m^2 bzw. 18,3 $\pm$ 1,1 kg/m^2. Hierbei konnten 16 verschiedene Mutationen in der übergewichtigen Studiengruppe festgestellt werden. Auch alle leiblichen Eltern der übergewichtigen Patienten wurden einer Untersuchung auf die entsprechenden Mutationen unterzogen (insgesamt 1040 Elternteile mit einem durchschnittlichen BMI der Mütter von 30,4 +/- 6,7 kg/m^2 bei einem Alter von 41,5+/- 5,5 Jahren sowie einem durchschnittlichen BMI der Väter von 30,4 +/- 5,4 kg/m^2 bei einem Altersdurchschnitt von 44,5 +/- 6,2 Jahren).

Sämtliche funktionellen Untersuchungen, von denen im Weiteren noch die Rede sein wird, fanden dabei unter folgender Fragestellung statt:

Kann eine extreme kindliche Adipositas wie die der untersuchten Probanden allein durch eine heterozygote Mutation eines einzelnen Gens hervorgerufen werden?

Und wenn ja, liegt dieser Tatsache ein dominant negativer Effekt zu Grunde oder eine Haploinsuffizienz?

Im Rahmen dieser Einleitung soll dabei zunächst auf die Mechanismen der Gewichtsregulation im Allgemeinen, und auf die Melanocortin-Rezeptorfamilie und den MC4R im Speziellen eingegangen werden.

1.1 Die Gewichtsregulation

1.1.1 Der Hypothalamus

Das komplexe Zusammenspiel der einzelnen an der Gewichtsregulation beteiligten Neurotransmitter-Systeme spielt sich im Wesentlichen in den einzelnen Kerngebieten des Hypothalamus ab [65;110], welche im kurzen Überblick hier noch einmal dargestellt werden sollen.

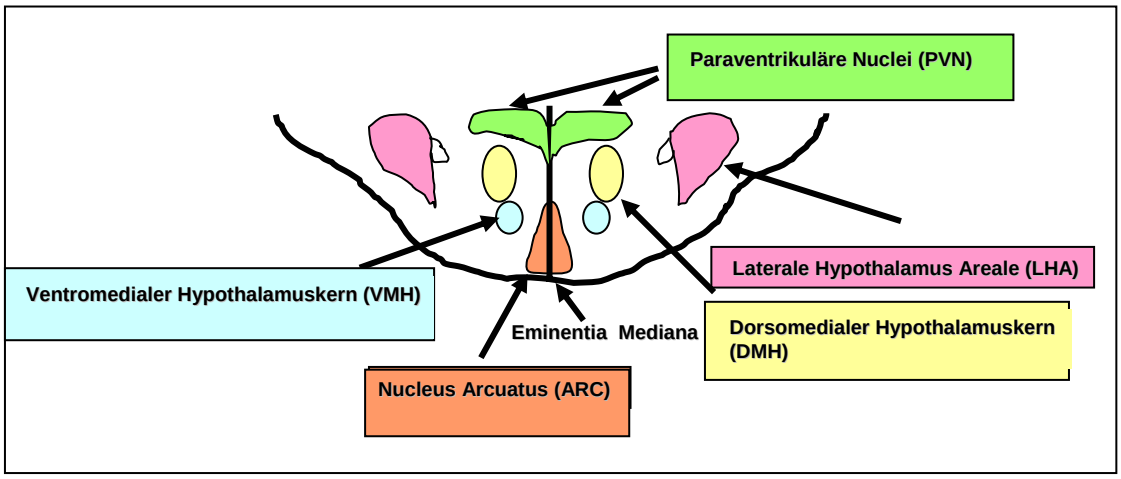

Abbildung 2: Der Hypothalamus im Frontalschnitt. Man erhält eine Übersicht über die Anordnung der für die Gewichtsregulation und Energiehomöostase wichtigen Kerngebiete wie den Nucleus arcuatus (ARC), die periventriculären Nuclei (PVN), die ventromedialen (VMH) und dorsomedialen (DMH) Hypothalamuskerne sowie die lateralen Hypothalamus-Areale (LHA). Die Darstellung ist sehr vereinfacht.

Zu den wichtigsten Kerngebieten im Dienste der Energie-Homöostase gehört der Nucleus arcuatus [87], welcher an der Basis des dritten Ventrikels direkt oberhalb der Eminentia mediana lokalisiert ist und dessen Zellpopulationen vorwiegend die die Nahrungsaufnahme stimulierenden Transmitter Neuropeptid Y und Agouti-Related-Protein (AgRP) [6;39] produzieren. Aber auch deren Gegenspieler POMC (Proopiomelanocortin) und CART (Cocaine and Amphetamine regulated Transcript) werden dort synthetisiert [21]. Die Kapillaren in diesem Bereich des Gehirnes besitzen keine „tight junctions“, so dass dieses Kerngebiet außerhalb der Blut-Hirnschranke liegt und von zirkulierenden Hormonen wie z.B. Leptin oder Insulin erreicht werden kann [11;27]. Durch die unmittelbare Nähe zum dritten Ventrikel können diese Wirkstoffe ebenfalls durch Diffusion über den Liquor zu den Zellpopulationen des Nucleus arcuatus gelangen. Neuronale Projektionen existieren in fast alle

anderen Kerngebiete des Hypothalamus, einschließlich des Nucleus paraventricularis [51], sowie der dorsomedialen und ventromedialen Nuclei. Der Nucleus paraventricularis liegt am oberen Ende des dritten Ventrikels im anterioren Bereich des Hypothalamus und fungiert als Integrationszentrum, wo viele projizierende Neurone aus anderen Kerngebieten zusammenlaufen (NPY/AGRP bzw. POMC/CART aus dem Nucleus arcuatus, sowie Orexine aus dem lateralen Hypothalamus [27]).

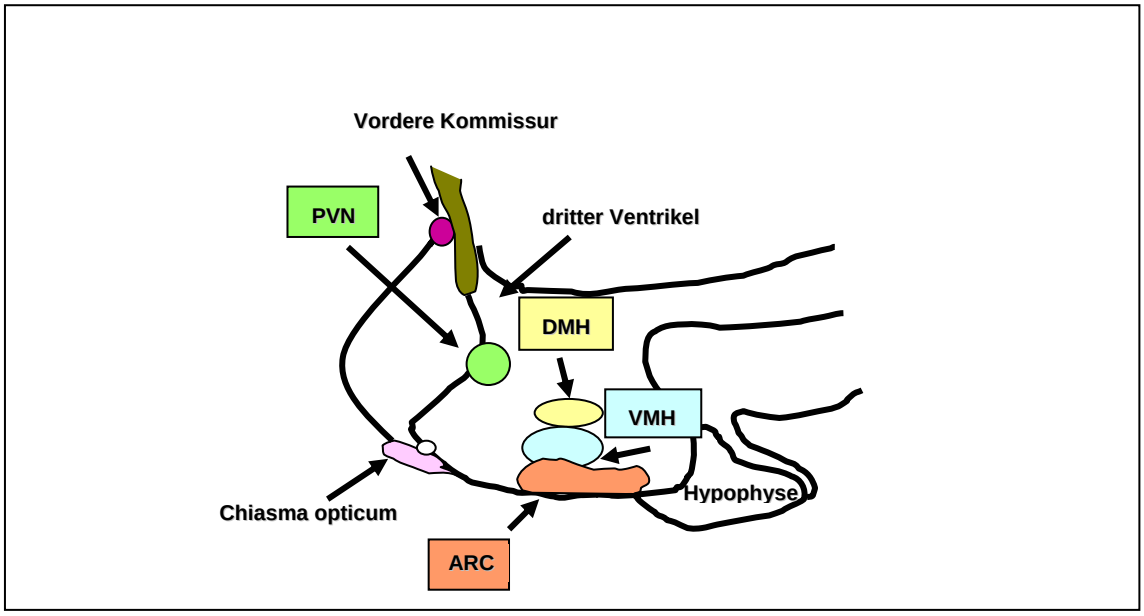

Abbildung 3: Der Hypothalamus im Sagittalschnitt. Abgebildet sind die gleichen Kerngebiete wie unter Abbildung 2, deutlich wird hier jedoch die örtliche Beziehung zu Strukturen wie dem dritten Ventrikel, der Hypophyse oder dem Chiasma opticum. Die Darstellung ist auch hier deutlich vereinfacht.

Seine Zellen besitzen viele Rezeptoren für die verschiedenen gewichtsregulierenden Neurotransmitter, vor allem die Melanocortin-Rezeptoren vom Typ 3 und 4, Neuropeptid-Y-Rezeptoren, aber auch $5HT_3$-Rezeptoren, adrenerge und Opioid-Rezeptoren.

Der ventromediale Nucleus umfasst eines der größten Kerngebiete im Hypothalamus und wurde lange Zeit als Sättigungszentrum bezeichnet, da seine Stimulation zu einem Einstellen der Nahrungsaufnahme führt und eine Läsion in diesem Kerngebiet eine deutliche Gewichtszunahme zur Folge hat. Als eine Ursache hierfür kann die große Anzahl von Leptin-Rezeptoren (Ob-Rb) angesehen werden, welche auf den Neuronen des ventromedialen Nucleus gefunden werden konnten [65]. Projektionen des Nucleus ventromedialis

existieren vor allem in den Nucleus paraventricularis sowie in die dorsomedialen Kerngebiete.

Der dorsomediale Nucleus, welcher sich dorsal direkt an das ventromediale Kerngebiet anschließt, projiziert vorwiegend in die Nuclei paraventriculares, den lateralen Hypothalamus, sowie in den Hirnstamm. Auch in diesem Kerngebiet findet sich eine größere Anzahl von Leptin-, aber auch von Insulinrezeptoren [65]. Durch ihre enge lokale Verbundenheit und die Ähnlichkeit im Rezeptorexpressionsmuster können ventromedialer und dorsomedialer Nucleus als eine funktionelle Einheit angesehen werden, welche die Nahrungsaufnahme initiiert oder beendet.

Der laterale Hypothalamus ist nur unklar umrissen und besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellpopulationen. An für die Gewichtsregulation relevanten Transmittern werden hier vor allem das Melanin-Concentrating-Hormone (MCH), sowie das Orexin synthetisiert, welche beide die Nahrungsaufnahme stimulieren [45]. Es kann eine große Anzahl von NPY-Rezeptoren des Typus 5 ausgemacht werden [11;12], außerdem existieren in diesem Gebiet besonders viele glucosesensitive Zellen. Eine Stimulation des lateralen Hypothalamus führt zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme, eine Läsion hier ruft Appetitlosigkeit und damit verbunden Gewichtsverlust hervor [98].

Von diesen verschiedenen Kerngebieten im Hypothalamus bestehen neuronale Verbindungen in viele verschiedene Zentren, z.B. in den Nucleus tractus solitarii (ein parasympathischer Hirnnervenkern, der vor allem über den Nervus vagus Informationen aus dem Gastrointestinaltrakt erhält und in dem neben glucosesensitiven Zellen auch eine erhöhte Expression von Leptin- und Melanocortin-4-Rezeptoren gefunden werden kann), oder in die Raphe-Kerne (hier liegt der Schwerpunkt vor allem auf der Produktion von Serotonin (5HT3), sowie der Expression der entsprechenden $5HT_3$ Rezeptoren) [110]. Wichtig für die Gewichtsregulation ist dies, da Serotonin als potenter Neurotransmitter mit anorexigener Wirkung ausgemacht werden konnte).

1.1.2 Insulin

Insulin (und auch Leptin, s.u.) fungiert nach der gängigen Meinung als Signal, das eine Langzeit-Regulation des Körpergewichtes durch das Gehirn

ermöglicht. Es zirkuliert in Mengen proportional zur Körperfettmasse im Blutkreislauf und tritt in Gehirnregionen ohne Blut-Hirn-Schranke (so z.B. in dem Gebiet des Nucleus arcuatus oberhalb der Eminentia mediana) in das zentrale Nervensystem über [7]. Dort bindet es an spezifische Insulinrezeptoren (welche sich vor allem im lateralen Hypothalamus, aber auch im Nucleus arcuatus befinden), aktiviert diese und führt letztendlich zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme [105;114].

1.1.3 Leptin

Das Peptidhormon Leptin wird vorwiegend von den Adipozyten sezerniert, zirkuliert im Kreislauf und tritt schließlich ins Gehirn über [20]. In den Kerngebieten des Hypothalamus (vorwiegend im Nucleus arcuatus) bindet es an seine spezifischen Rezeptoren. Diese sind der Superfamilie der Zytokinrezeptoren zuzurechnen und aktivieren über so genannte Janus-Kinasen STAT-Proteine (STAT: „Signal Transduction and Transcription“) [15;103;119]. Auf diesem Wege vermindert Leptin die Expression der orexigenen Peptide Neuropeptid Y [6] sowie AgRP [111] und erhöht die Transkriptionsfrequenz des Proopiomelanocortins [21] und somit die Konzentration anorexigener Hormone wie ACTH oder α-MSH [27;91]. Es reguliert also die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch eines Individuums in Abhängigkeit von dessen vorhandenen Reserven und nimmt eine Schlüsselstellung im Rahmen der Gewichtsregulation ein, da es die Verhältnisse in der Peripherie in zentrale Signale zu übersetzen im Stande ist [25;109;115]. Werden die Leptin-Spiegel experimentell im Rahmen der physiologischen Konzentrationen über längere Zeit angehoben, resultiert ein Gewichtsverlust bis hin zu einer leichtgradigen Anorexie. Im Gegensatz dazu führen herabgesetzte Leptin-Konzentrationen zu einer komplexen neuroendokrinen Antwort, wie sie z.B. auch nach längeren Fastenperioden auftritt. Aufgrund der Beobachtungen, dass adipöse Menschen trotz erhöhter Leptin-Spiegel [90] nicht in der Lage zu einer effizienten Kontrolle der Nahrungsaufnahme sind, wird eine Resistenz der Leptin-Rezeptoren gegen ihren Liganden (ähnlich der Insulinresistenz bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2) angenommen [16]. Niedrige Leptin-Konzentrationen konnten folgerichtig bei Patienten mit Erkrankungen, die in einer Malnutrition resultieren, wie z.B.

Anorexia nervosa, Morbus Crohn, zystischer Fibrose oder AIDS gefunden werden [62;95].

Dass eine Insuffizienz des Leptin-Systems, bedingt durch eine Mutation im Leptin-Gen [71] oder durch einen veränderten Rezeptor [23] zu einer extremen Adipositas führen kann, zeigen vor allem die „Knock out"-Modelle wie z.B. die ob/ob- (Leptin) bzw. die db/db- (Leptinrezeptor) Mäuse [22], welche einen fettsüchtigen Phänotyp aufweisen. Eine Leptin-Defizienz im Menschen ist jedoch eher selten. Das in einem solchen Falle feststellbare Krankheitsbild

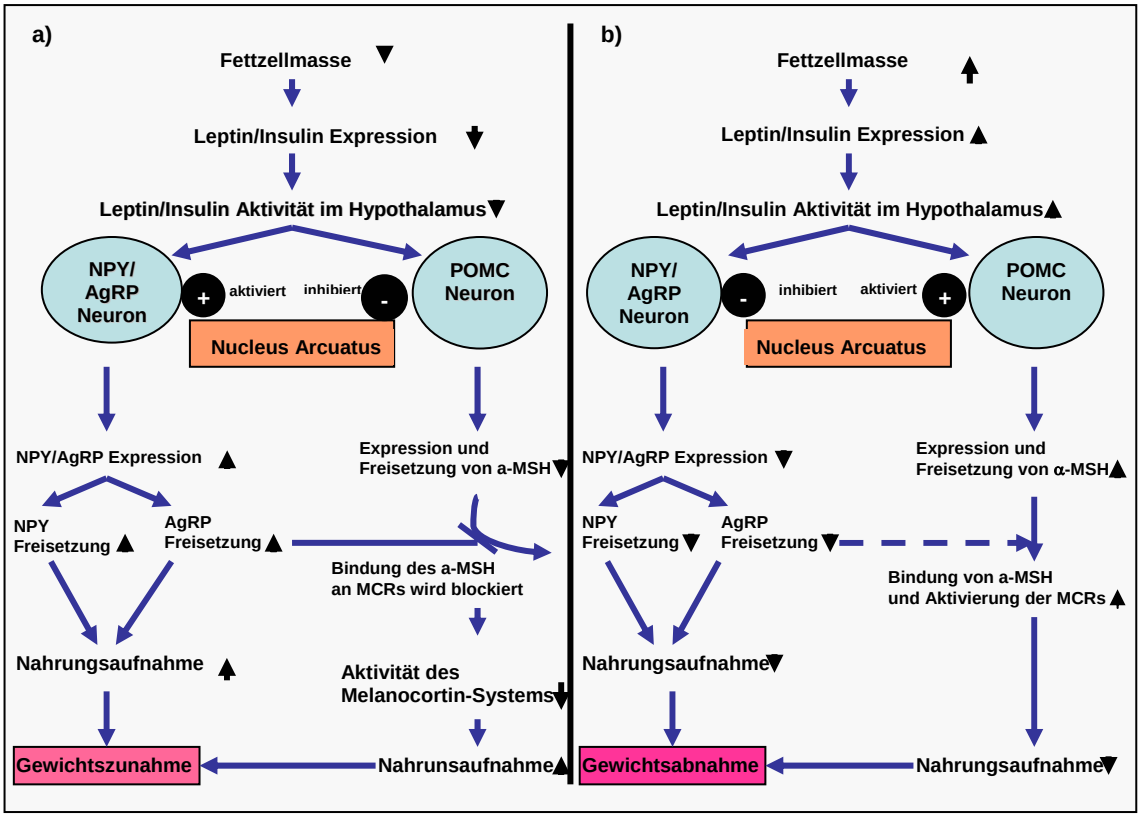

Abbildung 4: Die Regulation des Körpergewichtes über Leptin. a) Eine Abnahme der Fettzellmasse führt zu einer Verminderung der zirkulierenden Leptin-Spiegel und somit zu einer Reduktion der vorhandenen Leptin-Konzentrationen im Hypothalamus. Dadurch kommt es zu einer verminderten POMC-Expression in den Neuronen des Ncl. arcuatus und somit einer Aktivitätsabnahme im Melanocortin-System. Gleichzeitig entfällt die durch Leptin ausgeübte Hemmung auf das NPY/AgRP-Systems. Beide Transmitter werden vermehrt exprimiert. Während NPY über Aktivierung seiner Rezeptoren zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führt, wirkt AgRP antagonistisch am MC4R und reduziert so die Potenz des Melanocortinsystems. Es resultiert eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, das Individuum nimmt an Gewicht zu. **b)** Der umgekehrte Fall tritt bei Steigerung der Fettzellmasse ein. Erhöhte Leptin-Spiegel führen zu einer Steigerung der Aktivität des Melanocortin-Systems bei gleichzeitiger Hemmung der NPY/AGRP-Ausschüttung. Die Nahrungsaufnahme wird reduziert, das Individuum verliert an Körpermasse. **(Nach Schwartz et al., (1998) *Nature* 404:661-673)**

gleicht der bei uns verbreiteten Volkskrankheit Adipositas nur in wenigen Zügen [23]: So leiden die betroffenen Individuen bereits wenige Wochen nach der Geburt an einem extrem gesteigerten Drang zur Nahrungsaufnahme, einem Hypogonadismus, einem erhöhten Sympathikotonus sowie einer leichten Immundefizienz. Ein Defekt im Leptin-System kann somit als eine sehr seltene Ursache der genetisch bedingten Fettsucht angesehen werden. Als Erklärung für die endemisch vorkommende Adipositas des Erwachsenenalters in der westlichen Welt kann er jedoch nicht dienen.

1.1.4 Neuropeptid Y

Der Neurotransmitter Neuropeptid Y (NPY) ist ein aus 36 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und im Gehirn der Säugetiere sehr weit verbreitet.
Im Hypothalamus finden sich die NPY produzierenden Nervenzellen (welche meist außerdem Agouti-Related-Proteine (AgRP) synthetisieren) vorwiegend im Nucleus arcuatus [6;11;12]. Diese NPY/AgRP-Neurone projizieren vorwiegend in die Nuclei paraventriculares, die lateralen Kerngebiete des Hypothalamus und in die Nuclei dorsomediales. Außerdem existieren noch sehr kurze Projektionsbahnen, die noch im Nucleus arcuatus selber enden [39].
NPY werden viele verschiedene Funktionen zugeschrieben, so z. B. unter anderem die zentrale Regulation des Blutdrucks und der Körpertemperatur [10] und auch eine gewisse Rolle in der Funktion unseres Gedächtnisses. Hier soll jedoch allein auf die Eigenschaften und Aufgaben des NPY im Rahmen der Gewichtsregulation eingegangen werden. Der Effekt des Neuropeptid Y auf die Nahrungsaufnahme zeigt sich bereits nach Injektionen geringster Mengen dieses Transmitters in das Ventrikelsystem eines Versuchstieres: Der auf diese Weise stimulierte Organismus steigert im Anschluss die Nahrungsaufnahme und entwickelt bei wiederholter intraventrikulärer Behandlung eine Adipositas [10;51;97]. Die Energiebilanz des Tieres wird in den positiven Bereich verschoben, vor allem durch Verhinderung einer Thermogenese im braunen Fettgewebe (bei Nagetieren) sowie durch eine vom sympathischen Nervensystem stimulierte gesteigerte Insulinsekretion.
Dem NPY-System obliegt es also, in Zeiten der Nahrungskarenz für einen ausgeglichenen Energiehaushalt zu sorgen.

Leptin und auch Insulin wirken sich inhibierend auf die Sekretion von Neuropeptid-Y aus, was sich in einer Reduktion der spezifischen mRNA-Konzentrationen bemerkbar macht [74;100]. Leptin erreicht dies durch eine Stimulation seiner Ob/Rb Rezeptoren, welche sich in großer Anzahl auf den NPY/AgRP-Neuronen des Nucleus arcuatus finden [28]. Insulin inhibiert NPY-Neurone an ihrem Wirkungsort, wodurch typische Effekte des Insulins auf die Nahrungsaufnahme (wie z. B. eine Stimulation der Thermogenese, Gewichtsverlust oder vermindertes Hungergefühl) zu einem großen Teil erklärt werden können.

Das im Gastrointestinaltrakt sezernierte Hormon Ghrelin scheint im Gegenzug die Ausschüttung von NPY und AgRP im Nucleus arcuatus zu stimulieren [89].

Die NPY-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, bis heute sind sechs unterschiedliche Subtypen beschrieben worden, von denen fünf im zentralen Nervensystem insgesamt, und vier alleine im Hypothalamus nachgewiesen werden konnten (NPY-$Y_{1\text{-}5}$). Eine Bedeutung für die Gewichtsregulation kommt v.a. den Subtypen NPY-Y_1 und NPY-Y_5 zu [46]. Vor diesem Hintergrund erscheint zunächst verblüffend, dass NPY-„Knock out“-Modelle (-/-) in der Regel ein normales Essverhalten an den Tag legen und dementsprechend auch ein normales Körpergewicht entwickeln [29]. Die Abwesenheit von NPY wird hierbei durch eine Heraufregulierung der Produktion von AgRP kompensiert, welches ähnliche Effekte auf die Regulation der Nahrungsaufnahme ausübt, wie das NPY. Auf AgRP wird im Rahmen der Ausführungen über das Melanocortin-System wegen seiner Bedeutung für diese Arbeit als Antagonist am Melanocortin-4-Rezeptor noch einmal eingegangen werden.

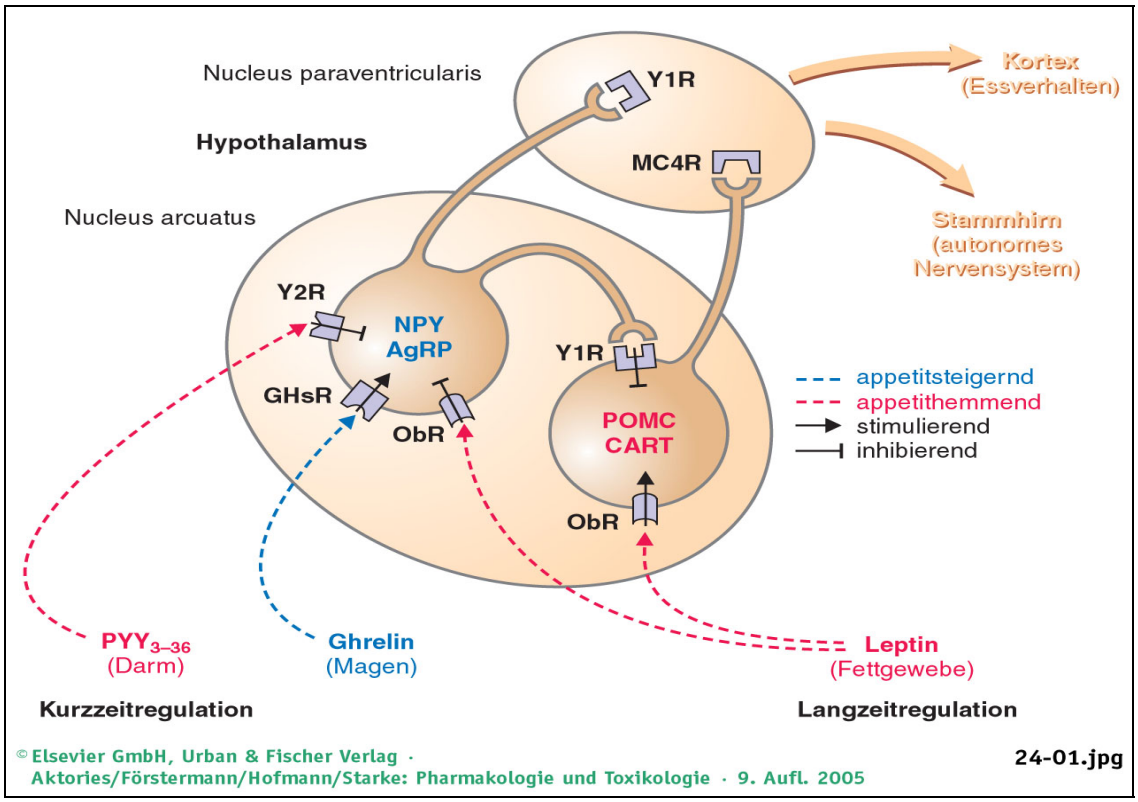

Abbildung 5: Die Zentren der Gewichtsregulation im Hypothalamus im Überblick. Während die von den neuroendokrinen Zellen des Darms sezernierten Peptide PYY $_{3-36}$ und Ghrelin kurzfristig die Nahrungsaufnahme regulieren, indem sie hemmend oder stimulierend auf die NPY/AgRP-Ausschüttung im Nucleus arcuatus einwirken, kommt dem Leptin die Aufgabe der langfristigen Regulation zu. So wirkt es über seine Ob-Rezeptoren stimulierend auf die Synthese von Proopiomelanocortin und CART, gleichzeitig inhibiert es die Sekretion des Neuropeptid Y und des AgRP. Je nach Überwiegen des Appetit-steigernden- (NPY/AGRP) oder hemmenden- (α-MSH/ACTH) Transmittersystems im Nucleus paraventricularis, kommt es zum Signal zur Nahrungsaufnahme oder zur Einstellung des Essens.

1.1.5 Das Melanin-Concentrating-Hormon (MCH)

Das Melanin-Concentrating-Hormon spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im komplexen System der Gewichtsregulation, ebenso wie das NPY oder das AgRP vermittelt es ein deutliches orexigenes Signal. Dieses führt zu einem Anstieg der Nahrungsaufnahme und infolgedessen auch des Körpergewichtes [81]. Man könnte auch von ihm als einem funktionellen Antagonisten des α-MSH sprechen. MCH wurde zunächst in Fischen entdeckt, bei denen es vor allem die Pigmentation beeinflusst. Im Gegensatz zum α-MSH, welches eine dunklere Pigmentierung verursacht, ist es von aufhellender Wirkung. Im Hypothalamus von Säugetieren konnte es erst einige Zeit später detektiert

werden [104]. In Tiermodellen führen Leptin-Defizienz, sowie längere Fastenperioden zu einer Verstärkung der Transkription des MCH-Gens [93].
Eine Injektion von MCH in das Ventrikelsystem einer Ratte induziert eine sofortige Nahrungsaufnahme. Zwei Stunden nach Injektion nimmt das Tier die dreifache Menge an Nahrung zu sich wie ein vergleichbares Mitglied der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu den getätigten Beobachtungen unter intraventrikulärer NPY-Gabe, führt eine kontinuierliche Injektion von MCH über mehrere Tage nicht zu einer deutlichen Gewichtszunahme, da sich das Fressverhalten des Tieres mit der Zeit normalisiert. Dies könnte evtl. mit einer Down-Regulation der entsprechenden Rezeptoren zusammenhängen [81].
Auch der Phänotyp des MCH-„Knock out"-Modells (Mäuse) [93] spricht für eine tragende Rolle des MCH im Bereich der Gewichtsregulation. MCH-defiziente Tiere wiegen im Schnitt 25-30% weniger als die zugeordnete Kontrollgruppe, was auf eine Reduktion des Gesamtkörperfettes zurückgeführt werden kann. MCH -/- Mäuse nehmen 15% weniger Futter zu sich als ihre Artgenossen in der Kontrollgruppe. Vor allem in den Nachtstunden scheint der Anreiz zur Nahrungsaufnahme deutlich reduziert zu sein. Weiter Auffälligkeiten weisen die Tiere jedoch nicht auf. In Anbetracht der geringeren Körperfettdepots verwundert es nicht, dass diese Tiere deutlich erniedrigte Leptin-Spiegel aufweisen.
Bis jetzt konnten zwei Rezeptoren für das Melanocortin-Concentrating-Hormon sowohl im Menschen, als auch in der Ratte identifiziert werden, welche beide zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zu rechnen sind [84]. Die MCH-Rezeptoren finden sich vorwiegend in den Projektionsarealen der MCH-Neurone, so z.B. im zerebralen Kortex, in den olfaktorischen Hirnnervenkernen und im limbischen System (z.B. im Nucleus accumbens). Im Hypothalamus selbst finden sie sich vor allem in den dorsomedialen und ventromedialen Kernen [104].
Da MCH und α-MSH funktionell entgegengesetzt wirken, existierte über lange Zeit die These, dass α-MSH am MCH-Rezeptor als Antagonist fungieren könnte. Dies ließ sich in transfizierten *In vitro*-Zellsystemen jedoch nicht bestätigen. Vermutlich wirken die beiden Hormone über ihre jeweiligen spezifischen Rezeptoren auf die gleichen Systeme der Signaltransduktion und

beeinflussen sich auf diesem Wege gegenseitig. Die genauen Mechanismen sind hierbei jedoch noch unklar.

1.2 Das Melanocortin-System

1.2.1 α-Melanozyten-stimulierendes-Hormon (α-MSH) und Proopiomelanocortin (POMC)

Das α-MSH ist ein aus 19 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches dem an vielen Stellen des Körpers exprimierten Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) entstammt, aus welchem außerdem das β- und γ-MSH, das ACTH, sowie das β-Endorphin hervorgehen [69;113].

Wie bereits erwähnt, wird POMC in vielen verschiedenen Geweben hergestellt, unter anderem in der Haut, der Hypophyse, dem Gastrointestinaltrakt und im Gewebe des Hodens. Je nach Produktionsort wird es posttranslational jedoch unterschiedlich in seine einzelnen Fragmente aufgespalten [92]. Im zentralen Nervensystem finden sich die Produktionsstätten von POMC vorwiegend im Nucleus arcuatus sowie in den Nucleus tractus solitarii [21]. Projektionen der α-MSH produzierenden Neurone finden sich vom Nucleus arcuatus ausgehend in alle anderen wichtigen Zentren der Gewichtsregulation des Hypothalamus, also in die dorsomedialen Nuclei, die Nuclei paraventriculares sowie in die lateralen Kerngebiete [110].

Einige Neurone aus den lateralen Anteilen des Nucleus arcuatus projizieren in das Rückenmark (dort vor allem in die praeganglionären Schaltstellen des Sympathikus), wo sie vermutlich über das vegetative Nervensystem in den Energiehaushalt regulierend eingreifen.

Die Rolle des α-MSH im komplexen Zusammenspiel der zahlreichen an der Gewichtsregulation beteiligten Substanzen wird deutlich durch Injektionen des Hormons, sowie seiner Agonisten und Antagonisten in das Ventrikelsystem eines Versuchstieres: Während das α-MSH selbst, sowie MTII (ein spezifischer Agonist am MC4R), eine deutlich messbare Verminderung der Nahrungsaufnahme in Mäusen hervorruft, zeigt der spezifische Antagonist am Melanocortin-4-Rezeptor, SHU9119, den genau umgekehrten Effekt. Das Versuchstier nimmt vermehrt hyperkalorische Nahrung zu sich [32;37]. Eine

Dosisabhängigkeit dieser beiden Effekte konnte dabei ebenfalls beobachtet werden.

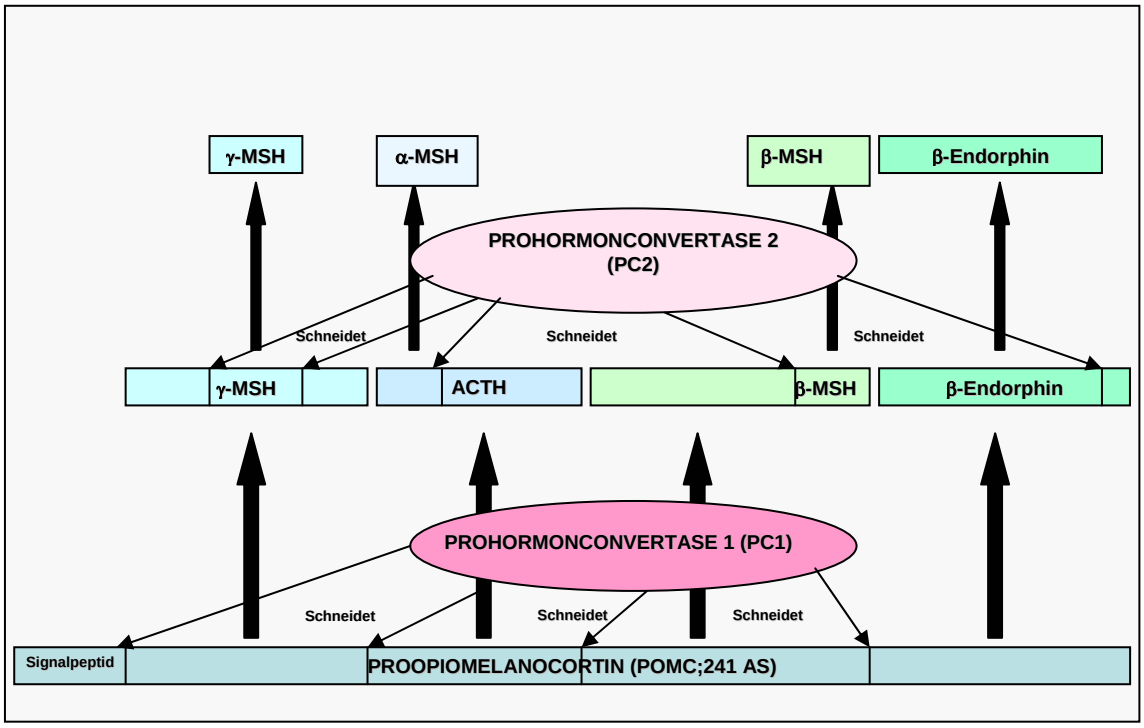

Abbildung 6: Die posttranslationale Prozessierung des Proopiomelanocortins (POMC) Für das zuständige Enzym, die Prohormonconvertase, existieren zwei verschiedene Subtypen, welche ein unterschiedliches Schneideverhalten an den Tag legen und auch unterschiedlich exprimiert werden. So existiert in der Hypophyse lediglich die Isoform 1 der PC, im Hypothalamus dagegen wird auch die Isoform 2 des Enzyms hergestellt, was hier zu einer Aufspaltung des POMC in seine kleineren Untereinheiten wie z.B. das α-, β- oder γ-MSH oder das β-Endorphin führt. Auch eine Mutation in der für die Prohormonconvertase kodierenden Region kann zu einer erblich bedingten Adipositas des Menschen führen.

Das α-MSH wirkt jedoch nicht nur auf diese eine Weise, so scheint es z.B. auch eine entscheidende Rolle bei der Thermogenese durch das braune Fettgewebe zu spielen und ist wichtig für die Pigmentierung von Haut und Haaren. Mannigfaltige weitere Effekte werden ihm zugeschrieben, auf die hier jedoch nicht genauer eingegangen werden kann.

Die Produktion des POMC (und somit auch des α-MSH) wird im Hypothalamus vor allem über das Hormon Leptin reguliert [21;27]. Als Indikator hierfür ist zu werten, dass alle POMC/CART-Neurone im Nucleus arcuatus an ihrer Oberfläche die Expression der langen Isoform des Leptinrezeptors aufweisen. Desweiteren lässt sich in Leptin-defizienten Tiermodellen eine deutlich reduzierte Konzentration an POMC nachweisen. Im umgekehrten Falle, bei

Versuchstieren mit erhöhten Leptin-Spiegeln und einer Leptin-Resistenz an den Rezeptoren, steigt die Konzentration von POMC erwartungsgemäß nicht proportional an [18].
Die Tatsache, dass sich der Appetit reduzierende Effekt von Leptin durch einen Antagonisten am MC4R aufheben lässt, spricht dafür, dass der Großteil der dem Leptin zugeschriebenen anorexigenen Wirkungen über α-MSH und das Melanocortin-System vermittelt wird.
Defizite an POMC oder α-MSH stellen sehr seltene Ursachen für eine humane Adipositas dar [26]. So resultieren beispielsweise rezessive Mutationen im POMC-Gen in einem Phänotyp mit frühkindlicher Fettsucht, roten Haaren, sowie einer adrenalen Insuffizienz [55;56].

1.2.2 Die Melanocortin-Rezeptorfamilie

Bis zum heutigen Tage konnten fünf Subtypen des Melanocortin-Rezeptors identifiziert werden, welche in unterschiedlichen Gewebearten des Körpers aufzufinden sind. Dementsprechend unterschiedlich sind auch die Aufgaben, denen die Rezeptor-Subtypen nachkommen [5;17;34;72;83]. Ihnen allen ist die Zugehörigkeit zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen gemeinsam. Die natürlichen Liganden an diesen Rezeptoren sind das α-MSH, sowie das ebenfalls dem Proopiomelanocortin entstammende ACTH.
Der Melanocortin-1-Rezeptor findet sich vorwiegend in den Melanozyten der Haut, in Makrophagen sowie in bösartigen Melanomzellen und beeinflusst die Pigmentierung von Haut und Haaren.
Der Melanocortin-2-Rezeptor wird in allen drei Schichten der Nebennierenrinde, sowie in Adipozyten exprimiert, und ist für die ACTH-vermittelte adrenale Steroidgenese, sowie für trophische Effekte des ACTH verantwortlich. Man könnte hier eher von einem ACTH-Rezeptor sprechen, da α-MSH nur sehr geringe Effekte auf den MC2R auszuüben scheint.
Der dritte Melanocortinrezeptor (MC3R) findet sich vorwiegend im Gehirn. Dort konzentriert sich sein Vorkommen (ähnlich dem des MC4R) auf bestimmte Kerngebiete des Hypothalamus (v.a. des Nucleus arcuatus und der Nuclei paraventriculares). Melanocortin-3-Rezeptoren existieren aber auch im Bereich des Gastrointestinaltraktes (multilokal) oder in der Placenta. Dem MC3R

scheint ebenfalls eine Rolle im komplizierten Zusammenspiel der Gewichtsregulation zuzukommen, worauf z.B. MC3R „Knock out"-Modelle der Maus als Hinweis dienen können [20], welche neben einer erniedrigten Muskelsubstanz einen erhöhten Körperfettgehalt vorzuweisen haben. Erstaunlich ist dies vor allem deshalb, weil diese Tiere nicht signifikant mehr Nahrung zu sich nehmen als die Tiere der Kontrollgruppen und eine normale Stoffwechselleistung besitzen. Die Annahme einer Interaktion zwischen dem MC3R und MC4R (z.B. im Sinne einer Rezeptor-Dimerisierung) liegt deshalb nahe und wird in letzter Zeit auch von der Forschung vermehrt aufgegriffen.

Der Melanocortin-5-Rezeptor wird ubiquitär exprimiert. Seine Rolle ist bisher weitgehend ungeklärt. Ein Funktionsverlust dieses Rezeptors scheint zu Insuffizienzen in den exokrinen Drüsensystemen zu führen. Es existiert allerdings die Kasuistik einer kanadischen Familie mit Mutationen im MC5R-Gen, bei welcher eine deutliche Adipositas beschrieben werden konnte. Diese Tatsache lässt die Frage offen, ob auch der Melanocortin-5-Rezeptor in die Vorgänge der Gewichtsregulation verwickelt sein könnte.

	Vorkommen	**Agonisten**	**Antagonisten**	**Funktion**
MC1R	**Melanozyten Makrophagen**	**α - MSH >ACTH >> γ - MSH**	**Agouti**	**Pigmentierung**
MC2R	**Adrenaler Kortex, Adipozyten**	**ACTH>>>α - MSH**		**ACTH induz. Steroidsynthese**
MC3R	**ZNS, GI - Trakt, Plazenta**	**γ - MSH = ACTH >α - MSH**	**AgRP**	**Regulation d. Energiehaushalt**
MC4R	**ZNS (ubiquitär)**	**α - MSH = ACTH >> γ - MSH**	**AgRP, Agouti**	**Energiehaushalt Körpergewicht**
MC5R	**ubiquitär**	**α - MSH >ACTH**		**unbekannt**

Tabelle 2 : Die Melanocortin- Rezeptorfamilie und ihre Eigenschaften.
Aufgeführt sind für jeden Rezeptor die spezifischen Agonisten und Antagonisten, die Orte des Vorkommens im menschlichen Körper sowie die ihm zugerechneten Funktionen und Aufgaben.

1.3 Der Melanocortin-4-Rezeptor

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Rezeptor, der Melanocortin-4-Rezeptor, ist ein aus 332 Aminosäuren bestehendes Rezeptorprotein, welches durch ein Gen mit einem einzigen Exon in der humanen Chromosomenregion 18q22 kodiert wird [34].

Neben dem Wildtypallel existiert noch ein weitverbreiteter Polymorphismus mit einer Substitution des Valins an Position 103 durch Isoleucin [35]. Wie alle anderen Mitglieder der Melanocortin-Rezeptorfamilie durchspannt der MC4R die Plasma-membran sieben Mal und ist an ein spezifisches G-Protein gekoppelt. Bei Bindung eines Agonisten an den Rezeptor aktiviert dieses G-Protein das Enzym Adenylylcyclase und führt so zu einer Umwandlung von ATP (Adenosintriphosphat) in cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat), welches über eine Aktivierung der Proteinkinase-A eine weiterführende Signal-transduktions-Kaskade in Gang setzt.

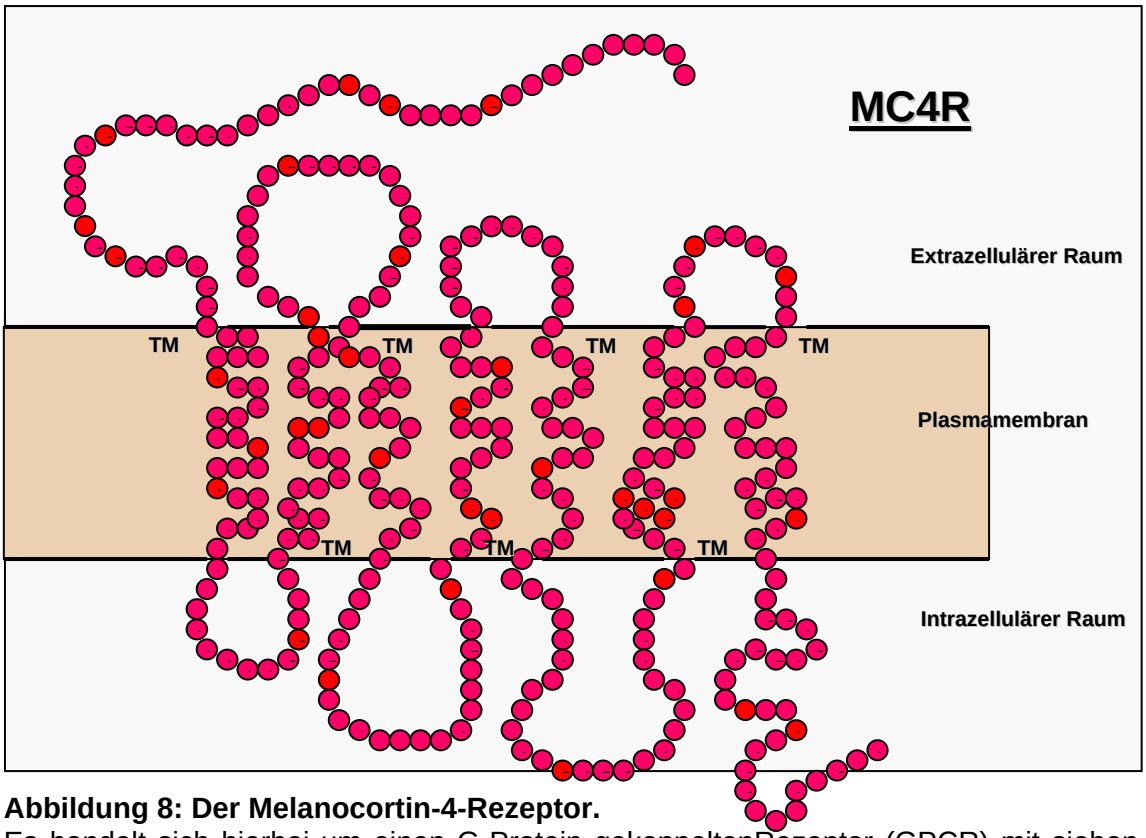

Abbildung 8: Der Melanocortin-4-Rezeptor.
Es handelt sich hierbei um einen G-Protein gekoppeltenRezeptor (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen. Er besteht aus 332 Aminosäuren und wird vorwiegend von den Zellen des zentralen Nervensystems exprimiert.

Als Agonisten fungieren am MC4R sowohl das α-MSH und das ACTH, als auch der für MC4R und MC3R spezifische, künstlich hergestellte Wirkstoff MTII [88]. Als Antagonist wäre in erster Linie das AgRP zu nennen [40;75;76], welches in denselben Neuronen des Hypothalamus produziert wird wie das NPY, außerdem das synthetisch hergestellte SHU9119 [116]. Dem AgRP wird ein inverser Agonismus zugeschrieben [75], was bedeutet, dass dieser Ligand auch bei fehlender gleichzeitiger Stimulation durch einen Agonisten zu einem Abfall der cAMP-Konzentration in der Zelle führt (Voraussetzung für einen solchen inversen Agonismus ist somit eine konstitutive Aktivität des Rezeptors ohne Agonisten-Stimulation).

Melanocortin-4-Rezeptoren sind im ZNS fast ubiquitär aufzufinden (so z.B. im Cortex, Hippocampus, Thalamus, im Rückenmark, aber auch im peripheren und vegetativen Nervensystem oder im Muskelgewebe). Von Interesse für die Gewichtsregulations-Mechanismen ist aber vor allem ihre Lokalisation im Hypothalamus, wo sie in großer Konzentration vorhanden sind [72]. Vor allem in den dorsomedialen Kerngebieten, in den Nuclei paraventriculares sowie in den lateralen Kerngebieten werden die MC4Rs in hohen Konzentrationen exprimiert. Hier enden auch viele Projektionsneurone aus dem Nucleus arcuatus, welche als Transmitter α-MSH produzieren.

Als ein wichtiger Faktor für die Gewichtsregulation identifiziert wurde der Melanocortin-4-Rezeptor durch den Umweg über die Agouti-Maus [30].

Die $A^{vy/-}$ Maus zeichnet sich durch folgenden Phänotyp aus: Eine sich frühzeitig manifestierende Fettsucht (bei gegenüber dem Wildtyp deutlich gesteigerter Nahrungsaufnahme, Hyperglykämie und Hyperinsulinämie), sowie eine gelbe Farbe des Fells. Dieser Phänotyp konnte auf eine genetisch bedingte Überexpression des so genannten Agouti-Proteins zurückgeführt werden, welches, wie damals schon bekannt war, als ein Gegenspieler des α-MSH am Melanocortin-1-Rezeptor die Fellfarbe beeinflusst [59]. Da die betreffenden Mutationen im Agouti-Gen außer einer peripheren Überexpression auch eine ektope Produktion des Proteins in Geweben wie z.B. dem ZNS zur Folge hatten, wurde die Hypothese formuliert, dass die Adipositas der betroffenen Tiere durch die antagonistische Wirkung des Agouti-Proteins an einem zentral vorkommenden Untertyp der Melanocortin-Rezeptor-Familie hervorgerufen sein könnte. Da Agouti in *In vitro*-Experimenten einen deutlichen Antagonismus nur

am Melanocortin-4-Rezeptor aufweisen konnte, wurde der MC4R als dieser verantwortliche Subtyp identifiziert und in der darauf folgenden Zeit verstärkt unter diesem Gesichtspunkt untersucht. Weitere Hinweise auf eine größere Rolle des MC4R im Rahmen der Gewichtsregulation konnten Versuche geben, in deren Rahmen spezifische Antagonisten am MC4R (z.B.SHU9119) in das Ventrikelsystem von Mäusen injiziert wurden, was zu einer verstärkten Nahrungsaufnahme durch die Tiere führte. Im umgekehrten Falle, bei Injektion eines spezifischen Agonisten am MC4R (z.B. MTII), stellten die Mäuse, selbst im Anschluss an längere Fastenperioden, das Fressen ein [1].

Auch das bald darauf beschriebene „Knock out"-Modell bestätigte die im Vorfeld getätigten Beobachtungen. Die $MC4R^{-/-}$ Mäuse zeigten einen der Agouti-Maus vergleichbaren Phänotyp mit sich relativ spät entwickelnder Adipositas, Hyperphagie und niedriger Stoffwechselrate [3;14;19;47;108]. Im Gegensatz zu den anderen Tiermodellen der Fettsucht waren die MC4R-„Knock out"-Mäuse jedoch in der Regel fertil und wiesen neben der Hyperinsulinämie keine weiteren endokrinen Besonderheiten auf, was sie zu einem besonders guten Modell für die humane Adipositas machte [47]. Eine weitere interessante Beobachtung auf der Basis von Tiermodellen war die Tatsache, dass heterozygote Tiere (also $MC4R^{+/-}$-Modelle) eine deutliche Gewichtszunahme gegenüber ihren Artgenossen mit zwei gesunden Wildtyp-Allelen vorzuweisen hatten. Ihr Gewicht lag zwischen dem der gesunden Wildtyp-Population und dem der $MC4R^{-/-}$-Tiere, wobei deutliche interindividuelle Unterschiede zu verzeichnen waren [19]. Auch führte das fehlende Allel bei weiblichen Tieren zu einer deutlicheren Gewichtszunahme als bei ihren männlichen Artgenossen. Von Bedeutung ist diese Beobachtung, da beim Menschen eventuelle Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor fast ausschließlich nur eines der beiden Allele betreffen (s.u.), die Situation dieser Individuen also am ehesten mit der des $MC4R^{+/-}$ -Modells vergleichbar wäre.

Weltweit konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlichste Mutationen im menschlichen Melanocortin-4-Rezeptor-Gen nachgewiesen werden (unter anderem Frameshift-, Nonsense- und Missense-Mutationen). Die betroffenen Individuen wiesen dabei fast immer eine extreme, bereits im frühen Kindesalter sich deutlich manifestierende hochgradige Adipositas auf [2;31;36;38;41;42;43;54;61;97;102;106;107;118]. In Studien-Populationen kon-

nten bei bis zu 6 % der fettsüchtigen Patienten Mutationen dieses Gens nachgewiesen werden. In den normalgewichtigen Kontrollgruppen dagegen wurden bisher keine Mutationen im MC4R gefunden. Diese Beobachtungen sprechen für einen sogenannten „major-gene-effect“ [42], was bedeutet, dass die besagten Mutationen eine hohe Penetranz aufweisen und den Phänotyp des betroffenen Individuums zu einem großen Prozentsatz erklären helfen. Auch konnte für eine Mutation ein dominant negativer Effekt nachgewiesen werden [9], was bedeutet, dass das mutierte Rezeptorprotein mit Wildtyp-Rezeptor-Proteinen dimerisiert und deren Funktion auf diese Weise beeinträchtigt. Für einige andere der bisher bekannten Mutationen konnte ein solcher Mechanismus jedoch bereits ausgeschlossen werden [107], so dass hier wohl keine Aussagen über allgemeingültige Mechanismen getroffen werden können.

Die funktionellen Konsequenzen der bisher entdeckten mehr als 30 Mutationen im MC4-Rezeptorgen sind im Großen und Ganzen jedoch eher unklar. Zwei Missense-Mutationen (V103I und I251L) wurden in 2-3 bzw. 1% der europäischen und nord-amerikanischen Bevölkerung (gleich ob adipös oder normalgewichtig) entdeckt und werden deshalb als Polymorphismen bezeichnet (s.o.).

In der normalgewichtigen Bevölkerung konnten drei Missense-Mutationen detektiert werden (I102T, F202L, N240S) [50]. Diese wurden jedoch keiner Untersuchung durch funktionelle Studien unterzogen, weswegen eine Aussage über eine eventuelle Beeinflussung der Rezeptorfunktion durch die Mutationen nicht getätigt werden kann.

Die meisten der oben erwähnten entdeckten Mutationen im MC4R-Gen wurden funktionell untersucht, wobei sich für einen Teil derselben (N62S, S127L, I137T, T150I, R165W, I170V, A244E, I103T, I317T) ein partielle Aktivität im Vergleich zur Aktivität des Wildtyprezeptors nachweisen ließ, bei einem anderen Teil (P78L, G98R, C271Y, P299H) jedoch ein kompletter Funktionsausfall des Rezeptors zu verzeichnen war.

Entgegen den vorherigen Erwartungen konnte bei einer in einem extrem dicken Index-Patienten entdeckten Mutation (L250Q) eine konstitutive Rezeptoraktivität beschrieben werden [107], was Schwierigkeiten bei der Interpretation des zugehörigen Phänotyps bereitete. Durch den Nachweis, dass ein Teil der

derartig veränderten Rezeptormoleküle in der Zelle retiniert wird und nicht an die Oberfläche der Plasmamembran gelangt, konnte jedoch auch diese Tatsache erklärt werden [60]. Betrachtet man die Familien der Mutationsträger, so lässt sich feststellen, dass Verwandte mit derselben funktionell relevanten MC4R-Mutation in der Regel ebenfalls eine gravierende Adipositas aufweisen. Es konnten jedoch auch einzelne, trotz Mutation schlanke Familienmitglieder detektiert werden. So fand die Arbeitsgruppe von *Vaisse* drei schlanke Verwandte eines extrem dicken Trägers der Frameshift-Mutation 47-48 insG (eine Mutation, die zu einer N-terminalen Verkürzung des Rezeptors führt), in deren Genom die gleiche Mutation identifiziert werden konnte [107]. Diese Personen waren niemals in ihrem Leben dick gewesen. Für dieses Phänomen konnte keine wissenschaftliche Erklärung gefunden werden. Ebenfalls interessant in diesem Zusammenhang ist die Entdeckung der Arbeitsgruppe um *Farooqui* [31], der es möglich war, in einer kosanguinen Familie mehrere extrem adipöse Individuen aufzuspüren, deren beide Allele des MC4R-Gens die selbe Missense-Mutation N62S aufwiesen. Auch heterozygote Personen konnten in dieser Familie nachgewiesen werden, welche aber allesamt normalgewichtig waren. Diese Tatsache führte zu der Annahme, dass es sich bei dieser Mutation um eine rezessiv vererbte Form der Adipositas handeln müsse.

Kobayashi et al. war es ebenfalls möglich, eine Patientin mit einer homozygoten Missense-Mutation (G98) zu beschreiben [54], welche einen extrem adipösen Phänotyp vorzuweisen hatte. Die Eltern und die Geschwister der Patientin, welche alle heterozygote Träger desselben Allels waren, wiesen ein deutliches Übergewicht auf. Dies spricht für eine kodominante Form der genetisch bedingten Adipositas.

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Familienstudien und funktioneller Untersuchungen werfen die Frage auf, inwieweit eine Mutation eines Allels des Melanocortin-4-Rezeptors tatsächlich das Körpergewicht des betroffenen Individuums beeinflussen kann, und ob der Phänotyp einer extremen Adipositas alleine durch eine solche Mutation erklärlich wäre.

Die Erstbeschreiber von humanen Mutationen im MC4R-Gen und deren Auswirkungen gingen von einer Form der dominant vererblichen Adipositas aus. Die Arbeitsgruppe um *Ho und MacKenzie* [43] stellte nach der

Durchführung von mehreren funktionellen Studien die Hypothese auf, Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen führten zu einer Haploinsuffizienz des Rezeptors.

Diesem widerspricht allerdings die Tatsache, dass normalgewichtige Individuen mit größeren Deletionen in der Region 18q existieren. Auch die Hypothese eines dominant-negativen Effektes der MC4R-Mutationen als Ursache der Adipositas im Phänotyp wurde erwogen und konnte für eine Mutation bereits nachgewiesen werden [9].

NMD (nonsense mediated decay) verhindert in einem solchen Falle eine Anhäufung von Nonsense- oder Frameshift-mutierter m-RNA und minimiert so die Synthese trunkierter Rezeptorproteine mit einem dominant-negativen Effekt. Eine Studie konnte jedoch zeigen, dass der Melanocortin-4-Rezeptor nicht NMD sensibel ist [13]. Die Frage, ob die funktionellen Konsequenzen der MC4R Mutationen eher auf eine Haploinsuffizienz oder auf einen dominant-negativen Effekt zurückzuführen sind, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Eine weitere Studie [60] von *Lubrano-Berthelier* und ihrer Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass fast alle darin neu beschriebenen Mutationen, die in einer Studienpopulation adipöser Kinder und Jugendlicher gefunden worden waren, in einer vermehrten intrazellulären Retinierung der Rezeptorproteine resultierten. Auch dieser Mechanismus stellt also einen Ansatz zur Erklärung des fettsüchtigen Phänotyps bei heterozygoten Mutationen im MC4R-Gen dar. Aus den verschiedenen Studien kann man jedoch ersehen, dass kein allgemeingültiger Mechanismus existiert, einige Mutationen bewirken durch eine Dimerisierung einen dominant negativen Effekt und beeinflussen auf diese Weise die Funktion der Wildtyprezeptoren, andere führen zu einer intrazellulären Retinierung der Rezeptorproteine. Auch eine Haploinsuffizienz der gesunden Allele wird diskutiert. Ziel der hier beschriebenen Studie war es zunächst, herauszufinden, ob funktionell relevante Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen häufiger unter adipösen Kindern- und Jugendlichen vorkommen als in den normalgewichtigen Kontrollgruppen (ob es sich also um einen so genannten major-gene-effect handelt). In diesem Zusammenhang sollen hier die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen (wie z.B. cAMP-Akkumulations-Assay und Zelloberflächen-ELISA) an den sechzehn in der

Studienpopulation detektierten Mutationen des MC4R-Gens dargestellt und diskutiert werden.

2 Material

2.1 Verbrauchschemikalien

Adenosin-5´-triphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin-Na-Salz	Applichem, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
HCl (32%)	Riedel de Haen, Seelze
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Imidazol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
LB-Medium :Bacto™ Agar, Bacto™ Trypton	Becton, Dickinson and Company,
Bacto™ Yeast Extract	Le Pont de Claix (Frankreich)
Natriumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
Rothiszint™	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Riedel de Haen, Seelze
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zyklisches 3´:5´-Adenosinmonophosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.2 Hormone bzw. Liganden am MC4R

α–Melanozyten stimulierendes Hormon	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)	Phoenix-Pharmaceuticals (USA)
Agouti-related-Proteine (AgRP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SHU9119	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NDP-MSH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.3 Radioaktive Substanzen

[2,8-^{3}H] Adenin (25-50 Ci/mmol	NEN, München

2.4 Enzyme, Kits und Grössenstandards

DNA-Marker (100 bp und 1 kbp)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Probenpuffer	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Expand High Fidelity PCR System™	Roche Diagnostics, Mannheim
Fugene 6™	Roche Diagnostics, Mannheim
Metafectene™	Biontex Lab. GmbH, München
Plasmid DNA Purification Kit	Nucleobond, Düren
Retriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Säulenmaterialien

Dowex AG50W-X8 Resin (H^{+}Form)	Bio Rad GmbH, München
Aluminiumoxid	Bio Rad GmbH, München

2.6 Antikörper

Anti-Hämagglutinin(HA)-antikörper, Biotin gekoppelt	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Hämagglutinin(HA)-antikörper, 12CA5	Roche Diagnostics, Mannheim
Anti-Maus IgG, FITC gekoppelt	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Peroxidase gekoppeltes Streptavidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

2.7 Verbrauchsmaterialien

Reaktionsgefäße, 0,5 ml/ 1,5 ml/ 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (variable Größe)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturmaterialien	Sarstedt, Nümbrecht
Säulen (Isotopenlabor)	Bio Rad, München
Szintillationsgefäße (20 ml)	Bio Rad, München

2.8 Geräte

Beckmann L7-65 Ultrazentrifuge	Beckmann, Krefeld
Mikropipetten	Gilson, Middleton, WI (USA)
Olympus IX70 (Fluoreszenzmikroskop)	Olympus, Hamburg
Sorvall RC-5 SuperSpeed Refrigerated Centrifuge	Sorvall, Bad Nauheim
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
ELISA Reader	Biometra GmbH, Göttingen
Photometer	Biometra GmbH, Göttingen
Inkubatoren	Biometra GmbH, Göttingen
Szintillationszähler	

2.9 Zelllinien und Nährmedien

Zellkulturmedien, PBS (phosphate buffered saline), FCS (fötales Kälber-Serum), Trypsin, Streptomycin und Penicillin stammen von der Firma PAA Laboratories, Pasching (Österreich).

Name	Ursprung	Nährmedium	Wachstum
COS7	Affennierenzellen	DMEM ,10 % FCS,100 U/ml Penicillin,100 μg/ml Streptomycin	adhärent
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	Earle´s MEM, 10 % FCS,100 U/ml Penicillin, 100μg/ml Streptomycin	adhärent

Tabelle 3: Verwendete Zellinien und die Zusammensetzung der jeweils verwendeten Medien. Die Zellen wurden in 250 ml Flaschen ausgesät, nach einem Tag das Medium gewechselt und nach spätestens drei Tagen (je nach Wachstum der Zellen) gesplittet.

2.10 Vektoren

pSG 5	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA 3.1	Invitrogen, Karlsruhe

2.11 Primer

Sämtliche von uns verwendete Primer wurden von der MWG-Biotech-AG aus Ebersberg synthetisiert.

MC4R-forward	**CCCACCATGGTGAACTCCACCCAC**
MC4R-reverse	**TTAATATCTGCTAGACAAGTC**
EcoR1 Koz-MC4R	**GAATTCCCCACCATGGTGAACTCCACCCAC**
BamH1 Stop-MC4R	**GGATCCTTAATATCTGCTAGACAAGTC**
HA-MC4R	**GAATTCCCCACCATGTATCCCTACGACGTACCGGAC**
MC4R-Flag	**GGATCCTTACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCATA**
MC4R-1F	**ATCAATTCAGGGGGACACTG**
MC4R-1R	**GACAGCACTACTATCTGAGT**
MC4R-2F	**ATGCTCTCCAGTACCATAAC**
MC4R-2R	**TGCAGAAGTACAATATTCAGG**

Tabelle 4: Im Rahmen unserer Studie verwendete Primer. Die Primer wurden im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der DNA verwendet.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Zur Identifizierung der Mutationen im Genom der Indexpatienten genutzte Methodik

Da die Identifizierung der vorhandenen Mutationen in der Studienpopulation nicht im Institut für Pharmakologie und Toxikologie, sondern von der klinischen Forschergruppe der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie durchgeführt wurde, soll auf die dort verwendete Methodik nur sehr kurz eingegangen werden.

Körpergewicht sowie Größe der 808 adipösen Kinder und Jugendlichen, 1040 Elternteilen sowie der normal- bis untergewichtigen Individuen der Kontrollgruppe wurden gemessen und ihre BMIs in Perzentilenkurven eingeordnet. Eine Blutentnahme folgte dieser Prozedur.

Die so gewonnenen Proben wurden einer PCR (Primer MC4R 1F/MC4R 1R und MC4R 2F/MC4R 2R, genaue Darstellung der Methodik unter 3.1.2) unterzogen und im Anschluss einer Analyse mit Hilfe der SSCP(Single-Strand-Conformation- Polymorphism) zugeführt. Die auf diese Weise detektierten Mutationen im MC4R-Gen wurden durch eine nachfolgende Sequenzierung nochmals gesichert, bevor uns die cDNA der betroffenen Patienten zur weiteren Verwendung zur Verfügung gestellt werden konnte.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR) kann man spezifische DNA Fragmente enzymatisch vervielfältigen (*Mullis und Faloona* [73]).

Im ersten Schritt wurde die zuvor von der klinischen Forschergruppe aufbereitete genomische DNA der Patienten mit Hilfe einer PCR vervielfältigt. Es wurden außerdem C- und N-terminal Schnittstellen für die später zu verwendenden Restriktions-Enzyme EcoR1 sowie BamH1 eingefügt.

Das Prinzip einer PCR soll hier noch einmal kurz erläutert werden: Der zu vervielfältigenden DNA werden sogenannte Primer (Sequenzhomologa des N- bzw. C-Terminus des jeweiligen Gens), sowie die vier Basen (Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin) in ausreichender Menge zugesetzt und der ganze Ansatz zusammen mit einer thermostabilen DNA-Polymerase (z.B. aus *Thermophilus aquaticus* (taq)), in einem Thermocycler auf über 90 °C erhitzt. Wir verwendeten hier die High-fidelity-Polymerase der Firma Roche.

Bei diesen hohen Temperaturen trennt sich der Doppelstrang. Die Primer können sich anlagern und die Polymerase beginnt zu synthetisieren. Nach einer Weile kühlt der Thermocycler die Proben auf niedrigere Temperaturen ab, die jeweiligen Einzelstränge verbinden sich zu Doppelsträngen. Dieser Abkühlung schließt sich ein erneuter Erhitzungsvorgang an. Das Ganze wird mehrere Zyklen hintereinander wiederholt, bis das gewünschte Gen in ausreichender

Konzentration vorhanden ist, um weiter behandelt zu werden. Die von uns verwendeten Primer waren im Vorfeld bei der Firma MWG-Biotech-AG bestellt und synthetisiert worden.

Pipettierschema	18,7 µl H_2O
	1,3 µl dNTP-Mix
	2,5 µl Polymerasepuffer
	0,5 µl EcoR1-Koz-MC4R
	0,5 µl BamH1-Stop-MC4R
	0,5 µl High-Fidelity Polymerase
	+ 1 µl genomische DNA

Tabelle 5: Pipettierschema für die durchgeführte PCR. Die aufgeführten Ingredienzien wurden nacheinander zusammengemischt, zuletzt erfolgte die Zugabe der Primer und der DNA-Polymerase

Im ersten Schritt wurde der Ansatz für die PCR zusammengestellt und zuletzt die genomische DNA zugegeben.

Dieser Ansatz wurde im Thermocycler zunächst für fünf Minuten auf 95°C erhitzt („hot start“), um im zweiten Schritt eine Minute bei 94 °C zu verbleiben. Im dritten Schritt wurde das Gemisch auf 55°C abgekühlt (ebenfalls eine Minute lang) um im vierten Schritt für eine Minute wieder auf 68°C erhitzt zu werden. Schritt 2-4 wurden vierzig Mal wiederholt, anschließend verblieb der Ansatz im fünften Schritt nochmals 10 Minuten bei 68 °C um dann auf Zimmertemperatur abgekühlt zu werden.

Schritt	**Temperatur**	**Dauer**	
1	95° C	5 Minuten	
2	94° C	1 Minute	
3	55° C	1 Minute	**40 Zyklen**
4	68° C	1 Minute	
5	68° C	10 Minuten	
6	21° C	Pause	

Tabelle 6: Temperatur und Dauer der PCR-Phasen. Vor Durchführung der PCR erfolgte eine Einstellung der Phasendauer, Temperatur und Zyklenanzahl im Thermocycler

3.1.3 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Nucleinsäuren können aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld, welches entlang einer Gelmatrix angelegt wird, aufgetrennt werden (*Sambrook et al*.[85]). Ihre Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode ist dabei lediglich von der Größe der Nucleinsäurefragmente abhängig. Zur Visualisierung der DNA setzt man der Gel-Lösung Ethidiumbromid zu, welches mit der DNA interkaliert und dadurch unter UV-Licht (320 nm) eine orange Fluoreszenz hervorruft.
Um das gewünschte MC4R-Gen aus dem PCR-Ansatz herausfinden zu können, mussten die vorhandenen DNA Stücke im PCR-Ansatz gel-elektrophoretisch aufgetrennt werden.
Dazu wurden 1,2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgelöst und anschließend in der Mikrowelle erhitzt.

TAE	20 mM Tris; 1mM EDTA; pH 8,0 mit Eisessig eingestellt

Tabelle 7: Zusammensetzung des TAE-Puffers.

Nach Abkühlen des Gemisches auf 50° C, wurden dem flüssigen Agarosegel 5 ml Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel anschließend in die dafür vorgesehene Kammer gegossen, wo es polymerisierte. Danach brachte man das Gel in das mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Becken ein. Die PCR-Proben wurden mit Laufpuffer versetzt (5 ml/Ansatz) und in die Geltaschen eingefüllt. Standards für 100 und 1000 kbp wurden parallel aufgetragen. Nach Anlegen einer Spannung von 90 V wanderten die Proben vom Minuspol in Richtung des Pluspols. Nach ausreichender Aufspaltung wurde unter UV-Licht die Bande mit der von uns gewünschten Größe von ca. 1000 kbp herausgesucht, welche aufgrund des parallel aufgetragenen 1000 kbp Markers leicht zu identifizieren war.

3.1.4 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Um die auf solche Art gewonnenen DNA-Fragmente nach der Agarose-Gel Analyse im Rahmen einer Klonierung weiterverwenden zu können, ist es erforderlich, die gewünschten DNA-Banden aus dem Gel zu isolieren.

Für diese Gel-Extraktion wurden die entsprechenden Banden zunächst mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarose-Gel herausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß (dessen Boden man zuvor kreuzweise eingeschnitten hatte) überführt. Das solchermaßen präparierte Gefäß wurde in ein gleichartiges (jedoch intaktes) Gefäß hineingestellt und beide Gefäße bei 13000 rpm für zehn Sekunden zentrifugiert. Dank der Zentrifugalkraft wird auf diese Weise die DNA zusammen mit dem TAE-Puffer von der Agarose-Gel-Matrix separiert und findet sich zum größten Teil am Boden des äußeren Eppendorf-Gefäßes.

3.1.5 Einbringen des Gens in den Vektor pcDNA 3.1 (Topo TA)

Bei der PCR synthetisiert die verwendete Polymerase am 3´ Ende des Amplifikationsproduktes Poly-A-Überhänge. Der linearisierte und offene TA-Vektor weist an seinem 3´ Ende komplementäre T-Überhänge auf. Eine an den Vektor gekoppelte Ligase kann das Insert so direkt in den Vektor ligieren.
Je 4 µl des zuvor aus dem Agarosegel eluierten PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl des TOPO Vektors Typ 3.1 sowie 1 µl der dazugehörigen Salzlösung versetzt und zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend in kompetente Bakterien transformiert zu werden.

3.1.6 Verdau durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, die DNA an spezifischen, palindromischen Sequenzen spalten (*Roberts et al.*[82]). Diese gerichtete DNA-Fragmentierung wird unter anderem beim Herausschneiden eines Inserts aus einem Vektor verwendet, kommt aber auch bei der Analyse von DNA zum Einsatz.
Die mit Hilfe einer DNA-Präparation gewonnenen Proben in pcDNA 3.1 (TOPO) wurden einem Verdau mit den Restriktionsendonucleasen EcoR1 und BamH1 unterzogen. Das MC4R-Gen enthält keine Schnittstelle für beide Enzyme, durch die PCR hatten wir jedoch sowohl am N- (BamH1) als auch am C-Terminus (EcoR1) je eine Schnittstelle eingefügt. So sollte gewährleistet werden, dass bei erfolgreicher PCR und Einfügung in den TOPO-TA-Vektor das Gen als Ganzes durch die Restriktionsenzyme herausgeschnitten würde. Der Versuchsansatz

bestand dabei aus je 2 µl DNA, 0,5 µl EcoR1, 0,5 µl BamH1, 1µl EcoR1- Puffer, 1µl BSA sowie 5µl H_2O. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend fand eine Auftrennung der DNA anhand von Agarose-Gel-Elektrophorese statt (siehe 3.1.3).
Die gesuchten Banden befanden sich bei 1000 kbp, sie wurden aus dem Gel herausgeschnitten und wiederum durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 13000 g die DNA eluiert.

3.1.7 Ligation der DNA in psG5

Das mit Restriktionsenzymen geschnittene und aus dem Gel eluierte, bzw. mittels PCR synthetisierte DNA-Fragment weist so genannte „klebrige Enden“ („sticky ends“) auf: Das sind Einzelstrang-Basen-Überhänge, die durch eine DNA-Ligase mit einem komplementären DNA-Fragment verknüpft werden können (*Ferretti und Sgaramella* [33]; *Wilson und Murray* [112]).
Die Ligation des MC4-Rezeptor-Gens in den Expressionsvektor psG5 erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase.
Dazu wurden je 0,5 µl der Ligase mit 1 µl Ligase-Puffer, 1 µl psG5 Vektor (nach Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoR1 und BamH1), 3,5 µl H_2O sowie 4 ml des Elutionsproduktes gemischt und im Anschluss für 16 Stunden bei 16°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 2,5 ml SOG-Medium aufgefüllt, eine Stunde bei 37°C geschüttelt und im Anschluss auf LB-Agarplatten aufgetragen.

SOG - Medium	500 ml SOB - Medium; 10 ml 1M Glucose
LB - Agarplatten	1,5 % Agar - Agar; 0,1 g/l Ampicillin in LB - Medium; pH 7,4

Tabelle 8: Zusammensetzung der Materialien SOG-Medium und LB-Agar-Platten

Nach einer Ruhezeit der Platten über Nacht bei 37°C im Inkubator wurden etwaige Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in LB-Medium überführt, woran sich eine neuerliche DNA-Präparation anschloss. Die hieraus gewonnene DNA wurde dann einem weiteren Restriktions-Verdau unterzogen (diesmal mit Apa1) und auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

LB - Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefe; 5 g/l NaCl:0,1g/l Ampicillin; pH 7.4

Tabelle 9: Zusammensetzung des LB-Mediums

Die gesuchte Bande befand sich bei ca. 800 kbp. War sie zu finden, konnte mit der jeweiligen Probe eine Maxi-DNA-Präparation (s.u.) angesetzt werden. Im Anschluss daran wurden die Proben sequenziert. Da alle unsere Patienten heterozygot für die jeweilige Mutation waren, musste auf diese Weise sichergestellt werden, dass wir auch wirklich das mutierte Gen und nicht die Wildtyp-Variante kloniert hatten.

3.1.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente wurde von der Firma MWG Biotech AG in Ebersberg durchgeführt und erfolgte in Anlehnung an die von *Sanger et al*. [86] entwickelte Nucleotid-Abbruch Methode.
Zur Vorbereitung der Sequenzierungsreaktion fällte man die DNA zunächst durch Versetzen von 2 μg/10 μl derselben mit 1 μl 3 M Na-Acetat-Lösung und 32 μl 100-prozentigem Ethanol. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 10000 g über 20 Minuten an. Die Re-Suspension des Pellet erfolgte in 200 ml 70%igem Ethanol, dieses wurde daraufhin erneut zentrifugiert und vollständig an der Luft getrocknet. Die solchermaßen vorbereiteten Proben wurden ordnungsgemäß beschriftet und zum Sequenzieren verschickt.

3.1.9 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit isolierter DNA (und messenger-RNA) können photometrisch ermittelt werden. Das Absorptionsmaximum der aromatischen Ringe von Nucleinsäuren liegt bei 260 nm, das von Aminosäuren dagegen bei 280 nm. Aus der Extinktion der zu analysierenden Nukleinsäureproben kann die Konzentration anschließend mittels des Lambert-Beer´schen Gesetzes ermittelt werden. Es gilt dabei die folgende Näherung:
Eine bei 260 nm gemessene Absorption von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 μg/ml, bei einzelsträngiger RNA von 33 μg/ml.

Der Quotient aus der gemessenen Absorption bei 260 und 280 nm kann darüber hinaus als Maß für die Reinheit der DNA verwendet werden. Reine DNA weist einen Quotienten von 1,8 auf; durch Proteine verringert sich der Extinktionsquotient entsprechend dem Grad der Verunreinigung.
Um die Extinktionsmessung durchführen zu können, wurde die Nucleotid-Lösung zuerst 1:50 mit destilliertem Wasser in einer Quarz-Küvette verdünnt. Im Anschluss konnte dann die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gegen destilliertes Wasser gemessen werden.

3.1.10 Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden

3.1.10.1 Herstellung kompetenter DH5α *E.coli* Bakterien

Unter dem Einfluss einer niedrigen Wachstumstemperatur und im Zuge einer Behandlung mit Manganchlorid und Calciumchlorid synthetisiert das Bakterium *E. coli* eine fehlerhafte Zellwand. Hierdurch wird es in die Lage versetzt, aus dem Medium freie DNA in sich aufzunehmen (*Inoue et al*.[48]).
Eine Kolonie des *E.coli*-Bakterienstammes DH5α wurde zunächst von einer LB-Agar-Platte in SOB-Medium überführt und bei 17°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,6 vermehrt (logarithmische Wachstumsphase).

SOB-Medium	2 % Trypton ; 0,5 % Hefeextrakt ; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; pH 7,0

Tabelle 10: Zusammensetzung des SOB-Mediums

Im Anschluß erfolgte eine 10-minütige Kühlung auf Eis, bevor die Sedimentation bei 2100 g und 4°C über 10 Minuten stattfand. Das auf diesem Wege erhaltene Pellet resuspendierte man in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer und inkubierte die Lösung für weitere 10 Minuten bei 4°C. Nach einer nochmaligen Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml Transformationspuffer versetzt mit 7 % DMSO aufgenommen, in 50 µl Aliquots aufgeteilt, schockgefroren und schließlich bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

Transformationspuffer	10 mM Hepes; 15 mM $CaCl_2$; 250 mM KCl; 55 mM $MnCl_2$; pH 6,7 mit KOH einstellen

Tabelle 11: Zusammensetzung des Transformationspuffers

3.1.10.2 Transformation kompetenter DH5α *E. coli* durch Hitzeschock

Um einen größeren Anteil an rekombinanten Plasmiden zu erhalten, wurde die sequenzierte DNA in kompetente Bakterien eingeschleust und dort vermehrt. Dabei kam die Hitzeschock-Methode zur Anwendung: Durch Erhitzen der Bakterien wird deren Membran flüssiger, so dass die DNA in das Innere des Bakteriums diffundieren kann. Im Anschluss erfolgt die Selektion der mit dem gewünschten Plasmid transformierten Bakterien mittels eines auf dem Plasmid enthaltenen Antibiotika- Resistenz-Gens.

Im Einzelnen wurden 50 µl kompetente DH5α *E.coli* mit 0,3-0,5 µg Plasmid-DNA versetzt und über 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im 42°C warmen Wasserbad erfolgte dann der Hitzeschock über 35 Sekunden hinweg. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubationszeit bei 4°C gab man jeweils 250 µl SOG-Medium zu den Ansätzen und ließ diese für ca. eine Stunde bei 37°C schütteln. Zuletzt wurden die derart vorbereiteten Proben auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht (oder aber für mindestens 8 Stunden) bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Zeigten sich am nächsten Morgen Kolonien auf einer Platte, so wurden diese mit Hilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in je 10 ml LB-Medium überführt.

3.1.10.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um Plasmide zu vermehren kultiviert man transformierte Bakterienkulturen und isoliert anschließend die niedermolekulare Plasmid-DNA mit Hilfe eines alkalischen Lyse-Verfahrens (*Sambrook et al*.[85]). Bei einer Midi- oder Maxi-Präparation setzt man im Gegensatz zur Mini-Präparation lediglich mehr Bakteriensuspension ein.

3.1.10.3.1 Mini-Präparation

Wie oben bereits beschrieben, wurden Bakterienkolonien mit Hilfe von Pipettenspitzen von der Oberfläche einer Agarplatte abgehoben, in geeignete Gefäße mit je 10 ml mit Ampicillin versetztes LB-Flüssigmedium überführt und über einen Zeitraum von mindestens acht Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation von je 2 ml der Bakterien-Suspension über ca. 10 Minuten bei 13000 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl des S1 Puffers durch vortexen der Probe re-suspendiert.

S1 (Re-Suspensionspuffer)	50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNAse A; pH 8,0

Tabelle 12: Zusammensetzung des Re-Suspensionspuffers

Nach Zugabe von wiederum 200 ml des S2 Puffers erfolgte eine fünfminütige Lagerung auf Eis, bevor man 200 ml des Puffers S3 zupipettieren konnte.

S2 (Lysispuffer)	0,2 M NaOH; 1% SDS
S3 (Neutralisierungspuffer)	2,8 M KCl; pH 5,1

Tabelle 13: Zusammensetzung der Puffer S2 und S3

Bei nochmaliger, diesmal 10 Minuten langer Kühlung auf Eis, wurden die Proteine durch S3 denaturiert und dann erneut bei 13000 g für 10 Minuten pelletiert. Den dabei entstehenden Überstand versetzte man mit 1 ml 100%igem Ethanol bevor man ein drittes Mal zentrifugierte (s.o.). Das auf diese Art entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. War das Pellet vollständig an der Luft getrocknet, konnte es in 30 µl Wasser aufgenommen und anschließend im Kühlschrank aufbewahrt werden.

4.1.9.3.2 Midi-Präparation

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen verwendeten wir zu Beginn dieser Arbeit das Maxi-Präparations-Kit der Firma Quiagen, später stiegen wir auf ein vergleichbares aber etwas günstigeres Produkt, das „Plasmid-DNA-Purification-Kit“ der Firma Macherey-Nagel um. Diese Aufreinigungsmethode beinhaltet im Vergleich zur Mini-Präparation einen zusätzlichen Reinigungsschritt in Form einer Anionen-Austauscher-Säule.
Ein mit Hilfe der Mini-Präparation gewonnenes Plasmid wurde dafür wie oben dargelegt in kompetente DH5α *E.coli*-Bakterien hinein transformiert. Anstatt diese Bakterien aber auf LB-Agarplatten auszustreichen, überführte man sie direkt in 250 ml LB-Flüssigmedium (mit Ampicillin versetzt) und bebrütete sie in dieser Form bei 37°C und 225 rpm über mindestens acht Stunden im Schüttelinkubator. Die so gewonnene Bakteriensuspension zentrifugierte man am nächsten Tag bei 5000 g und 4°C über 15 Minuten. Im Anschluss daran goss man den Überstand ab und re-suspendierte das Pellet unter längerem vortexen in 8 ml S1 Puffer. Danach wurde der Puffer S2 zugegeben, die Probe für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen und mit 4 ml des kalten S3 Puffers versetzt. Es folgte eine Trennung der DNA von denaturierten Bakterienproteinen mittels eines Faltenfilters. Den dabei entstehenden klaren Durchfluss gab man auf eine im Vorfeld mit 2,5 ml N2-Puffer äquilibrierte Nucleobond-Säule.

N2	100 mM Tris; 15 % Ethanol; 900 mM Triton - X - 100; pH 6,3 eingestellt mit H_3PO_4

Tabelle 14: Zusammensetzung des Puffers N2

Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml Puffer N3 eluierte man die DNA mit 5 ml N5 Puffer und präzipitierte sie mit 3,5 ml Isopropanol.

N3	100 mM Tris; 15% Ethanol; 1,15 M KCl ; pH 6,3 eingestellt mit H_3PO_4
N5	100 mM Tris; 15 % Ethanol;1,15 M KCl ; pH 8,5 eingestellt mit H_3PO_4

Tabelle 15: Zusammensetzung der Puffer N3 und N5

Nun wurde erneut über 30 Minuten bei 4°C und 15000 g zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die Proben nochmals mit 70%igem Ethanol aufgeschüttelt, es schloss sich dieser Prozedur eine erneute Zentrifugation (30 Min bei 11000 g) an. Zu guter letzt wurden die Niederschläge an den Wänden der Gefäße (nach Abgießen des Überstandes und einer gewissen Zeit des Trocknens an der Luft) in einer angemessenen Menge TE-Lösung aufgenommen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Sowohl die COS7-, als auch die HEK293-Zellen wurden in 75 cm^2 Plastik-Zellkulturflaschen mit je 15 ml Medium ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Um die adhärenten Zellen vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen sowie gleichzeitig zu separieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt und anschließend zweimalig mit PBS gewaschen. Die danach noch vorhandenen Zell-Zell-Interaktionen löste man mit Hilfe von 2 ml Trypsin, welches für 0,5 bis 4 Minuten bei 37°C auf den Zellen belassen wurde. Danach stoppte man die Protease-Reaktion durch Zugabe von 8 ml des jeweiligen Kulturmediums, separierte die Zellen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren und überführte jeweils einen Teil dieser Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium. Zur Vorbereitung auf die funktionellen Untersuchungen wurden die Zellen auf 6- bzw. 12-Loch-Platten ausgesät.

3.2.2 Kryokonservierung kultivierter Zellen

Zellen können durch das Verfahren der Kryokonservierung über mehrere Jahre unbeschadet gelagert werden. Um bei dem Prozess des Einfrierens die Bildung von Wasserkristallen in der Membran und damit die Zerstörung der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen in einer DMSO-haltigen Lösung mit einer Temperatur-Erniedrigung von 1°C/min eingefroren.

Im Einzelnen erfolgte zunächst eine Trypsinisierung der Zellen in einer 75 cm^2 Flasche mit anschließender Pelletierung durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 g.
Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 4 ml Medium und 10 % DMSO re-suspendiert, bevor 1 ml Aliquots in einem mit Isopropanol aufgefüllten Gefäß auf 80°C heruntergekühlt werden konnten. Zuletzt überführte man die Aliquots in flüssigen Stickstoff, wo sie für längere Zeit lagerten.

3.2.3 Transiente Transfektion von COS7-Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung der jeweiligen Mutanten wurden diese in COS7-Zellen transient exprimiert.
Das Prinzip der transienten Transfektion mit Hilfe eines poly-kationischen, lipophilen Transfektions-Mediums wie Metafectene oder Fugene 6 beruht auf der Einschleusung der für das gewünschte Protein kodierenden DNA in die Zelle mit anschließender Expression derselben im *In vitro*-Zellsystem.
Dazu wurden die Zellen in einer 12-Loch-Platte (2 *10^5 Zellen/Loch) am Tag vor der Transfektion ausgesetzt und über Nacht bei 37° C und 5 % CO_2 im Inkubator kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden dann die entsprechende DNA sowie Fugene 6-Transfektionsreagenz im Verhältnis 1:3 in DMEM-Medium vermischt und nach zwanzig Minuten Inkubationszeit auf die Zellen gegeben (1 µg DNA/Loch). Diese Mischung wurde über Nacht auf den Zellen belassen und am Folgetag gegen neues DMEM-Vollmedium ausgetauscht.
Zu späterem Zeitpunkt der Untersuchungen wurde beim Transfektionsreagenz aus Kostengründen auf Metafectene umgestellt, die Transfektion hiermit erfolgte ähnlich wie mit Fugene 6, es wurden jedoch nur jeweils 1,5 µg DNA/Loch (ebenfalls im Verhältnis 1:3) verwendet. Die Transfektionsreagenz-DNA-Mischung konnte dabei im Anschluss nur sechs Stunden auf den COS7-Zellen belassen werden, da wir nach längeren Zeiträumen ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachten konnten.

3.3 Funktionelle Charakterisierung der Rezeptormutanten

Mutationen in Rezeptoren können diese auf verschiedenen Ebenen beeinflussen. So kann zum Beispiel eine strukturelle Veränderung sowohl die intrazelluläre Rezeptor-Protein-Synthese, den Transport der Rezeptor-Proteine vom Ort der Herstellung an die Zelloberfläche, als auch die Signaltransduktion oder die Bindung der spezifischen Liganden beeinträchtigen.
Unsere Schwerpunkte setzten wir hierbei an verschiedenen Stellen. Mit Hilfe des cAMP-Akkumulations-Assay wurde ein Teil der Signaltransduktion der mutierten Melanocortin-4-Rezeptoren eingehender untersucht. Zelloberflächen-ELISA und Immunfluoreszenz ließen uns Aussagen darüber treffen, ob Transport und Einbau der veränderten Rezeptor-Proteine in die Zellmembran regelhaft erfolgten. Die interessante Frage, ob Melanocortin-Rezeptoren mit Rezeptoren der eigenen Familie oder anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren di- oder oligomerisierten, und ob dies auch bei mutierten Rezeptor-Proteinen der Fall sein könnte, führten uns dazu, einige exemplarische Experimente mit der FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) Technik durchzuführen (welche hier jedoch nicht dargestellt werden soll).

4.3.1 cAMP-Akkumulations-Assay

Mit Hilfe eines cAMP-Akkumulations-Assay können relative Veränderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration, wie sie durch Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors gegenüber dem Basalwert (normale Konzentration von cAMP ohne Rezeptor-Aktivierung) entstehen, bestimmt werden.
Das Prinzip dieses Versuches besteht darin, die mit einem G-Protein gekoppelten-Rezeptor transfizierten Zellen mit ^{3}H-markiertem Adenin zu inkubieren. Dieses Adenin wird von den Zellen zu ATP verstoffwechselt, welches nach Stimulation des Rezeptors und Aktivierung der Adenylylcyclase durch das G_s-Protein in cAMP überführt werden kann.
Der intrazelluläre Abbau von cAMP wird dabei durch Zugabe von 3-Isobutyl-1 Methylxanthin verhindert, welches die abbauenden Phosphatdiesterasen blockiert. Im Anschluss wird sich die Eigenschaft zyklischer Nucleotide zu Nutze gemacht, selektiv an Aluminiumoxid zu binden, indem man sie

säulenchromatographisch von den verwandten Nucleotiden Adenin, Adenosin, ATP, ADP sowie AMP abtrennt.

3.3.1.1 Inkubationsansatz

Die 48 Stunden zuvor mit einer MC4R-Rezeptormutante transfizierten Zellen (s.o.) wurden mit 2 μCi /ml ^{3}H-Adenin über Nacht kultiviert (mindestens jedoch über einen Zeitraum von 18 Stunden), und am darauf folgenden Tag zunächst nach Absaugen des radioaktiven Mediums unter einem Abzug mit DMEM-Medium ohne Zusätze gewaschen.
Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen in je 1 ml DMEM + 1mM IBMX pro Loch. Hierbei wurden für die Dosis-Wirkungskurven Duplikate in einer dekadischen Verdünnungsreihe von 10 μM bis 1 nM α-MSH angesetzt und anschließend für eine Stunde bei 37° im CO_2 Inkubator ruhen gelassen.
Nach abgeschlossener Stimulation erfolgte der Zellaufschluss mit 1 ml 5%iger Trichloressigsäure, welche 1mM ATP sowie 1mM cAMP enthielt.

Lysis-Lösung	5 % Trichloressigsäure,1 mM ATP, 1 mM cAMP

Tabelle 16: Zusammensetzung der Lysis-Lösung

Zunächst wurden alle Rezeptormutationen nur mit α-MSH stimuliert, zu späteren Zeitpunkten erfolgte jedoch eine Co-Stimulation mit 10 nM AGRP und 10 nM SHU9119 sowie eine alleinige Stimulation mit ACTH in einer dekadischen Verdünnung zwischen 100 nM und 10 pM .

3.3.1.2 Säulentrennung

Die Säulentrennung erfolgte an vorbereiteten Dowex-Säulen (AG50W-X8, Kationenaustauscher, 2g/Säule, Säulendurchmesser 8 mm) und Aluminiumoxid-Säulen (1,5 g/Säule, Säulendurchmesser 10 mm), welche von uns in regelmäßigen Abständen ausgetauscht und durch Neue ersetzt wurden. Zuerst begann man mit der Regeneration der Aluminiumoxid-Säulen (aufgrund des längeren Zeitaufwandes), indem man je 10 ml des Tris/HCl Puffers durch jedes Säulchen laufen ließ.

Tris / HCl	0,5 M , pH 7,4

Tabelle 17: Zusammensetzung des Tris/HCl-Puffers

Anschließend gab man auf jede Säule zweimal je 5 ml H_20, um zuletzt je 5 ml Imidazol-Puffer über die Säulen laufen zu lassen.

Imidazol-Puffer	0,1 M , pH 7,4
HCl	1 M

Tabelle 18: Zusammensetzung der HCl-Lösung sowie des Imidazol-Puffers

Es folgte die Regeneration der Dowex-Säulchen mit je 5 ml HCl/Säule. Nun konnte man die wie unter Punkt 4.3.1.1 beschrieben aufbereiteten Proben vorsichtig auf die Dowex-Säulen geben und im Anschluss mit 2 ml H_2O waschen.

Schritt 1	Regeneration der Alu-Säulchen mit je 10 ml Tris/HCl
Schritt 2	2 mal je 5 ml HCl auf jedes Aluminium-Säulchen
Schritt 3	10 ml Imidazol-Puffer je Aluminium-Säule
Schritt 4	Regeneration der Dowex-Säulen durch je 5 ml HCl/Säule
Schritt 5	Gabe der Proben auf die Dowex-Säulen, waschen mit je 2 ml H_2O
Schritt 6	Platzierung des Säulenhalters mit den Dowex-Säulen auf den Halter mit den Aluminiumoxid-Säulen
Schritt 7	Waschen mit je 10 ml H_2O, anschließend Entfernung der Dowex-Säulen
Schritt 8	Waschen der Alu-Säulchen mit je 10 ml H_2O
Schritt 9	cAMP-Elution mittels 5 ml Imidazol-Puffer je Säule in Szintillationsgefäße
Schritt 10	Zugabe von je 10 ml Rothiszint, Messung im Szintillationszähler

Tabelle 19: Die einzelnen Schritte der Säulenbeschickung beim cAMP-Akkumulations-Assay. Teilweise erfolgten einzelne Schritte gleichzeitig, so z.B. die Säulenregeneration von Aluminium- und Dowex-Säulen. Vor erneutem Verschliessen wurden die Dowex-Säulen mit HCL regeneriert, die Alu-Säulen mit TRIS/HCl und Wasser.

Danach wurden die Halter mit den Dowex-Säulen auf die Halter der Aluminiumoxid- Säulen platziert, so dass das Filtrat der erstgenannten direkt in eine der AlO_2- Säulchen gelangte. Es folgte ein neuerlicher Waschgang mit je 10 ml H_2O, woraufhin die Dowex-Säulchen entfernt, und nach einer neuerlichen Regeneration mit je 5 ml HCl befüllt und verschlossen werden konnten.
Die Aluminiumoxid- Säulchen wurden nun ebenfalls noch einmal mit je 10 ml H_2O gewaschen. Im Nächsten Schritt erfolgte die cAMP-Elution durch Gabe von je 5 ml der Imidazol-Lösung auf jede Säule, das hierbei gewonnene Filtrat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen und beschriftet. Nach Zugaben von je 10 ml Szintillationslösung (Rothiszint) pro Gefäß wurden die Proben im Szintillationszähler ausgemessen und aus den hierbei gewonnenen Werten mit Hilfe des Programmes Graph-Pad-Prism Konzentrations-Wirkungs-Kurven errechnet.

.

3.3.2 Immunologische Untersuchungen

3.3.2.1 Immunfluoreszenz an intakten Zellen zur Darstellung der Plasmamembraninsertion

Mit Antikörpern, die gegen den Rezeptor-N-Terminus gerichtet sind, lässt sich die Expression von Rezeptoren in der Plasmamembran von transfizierten Zellen zeigen.
Dem Wildtyp-MC4R sowie einigen ausgewählten Mutanten mit deutlichem Funktionsausfall im cAMP-Akkumulations-Assay wurde ein N-terminales HA-Epitop einkloniert (siehe oben), um mit dessen Hilfe den Rezeptor in der Membran nachweisen zu können. Im Anschluss daran wurden die mit einem HA-Epitop versehenen Rezeptormutationen in HEK293-Zellen exprimiert, welche auf Glasplättchen in 6-Loch-Platten ausgesät worden waren. Die Transfektion erfolgte, wie oben bereits beschrieben, unter Zuhilfenahme von Metafectene-Transfektionsreagenz.
Drei Tage nach erfolgter Transfektion wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml PBS/Vertiefung gewaschen und für eine halbe Stunde mit 1ml 4%iger Formaldehydlösung in PBS pro Loch fixiert.

Fixierungslösung	4 % Formaldehyd in PBS

Tabelle 20: Zusammensetzung der Fixierungslösung

Nach der Fixierung erfolgte ein weiterer Wasch-Schritt, infolge dessen jedes Loch zweimal mit je 2 ml PBS gespült wurde. Mit 2 ml 10%igem fötalen Kälberserum in Earles-MEM je Loch wurden danach unspezifische Bindungsstellen blockiert, wofür der ganze Ansatz eine Stunde im Inkubator bei 37°C zum Stehen kam. Nun konnte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (10 µg/ml Anti-HA-Antikörper in Earles-MEM) für zwei Stunden bei 37°C erfolgen. Um den Anteil an ungebundenem Antikörper zu entfernen, musste im Anschluss jedes Loch dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen werden, woraufhin der Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG, FITC-markiert) in einer Verdünnung von 1:200 für eine Stunde bei 37°C im Inkubator einwirken konnte. Nach nochmaligem Waschen mit PBS (3 Mal je 2ml/Loch) wurden die Glasplättchen mit Hilfe des Fluoromount-Eindeckmediums auf Objektträger aufgebracht und anschließend unter einem konfokalen Lasermikroskop untersucht.

3.3.2.2 Bestimmung der Zelloberflächen-Expression von ausgewählten Mutationen des Melanocortin-4-Rezeptors mittels ELISA

Zur Bestimmung der Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche können gegen den N-Terminus des Rezeptors gerichtete Antikörper genutzt werden. Falls eine solche Möglichkeit nicht zur Verfügung steht, kann der Rezeptor mit einem N-terminalen Epitop (z.B. Hämagglutinin (HA)), gegen welches Antikörper käuflich zu erwerben sind, versehen werden. Hierbei sollte sichergestellt sein, dass das artifizielle Epitop nicht mit der Rezeptorfunktion interferiert.
Ausgewählte Rezeptormutationen, bevorzugt solche mit einem deutlichen Funktionsausfall im cAMP-Akkumulations-Assay, aber auch der Wildtyp-MC4R sowie Mutationen mit Aktivitätserhöhung in der funktionellen Untersuchung, wurden zu diesem Zweck mit einem HA-Tag versehen (Verfahren siehe oben).
COS7-Zellen wurden in 48-Loch-Platten ausgesetzt und mit Hilfe von Fugene 6-Transfektionsreagenz (bzw. zu späteren Zeitpunkten mit Metafectene) und 0,5 µg DNA je Loch im Verhältnis von 3:1 (Transfektionsreagenz:DNA) transfiziert.

Im Anschluss daran wurde der ganze Ansatz für drei Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Am eigentlichen Versuchstag erfolgte dann zunächst eine zweimalige Waschung mit je 0,5 ml PBS/Loch, woran sich die halbstündige Fixierungsphase mit je 250 µl 4%igem Formaldehyd in PBS/Loch bei Zimmertemperatur anschloss. Nach nochmaligem Waschen in PBS (zweimal je 0,5 ml je Loch) wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch 0,5 ml 10%iges fötales Rinderserum in DMEM pro Loch für eine Stunde bei 37°C blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 100 µl je Loch des Biotin-markierten Anti-HA-Antikörpers in einer Konzentration von 1 µg/ml in DMEM Vollmedium für zwei Stunden bei 37°C. Auch hieran schloss sich eine dreimalige Waschung mit je 400 µl PBS/Loch an, bevor jeweils 100 ml je Loch eines Streptavidin-POD-Konjugates in einer Verdünnung von 1:5000 in DMEM-Vollmedium zugegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert werden konnten.

Substratpuffer	0,1 M Citronensäure, 0,1 M Na_2HPO_4 ,pH 5,2 ;in H_2O
Substratlösung	25 ml Substratpuffer, 10 mg Phenylendiamin, 20 µl H_2O_2

Tabelle 21: Zusammensetzung von Substratpuffer und -Lösung

Nach einem letzten Waschgang mit dreimal je 400 µl PBS pro Loch, erfolgte dann die Enzymreaktion mit 300 µl Substratlösung/Loch, welche nach zehn Minuten durch Zugabe von 100 µl HCl (1M) mit 0,05 M Na_2SO_3 /Loch gestoppt wurde.

Stoplösung	1 M H_2SO_4 , 0,05 M Na_2SO_3 ;in H_2O

Tabelle 22: Zusammensetzung der Stop-Lösung

Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer. Die hierbei gewonnenen Extinktionswerte wurden ausgewertet und

mit Hilfe des Programmes Graph-Pad-Prism zu Blockdiagrammen zusammengeführt.

4 Ergebnisse

4.1 In der Studienpopulation entdeckte MC4R-Rezeptormutanten

4.1.1 Kinder und Jugendliche mit extremer Adipositas

In dieser Studiengruppe wurden mit Hilfe der eingesetzten molekular-genetischen Methoden (s.o.) insgesamt achtzehn nicht-stille MC4R-Gen-Varianten in 43 der 808 untersuchten adipösen Kindern und Jugendlichen detektiert (nicht-still bedeutet, dass der Austausch nicht zwischen Aminosäuren derselben Untergruppen stattfindet, also eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins zur Folge hat).

Unterschieden werden konnten hierbei zwei Frameshift-Mutationen, eine Nonsense-Mutation sowie fünfzehn Missense-Mutationen. Dabei führen die Frameshift-, sowie die Nonsense-Mutationen vermutlich zur Unterbrechung der Transkription im N-terminalen Bereich (Y35X), in der fünften (codon 211 del ctct) und sechsten (Codon 250 del GA) Transmembran-Domäne.

Neun der oben erwähnten Missense-Mutationen (S30F, D37V, I121T, S127L, R165W, G181D, G252S, A244E, I317T) führen zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch, weitere sechs (P78L, T112M, P230L, V95I sowie die beiden Polymorphismen V103I, I251L) kodieren einen konservativen Austausch.

Die bereits im Vorfeld als Polymorphismen bekannten Varianten ohne nachweisbaren funktionellen Vorteil, V103I und I251L, konnten in 13 bzw. 9 der untersuchten adipösen Individuen entdeckt werden.

Auch die Nonsense-Mutation Y35X und die Missense-Mutation D37V waren aus vorangegangenen Studien bekannt und fanden sich beide in denselben fünf adipösen Studienteilnehmern. Wie parentale Transmissions-Muster zeigen, formen diese beiden Varianten einen Haplotyp.

Je zweimal in der Population vorhanden waren die Missense-Mutationen S30F, S127L und R165W, sowie die Frameshift-Mutation L211fsX216. Alle weiteren gefundenen Varianten, darunter neun Missense- und eine Frameshift-Mutation traten nur ein Mal in der untersuchten Gruppe auf.

Drei der Index-Patienten waren kombiniert-heterozygot für zwei Missense-Mutationen:

Der erste für S127L und R165W, der zweite für S30F und G252S, der dritte für G181D und I251L. Der Haplotyp S127L und V103I fand sich bei einer Patientin und deren Mutter.

4.1.2 Erwachsene in der unter/normalgewichtigen Kontrollgruppe

Unter den 231 untergewichtigen und den 96 normalgewichtigen Studenten, welche die Kontrollgruppe formten, fanden sich insgesamt acht Träger der Polymorphismus-Variante V103I. Auch der andere Polymorphismus I251L konnte sieben Mal in dieser Gruppe detektiert werden, in einer Person fanden sich beide Varianten.
Keinerlei Nonsense- oder Frameshift-Mutationen konnten in dieser Studiengruppe identifiziert werden, eine zu einem konservativen Aminosäure-austausch führende Missense-Variante (T178M) wurde in einem normal-gewichtigen Mitglied der Kontrollgruppe entdeckt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der MC4R-Mutationen mit Hilfe des cAMP-Akummulationsassays (Stimulation mit α-MSH)

4.2.1 Wildtyp und Polymorphismus V103I

Um einen Vergleichswert für die Funktion unserer Rezeptormutanten zu erhalten, untersuchten wir zunächst das Wildtyp-Allel sowie die weit verbreitete Variante V103I, bei der das Valin an Stelle 103 durch ein Isoleucin ersetzt ist. Beide Rezeptoren ließen sich im cAMP-Akkumulations-Assay gut durch α-MSH stimulieren und zeigten einen ähnlichen Verlauf ihrer Dosis-Wirkungskurven. Diese beiden Rezeptorvarianten waren bereits von anderen Arbeitsgruppen mit

Basenposition	Aminosäuresequenz	Basalwert	E_{max}	EC_{50}
Wildtyp		**1,0**	**9,8+/ - 0,9**	**51+/ - 18 nM**
307 G > A	**V103I**	**0,95+/ - 0,1**	**8,9+/ - 1,3**	**29+/ - 15 nM**
	pSG 5 *	**0,5+/ - 0,1**	**0,6+/ - 0,4**	

Tabelle 23: Ergebnisse des cAMP-Akkumulations-Assay für Wildtyp-MC4R und Polymorphismus V103I. Berücksichtigt wird außerdem das Ergebnis bei Transfektion mit pSG5 ohne eingefügtes MC4R-Fragment. Procedere siehe Abbildung 9.

vergleichbaren Ergebnissen untersucht worden. Da jedoch in der unter- bis normalgewichtigen Kontrollgruppe proportional deutlich mehr Träger der Mutation V103I detektiert werden konnten als in der adipösen Population läge der Gedanke nahe, diese Mutation könnte einen protektiven Effekt im Hinblick auf das Risiko eine Fettsucht zu entwickeln ausüben. Mit dieser Arbeitshypothese wurde der Polymorphismus deshalb einige Zeit später erneut von unserer Arbeitsgruppe untersucht und ein solcher Effekt postuliert.

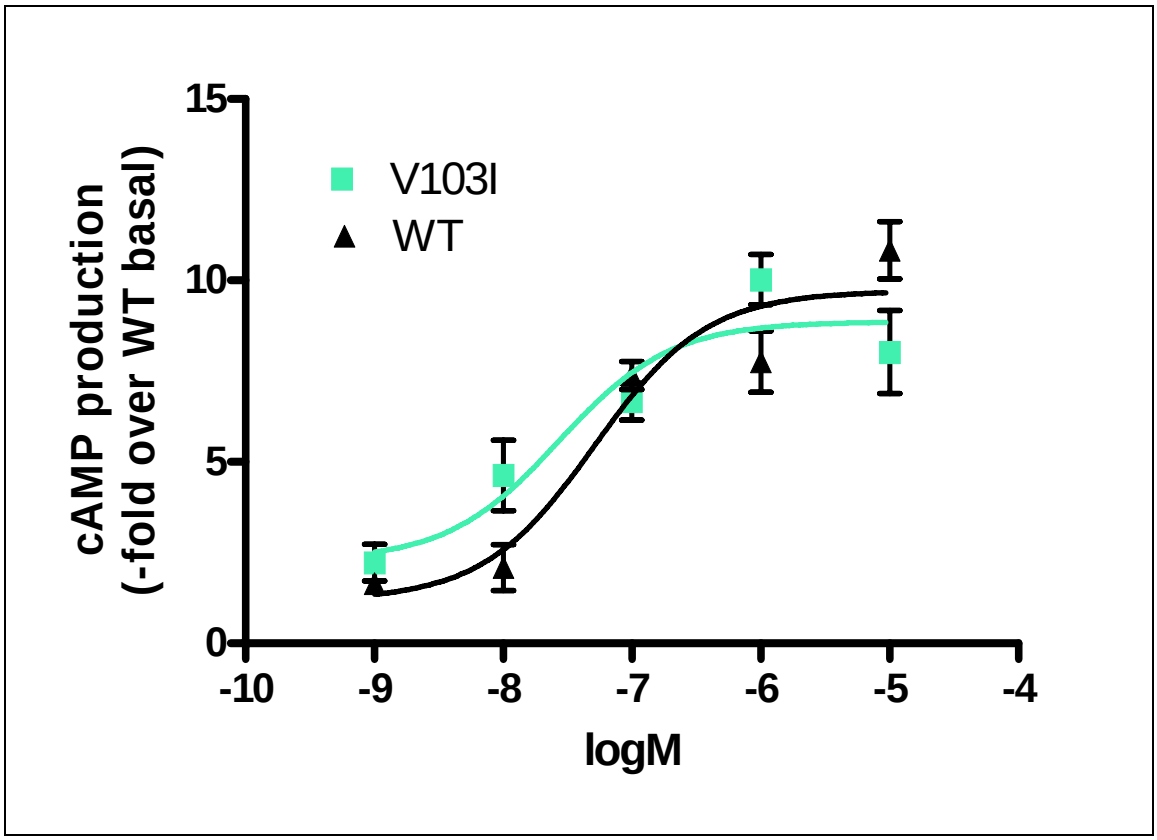

Abbildung 9: Ergebnisse des cAMP-Akkumulationsassay für Wildtyp-MC4R und Polymorphismus V103I im Überblick.
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Zur Kontrolle erfolgte die Transfektion einiger Zellen nur mit dem Expressionsvektor psG5 ohne eingefügtes Gen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als 3 unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt.

Wie man Abbildung 9 sowie der zugehörigen Tabelle entnehmen kann, lässt sich der Polymorphismus in niedrigeren Konzentrationsbereichen etwas besser stimulieren als der Wildtyp-Rezeptor, der Kurvenverlauf wird jedoch im maximalen Stimulationsbereich flacher. Dieses Verhalten lässt sich auch an

den Werten in der Tabelle ablesen, der EC_{50} (also die Konzentration von α-MSH, bei der eine halbmaximale Stimulation des Rezeptors erreicht werden kann) von V103I ist etwas niedriger als der des Wildtyp-Rezeptors, die maximale Stimulation E_{max} fällt ebenfalls etwas niedriger aus. Der Rezeptor schien also auf niedrige Dosen des Hormons sensitiver zu reagieren, was an einen protektiven Mechanismus denken lassen könnte.

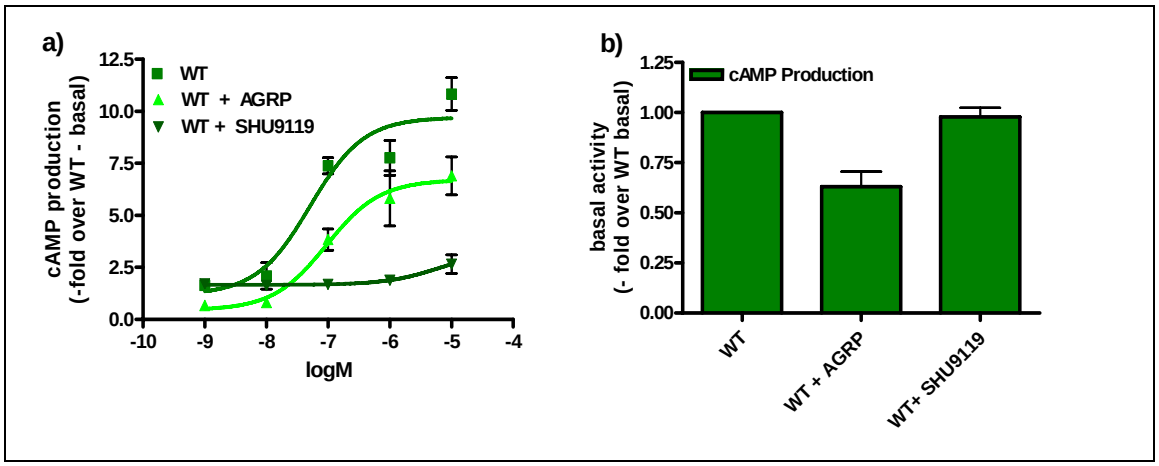

Abbildung 10: Die Wirkung der Antagonisten AgRP und SHU9119 auf a) das Verhalten des MC4R Wildtyp-Rezeptors unter Stimulation mit α-MSH sowie b) den Basalwert
a)Verhalten des MC4R-WT im cAMP-Akkumulationsassay unter Stimulation mit α-MSH sowie Zugabe der Antagonisten AgRP und SHU9119. Die beiden Antagonisten wurden in gleich bleibender Konzentration von 10 nM zugegeben, die Dosis des α-MSH kontinuierlich gesteigert.
b)Verhalten der basalen Aktivität des Wildtyp-Rezeptors bei Zugabe der beiden Antagonisten ohne eine erfolgte Stimulation durch den Agonisten. Alle Werte wurden auf den Basalwert des WT bezogen. Den Werten liegen mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente zu Grunde.

Weitere Ergebnisse unserer Untersuchungen mit Hilfe des cAMP-Akkumulations-Assay beziehen sich auf das Verhalten des Wildtyp-Rezeptors unter Antagonisten-Einwirkung. Hierbei verwendeten wir zum einen den natürlich vorkommenden Antagonisten am MC4R, AgRP, sowie das sehr spezifisch an MC4R und MC3R antagonisierende, synthetisch hergestellte SHU9119. Da dem AgRP in vorangegangenen Studien ein inverser Agonismus nachgewiesen worden war, interessierte uns in diesem Zusammenhang besonders auch die Wirkung dieses Stoffes auf die basale Aktivität des Rezeptors. Wie in Abbildung 10 erkennbar, ist der basale cAMP-Spiegel des Wildtyp-Rezeptors unter AgRP reduziert, während er durch SHU9119 nicht beeinflusst zu werden scheint. In dem Konzentrations-Wirkungs-Diagramm

erscheint die AgRP-Kurve nach unten und rechts verschoben, SHU9119 vermindert den E_{max}-Wert deutlicher.

4.2.2 Loss-of-function Mutationen

Im Rahmen der funktionellen Studien mit Hilfe des cAMP-Akummulations-Assays unter Stimulation mit dem natürlichen Agonisten am MC4R, α-MSH, zeigte sich bei vier der untersuchten Mutationen (darunter die zwei Frameshift-Mutationen, sowie zwei Missense Mutationen) ein kompletter Ausfall der Rezeptorfunktion. Trotz einer Zugabe hoher Konzentrationen des α-Melanozyten-stimulierenden-Hormons stiegen die Konzentrationen des cAMP nicht wesentlich über die basal (ohne Stimulation) bereits vorhandenen Werte an.

Basenpaare	Aminosäuresequenz	Basalwert	E_{max}	EC_{50}
283 G > A	V95I	1,2 +/- 0,8	1,7 +/- 0,6	n. e.
542 G > A	G181D	0,7 +/- 0,1	1,1 +/- 0,1	n. e.
631_634del	L211fsX216	0,5 +/- 0,3	0,5 +/- 0,1	n.e.
750_751del	L250fsX284	0,4 +/- 0,2	1,3 +/- 0,6	n.e.
282 C >G	S94R	1 +/- 0,2	1,2 +/- 0,3	n. e.

Tabelle 24: Das Verhalten der Mutationen V95I, G181D, 631_634del, 750_751del und S94R im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum MC4-Wildtyp-Rezeptor. COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt.

Die betroffenen Rezeptoren reagierten also nicht auf die Stimulation mit den betreffenden Liganden. Aufgrund dieser Tatsache können für diese Rezeptorvarianten keine validen EC_{50}-Werte ermittelt werden. Bei der Untersuchung dieser vier Mutationen stellte sich also das Ergebnis ein, welches man im Grunde für alle gefundenen Mutationen postuliert hätte, nämlich ein kompletter Funktionsverlust des Rezeptors, welcher zumindest partiell in der Lage wäre, den adipösen Phänotyp der betroffenen Individuen zu erklären.

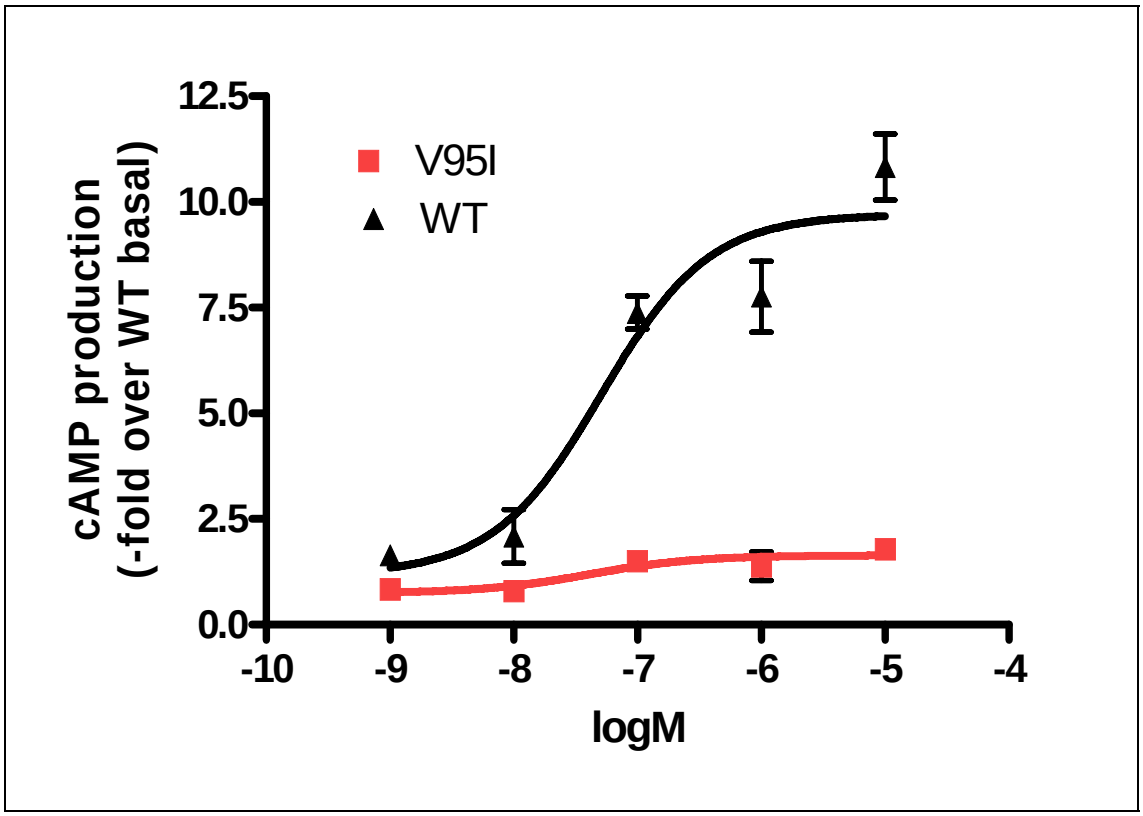

Abbildung 11: Das Verhalten der Missense-Mutation V95I im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor.
COS7 Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt.

In Abb. 11 und der obigen Tabelle wird deutlich, dass V95I (lokalisiert in der zweiten Transmembrandomäne) sich durch α-MSH kaum stimulieren lässt. Der maximal zu erreichende Wert liegt nur unwesentlich über dem Basalwert ohne hormonelle Stimulation, ein EC_{50} Wert lässt sich aufgrund dessen nicht zuverlässig bestimmen. Der Rezeptor ist also nicht in der Lage, das durch α-MSH gegebene Signal von außen in ein intrazelluläres Signal im Sinne eines cAMP-Anstiegs zu übersetzen.

Bei G181D (siehe Abb. 12) handelt es sich ebenfalls um eine Missense-Mutation, welche in der vierten Transmembrandomäne des Rezeptorproteins angesiedelt ist.

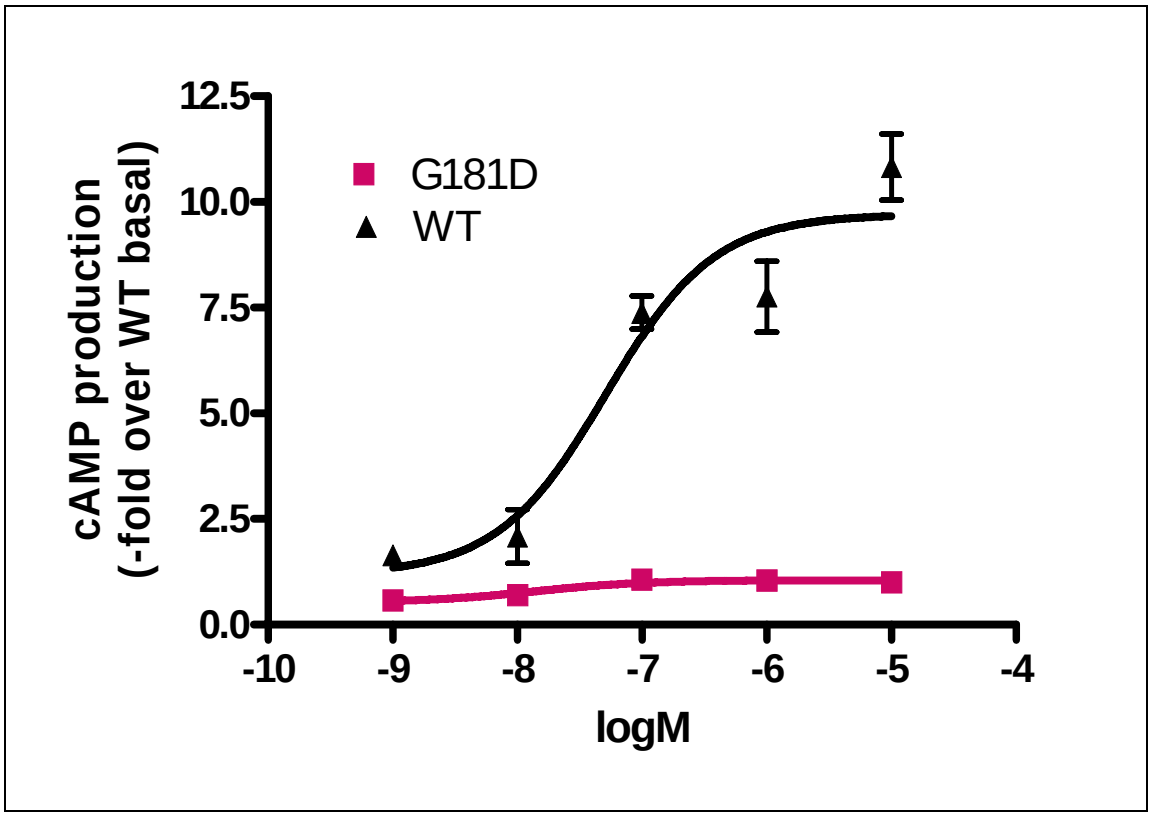

Abbildung 12: Das Verhalten der Missense-Mutation G181D im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor.
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt.

Ähnlich dem Verhalten von V95I lässt auch diese Mutante keinerlei Ansprechen auf die Stimulation mit α-MSH erkennen, die gemessenen cAMP-Spiegel entsprechen auch bei maximaler Dosis den Basalwerten. Dementsprechend erscheint auch der Verlauf der Dosiswirkungskurve.

Bei der in Abb. 13 dargestellten Mutation handelt es sich um eine der beiden in unserer Studienpopulation detektierten Frameshift-Mutationen, welche zum Kettenabbruch im Bereich der fünften Transmembrandomäne führt. Auffällig erscheint zunächst, dass hier auch die Basalwerte im Gegensatz zu denen des Wildtyp-Rezeptors deutlich erniedrigt sind, d.h. bereits ohne jegliche Stimulation durch einen Liganden macht sich diese Mutation negativ in den cAMP-Spiegeln der Zellen bemerkbar. Diese Tatsache ließe sich vermutlich dadurch erklären, dass die trunkierten Rezeptorproteine im Zellinneren verbleiben und nur in

geringer Zahl an die Zelloberfläche transportiert werden, eine Hypothese, die wir mit Hilfe des Zelloberflächen-ELISA zu klären hofften (s.u.).

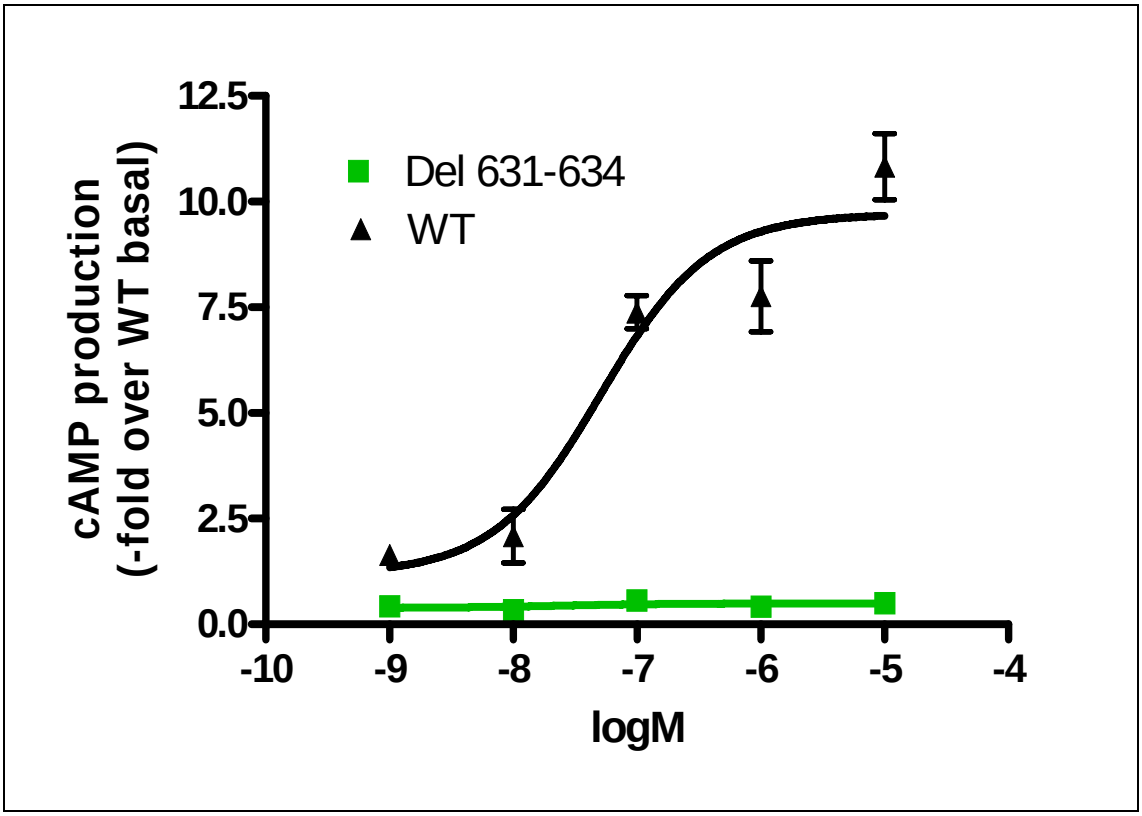

Abbildung 13: Das Verhalten der Frameshift-Mutation 631_634del im cAMP-Akkumulation-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Wie erwartet, reagierte die Mutation 631_634del nicht auf eine Stimulation mit α-MSH, der Kurvenverlauf gleicht einer geraden Linie und E_{max} entspricht den ohnehin erniedrigten Basalwerten.

Die zweite der beiden von uns in der Studienpopulation entdeckten Frameshift-Mutationen(750_751del, Abb. 14) liegt im Bereich der sechsten Transmembrandomäne. Der Kettenabbruch findet statt an Position 284, am Übergang von der dritten extrazellulären Schleife zur siebten Transmembrandomäne. Wie zu erwarten, zeigt sich eine deutliche Erniedrigung des Basalwertes im Vergleich zum Wert des Wildtyp-Rezeptors.

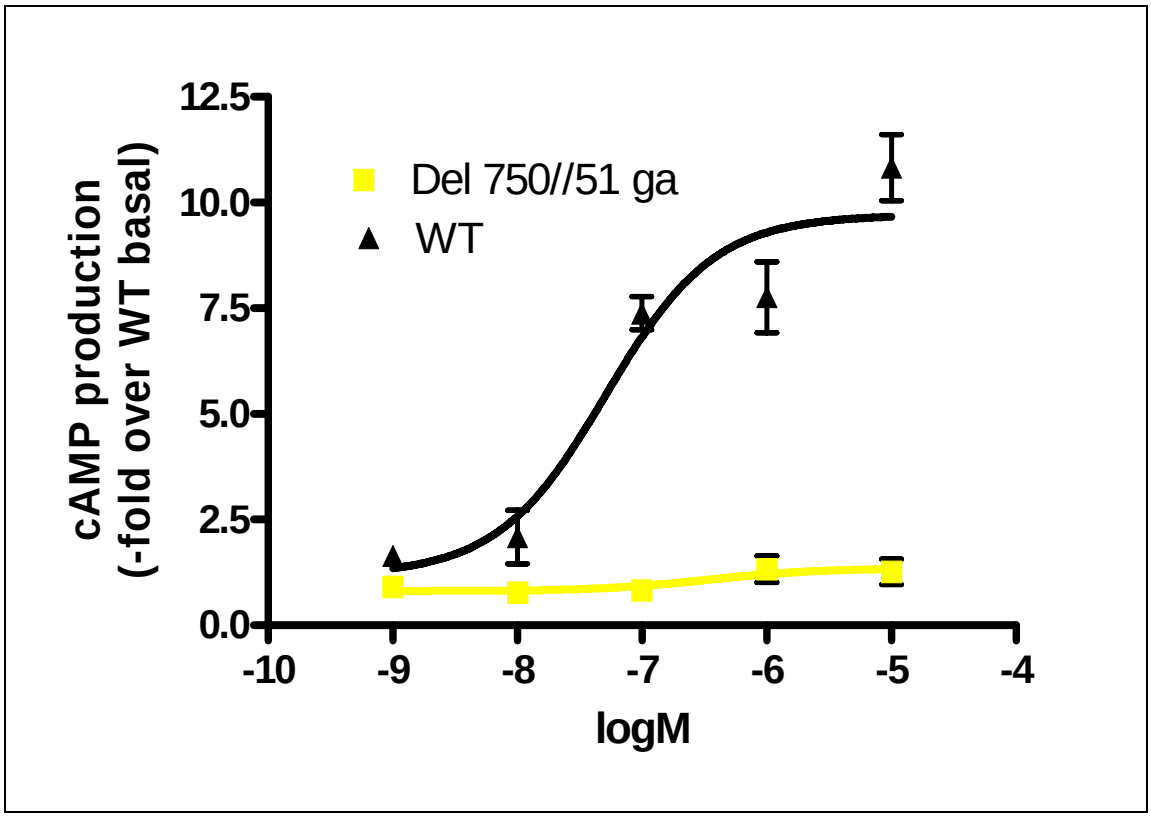

Abbildung 14: Verhalten der Frameshift-Mutation 750_751del im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Es könnte dafür ebenfalls eine intrazelluläre Retinierung des trunkierten Rezeptor-Proteins als Erklärungsansatz herangezogen werden (siehe dazu die Ergebnisse des Zelloberflächen ELISA unter 4.3), was bei der deutlich veränderten Konformation des Polypeptides nicht verwunderlich wäre. Im Verlauf der Stimulation mit α-MSH zeigt der mutierte Rezeptor keinerlei Reaktion auf die Bindung des Agonisten, die cAMP-Spiegel bleiben auch bei hohen Hormondosen im basalen Bereich.

Auch die dritte Missense-Mutation in dieser Kategorie, S94R (siehe Abb. 15), zeigt ein ähnliches Bild wie die bereits oben beschriebenen anderen beiden (G181D und V95I). Der Aminosäureaustausch befindet sich in diesem Fall im Bereich der zweiten Transmembrandomäne. Die basalen Level des cAMP liegen in ähnlichen Bereichen wie diejenigen des Wildtyp-Rezeptors, es erfolgt jedoch auch hier eine Anhebung der cAMP-Spiegel durch das α-MSH.

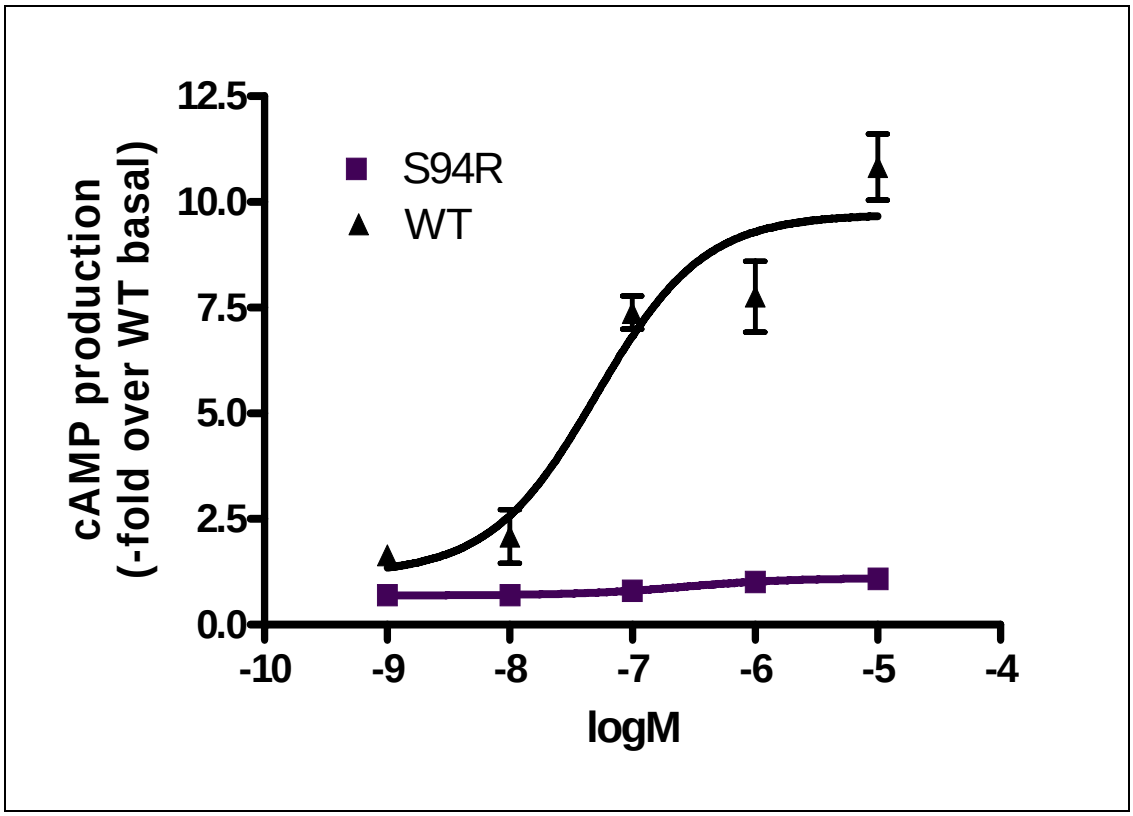

Abbildung 15: Verhalten der Missense-Mutation S94R im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor.
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

4.2.3 Mutationen mit reduzierter Funktion gegenüber dem Wildtyp

Neben den oben erwähnten Genvarianten des Melanocortin-4-Rezeptors mit komplettem Ausfall der Rezeptorfunktion fanden wir in unseren funktionellen Studien unter Stimulation mit α-MSH ebenfalls eine Gruppe von Mutationen, welche zwar nicht zu einem kompletten Funktionsverlust, aber zu einer deutlichen Reduktion der cAMP-Produktion verglichen mit der cAMP-Akkumulation des Wildtyp-Rezeptors führten.

Diese Rezeptoren zeigten demnach zwar ein Ansprechen auf den Liganden, es waren jedoch jeweils höhere Konzentrationen des Hormons nötig, um eine geringere maximale Funktion des Rezeptors hervorzurufen. Dieses Verhalten spiegelt sich in einer deutlichen Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven nach rechts, die Werte der maximalen Funktion E_{max} in dieser

Basenposition	Aminosäuresequenz	Basalwert	E_{max}	EC_{50}
362 T > C	I121T	0,4 +/- 0,02	7,7 +/- 1	570 +/- 182
731 C > A	A244E	0,5 +/- 0,1	10 +/- 1,5	425 +/- 146
233 C >T	P78L	0,8 +/- 0,3	3,5 +/- 1,6	570 +/- 182
960 del T	Y320fsX354	1,4 +/- 0,4	13,3 +/- 1,2	149 +/- 105

Tabelle 25: Verhalten der Mutationen I121T, A244E, P78L und 960delT im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor.
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

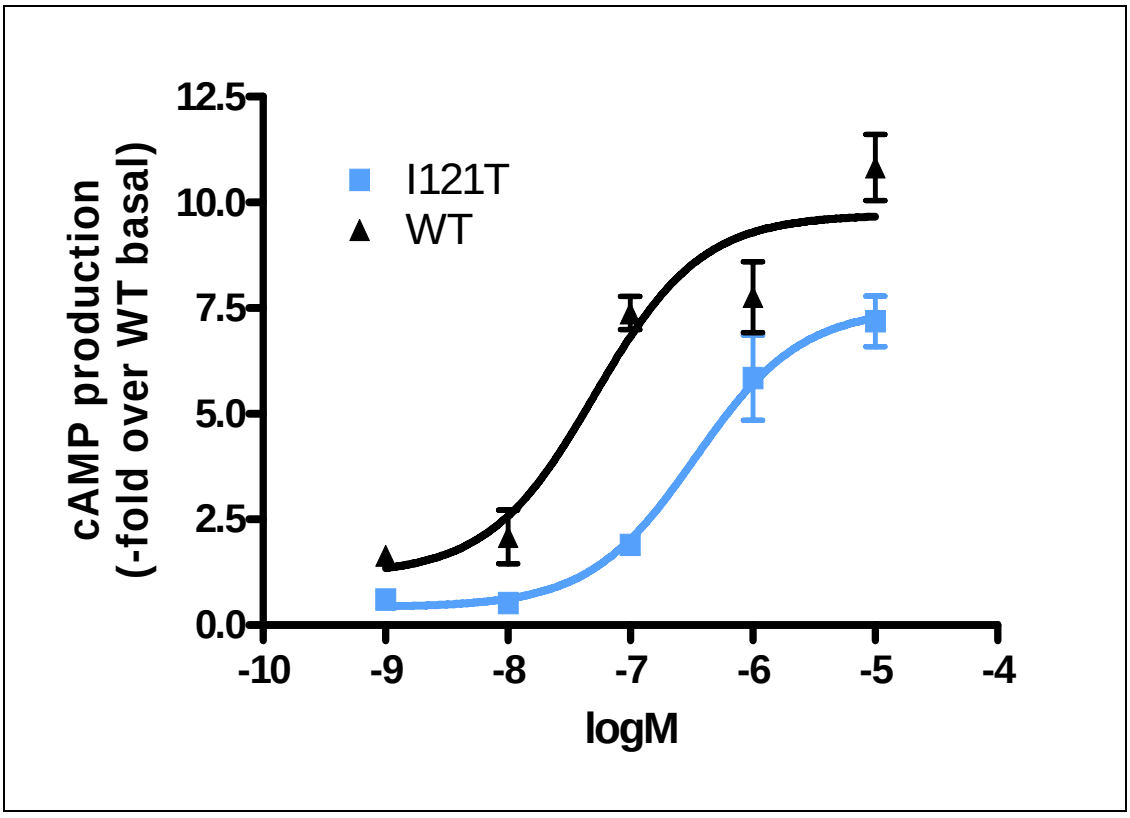

Abbildung 16: Das Verhalten der Missense-Mutation I121T im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Gruppe variieren zwischen starker Erniedrigung und der Funktion des Wildtyp-Allels ähnlichen Werten. Die Missense-Mutation I121T (Abb.7) liegt im Bereich der ersten extrazellulären Schleife. Bereits bei noch nicht stattgehabter Stimulation mit α-MSH sind die Konzentrationen an cAMP im Verhältnis zu den basalen Werten des Wildtyp- Rezeptors erniedrigt. Im Gegensatz zu den im Vorhergehenden beschriebenen „Loss-of-Function"-Mutationen zeigt I121T jedoch ein signifikantes, wenn auch proportional zum Wildtyp reduziertes Ansprechen auf das Hormon. Es ergeben sich ein deutlich erhöhter EC_{50}- sowie ein erniedrigter E_{max}-Wert, die Dosis-Wirkungskurve weist eine Rechtsverschiebung auf.

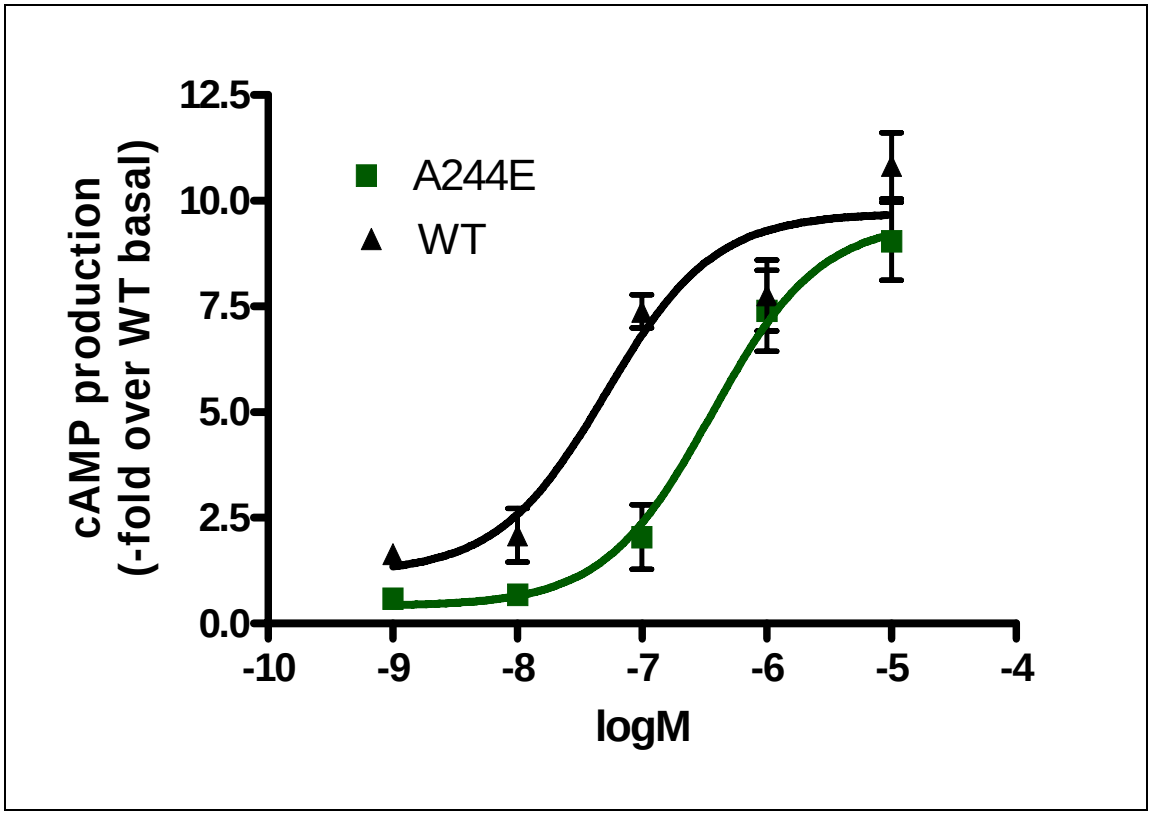

Abbildung 17: Verhalten der Missense-Mutation A244E im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Auch bei A244E (Abb. 17) handelt es sich um eine Missense-Mutation, der Aminosäureaustausch ist dabei im Bereich der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptorproteins lokalisiert. Auch bei dieser Variante lassen sich

proportional gegenüber dem Wildtyp erniedrigte Basalwerte nachweisen. Da Untersuchungen über diese Mutation einige Wochen vor Veröffentlichung unserer Arbeit bereits von einer anderen Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden, kann hier bereits die Aussage getroffen werden, dass das veränderte Rezeptorprotein zu größeren Anteilen im Zellinneren retiniert wird, wodurch sich diese Tatsache erklären ließe. Unter Zugabe ansteigender Dosen des α-MSH zeigt A244E ein schwächeres Ansprechen auf niedrige Konzentrationen (woraus ein erhöhter EC_{50}-Wert resultiert), unter höheren Konzentrationen lässt es sich gut stimulieren (der E_{max}-Wert ist dem des Wildtyps vergleichbar). Die Konzentrations-Wirkungskurve ist nach rechts verschoben.

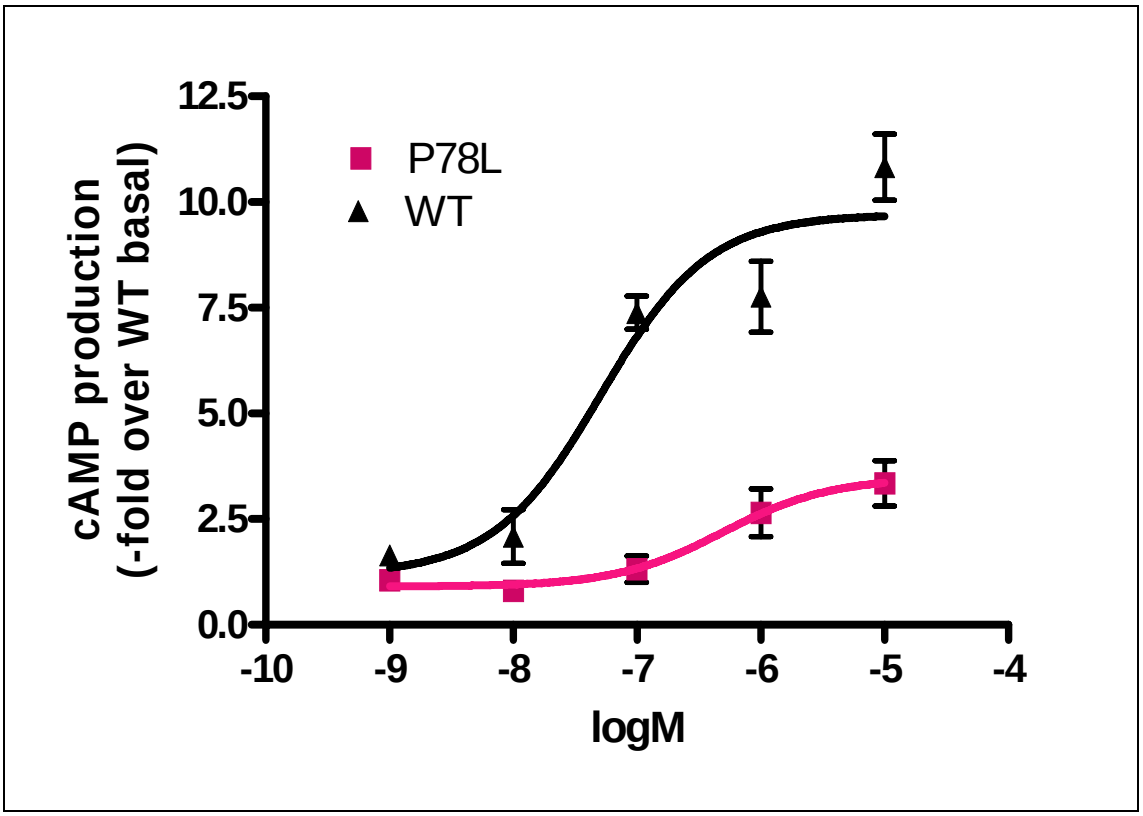

Abbildung 18: Verhalten der Missense-Mutation P78L im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Die dritte Missense-Mutation in dieser Kategorie(P78L (Abb. 18)) wiederum zeigt einen ganz anderen Kurvenverlauf. Sie liegt im Bereich der ersten intrazellulären Schleife. Ihre basalen Spiegel an cAMP lassen sich mit denen des Wildtyp vergleichen, jedoch spricht sie nur sehr zögerlich und schwach auf die durchgeführte hormonelle Stimulation an. Es werden sehr viel höhere Werte als beim Wildtyp-Rezeptor benötigt, um eine halbmaximale Rezeptorstimulation zu erreichen. Die maximalen Stimulationsmöglichkeiten bewegen sich bei etwa einem Drittel des Wildtyp-Wertes.

Die Frameshift-Mutation 960 del T führt zu einer Verschiebung des Codes im Bereich des für den Rezeptor-C-Terminus codierenden Bereiches des MC4R-Gens. Diese Mutation wurde in einem Elternteil detektiert (einem Vater), das betreffende Kind war jedoch kein Mutationsträger. Es handelt sich somit um eine nicht-transmittierte Mutation. Wie man der Tabelle entnehmen kann, gleichen zwar E_{max} und Basalwerte denen des Wildtyp-Rezeptors, der EC_{50} jedoch ist deutlich erhöht. Dies führt zu einer Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve nach rechts und somit zu einem abgeschwächten Ansprechen auf das α-MSH.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sich bei der von uns als Rezeptoren mit reduzierter Funktion bezeichneten Gruppe um eine sehr heterogene Mischung handelt, deren Mitglieder nicht ganz ohne Bedenken in ein und dieselbe Kategorie eingeordnet werden können. Die Einordnung in solche Gruppen soll hier jedoch nur der Vereinfachung der Darstellung dienen und keine starre Klassifikation darstellen.

4.2.4 Mutationen mit dem Wildtyprezeptor vergleichbarer Funktion

Die nächste der von uns vereinfachungshalber benannten Gruppen besteht aus einer Reihe mehr oder weniger unterschiedlich reagierender Missense-Mutationen, welche hier zusammengefasst wurden, da sie in ihrem funktionellen Verhalten nach Stimulation mit α-MSH weder Komplettausfall, noch Reduktion der cAMP-Spiegel zeigten, sondern vielmehr genau so gut oder gar besser als der Wildtyp-Rezeptor ansprachen.

Basenposition	Aminosäuresequenz	Basalwert	E_{max}	EC_{50}
89 C > T	S30F	1,4 +/- 0,5	15,4 +/- 3,8	22 +/- 14
754 G > A	G252S	1,1 +/- 0,6	9,7 +/- 2,7	37 +/- 20
950 T > C	I317T	1,3 +/- 0,4	12 +/- 3	57 +/- 37
533 C > T	T178M	1,5 +/- 0,7	14.2 +/- 5,7	90 +/- 39

Tabelle 20: Verhalten der Mutationen S30F, G252S, I317T und T178M im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem MC4-Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

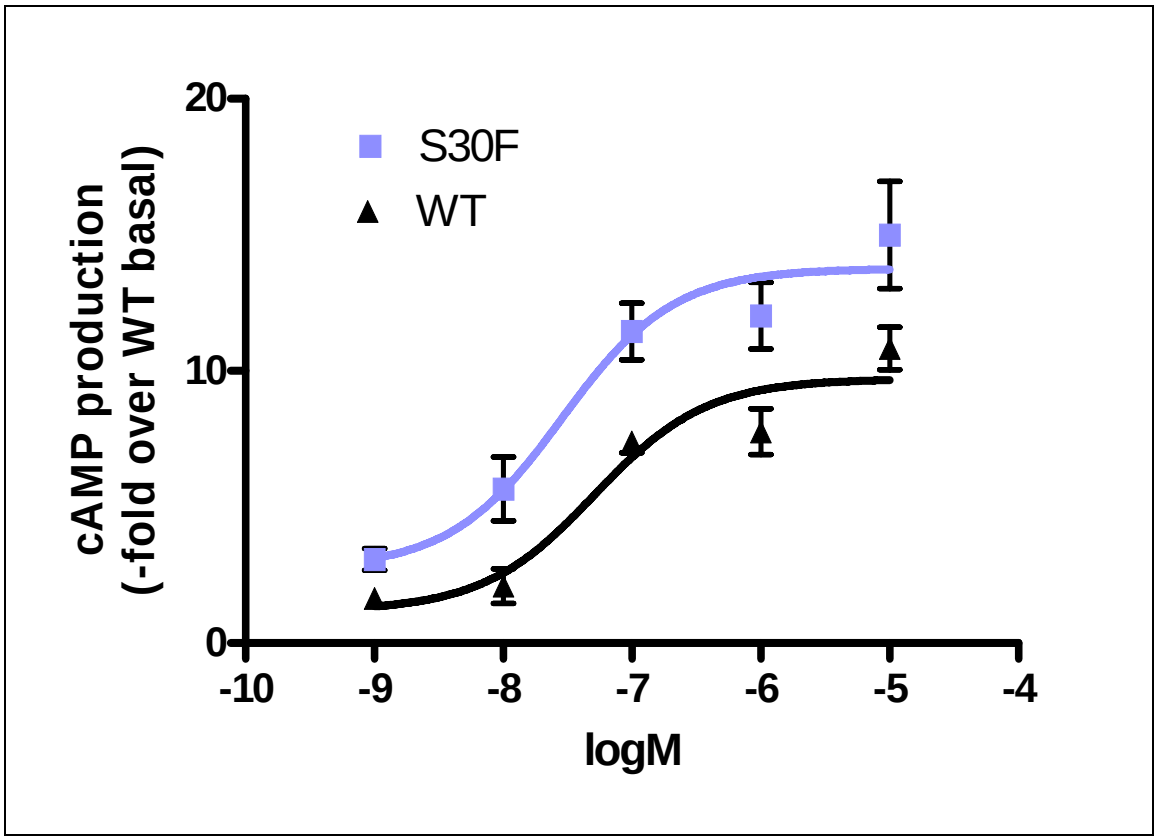

Abbildung 19: Verhalten der Missense-Mutation S30F im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt**.**

Diese Gruppe ist somit als am relativ problematischsten zu betrachten, denn erwarteten wir nicht in Anbetracht des eindeutig adipösen Phänotyps der Patientenpopulation zumindest eine geschwächte Rezeptorfunktion?

Bei S30F (Abb.19) handelt es sich um eine Missense-Mutation, welche am N-Terminus des Rezeptors lokalisiert ist. Wie man aus Abbildung und Tabelle entnehmen kann kommt es durch diese Mutation nicht zu einer Abnahme der Rezeptorfunktion, im Gegenteil: Der EC_{50}-Wert ist leicht erniedrigt, der E_{max}-Wert heraufgesetzt, die Kurve präsentiert sich als gegenüber der Wildtyp-Kurve nach links und oben verschoben. Die Funktion dieser Rezeptormutante, so wie sie aus dieser Art von Untersuchung hervorgeht, scheint somit also eher verbessert denn verschlechtert zu sein.

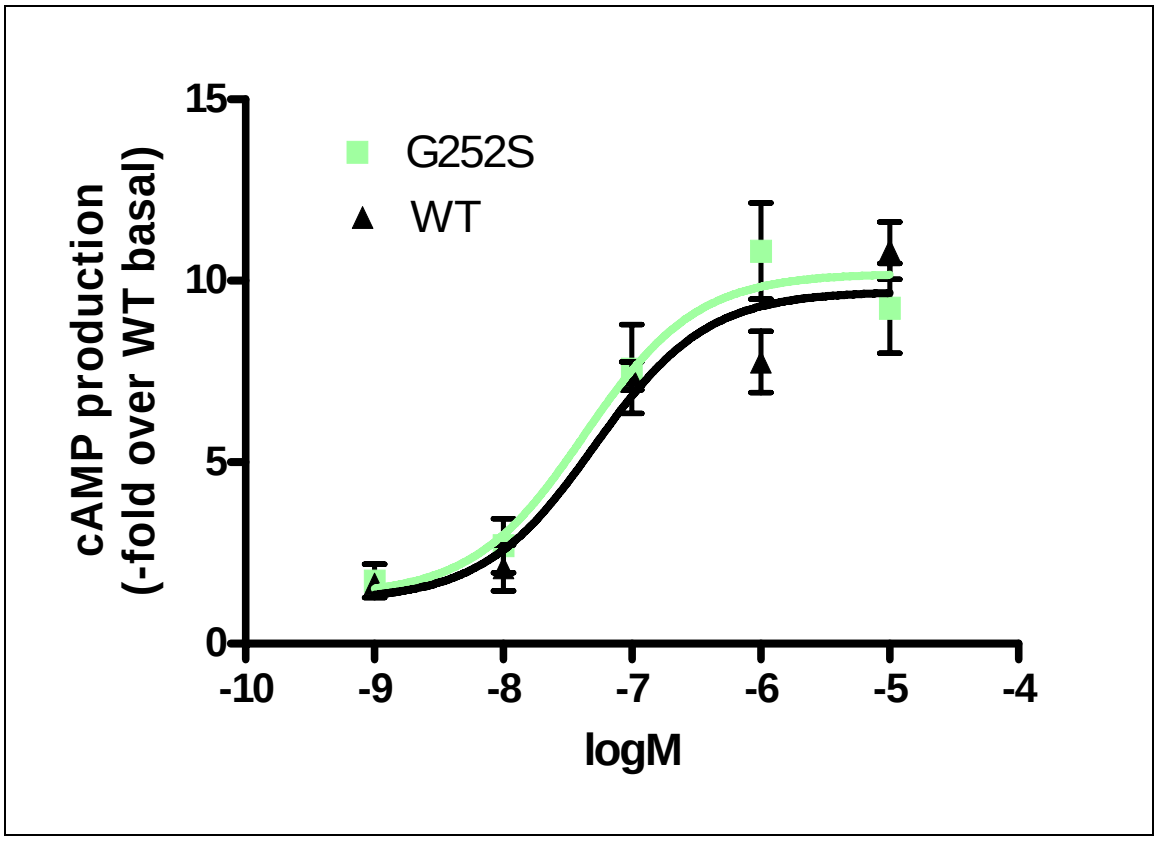

Abbildung 20: Verhalten der Missense-Mutation G252S im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Die Missense-Mutation G252S (Abb.20) bedingt einen Aminosäureaustausch im Bereich der sechsten Transmembrandomäne, ihr Verhalten im Rahmen der funktionellen Untersuchung entspricht dem des Wildtyp-Rezeptors. Sowohl der EC_{50}- als auch der Maximalwert sind vergleichbar, es ist also kein Funktionsverlust (oder -zuwachs) durch die Mutation zu erkennen.

I317T, ebenfalls eine Missense-Mutation und im Bereich des Rezeptor-C-Terminus gelegen, ist in Abbildung 21 dargestellt. Ihr Basalwert liegt leicht über dem des Wildtyp-Rezeptors, ebenso E_{max}, was sich in einer Verschiebung der Kurve nach oben bemerkbar macht. Sie ist jedoch nicht nach links verschoben, da der EC_{50} Wert sich in ähnlichen Bereichen wie der des Wildtyp-Rezeptors bewegt.

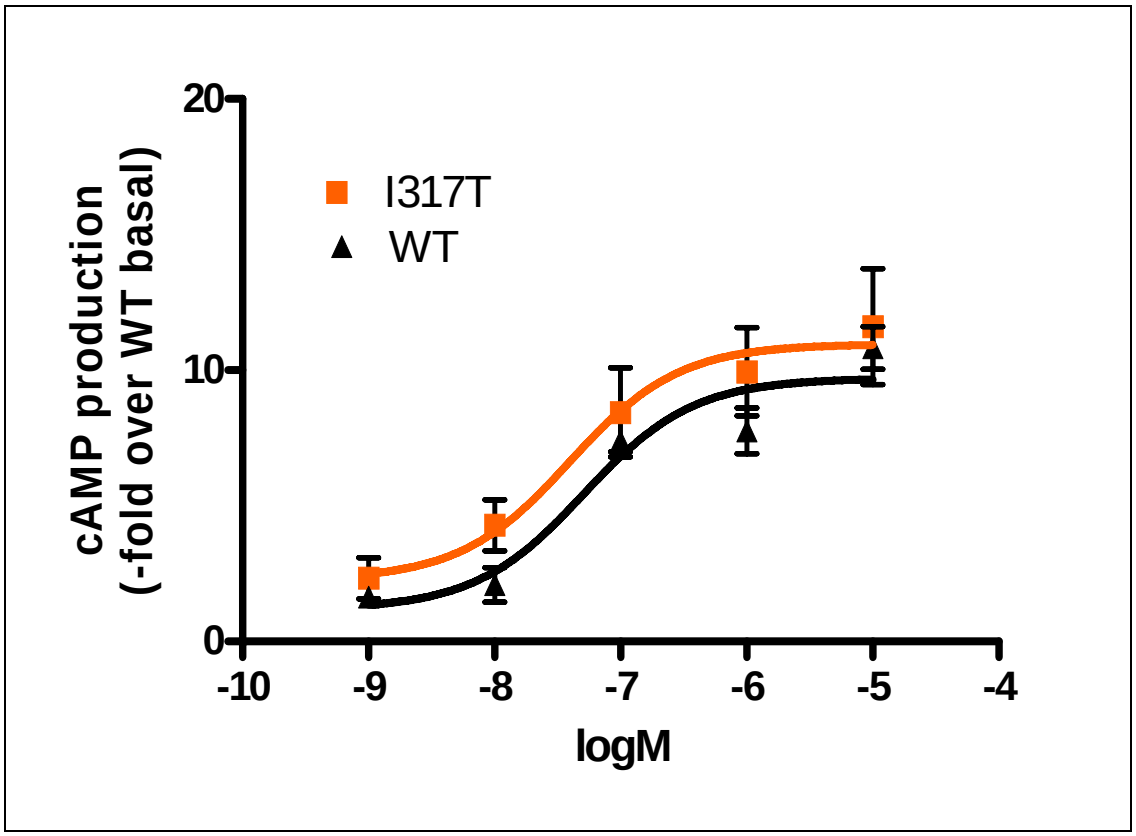

Abbildung 21: Verhalten der Missense-Mutation I317T im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

I317T spricht also alles in allem etwas besser auf das α-MSH an, die zum Erreichen der halbmaximalen Stimulation benötigten Dosen sind jedoch genauso hoch wie die des unveränderten Rezeptorproteins. Eine Erklärung für den adipösen Phänotyp ihres Trägers bietet das funktionelle Verhalten dieser Mutation somit nicht.

T178M (Abb. 22) kodiert für einen Aminosäureaustausch im Bereich der vierten Transmembrandomäne des Rezeptors. Auch sie weicht in ihrem Verhalten im Rahmen des cAMP-Assay nicht deutlich von dem des Wildtyp-Allels ab. Im Kurvenverlauf zeichnet sich ein minimal besseres Ansprechen auf α-MSH im niedrigeren Dosisbereich, bei gleichzeitiger Abschwächung dieses Effektes in höheren Bereichen ab.

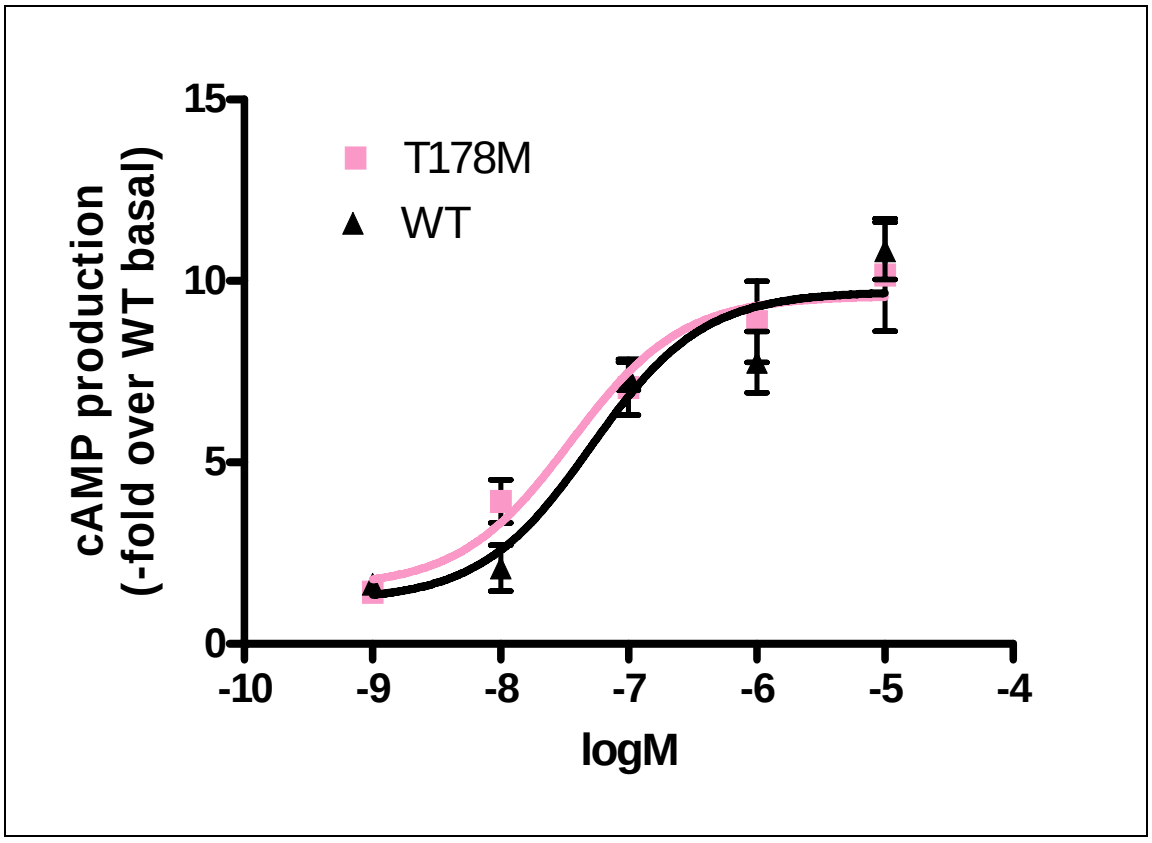

Abbildung 22: Verhalten der Missense-Mutation T178M im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Der EC_{50}-Wert fällt etwas höher aus, der E_{max}-Wert ebenfalls, hier deutet jedoch eine relativ hohe Standardabweichung auf eine gewisse Inkonsistenz dieses Ergebnisses hin. Auch das Verhalten von T178M unter Stimulation mit α-MSH liefert also keine Erklärung für die Adipositas des Mutationsträgers.

4.2.5 Mutationen mit konstitutiv aktiver Rezeptorfunktion

Neben allen oben bereits ausführlich beschriebenen erwarteten Ergebnissen der Rezeptorfunktionsprüfung, fanden sich unter den von uns untersuchten Mutationen aus dem Genom der adipösen Index-Patienten zwei Rezeptor-Varianten, die in keine der bisher aufgeführten Kategorien passten.
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist dem MC4R an sich schon eine gewisse konstitutive Aktivität zu bescheinigen. So sind die basalen cAMP-Spiegel MC4R-transfizierter Zellen bereits ohne Stimulation durch α-MSH oder ACTH deutlich höher, als bei nicht-transfizierten Zellen. Auch das Wirken des Agouti-related-Proteines (AgRP) im Sinne eines inversen Agonisten setzt per se schon eine konstitutive Rezeptoraktivität voraus. Die unter dieser Kategorie betrachteten Rezeptoren zeichneten sich darüber hinaus durch gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor noch deutlich erhöhte basale cAMP-Werte aus, in ihrem Verhalten unter hormoneller Stimulation unterschieden sie sich jedoch untereinander deutlich.

Basenposition	Aminosäuresequenz	Basalwert	E_{max}	EC_{50}
380 C >T	S127L	2,1 +/- 0,3	20,2 +/- 3,4	4003 +/- 615
689 C >T	P230L	3,1 +/- 1,6	27 +/- 10	107 +/- 20

Tabelle 26: Verhalten der Mutationen S127L und P230L im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Die erste dieser beiden Mutationen ist S127L (Abb. 23), deren Aminosäureaustausch im Anfangsbereich der dritten Transmembrandomäne lokalisiert ist. S127L zeigte ein ungewöhnliches Verhalten im cAMP-Assay: Ihre

Basalwerte waren gegenüber denen des Wildtyp-Rezeptors deutlich erhöht (hier im Mittelwert verdoppelt). In niedrigen und mittleren Konzentrationsbereichen zeigte sie kaum ein Ansprechen auf das α-MSH. Jedoch ab 100 nM des Hormons stieg die Kurve steil an und die maximal erreichten Werte lagen weit über dem E_{max}-Wert des Wildtyp-Rezeptors. Aufgrund dieses Verhaltens sind die extrem hohen EC_{50}-Werte erklärlich (im Mittelwert um die 4000 nM). Aus dem hier Aufgeführten ergeben sich folgende Eigenschaften des betroffenen Rezeptors: S127L ist bereits ohne hormonelle Stimulation aktiver als der durchschnittliche MC4R, aufgrund seines schlechten Ansprechens auf normale Konzentrationen von α-MSH muss man allerdings von einer stark reduzierten Funktion des Proteins in vivo ausgehen.

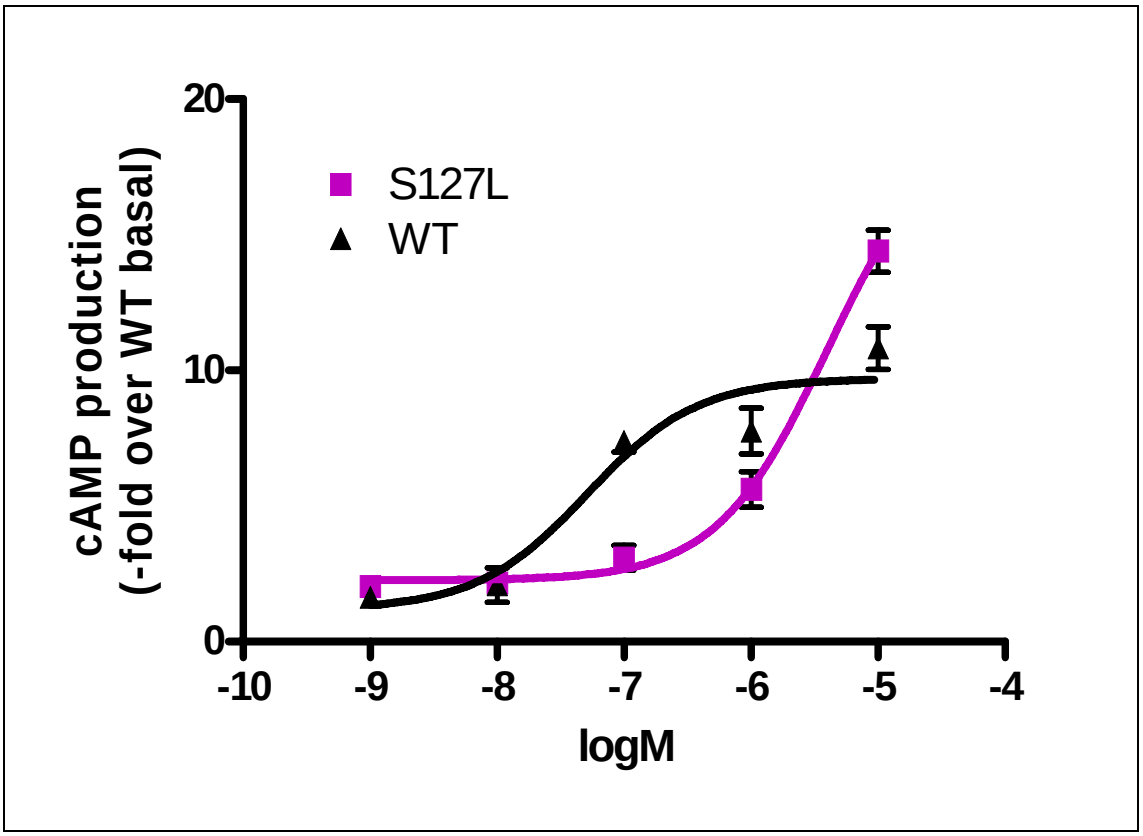

Abbildung 23: Verhalten der Missense-Mutation S127L im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

In höheren Konzentrationsbereichen spricht er zwar dafür umso besser an, solche Konzentrationen werden aber im Patienten niemals erreicht werden können. Somit könnte S127L auch in die Gruppe der Rezeptormutationen mit reduzierter Funktion eingeordnet werden.

Die zweite von uns als konstitutiv-aktiv deklarierte Mutation ist P230L (Abb. 24), welche im Bereich der dritten intrazellulären Rezeptorschleife angesiedelt ist. Auch P230L weist einen erhöhten basalen cAMP-Spiegel auf, im Gegensatz zu S127L sprach sie jedoch auf niedrige und mittlere Konzentrationen von α-MSH sehr gut an und zeigte einen im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor stark nach oben verschobenen Kurvenverlauf. Dabei erreichte E_{max} fast das Dreifache des Wildtyp-Wertes. Der EC_{50}-Wert war etwas höher als der des unveränderten Rezeptors, was hier aber keinerlei funktionelle Auswirkungen haben dürfte, da die cAMP-Spiegel stets deutlich über denen des Wildtyp-Allels lagen.

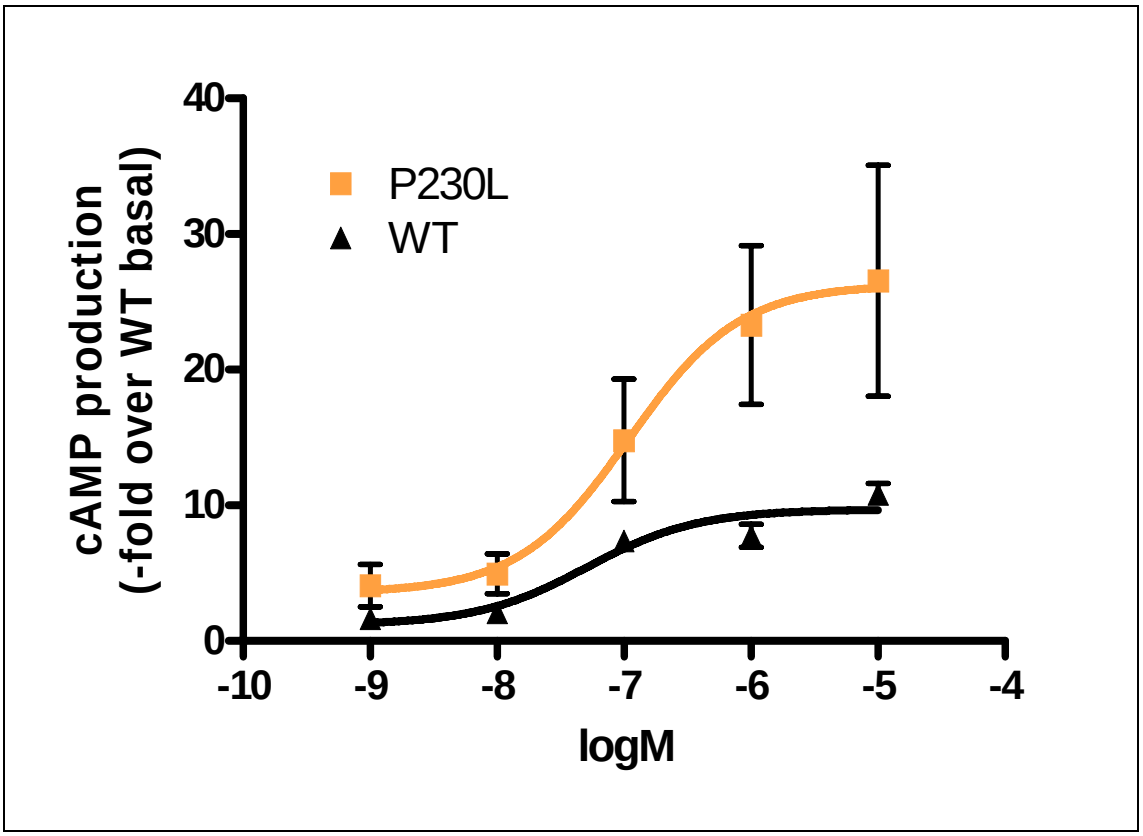

Abbildung 24: Verhalten der Missense-Mutation P230L im cAMP-Akkumulations-Assay im Vergleich mit dem Wildtyp-Rezeptor
COS7-Zellen wurden mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert, drei Tage nach der Transfektion die Zellen mit ansteigenden Dosen α-MSH inkubiert und die cAMP-Spiegel gemessen. Die Ergebnisse wurden als x-fach über dem Basalwert des Wildtyps abgebildet und stellen Mittelwerte aus mehr als drei unabhängigen Experimenten dar. Die Maximalwerte E_{max} wurden bei einer Konzentration von 10^{-5} M α-MSH ermittelt

Im Gegensatz zu S127L kann hier also von einem Rezeptor ausgegangen werden, der bereits in unstimuliertem Zustand deutlich aktiver ist, jedoch durch Bindung des Hormons in seiner Aktivität noch deutlich gesteigert werden kann. Eine Rezeptorüberfunktion bzw. Daueraktivität kann in diesem Falle angenommen werden.

Wie bereits beim Wildtyp-Rezeptor interessierte uns auch das Verhalten der beiden konstitutiv-aktiven Rezeptorvarianten unter dem Einfluss der beiden Antagonisten AgRP sowie SHU9119. Deshalb führten wir auch für diese beiden Rezeptoren neuerliche cAMP-Akkumulations-Assays durch, während derer zusätzlich zur Stimulation durch das α-MSH außerdem noch einer der beiden Antagonisten in gleich bleibender Konzentration von 10^{-8} M zugegeben wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen finden sich in den Abbildungen 25 und 26.

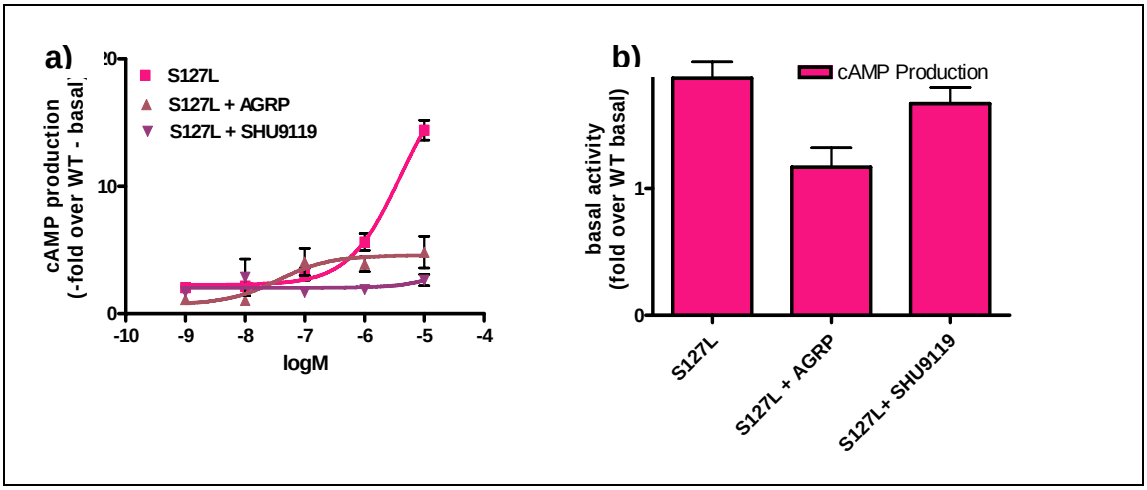

Abbildung 25 : Die Wirkung der Antagonisten AgRP und SHU9119 auf a) das Verhalten der Missense-Mutation S127L unter Stimulation mit α-MSH sowie b) den Basalwert

a) Verhalten von S127L im cAMP-Akkumulations-Assay unter Stimulation mit α-MSH sowie Zugabe der Antagonisten AgRP und SHU9119. Die beiden Antagonisten wurden in gleich bleibender Konzentration von 10 nM zugegeben, die Dosis des α-MSH kontinuierlich gesteigert.

b) Verhalten der basalen Aktivität von S127L bei Zugabe der beiden Antagonisten ohne eine erfolgte Stimulation durch den Agonisten. Alle Werte wurden auf den Basalwert des Wildtyp bezogen. Den Werten liegen mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente zu Grunde.

Abbildung 25 geht genauer auf das Verhalten der Mutation S127L ein. Der Basalwert liegt, wie aus Tabelle 26 zu erfahren, im Bereich des doppelten Wildtyp-Wertes. Gibt man nun AgRP dazu, so sinkt dieser Basalwert deutlich ab. Zwar werden dabei nicht Werte unterhalb des Wildtyp-Basalwertes erreicht, eine

durch den Antagonisten hervorgerufene Verminderung des ursprünglichen cAMP-Spiegels (im Sinne des beschriebenen inversen Agonismus) ist jedoch offensichtlich. SHU9119 kann eine solche Veränderung des Basalwertes bei S127L nicht hervorrufen, es beeinträchtigt den durch S127L bewirkten basalen cAMP-Spiegel nicht. Auch in der Dosis-Wirkungs-Kurve zeigen die beiden Antagonisten einen unterschiedlichen Kurvenverlauf. AgRP bewirkt einen Beginn auf niedrigerem Niveau, hebt die α-MSH Wirkung aber nicht vollständig auf, sodass eine flache aber doch deutlich positiv verlaufende Kurve resultiert. SHU9119 dagegen verändert den Kurvenverlauf in Richtung eines totalen Funktionsausfalls, ein Ansprechen auf das α- MSH ist nicht erkennbar.

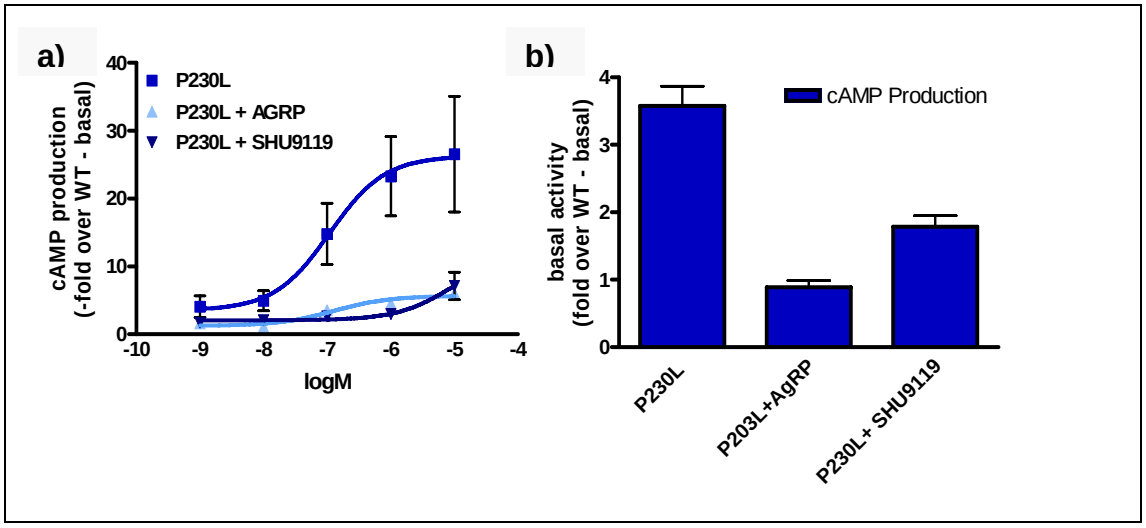

Abbildung 26 : Die Wirkung der Agonisten AgRP und SHU9119 auf a) das Verhalten der Missense-Mutation P230L unter Stimulation mit α-MSH sowie b) den Basalwert

a) Verhalten von P230L im cAMP-Akkumulationsassay unter Stimulation mit α-MSH sowie Zugabe der Antagonisten AgRP und SHU9119. Die beiden Antagonisten wurden in gleich bleibender Konzentration von 10 nM zugegeben, die Dosis des α-MSH kontinuierlich gesteigert.

b) Verhalten der basalen Aktivität von P230L bei Zugabe der beiden Antagonisten ohne eine erfolgte Stimulation durch den Agonisten. Alle Werte wurden auf den Basalwert des Wildtyp bezogen. Den Werten liegen mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente zu Grunde.

Auch bei der zweiten Missense-Mutation mit konstitutiv aktiver Rezeptorfunktion, P230L, führt eine Zugabe von AgRP zu einer deutlichen Verminderung der basalen Aktivität. Hier ist die Reduktion der cAMP-Spiegel sogar noch weitaus stärker als bei S127L. Ohne die Zugabe des Antagonisten beträgt der Basalwert des veränderten Rezeptors ca. ein Dreifaches des Wildtyp-Rezeptor-

Basalwertes, mit AgRP liegt er bei unter eins (siehe Abb. 26). Allerdings scheint hier (im Gegensatz zur Situation bei S127L) auch SHU9119, welches nicht die Wirkung eines inversen Agonisten besitzt, die basalen cAMP-Spiegel herunter zu regulieren. Der dadurch hervorgerufene Effekt ist geringer als der des AgRP. In der Konzentrations-Wirkungskurve wird deutlich, dass beide Antagonisten bei dieser Mutation zu einem kompletten Funktionsausfall führen, das α-MSH kann keine nennenswerten Effekte mehr vermitteln

4.3 Bestimmung der Zelloberflächen-Expression mittels ELISA

Wie bereits in der Einleitung bzw. in den oberen Abschnitten des Ergebnisteils beschrieben, neigen veränderte Rezeptorproteine dazu, im Zellinneren zu verbleiben, also nicht an die Zelloberfläche zu gelangen. Dies wäre auch ein sehr guter Erklärungsansatz für den kompletten oder auch partiellen Ausfall in der Funktion der jeweiligen Mutante. Um zu überprüfen, ob ein Teil der von uns gemessenen Ergebnisse im cAMP-Assay ebenfalls durch diesen Mechanismus hervorgerufen sein könnten, haben wir ausgewählte Mutationen einer Untersuchung im Zelloberflächen- ELISA unterzogen. Dazu zählen die beiden Missense-Mutationen mit komplettem Funktionsverlust G181D und S94R, die beiden Frameshift-Mutationen 631_634del und 750_751del, sowie beide Mutanten mit vermuteter konstitutiver Aktivität, bei denen uns ebenfalls die Zelloberflächen-Expression interessant erschien.

Wie der Abbildung 27 zu entnehmen ist, zeigt der Wildtyprezeptor des MC4R ein deutliches Signal im Zelloberflächen-ELISA. Die gemessene optische Dichte bei 450 nm ist zwar etwas geringer als die des Vasopressin-Rezeptors, liegt jedoch ein vielfaches über dem mit Hilfe von nicht-transfizierten COS7-Zellen ermittelten Basalwert (dieser wurde von beiden Werten bereits abgezogen und erscheint deshalb nicht in der Abbildung). Da es sich hierbei jedoch um die unveränderte, gut funktionierende Rezeptorvariante handelt, wäre ein anderes Ergebnis eher überraschend gewesen.

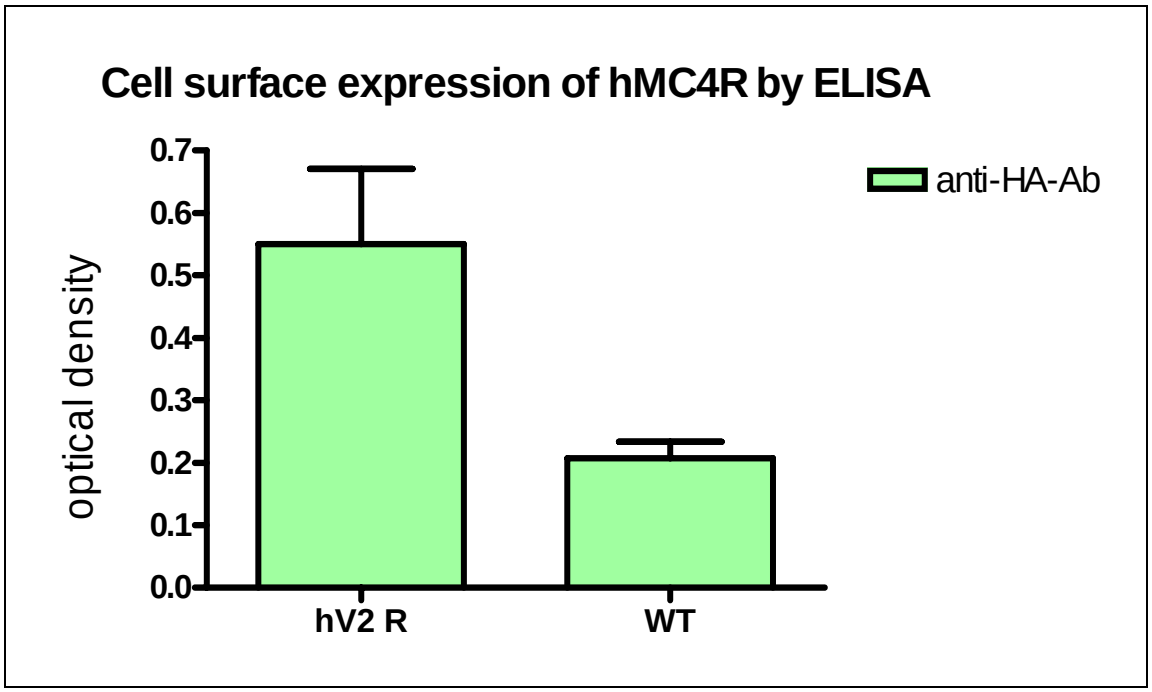

Abbildung 27: Bestimmung der Oberflächenexpression des Wildtyp-MC4R mittels ELISA
Zur Bestimmung der Oberflächenexpression wurden COS7-Zellen mit HA-MC4R bzw. ebenfalls HA-markierten Rezeptormutanten transfiziert (siehe Material und Methoden,3.4.1) und im Anschluss der ELISA wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Als Vergleich wurde der humane Vasopressin-Rezeptor (hV2-R) herangezogen, welcher hier mit dargestellt ist. Die Ergebnisse ermitteln sich aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Abbildung 28 zeigt das Verhalten der von uns im ELISA untersuchten MC4R-Rezeptormutationen im Vergleich mit dem Verhalten des Wildtyp-Rezeptors. G181D (Abb. 12) weist dabei eine schwächere Oberflächenexpression auf, wie aus Abb. 29 ersichtlich, seine Werte erreichen nur ca. 65 % der Expression des Wildtyps. Vermutlich liegt also ein gewisser Anteil des Funktionsverlustes dieses Rezeptors auch in der Tatsache begründet, dass das in seiner Konformation veränderte Protein weniger gut an die Zelloberfläche gelangt und somit dort eine kleinere Anzahl von Rezeptoren zur Verfügung steht.

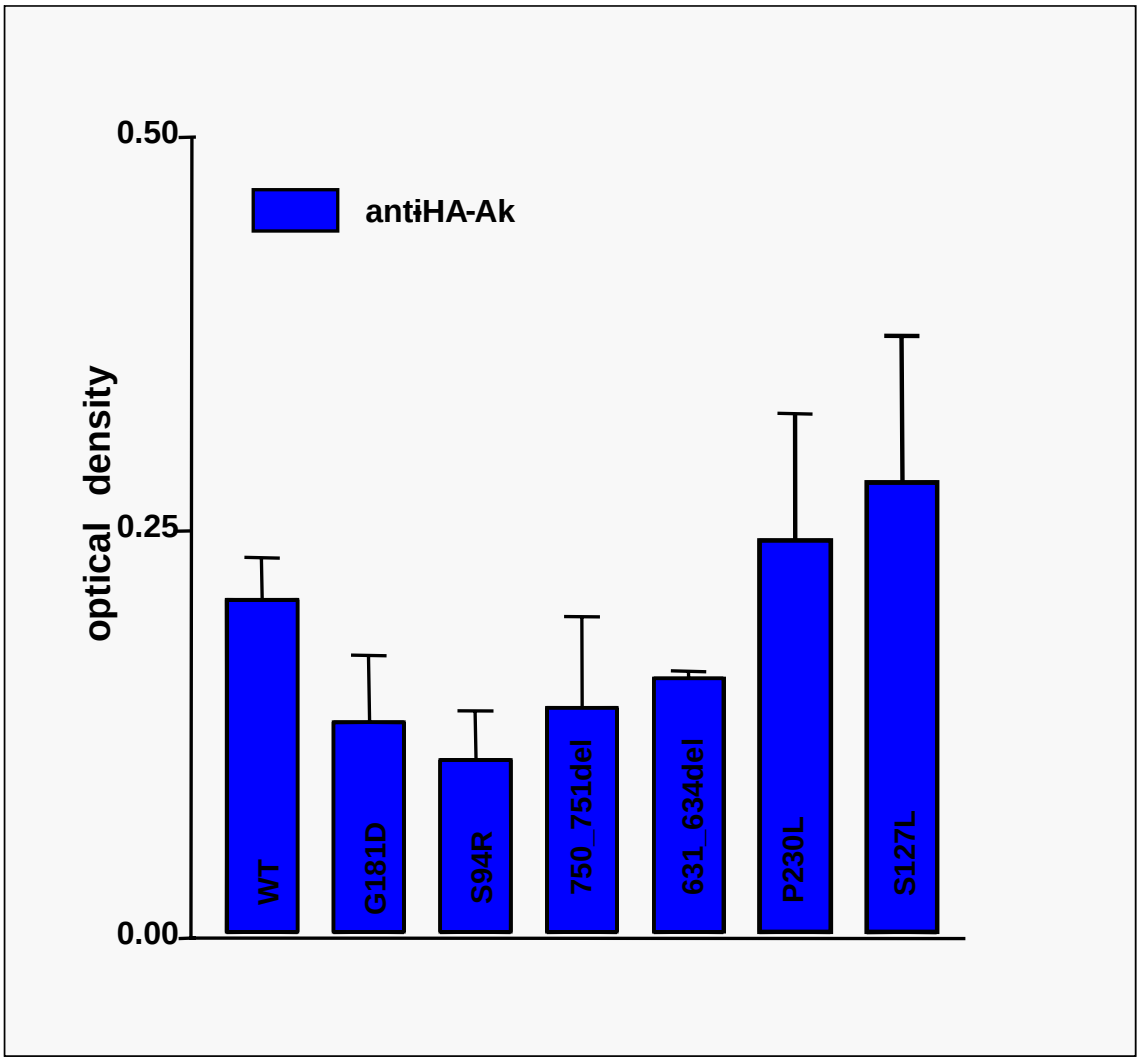

Abbildung 28: Oberflächenexpression der MC4R-Mutationen G181D, S94R, 750_751del, 631_634del, P230L sowie S127L im ELISA, verglichen mit dem Wildtyp-MC4R
Zur Bestimmung der Oberflächenexpression wurden COS7-Zellen mit HA-MC4R bzw. ebenfalls HA-markierten Rezeptormutanten transfiziert (siehe Material und Methoden, 3.2.3) und im Anschluss der ELISA wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt.
Die Ergebnisse ermitteln sich aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Auch die zweite von uns untersuchte Missense-Mutation mit komplettem Ausfall im cAMP-Akkumulations-Assay, S94R, zeigte eine deutlich abgeschwächte Oberflächen-Expression (Abb. 15, 28/29). So ergibt sich eine Differenz zwischen den für den Wildtyp gemessenen Werten und den für die betreffende Mutation ermittelten von ca. 50 %, die Zellen tragen also im Schnitt nur halb so viele mutierte Rezeptorproteine an ihrer Oberfläche wie Wildtyp-Rezeptoren. Auch hier kann also eine intrazelluläre Retinierung der Rezeptorproteine als eine der Ursachen für den gemessenen Funktionsausfall herangezogen werden.

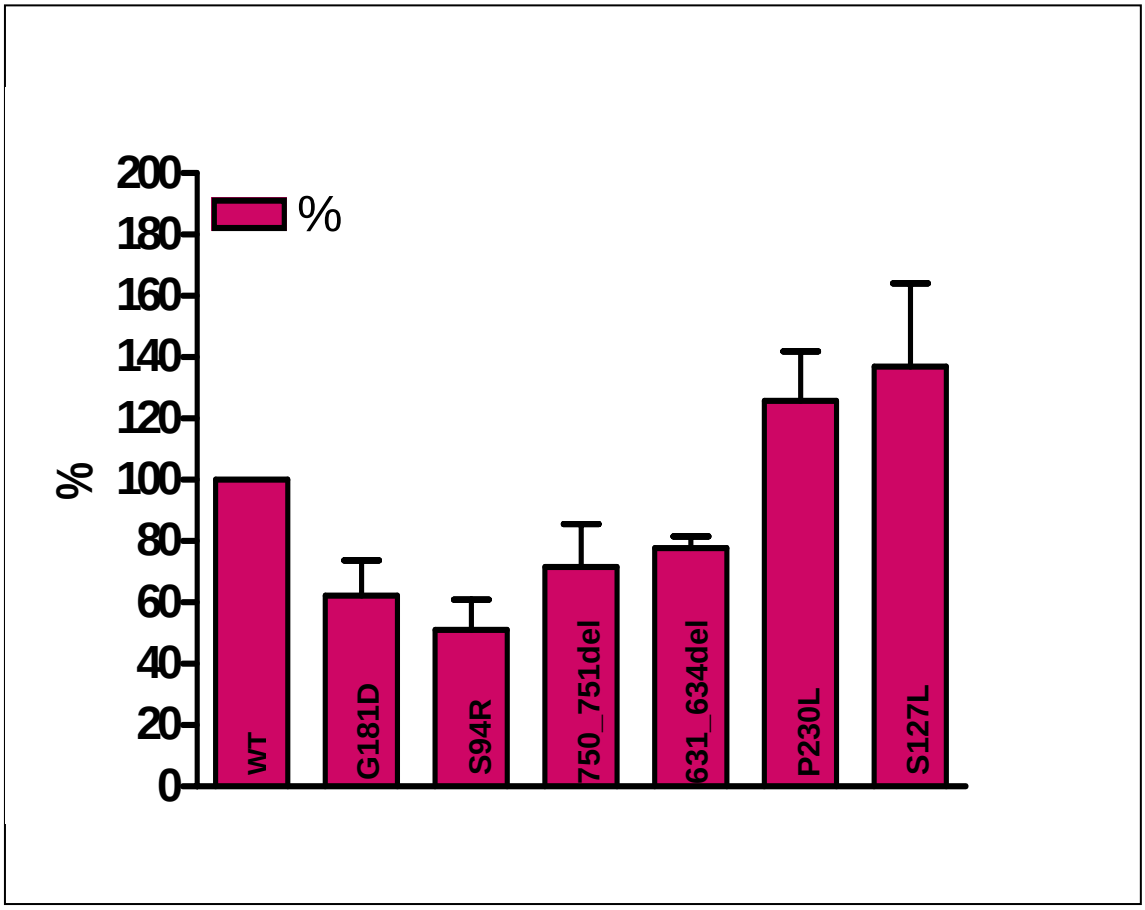

Abbildung 29: Oberflächenexpression der MC4R-Mutationen G181D, S94R, 750_751del, 631_634del, P230L sowie S127L im ELISA, ausgedrückt in Prozenten der Expression des MC4R-WT
Zur Bestimmung der Oberflächenexpression wurden COS7-Zellen mit HA-MC4R bzw. ebenfalls HA-markierten Rezeptormutanten transfiziert (siehe Material und Methoden, 3.4.1) und im Anschluss der ELISA wie unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Der beim WT- Rezeptor gemessene Wert wurde für 100 % angenommen und die für die Mutanten ermittelten Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse ermitteln sich aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Die erste der beiden Frameshift-Mutationen, 750_751del (Abb. 14, 28/29) wird ebenfalls weniger auf der Zelloberfläche exprimiert, wenn auch die Reduktion der Expression in diesem Falle weniger drastisch ausfällt als bei S94R (sie liegt bei ca 70-80 % der Wildtyp-Expression). Trotz eines Kettenabbruchs mit der Folge einer Trunkierung des Rezeptorproteins scheint also ein relativ großer Teil der Rezeptoren doch den Weg an die Zelloberfläche zu finden. Der verzeichnete komplette Ausfall der Funktion resultiert hier also vermutlich nicht zum Großteil aus einer verminderten Anzahl von Rezeptortproteinen in der Zellmembran. Ähnlich verhält es sich mit der zweiten Frameshift-Mutation, 631_634del, welche bereits in Abbildung 13 gezeigt wurde und nun auch in den Abbildungen 28 und

29 betrachtet werden soll. In Prozenten gegenüber der Expression des Wildtyp-Rezeptors ausgedrückt liegt ihr Wert bei ca. 85%, auch hier gelangt also ein deutlich verändertes und verkürztes Protein in einer relativ großen Anzahl trotzdem vom Zellinneren in die Plasmamembran, wo es aber auf das entsprechende Hormon nicht adäquat reagieren kann. Mit den beiden von uns im Vorfeld als konstitutiv-aktiv klassifizierten Mutationen P230L und S127L dagegen verhält es sich genau andersherum. P230L (siehe Abb.26, 28 und 29) kann demnach um ca. 30 % mehr an der Zelloberfläche nachgewiesen werden als das unveränderte Wildtyp-Rezeptorprotein. Ob dies einen eher zufälligen Befund darstellt, welcher nicht mit der deutlich verbesserten Rezeptorfunktion im Rahmen des cAMP-Akkumulations-Assay zusammenhängt, oder ob diese Tatsache doch einen Teil des Ergebnisses der funktionellen Untersuchungen erklären könnte, ist fraglich.

Bei S127L (Abb. 25, 28 und 29) ist der zu verzeichnende Anstieg der Oberflächen-Expression sogar noch deutlicher, im Gegensatz zur Expression des Wildtyp-Rezeptors liegt sie zwischen 140 und 150 %. Es gilt hier die bereits im Zusammenhang mit P230L formulierte Fragestellung, inwieweit dieses Ergebnis dazu beitragen könnte, den Mechanismus zu klären, der zu den beschriebenen Werten der funktionellen Untersuchung zu führen vermag. In diesem Fall dürfte es sogar noch schwerer sein hier eine mögliche Verbindung herzustellen, da das mutierte Rezeptorprotein zwar vermehrt an die Zelloberfläche zu gelangen scheint, dort auch eine vermehrte basale Aktivität hervorruft, aber zunächst nicht in der Lage ist, auf das Hormon α-MSH anzusprechen. Hier wären vermutlich weitere Untersuchungen, wie z.B. Bindungs-Studien notwendig, um das Verhalten dieses Rezeptorproteins noch weiter aufklären zu können.

4.4 Darstellung der Rezeptoren an der Zelloberfläche mittels Immunfluoreszenz

Eine weitere Untersuchung führten wir wiederum an einigen wenigen Rezeptoren durch, um die im ELISA gemessene Oberflächenexpression noch einmal qualitativ sichtbar zu machen. Dabei wurden der Wildtyp-Rezeptor, G181D, S127L sowie 750/751delT in HEK293-Zellen exprimiert und, wie in Material und Methoden beschrieben, behandelt. Für alle vier untersuchten

Rezeptor-Varianten zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine eindeutige Anwesenheit der Rezeptor-Proteine an der Zelloberfläche. Der Transport der Proteine vom endoplasmatischen-Reticulum über den Golgi-Apparat bis hin zur Plasmamembran erscheint hier also nicht (oder nur in relativ geringem Maße bei G181D) beeinträchtigt zu sein. Dieses Ergebnis bestätigt im Nachhinein nochmals unsere im Zell-Oberflächen-ELISA gewonnenen Erkenntnisse. Da es sich bei der Immunfluoreszenz-Untersuchung jedoch im Gegensatz zum ELISA um ein qualitatives Verfahren handelt, kann hier nur die Aussage getroffen werden, dass überhaupt ein Transport und eine Insertion in die Plasmamembran stattfindet. Aussagen über die Quantität lassen sich genauer mit Hilfe des oben beschriebenen ELISA treffen. Eine Visualisierung des beschriebenen Ergebnisses ist aber auf diesem Wege sehr gut möglich (Abbildung siehe S.77)

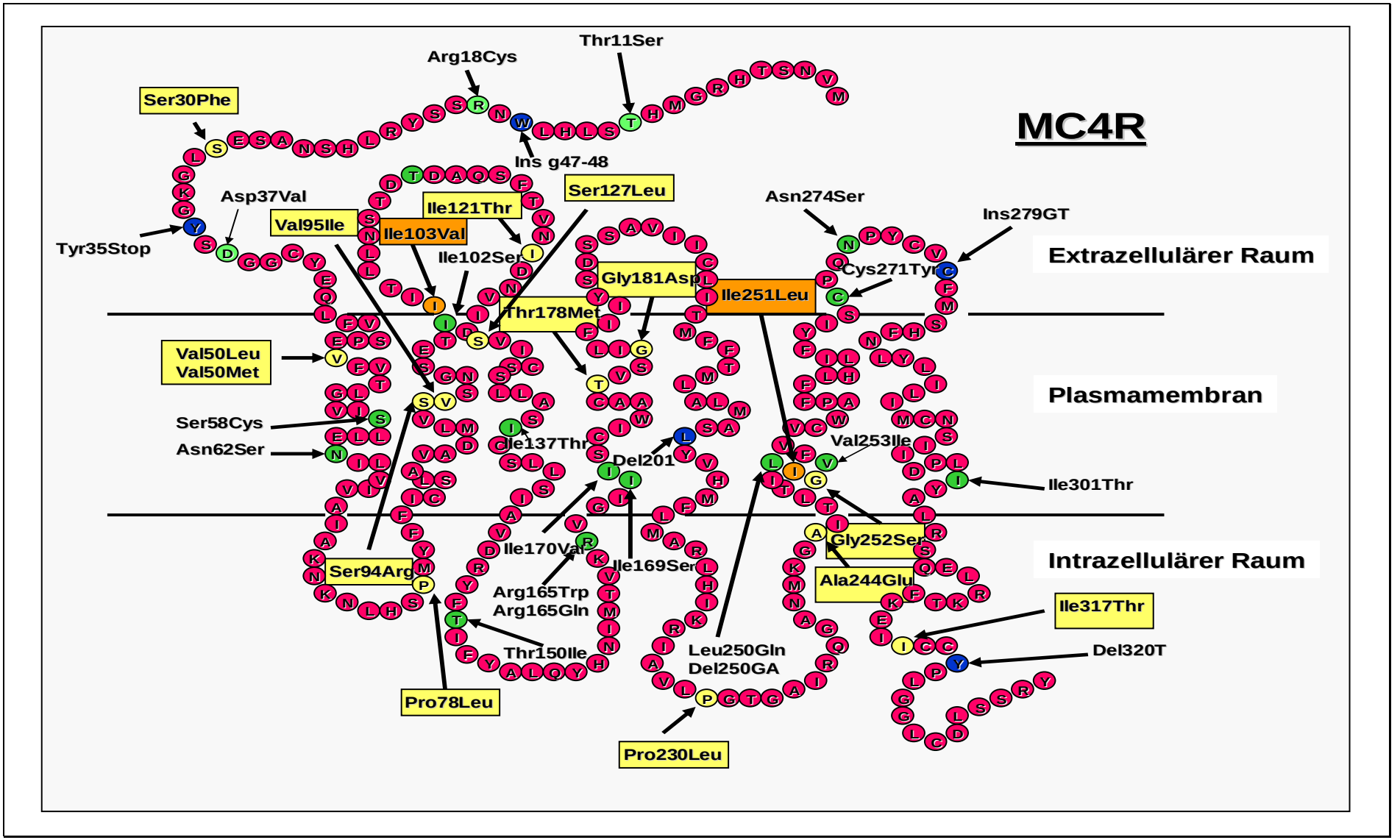

Abbildung 1:Der Melanocortin-4-Rezeptor in der Übersicht unter Berücksichtigung aller bis zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen bekannten humanen Mutationen.

In Grün erscheinen Missense-Mutationen, Blau steht für Frameshift- oder Nonsense-Mutationen. In Gelb sind all jene Mutationen hervorgehoben, welche im Rahmen unserer Arbeit erstmals untersucht wurden, Orange kennzeichnet die beiden Polymorphismus Varianten.

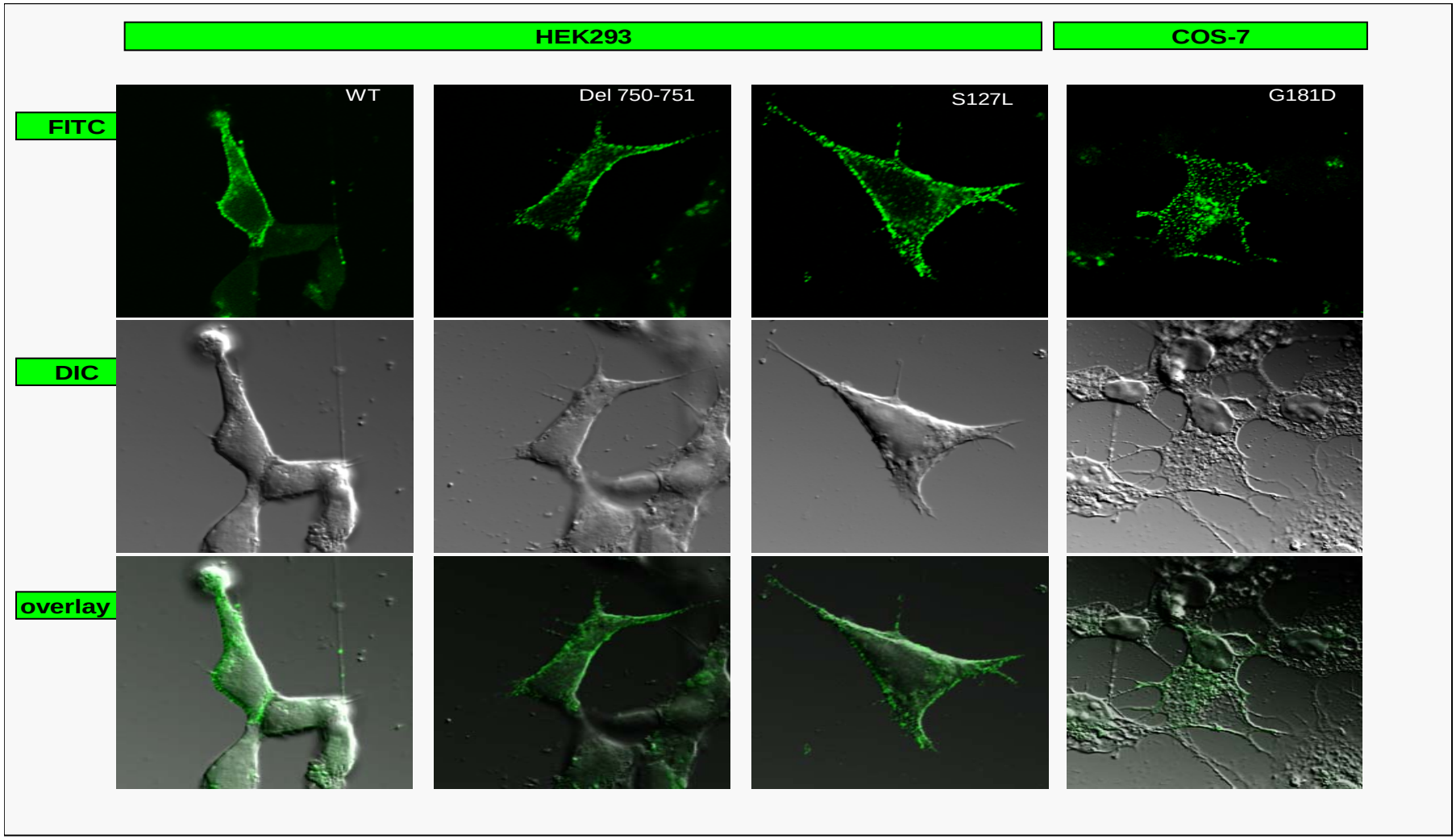

Abbildung 2: Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen am Wildtyp-Rezeptor sowie den Mutationen G181D, S127L und 750_751delT

Nach Einklonierung eines N-terminalen HA-Epitops wurden die Mutationen in HEK293-Zellen exprimiert und diese in 6-Loch Platten auf Glasplättchen ausgesät. Drei Tage nach der Transfektion erfolgte eine mehrmalige Waschung mit PBS sowie eine Fixierung in Formaldehyd. Nach Blockade der Bindungsstellen für 1h in Earles-MEM+FCS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-HA) über 2h.Nach erneuter Waschung in PBS, Inkubation mit dem zweiten AK (anti-Maus IgG, FITC-markiert) über 1h. Untersuchung unter konfokalem Lasermikroskop. Die erste Reihe zeigt ausschließlich das FITC-Signal, die zweite die unmarkierte Zelle, die dritte Reihe legt beide Signale übereinander. Deutlich wird, dass alle drei mutierten Rezeptorproteine in die Zellmembran gelangen. Bei G181D ist dieses Ergebnis weniger eindeutig.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wollten wir die funktionellen Auswirkungen verschiedener Mutationen im Bereich eines im komplizierten Regelkreis der Gewichtsregulation eingebundenen Rezeptors, des Melanocortin-4-Rezeptors, zu beschreben suchen und dabei herausfinden, welche Rolle solche Mutationen in Zusammenhang mit der weit verbreiteten Volkskrankheit Adipositas spielen. Um die quantitative Bedeutung zu sichern, führten wir im Zusammenhang mit dieser Untersuchung die bis zu diesem Zeitpunkt zahlenmäßig größte Studie an adipösen Kindern und Jugendlichen, sowie einem nicht geringen Anteil deren Eltern durch.

Bereits die Tatsache, dass in der Studienpopulation 43 der 808 Kinder einen nicht-konservativen Aminosäure-Austausch im Bereich des MC4R-Proteins in ihrer DNA trugen, während dies in der Kontrollgruppe nur bei 16 der 327 Personen der Fall war (wovon fünfzehn Träger der bereits bekannten Polymorphismen V103I und I251L darstellten), kann als ein Hinweis auf die relative Häufigkeit dieser Art der genetisch bedingten Adipositas dienen.

Um die Relevanz dieser detektierten Mutationen zu ergründen, untersuchten wir 16 Mutationen sowie den Wildtyp-Rezeptor mit Hilfe des cAMP-Akkumulations-Assays. Dabei stellten wir fest, dass die unterschiedlichen Mutationen, obwohl sie allesamt aus einer aus extrem adipösen Individuen zusammengesetzten Studienpopulation stammten, nicht alle zum erwarteten Funktionsverlust des Rezeptors führten. Im Gegenteil waren sie teilweise sogar im Stande, eine Funktionssteigerung des Rezeptorproteins hervorzurufen. Diese Erkenntnisse stehen im Einklang mit denen der Arbeitsgruppen um *Ho und Mckenzie* sowie *Vaisse* [43; 107], die in ähnlich angelegten Studien bereits die intakte Funktion mutierter MC4R-Proteine nachweisen konnten. Da die Retention veränderter Rezeptorproteine im Zellinneren als ein Erklärungsansatz für den Funktionsausfall dieser Art von Mutationen herangezogen werden konnte (*Lubrano-Berthelier et al.* [60]), gingen wir auch dieser Tatsache mit Hilfe eines Oberflächen-ELISA sowie (in vereinzelten Fällen) mit immunhistochemischem Methoden nach. Auch in diesem Falle fanden wir ein nicht-einheitliches Verhalten der beschriebenen Rezeptorproteine vor, einige wurden weniger

stark exprimiert als das Wildtyp-Allel, andere wiederum schienen in größerer Anzahl an die Zelloberfläche zu gelangen. Eine schwierige Frage, welche verschiedenste Arbeitsgruppen seit Jahren beschäftigt, ob nämlich der Phänotyp der fast ausschließlich heterozygoten Patienten am ehesten auf einen dominant negativen Effekt der mutierten Rezeptorproteine hervorgerufen sein könnte oder ob es sich um eine Haploinsuffizienz des betroffenen Allels handeln sollte, konnten wir mit den von uns verwendeten Methoden nicht eindeutig klären.

5.1 Funktionelle Relevanz der gefundenen Mutationen im MC4R-Gen

Die im Rahmen der SSCP-Untersuchung im Genom der 808 adipösen Kinder und Jugendlichen, deren Eltern sowie der Kontrollgruppe detektierten Mutationen sollten von uns im Hinblick auf ihre funktionelle Relevanz unter die Lupe genommen werden. Dies lag nahe, da zwar die Orginalarbeiten über MC4R-Mutationen im Menschen (*Vaisse et al*.[106], *Ho & MacKenzie* [43]) die Hypothese aufgestellt hatten, dass solchermaßen geartete Veränderungen der häufigsten monogen vererbten Form der Adipositas zu Grunde lägen. Diese Annahme war jedoch in letzter Zeit immer wieder in Frage gestellt worden. Die Zweifel begründeten sich vor allem in der Existenz schlanker Mutationsträger, deren genetische Ausstattung nach oben genannten Kriterien zu einer Fettsucht hätte führen müssen (*Vaisse et al*. [107]). Zudem hatten *Jacobson* und seine Arbeitsgruppe im Rahmen einer groß angelegten Studie unter Berücksichtigung etwaiger Unterschiede in verschiedenen ethnischen Gruppen zwar einen gewissen Prozentsatz an Mutationen im MC4-Rezeptor-Gen gefunden, diese zeigten jedoch durchweg keine signifikante Assoziation mit einem adipösen Phänotyp [50]. Unter den farbigen Mitgliedern der Studienpopulation fanden sich keine pathogenetisch interessanten Mutationen in Melanocortin-4-Rezeptor-Gen. Aus diesen Untersuchungsergebnissen folgerte man deshalb, dass MC4R-Mutationen im Sinne einer monogen vererbten Form der Adipositas nur einen sehr geringen Prozentsatz der Fälle ausmachten und zudem vermutlich nur in bestimmten ethnischen Gruppierungen vermehrt zu finden seien. Der Prozentsatz an Personen mit detektierten Melanocortin-4-Rezeptor-Mutationen war in unserer adipösen Studienpopulation im Gegensatz zur unter-

bzw. normalgewichtigen Kontrollgruppe deutlich erhöht. Von den beiden Polymorphismus-Varianten abgesehen trugen 21 von 808 adipösen Probanden eine nicht stille Mutation in ihrem Genom (ca. 2,5%). In der Kontrollgruppe von 327 Probanden konnte nur bei einer Person eine Missense-Mutation ausgemacht werden (ca. 0,3 %). Auf dem Boden dieser Ergebnisse erschien es uns nun interessant zu untersuchen, wie viele der gefundenen Mutationen eine Verminderung der Rezeptorfunktion bedingen könnten.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen auf die jeweilige Rezeptorfunktion zu untersuchen, wählten wir den cAMP-Akkumulations-Assay als hierfür geeignete Methode aus. Der Melanocortin-4-Rezeptor gehört der Familie der G- Protein gekoppelten Rezeptoren an (*Gantz et al.*[34]) und koppelt an ein G_s-Protein. Bei seiner Aktivierung durch einen Liganden wird die Adenylatcyclase stimuliert, welche ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) überführt. cAMP wiederum aktiviert die Proteinkinase-A, welche weitere Signaltransduktions-Prozesse in Gang setzt und somit am Ende der Kaskade zum eigentlichen Effekt dieses Rezeptors führt. Eine Stimulation dieses Rezeptor-Proteins, z. B. mit Hilfe seines Liganden α-MSH, führt also zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Zellen, welcher als quantitatives Maß für die Funktion des Rezeptors herangezogen werden kann.

Um diese Werte zu ermitteln, klonierten wir zunächst die mutierten MC4R-Gene der Patienten in den Transfektionsvektor pSG5 (worauf unter anderem aufgrund der Heterozygotie aller untersuchter Individuen eine Sequenzierung folgte), transfizierten COS7-Zellen damit und inkubierten diese im Anschluss mit radioaktiv markiertem Adenin. Nach dem Durchführen der Stimulation mit Hilfe von α-MSH wurden über die weiteren unter Material und Methoden 3.3.1 beschriebenen Schritte die cAMP-Spiegel unter den verschiedenen Konzentrationen von α-MSH ermittelt und Dosis-Wirkungskurven errechnet.

Um eine Einordnung der Mutationen zu vereinfachen, schufen wir zwei verschiedene Haupt- und vier weitere (in sich selbst relativ heterogene) Unterkategorien, in welche die einzelnen Mutationen eingeordnet werden konnten. Die beiden Hauptkategorien trugen die Namen *beeinträchtigte Funktion* (worunter die Unterkategorien „*Reduzierte Funktion*“ und „*kompletter Funktionsausfall*“ subsummiert werden konnten), sowie *ähnlich dem Wildtyp*. Zwei Rezeptoren, denen wir eine konstitutiv aktive Rezeptorfunktion

nachweisen konnten, bildeten die vierte Unterkategorie. Da diese Kategorisierung der Mutationen zwar zum vereinfachten Verständnis beizutragen vermag, jedoch auch darüber hinwegtäuscht, wie unterschiedlich das Verhalten der einzelnen Rezeptormutationen ein- und derselben Kategorie sein kann, sollte sie mit Vorsicht verwendet und nur als Hilfestellung betrachtet werden.

Unter den 15 von uns untersuchten Mutationen zeigten fünf einen kompletten Funktionsausfall, wie er aufgrund des Phänotyps der jeweiligen Patienten erwartet werden konnte. Weitere vier wiesen eine reduzierte Rezeptorfunktion gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor auf. Auch dieses Verhalten im cAMP-Akkumulations-Assay wäre (die Annahme einer durch MC4R-Mutationen bedingten Adipositas vorausgesetzt) vereinbar mit dem klinischen Bild der betroffenen Patienten. Die folgende Gruppe, welche vier weitere Mutationen beinhaltet, verhielt sich in allen durchgeführten Versuchen ähnlich wie das durch das Wildtyp-Allel codierte Protein. Nähme man also die Veränderung im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen als die einzige Ursache für die Adipositas des betroffenen Individuums an, so käme man an diesem Punkt in Erklärungsnot. Auf eine funktionelle Störung des MC4R als Grundlage der Fettsucht kann hier nicht zurückgegriffen werden. Bereits andere Arbeitsgruppen hatten die Beobachtung getätigt, dass einige der Mutationen im Melanocortin-4-Gen nicht zu einer Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion führen, so z. B*. Vaisse et al*. oder *Gu et al.* [107; 38]. Trotz dieser Tatsache weisen die betroffenen Patienten einen extrem adipösen Phänotyp auf, welcher, da er mit einem durch die Mutation bedingten Funktionsverlust nicht erklärt werden kann, im Sinne einer polygenen Vererbung interpretiert werden könnte. Dies erscheint ob der Komplexität der vielen verschiedenen Regelkreise, welche das Körpergewicht und die Energie-Homöostase regulieren, nicht unwahrscheinlich.

Noch schwieriger fällt die Interpretation der von uns unter der Kategorie der *konstitutiv aktiven Rezeptoren* zusammengefassten Rezeptor-Varianten aus. Diese beiden Rezeptoren gleichen sich in ihrem funktionellen Verhalten kaum, lediglich einen deutlich höheren Basalwert ohne jegliche hormonelle Stimulation haben die beiden Varianten gemeinsam. Während S127L aufgrund seines Verhaltens unter α-MSH der Hauptkategorie *beeinträchtigte Funktion* zuzuordnen wäre, zeigt P230L eine Dosis-Wirkungskurve, welche gegenüber

der des Wildtyp-Rezeptors nach oben verschoben erscheint (siehe Kapitel 4 Abb. 25 und 26). Da der P230L zugrunde liegende Aminosäureaustausch im Bereich der dritten intrazellulären Schleife lokalisiert ist, welcher eine besondere Bedeutung bei der Kopplung des Rezeptors an das G-Protein zugeschrieben wird, erscheint eine dauerhafte Aktivierung durch eine Veränderung dieser Region nicht unwahrscheinlich. Jedoch wäre es in diesem Falle schwierig, einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp, dessen funktioneller Konsequenz und dem sich präsentierenden klinischen Bild des Patienten herzustellen. Wären Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen wirklich für eine autosomal dominante Form der Adipositas verantwortlich, wie ursprünglich angenommen, müsste dann eine aktivierende Mutation im selben Gen nicht auch zu einer deutlichen Gewichtsreduktion und somit einem untergewichtigem Phänotyp führen? Bereits im Vorfeld war eine aktivierende Mutation im MC4R-Gen beschrieben worden (*Vaisse et al*.[107]), die Erklärung des Phänotyps resultierte hier aus der Tatsache, dass der betroffene Rezeptor zu großen Teilen im Zellinneren retiniert worden war und nicht an die Zelloberfläche gelangen konnte (*Lubrano-Berthelier et. al.*[60]). Konstitutiv aktive Rezeptor-Mutationen scheinen im Allgemeinen häufig in geringerer Zahl exprimiert zu werden (*Milligan et al*.[67]), auch eine Strukturinstabilität konnte ihnen nachgewiesen werden (*Milligan et al*.[68]). Aufgrund dieser Tatsache untersuchten wir beide konstitutiv-aktiven Rezeptor-Varianten auch im Zelloberflächen-ELISA, dessen Ergebnisse weiter unten noch diskutiert werden sollen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang evtl. auch die Tatsache, dass der Melanocortin-4-Rezeptor-Wildtyp selbst eine gewisse konstitutive Aktivität zu besitzen scheint. Dies ist belegbar anhand der Beobachtung, dass der cAMP-Spiegel bereits in der unstimulierten Zelle durch den Antagonisten (und hier im Sinne eines inversen Agonisten agierenden) AgRP erniedrigt werden kann (*Nijenhuis et al.*[75]). Ein solcher inverser Agonismus kann nur bei Rezeptoren stattfinden, die auch ohne Bindung ihres Agonisten (also hier des α-MSH) eine gewisse Grundaktivität zeigen. Dies wird auch an den von uns gemessenen Werten deutlich (siehe dazu auch Kapitel 4.2.1, Tabelle 23): Im Vergleich mit den cAMP-Spiegeln der Zellen, welche zum Zweck der Kontrolle ausschließlich mit dem Expressionsvektor transfiziert worden waren, wiesen die mit dem

Wildtyp-MC4R bestückten Zellen doppelt so hohe Werte auf. Die basale Aktivität der Mutationen, welche von uns in die Kategorie „kompletter Funktionsverlust“ eingeordnet worden waren, lag jedoch auf vergleichbarem Level mit der der pSG5-Kontrolle. Auch die oben erwähnte geringe konstitutive Aktivität des Wildtyp-Rezeptors scheint hier also aufgrund der Konformationsänderung des Rezeptorproteins verloren gegangen zu sein. In einer Arbeit zu der erwähnten konstitutiven Aktivität des Wildtyp-Rezeptors [96] erläutern die Autoren *Srinivasan et al*. ihre Hypothese, der N-Terminus des MC4R sei für dieses Phänomen verantwortlich. Belegt wird dies anhand der Untersuchungen, dass alle in diesem Bereich liegenden Mutationen eine Reduktion der basalen Aktivität des Rezeptors trotz unverminderter Zelloberflächenexpression bedingten. Des Weiteren zeige sich eine Häufung von Missense-Mutationen gerade in diesem Bereich (an Position 18 seien bislang drei verschiedene Aminosäureaustausche bekannt, die einzige Dreifach-Mutation im gesamten MC4R-Gen). Auch sei der N-terminale Bereich nicht wichtig für die Wirkungen des α-MSH am Rezeptor. Durch eine Verminderung der basalen Aktivität des Rezeptors bei gleichzeitiger weiterer Stimulationsfähigkeit des Proteins durch seinen Agonisten könne eine genetische Disposition zur Adipositas hervor gerufen werden. Auch wir fanden Mutationen, welche eine Reduktion der basalen cAMP-Spiegel des Rezeptors bedingten. Von diesen Mutationen zeigte jedoch keine einen Aminosäure-Austausch im Bereich des Rezeptor-N-Terminus. Da sie jedoch alle auch eine reduzierte Oberflächen-expression im ELISA zeigten, wird hierin die Ursache für eine reduzierte basale Aktivität zu finden sein (siehe 5.2).

Zusätzlich zur bei allen hier beschriebenen Mutanten durchgeführten Stimulation mit α-MSH und anschließender Messung im Rahmen des cAMP-Akkumulations-Assays, interessierten wir uns bei den beiden als konstitutiv-aktiv klassifizierten Mutationen S127L sowie P230L außerdem für ihr Verhalten bei Hemmung durch einen Antagonisten. Dafür verwendeten wir zum einen den natürlich vorkommenden Gegenspieler des α-MSH, das AgRP (welches wie oben bereits ausgeführt auch als ein inverser Agonist am MC4R wirkt). Zum anderen kam das synthetisch hergestellte SHU9119 zum Einsatz, welches als spezifischer Antagonist nur am MC4R, sowie am MC3R (dem zweiten im Bereich des Hypothalamus lokalisierten Melanocortin-Rezeptor) wirkt. Bei

beiden Rezeptorvarianten senkt das AgRP den Basalwert deutlich herab, seine Wirkung im Sinne eines inversen Agonismus scheint also durch die Mutationen nicht beeinträchtigt zu sein. Sowohl SHU9119 als auch AgRP sind in der Lage, die Wirkung des α-MSH zu antagonisieren. Dies entspricht im Großen und Ganzen dem Verhalten des Wildtyp-MC4R unter Antagonisteneinwirkung, hier kann also keine abweichende Charakteristik ausgemacht werden.

Eine weitere Beobachtung, welche hier diskutiert werden kann, betrifft das Verhalten des Polymorphismus V103I im Vergleich mit dem Verhalten des Wildtyp-Rezeptors. V103I kommt proportional häufiger in normal- bzw. untergewichtigen Individuen vor, als in der adipösen Studienpopulation. In unseren 808 fettsüchtigen Kindern und Jugendlichen fand er sich beispielsweise in neun Probanden, was einem Prozentsatz von 1,1% entspricht. In der Kontrollgruppe hingegen konnte er bei acht der 326 untersuchten Personen detektiert werden, 2,45%. Deshalb lag die Vermutung nahe, dieser Aminosäureaustausch im Bereich der dritten Transmembrandomäne könne einen protektiven Effekt im Sinne eines Schutzes vor unkontrollierter Gewichtszunahme zur Folge haben. Bereits in mehreren funktionell ausgerichteten Studien war der Polymorphismus deshalb auch eingehend untersucht worden (*Gu et al.; Vaisse et al.*[38;107]), jedoch mit dem Ergebnis, dass kein erkennbarer, mit Hilfe funktioneller Untersuchungen quantifizierbarer Effekt dieser Mutation gefunden werden konnte. Auch unsere Untersuchungen zeigen zwar eine leichte Abweichung des Verhaltens von V103I gegenüber dem Verhalten des Wildtyp-Rezeptors (siehe auch 4.2.1, Abb.11) im cAMP-Akummulations-Assay, diese ist jedoch nicht deutlich genug, um hier einen eindeutigen protektiven Effekt postulieren zu können. Mit Hilfe einer Meta-Analyse mehrerer in diese Richtung gehender Studien haben *Geller et al*. [35] jedoch einen solchen Effekt nachweisen können, indem sie sich nicht allein an den funktionellen Ergebnissen orientierten, sondern ihr Augenmerk vor allem auf den durchschnittlichen BMI sowie die „Hip-to-Waist“-Ratio der V103I-Träger im Vergleich zu den Werten der Durchschnittsbevölkerung richteten.

5.2 Verminderung der Zelloberflächen-Expression der Mutationen als mögliche Ursache des Funktionsverlustes.

Die intrazelluläre Retinierung veränderter Membranproteine stellt einen Mechanismus dar, welcher zur Erklärung des Effektes hereditärer Mutationen von ganz unterschiedlichen Proteinen immer mehr herangezogen wird. So wird z.B. das Krankheitsbild der familiären Hypercholesterinämie (bzw. einiger seiner Subtypen) auf den ungenügenden Transport des LDL-Rezeptors an die Zelloberfläche zurückgeführt (*Hobbs et al.* [44]). Die weit verbreitete Augenerkrankung Retinitis pigmentosa, der eine Mutation im Rhodopsin-Gen zu Grunde liegt, wird in ihren dominanten Formen zumeist auch durch Verbleiben des veränderten Rezeptor-Proteins im Zellinneren bedingt (*Sung et al., Kaushal et al.*[101;53]).

Wie bereits im Vorfeld erwähnt, stellt eine Verminderung der Expression veränderter MC4R-Proteine an der Zelloberfläche eine relativ häufige Ursache für deren Funktionsverlust im cAMP-Akkumulations-Assay (bzw. auch im Rahmen anderer funktioneller Untersuchungen) dar und könnte einen Teil des adipösen Phänotyps der betroffenen Patienten erklären helfen. So machten nach *Gu et al.* [38], welche zuerst Versuche in dieser Richtung durchführten, auch *Lubrano-Berthelier et al*. [60] die Beobachtung, dass fast alle der von ihnen in einer Studienpopulation von adipösen Kindern und Jugendlichen entdeckten Mutationen des MC4R teilweise im Zellinneren retiniert werden. Dieses Verhalten wurde als eine der Grundlagen für die Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion bei dieser Art der monogen vererbten Adipositas angesehen. Um die Oberflächen-Expression des MC4R zu quantifizieren, bedienten sich die oben genannten Gruppen zum einen der Immunfluoreszenz (*Gu et al.*[38]), zum anderen einer neuen Methode, die auf der Konstruktion eines Rezeptors mit C-terminalem GFP-Tag (grün fluoreszierend) sowie N-terminalem Flag-Tag verbunden mit einer Untersuchung mittels Flow-Zytometrie beruhte (*Lubrano-Berthelier et al.*[60]).

Um die den Funktionsausfällen der von uns detektierten Rezeptormutanten zu Grunde liegenden Ursachen genauer bestimmen zu können, erschien es also notwendig, ebenfalls Untersuchungen zur Oberflächenexpression der MC4R-Mutationen anzustrengen. Da wir allerdings eine sehr große Anzahl von MC4R-

Mutationen im cAMP-Assay untersucht hatten, welche nicht alle von weiterem Interesse für uns zu sein schienen, entschieden wir uns dafür, nur einen Teil von ihnen weiteren Untersuchungen zuzuführen. Die Wahl fiel auf vier Mutationen, welche einen kompletten Funktionsausfall des Rezeptors bedingt hatten, G181D, S94R, 631_634del, 750_751ga, sowie auf die beiden konstitutiv aktiven Varianten S127L sowie P230L. Wir entschieden uns dabei für die Methodik des Zelloberflächen-ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay), in dessen Rahmen ein N-terminales Hämagglutinin(HA)-Epitop an unsere Mutanten kloniert wurde, da keine speziellen, gegen den N-Terminus des MC4R gerichteten Antikörper zur Verfügung standen. COS7-Zellen wurden mit der solchermaßen veränderten DNA transfiziert und drei Tage bei 37°C und 5 % CO_2 im Inkubator belassen, bevor man den unter Material und Methoden 3.3.2.2. genauer beschriebenen Versuch durchführte.

Die hierbei ermittelten Werte lassen sich aus den Abbildungen 27 bis 29 des Ergebnisteils entnehmen. Wie im Vorfeld erwartet, zeigte der Wildtyp-Rezeptor eine gut erkennbare Oberflächenexpression, seine Werte lagen zwar nicht im Bereich derer der Positivkontrolle (des humanen Vasopressin-Rezeptors vom Typ 2), hoben sich jedoch deutlich vom Basalwert (nicht transfizierte COS7-Zellen) ab. Die beiden Missense-Mutationen S94R sowie G181D zeigten hingegen (dies übereinstimmend mit den oben genannten Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen) eine signifikante Reduktion der Expression des MC4R-Proteins an der Zelloberfläche. In diesen Fällen scheint also dem Funktionsausfall im cAMP-Akkumulations-Assay unter anderem ein gestörter Proteintransport vom Zellinneren zur Plasmamembran zu Grunde zu liegen. Bei Patienten, welche heterozygot für besagte Mutationen sind, würde also eine deutlich reduzierte Anzahl der Rezeptoren die Zelloberfläche erreichen und somit eine verminderte Zahl von Bindungsstellen für das α-MSH vorliegen. Hieraus resultierte vermutlich ein Überwiegen des NPY-Systems und daraus folgend eine deutliche Gewichtszunahme. Auch unsere beiden Frameshift-Mutationen 631_634del und 750_751del, welche zu einem Kettenabbruch im Bereich der sechsten bzw. siebten Transmembrandomäne führen, weisen im ELISA eine verminderte Oberflächenexpression auf. Diese fällt jedoch nicht ganz so deutlich aus wie bei den beiden vorher besprochenen Missense-Mutationen, was angesichts der deutlichen Änderung in der Konformation des

Proteins verwunderlich erscheint. So ist die Expression von 750_51del gegenüber der des Wildtyp nur unwesentlich verändert .Trotz allem kann man sagen, dass vermutlich auch in diesen beiden Fällen die intrazelluläre Retinierung der veränderten Rezeptorproteine ihren Teil zur Erklärung des adipösen Phänotyps der Mutationsträger leisten kann, wenn sie auch nicht in der Lage sein dürfte, das volle Bild zu erklären.

Im Falle der beiden von uns als konstitutiv aktiv deklarierten Rezeptoren liegt der Fall wieder einmal komplizierter. Wie unter 5.1 bereits erwähnt, neigen konstitutiv aktive Rezeptoren dazu, im Inneren der Zelle zu verbleiben, also in deutlich verminderter Anzahl an die Oberfläche der Zelle zu gelangen (*Milligan et al*.[67]). Bei einem solchen Verhalten führte die aktivierende Mutation nicht wie erwartet zu einer Aktivitätssteigerung (im Falle des MC4R also zum Einstellen eines Sättigungsgefühls und daraus resultierend zu Gewichtsabnahme und Untergewicht), sondern im Gegenteil zu einem Funktionsverlust des Rezeptors. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen erschien eine Verminderung der Insertion der beiden Mutationen S127L und P230L in der Zellmembran angesichts der Fettsucht ihrer Träger sehr wahrscheinlich. Erstaunlicherweise konnten wir jedoch sowohl bei P230L als auch bei S127L eine gegenüber dem Wildtyp eher erhöhte Oberflächen-expression messen. S127L war auch in der Studie von *Lubrano-Berthelier* [60] auf seine Insertion in die Zellmembran hin untersucht und für nicht verändert gegenüber dem MC4R-Wildtyp befunden worden. Was bedeuten nun diese Ergebnisse für den betroffenen Patienten? Kann seine Adipositas durch eine Mutation im MC4R erklärt werden, welche zu einer Aktivitätssteigerung des Rezeptors führt, auch wenn dieser trotzdem ohne Probleme an die Zelloberfläche transportiert wird? Oder müssen vor diesem Hintergrund nicht doch andere polygen vererbte Praedispositionen für den fettsüchtigen Phänotyp angenommen werden? Natürlich ist unsere Untersuchung unvollständig, mit anderen funktionellen Untersuchungen hätte man vielleicht noch einen Anhalt finden können, wie sich die untersuchten Mutationen negativ auf die Funktion des Rezeptors auswirken könnten. Allerdings machen die Ergebnisse der beiden durchgeführten Experimente cAMP-Akkumulations-Assay und Oberflächen-ELISA eine alleinige Ursache (also die MC4R-Mutation als Grundlage einer monogen vererbten Adipositas) eher unwahrscheinlich. Auch

die beschriebene Instabilität der konstitutiv-aktiven Rezeptoren (*Milligan et al*.[68]), welche uns ja bei unseren *In vitro*-Versuchen trotz allem hätte auffallen müssen, reichte hier als Erklärung für die Fettsucht der Index-Patienten nicht aus.

Die Reduktion der Zelloberflächenexpression des MC4R kann also zur Erklärung der reduzierten Rezeptorfunktion bei einem Teil der von uns untersuchten Rezeptoren durchaus als Erklärungsansatz herangezogen werden. Eine allgemeingültige Antwort auf die Frage, auf welche Art und Weise MC4R-Mutationen zu einer verminderten Antwort auf α-MSH, bzw. zur Adipositas des Patienten führen, liefert jedoch auch dieses Verfahren nicht. Insbesondere die Diskrepanz zwischen einem dauerhaft aktiven Rezeptor-protein mit mehr als hundertprozentiger Oberflächenexpression im ELISA, und einem von extremer kindlicher Adipositas geprägten klinischen Bild wirft hier weitere Fragen auf.

5.3 Ein „major-gene-effect“ ?

Eine zentrale Frage der von uns durchgeführten Studie bestand darin, ob Mutationen im MC4-Rezeptor Gen einen so genannten „major-gene-effect“ für eine extreme Adipositas darstellen, d.h. ob funktionell relevante Varianten des Rezeptors im Sinne einer autosomal dominanten Vererbung einen adipösen Phänotyp bedingen. Wie unter 5.1 bereits erwähnt, wurde dieses Konzept vor allem durch die Detektion schlanker Individuen in Frage gestellt, welche Träger von im in-vitro Versuch funktionslosen MC4R-Rezeptormutationen darstellten (*Farooqi et al.; Jacobson et al.*[31; 50]). Diese Tatsache ließe sich mit der Hypothese erklären, dass eine einzelne Mutation im MC4R nicht ausreichte, um einen adipösen Phänotyp zu bedingen, es müssten außerdem noch andere genetische bzw. umweltbedingte Voraussetzungen erfüllt sein, um zu einer Fettsucht des betroffenen Individuums zu führen. Ein autosomal dominanter Erbgang wäre unter dieser Vorraussetzung also ausgeschlossen, man ginge von einer multifaktoriellen Ursache der Adipositas aus. Die MC4R-Mutation stellte dabei nur eine praedisponierende Eigenschaft unter vielen dar.

Eben diese Frage nach der Bedeutung einer bestehenden MC4R-Mutation im Hinblick auf den adipösen Phänotyp eines Patienten sollte im Rahmen unserer

gemeinsamen Studie mit der klinischen Forschergruppe der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Marburg zu beantworten versucht werden (*Hinney et al*.[42]). Zu diesem Zweck wurden die Probanden sowie die Kontrollgruppe auf Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen hin untersucht und im Anschluss die auf diese Weise detektierten Varianten auf ihre funktionelle Relevanz hin getestet (s.o.). Um eine weitere Analyse zu ermöglichen, folgte zusätzlich ein Screening der Eltern von 520 der untersuchten Patienten. Unter der Hypothese, dass funktionell relevante MC4R-Mutationen einen „major-gene-effect“ repräsentieren, mussten zwei Voraussetzungen erfüllt werden: Zum einen sollten Eltern von Mutationsträgern keine weiteren funktionell relevanten MC4R-Mutationen außer den an die Kinder weitervererbten tragen. Zum anderen mussten die Eltern, falls in ihrem Genom funktionell relevante MC4R-Varianten existierten, adipös sein. Die auf diese Weise erhobenen Daten wurden einer Assoziationsanalyse (*P*(Fishers-Exact-Test)=0,006 (einseitig) bzw. 0,114 (Frameshift/Nonsense-Mutationen, zweiseitig) oder 0,124 (Missense-Mutationen, zweiseitig)) und einem Transmissions-Disequilibrium-Test (TDT) (Transmissionsrate 81,8 für alle Mutationen mit reduzierter Funktion, *P*(Exact-McNemar-Test)=0,033) unterzogen. Bereits die deutliche Diskrepanz zwischen 15 Trägern einer funktionell relevanten Mutation in der adipösen Studienpopulation im Gegensatz zu keiner einzigen funktionell Einfluss nehmenden Variante in der Kontrollgruppe, lässt einen „major-gene-effect“ möglich erscheinen. Die Tatsache, dass funktionell relevante Mutationen von den Eltern auf die Kinder in 81,2 % der Fälle weitergegeben werden, liefert einen ebenso deutlichen Hinweis. Das relative Risiko eines heterozygoten Individuums mit einer funktionell relevanten MC4R-Mutation, einen adipösen Phänotyp zu entwickeln (BMI>90. Perzentile), ist laut den angestellten Berechnungen gegenüber Trägern des Wildtyp-Allels um ein 4,5-faches erhöht (95% Konfidenzintervall: 0,9-42,8). Auf der Basis dieser Ergebnisse kann ein „major-gene-effect“ der funktionell relevanten Varianten des MC4R in Bezug auf die Entwicklung eines adipösen Phänotyps des betroffenen Individuums angenommen werden. Deutlich wird jedoch auch aus den erhobenen Daten, dass Mutationen des MC4R nur für einen sehr geringen Prozentsatz der Adipositas-Fälle

verantwortlich gemacht werden können, sie haben also eine geringe epidemiologische, jedoch eine hohe individuelle Relevanz.

5.4 Ausblick

Der Melanocortin-4-Rezeptor hat im komplizierten System der Gewichtsregulation eine wichtige Stellung inne. Er vermittelt im Falle seiner Aktivierung ein Signal, welches zum Einstellen der Nahrungsaufnahme führt, bzw. welches die Nahrungsaufnahme des Individuums an den Energiebedarf des Organismus anzupassen scheint (*Huszar et al*.[47]). Diverse Mutationen wurden bis zum heutigen Tage im Gen dieses Rezeptors gefunden, die Hoffnung, hierin eine weit verbreitete genetisch bedingte Ursache für die sich weltweit immer mehr auf dem Vormarsch befindende Adipositas, und somit auch einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt gefunden zu haben, konnte sich jedoch nicht bewahrheiten. Auch im Rahmen unserer Studie war trotz der verhältnismäßig großen Anzahl untersuchter fettsüchtiger Individuen nur ein äußerst kleiner Teil von Mutationen im MC4R-Gen betroffen. Wie in allen bisher durchgeführten funktionellen Überprüfungen von MC4R-Varianten, zeigte sich auch bei uns ein sehr heterogenes Bild. Nicht alle detektierten Mutationen konnten zur Erklärung des Phänotyps der Patienten herangezogen werden. Ist ein Patient jedoch von einer funktionell relevanten Mutation betroffen, so beeinflusst diese seinen Phänotyp sehr deutlich, trotz des Vorhandenseins eines intakten Wildtyp-Allels ist sein Risiko, eine Adipositas zu entwickeln, sehr hoch.

Hieraus ergäbe sich eine der offenen Fragen, welche in Zukunft noch zu beantworten wäre: Übt das mutierte Rezeptorprotein einen dominant-negativen Effekt auf das intakte aus (d.h., behindert es dessen Funktion über Dimerisierung)? Oder entsteht der beobachtete Phänotyp durch eine Haploinsuffizienz des intakten Allels? Verschiedene Arbeitsgruppen sind in dieser Frage bisher zu unterschiedlichen Antworten gekommen. *Biebermann et al*. haben eine Studie zu einer funktionell relevanten Melanocortin-4-Rezeptor-Mutation veröffentlicht, bei welcher mit Hilfe der FRET(Fluorescence-Resonance-Energy-Transfer)-Untersuchung eine Dimerisierung der mutierten Rezeptorproteine mit den intakten Wildtyp-Proteinen nachgewiesen werden konnte [9]. Es wurde also hier ein dominant-negativer Effekt durch das mutierte

auf das intakte Rezeptor-Protein ausgeübt. Auch wir haben einzelne FRET-Untersuchungen mit dem Wildtyp-Rezeptor und unseren beiden Frameshift-Mutationen durchgeführt, welche in die gleiche Richtung zu weisen scheinen (aufgrund der geringen Anzahl der Experimente wurde hierauf im Rahmen der Dissertation jedoch nicht näher eingegangen). Interessant wäre es also, die von uns funktionell untersuchten, relevanten MC4R-Varianten auch im Hinblick auf ihre mögliche Dimerisierung mit dem intakten Wildtyp-Rezeptor, z. B. mit Hilfe der FRET-Technik, zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang könnte es auch interessant erscheinen, inwieweit der MC4R auch mit anderen im Hypothalamus vorkommenden Rezeptoren zu dimerisieren im Stande ist. Von besonderem Interesse wäre hierbei die Interaktion mit den beiden anderen in den Gewichtsregulationszirkel mit eingebundenen Melanocortin-Rezeptoren MC3R und MC5R, aber natürlich ebenso die Beziehungen zu den Melanin-Concentrating-Hormone Rezeptoren MCHR1+2, dem NPY-Rezeptor, etc.

Die Entdeckung der beiden von uns als konstitutiv-aktiv klassifizierten Rezeptoren im adipösen Patientengut (v.a. P230L, da S127L ja unter niedrigen Dosen α-MSH schlecht anspricht und somit eine reduzierte Rezeptorfunktion aufweist) bedürfte einer weiteren Untersuchung. Dabei sollte das Augenmerk auf die Ursache der Daueraktivität auf molekularer Ebene gerichtet werden (z.B. mit Hilfe von Bindungsstudien oder Ähnlichem, begonnen hatten wir mit Beobachtungen des Internalisierungsverhaltens nach Hormongabe, welches bei P230L im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor vermindert erschien). Auch sollte weiterhin über einen Mechanismus nachgedacht werden, welcher eine verbesserte Rezeptorfunktion im cAMP-Akkumulations-Assay mit dem extrem adipösen Phänotyp des betroffenen Individuums in Einklang bringen könnte.

Interessante neue Ansätze zur Erklärung und Behandlung der endemisch vorkommenden Adipositas ergeben sich in letzter Zeit z.B. aus der Entdeckung eines endogenen cannabinoiden Systems, welches sowohl zentral als auch peripher vor allem die Lipogenese und die Aufnahme hochkalorischer Nahrungsmittel zu stimulieren scheint (*Lichtmann et al.*;*Osei-Hyiaman et al.*[58;79]). Auch scheinen hier durchaus Verbindungen zu den beschriebenen Regelkreisen vorhanden zu sein, so weisen ob/ob-Mäuse (mit Leptindefizienz) beispielsweise eine erhöhte Konzentration an endogenen Cannabinoiden (z.B.

Anandamide) im Hypothalamus auf. Die Effekte dieser Cannabinoide werden vor allem durch den CB1-Rezeptor vermittelt, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, der sich zentral überwiegend im Bereich des Hypothalamus, aber auch peripher z.B. in der Leber finden lässt. Zentral führt eine Aktivierung dieses Rezeptors zu einer vermehrten Aufnahme von hochkalorischer, zuckerhaltiger Nahrung. Peripher wird über eine vermehrte Expression eines Transkriptionsfaktors die Fettsäuresynthese „angekurbelt“, was unter anderem zu einer Fettleber und erhöhten Lipidwerten im Blut führen kann. In adipösen Tiermodellen war es möglich, diesen Regelkreis durch den CB1-Rezeptor-Antagonisten Rimonabant zu unterbrechen. Dieser führte zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme von zuckerhaltigen Futterstoffen (jedoch keiner allgemeinen Nahrungsreduktion). Auch die Lipidwerte im Blut normalisierten sich, eine Steatosis hepatis trat nicht auf.

Das beschriebene endocannabinoide System scheint auch bei der Genese der humanen Adipositas eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird abzuwarten sein, ob Rimonabant auch menschliche Probanden dabei unterstützen kann, ein gesundes Körpergewicht zu bekommen und auch zu halten. Entscheidend ist jedoch, dass wir noch lange nicht alle Feinheiten des sehr komplexen Systems der Gewichtsregulation kennen. Auch bestehen zwischen den verschiedenen Regelkreisen Verknüpfungen, die uns weiterhin Rätsel aufgeben. “Die eine Ursache“ für so verschiedenartige Erkrankungen wie die Adipositas oder die Anorexia nervosa, welche bei allen Betroffenen zu Grunde liegt, wird sich nicht finden lassen. Vielmehr handelt es sich bei jedem Fall einer Essstörung um eine multifaktorielle Erkrankung, die neben verschiedenartigsten, genetisch bedingten Ursachen auf molekularer Ebene auch die psychosozialen Umstände des Betroffenen mit einbezieht.

6 Zusammenfassung

Die Adipositas ist eine Erkrankung, welche in den westlichen Industriestaaten immer mehr an Bedeutung gewinnt. Zunehmend sind auch Kinder- und Jugendliche betroffen, was bereits in jungem Alter Folgeerkrankungen wie den Diabetes mellitus Typ 2 oder Hyperurikämie bedingt. Aufgrund dieser Tatsachen ist die Erforschung der molekularen Grundlagen der Gewichtsregulation in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Damit verbunden ist natürlich auch die Hoffnung auf das Auffinden eines möglichen Ansatzpunktes zur effektiven Bekämpfung der Fettsuchts-Epidemie. Bisher konnte ein solcher (auch augrund der Komplexität der betroffenen Regelkreise) jedoch noch nicht ausgemacht werden.

Der Melanocortin-4-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle in der Gewichtsregulation, er vermittelt (indirekt) die anorexigenen Effekte des Leptin, indem er nach Aktivierung eine Einstellung der Nahrungsaufnahme und eine Erhöhung der Stoffwechselrate bedingt. Er ist der Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren zuzuordnen und koppelt an ein G_s-Protein, welches die Adenylylcyclase aktivieren kann. Das Rezeptorprotein besteht aus 332 Aminosäuren und wird durch ein einziges Exon in der humanen Chromosomen-region 18q22 kodiert. Den endogenen Agonisten am Melanocortin-4-Rezeptor stellt das α-MSH dar, welches dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) entstammt. Neben dem MC4R existieren noch vier weitere Melanocortin-Rezeptoren, von denen der MC3R und der MC5R auch in den Prozess der Gewichtsregulation mit eingebunden sind. Zahlreiche Mutationen im MC4R-Gen konnten bis zum heutigen Tage gefunden werden, die Hoffnung, hierin eine Hauptursache für die extreme kindliche Adipositas gefunden zu haben, hat sich leider nicht bestätigen können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine sehr große Patientenpopulation (808 Kinder und Jugendlich mit einem durchschnittlichen BMI> 30 kg/m^2), sowie deren Eltern auf Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen hin untersucht. Dabei ergab sich ein signifikant höherer Anteil von Trägern relevanter Mutationen als in der unter- bis normalgewichtigen Kontrollgruppe.

Um die funktionelle Relevanz der 16 neu detektierten Mutationen untersuchen zu können, wurden diese zunächst in den Expressionsvektor pSG5 kloniert. Im

Anschluss transfizierten wir COS7-Zellen mit den entsprechenden Proben und führten den cAMP-Akkumulations-Assay durch. Im Rahmen dieser Untersuchung zeigten die 16 Mutationen sehr unterschiedliche Verhaltensweisen. Ein Teil zeigte eine deutliche Reduktion der cAMP-Spiegel unter Stimulation mit α-MSH gegenüber denen des Wildtyp-Rezeptors. Ein anderer Teil zeigte Konzentrations-Wirkungskurven, die der des Wildtyps entsprachen. Zwei der von uns untersuchten Rezeptorvarianten (S127L und P230L) zeigten gar ohne Stimulation durch den entsprechenden Liganden Basalwerte, die weit über dem des Wildtyp-Allels lagen, so dass wir hier eine konstitutive Aktivität der Rezeptorproteine postulierten. Gerade die physiologische oder gar die gesteigerte Aktivität der veränderten Rezeptorproteine unter Agonisten-Stimulation lässt sich dabei nur schwer zur Erklärung des adipösen Phänotyps des betroffenen Probanden heranziehen. Der von uns ebenfalls im cAMP-Assay untersuchte, weit verbreitete Polymorphismus V103I zeigte in seiner Dosis-Wirkungskurve nur geringe Abweichungen von den Werten des Wildtyp-Rezeptors. Einen protektiven Effekt dieser Variante auf das Körpergewicht, wie vor einiger Zeit postuliert, konnten wir deshalb aus den von uns erhobenen Daten nicht ableiten.

Da sich ein Teil der Ausfälle in der Funktionalität bei Mutationen des MC4R-Gens durch einen gestörten Transport der veränderten Proteine in die Plasmamembran erklären lässt, untersuchten wir einige der Rezeptoren außerdem im Zelloberflächen-ELISA. Da uns kein spezifischer Antikörper gegen den Rezeptor-N-Terminus des MC4R zur Verfügung stand, versahen wir im Vorfeld der Untersuchung die entsprechenden Proteine mit einem HA (Hämagglutinin)-Tag. Im ELISA ergab sich eine Reduktion der Oberflächenexpression der Mutationen G181D und S94R (welche bereits im cAMP-Assay einen totalen Funktionsausfall gezeigt hatten). Die von uns als konstitutiv aktiv deklarierten Rezeptorvarianten S127L und P230L zeigten jedoch wider Erwarten keinen behinderten Transport an die Zelloberfläche, im Gegenteil erschien die Zelloberflächen-Expression gegenüber der des Wildtyp-Rezeptors eher erhöht. Die restlichen im ELISA untersuchten Rezeptorvarianten zeigten eine ähnliche Expression an der Zelloberfläche wie der Wildtyp-MC4R. Auch der intrazelluläre Verbleib der veränderten Rezeptorproteine reicht hier also zur Klärung der Ursache der Fettsucht des betroffenen Patienten nicht aus. Die im

ELISA festgestellte Oberflächenexpression konnten wir für einige der untersuchten Rezeptoren auch noch mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Untersuchungen qualitativ visualisieren.

Die Frage, welche Bedeutung bestehenden Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen im Hinblick auf den adipösen Phänotyp des betroffenen Individuums zukommt, konnte von uns nur teilweise gelöst werden: Die Annahme eines autosomal dominanten Erbganges kann vor dem Hintergrund der Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen (und vorheriger Beschreibungen schlanker, heterozygoter Träger funktionell relevanter Mutationen) eindeutig verneint werden. Aufgrund der Tatsache, dass in unserer Studienpopulation signifikant mehr Träger einer funktionell relevanten Mutation (15) auftraten (gegenüber keiner funktionell relevanten Mutation innerhalb der Kontrollgruppe) und alle funktionell relevanten Mutationen zudem von den Eltern auf ihre Kinder weitervererbt worden waren, konnten wir einen „major-gene-effect“ von funktionell relevanten MC4R-Varianten auf den Phänotyp des betroffenen Individuums postulieren. Da Melanocortin-4-Rezeptor-Mutationen jedoch nur für einen sehr geringen Prozentsatz der Adipositas-Fälle verantwortlich gemacht werden können, haben sie eine geringe epidemiologische, bei gleichzeitiger hoher individueller Relevanz. Sie stellen also nicht den gesuchten generellen Ansatzpunkt für die Behandlung der sich rapide ausbreitenden Fettsucht dar. Fraglich bleibt, ob es einen solchen allgemeingültigen Ansatzpunkt überhaupt geben kann oder ob sich eine von multiplen molekularen, aber auch psychosozialen Umständen verursachte Erkrankung wie die Adipositas nicht auch nur mit Hilfe vieler verschiedener Ansätze behandeln lassen wird.

7 Literaturverzeichnis

1) **Adan RA**, Gispen WH. (2000) Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur. J. Pharmacol*. **405**:13-24

2) **Adan RA**, Vink T. (2001) Drug target discovery by pharmacogenetics: mutations in the melanocortin system and eating disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol*.**11**:483-490

3) **Albarado DC**, McClaine J, Stephens JM, Mynatt RL, Ye J, Bannon AW, Richards WG, Butler AA. (2004) Impaired Coordination of Nutrient Intake and Substrate Oxidation in Melanocortin - 4 Receptor Knockout Mice. *Endocrinology* **145**:243-252

4) **Baran K**, Preston E, Wilks D, Cooney GJ, Kraegen EW, Saisbury A. (2002) Chronic central melanocortin-4 receptor antagonism and central neuropeptide - y infusion in rats produce increased adiposity by divergent pathways. *Diabetes* **51**: 152-158

5) **Barret B** et al. (1994) Cloning of a new member of the melanocyte stimulating hormone receptor family. *J. Mol. Endocrinol*. **12**:203-213

6) **Baskin D**, Breininger J, Schwartz MW. (1999) Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* **48**:828-833

7) **Baura GD**, Foster DM, Porte D, Kahn SE, Bergmann RN, Cobelli C, Schwartz MW. (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo: a mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest*. **92**:1824-1830

8) **Bednarek MA**, MacNeil T, Kalyani RN, Tang R, Van der Ploeg LHT, Weinberg DH. (1999) Analogs of MTII, Lactam Derivates of α-Melanotropin, Modified at the N-Terminus, and Their Selectivity at Human Melanocortin Receptors 3, 4, and 5. *Biochem. Biophys. Res. Com*. **261**:209-213

9) **Biebermann H**, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Grüters A. (2003) 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* **52**:2984-2988

10) **Billington CJ**, Briggs JE, Grace M, Levine S. (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol*. **260**:R321-R327

11) **Broadwell RD,** Brightman MW. (1976) Entry of proxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp. Neurol*. **166**:257-283

12) **Broberger C** et al. (1997) Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide Y-containing neuronsof the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* **66**:393-408

13) **Brocke KS**, Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. (2002) The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive .*Hum. Mol. Gen*. **11**:331-335

14) **Butler AA**, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD. (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nature Neuroscience* **4:**605-611

15) **Campfield L**, Smith F, Gulsez Y, Devos R, Burn P. (1995) Mouse OB-protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**:546-549

16) **Caro JF** et al. (1996) Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* **348**:159-161

17) **Chhajlani C** et al. (1993) Molecular cloning and expression of a novel human melanocortin receptor. Biochem. *Biophys. Res. Commun*. **195**:866-873

18) **Challis BG**, Coll AP, Yeo GSH, Pinnock SB, Dickinson SL, Threshner RR, Dixon J, Zahn D, Rochford JJ, White A, Oliver RL, Millington G, Aparicio SA, Colledge WH, Russ AP, Carlston MB, O´Rahilly S. (2004) Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY_{3-36}. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:4695-4700

19) **Chen AS**, Metzger JM, Trumbauer ME, Guan X, Yu H, Frazier EG, Marsh DJ, Forrest MJ, Gopal-Truter S, Fisher J, Camacho R, Strack AM, Mellin TN, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LHT. (2000) Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res*. **9**:145-154

20) **Chen AS**, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LHT. (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet*. **26**:8-9

21) **Cheung C**, Clifton D, Steiner R. (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138**: 4489-4492

22) **Chua SC** et al. (1996) Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutation in the OB (Leptin) receptor. *Science* **271**:994-996

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

24) **Cone RD**. (2000) Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor: part of a thrifty genotype? *J. Clin. Invest.* **106**:185-187

25) **Considine RV**. (1996) Serum immunoreactive leptin concentrations in normal weight and obese humans. *N. Engl. J. Med*. **334**:292-295

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

27) **Elmquist JK**, Maratos-Flier E, Saper C, Flier J. (1998) Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nat. Neurosci*. **1**:445-450

28) **Erickson JC**, Hollopeter G, Palmiter RD. (1996) Attenuation of the obesity syndrome of *ob/ob* mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* **274**:1704-1707

29) **Erickson JC**, Clegg KE, Palmiter RD. (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* **381**:415-418

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

31) **Farooqi IS**, Yeo GSH, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O´Rahilly S. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin-4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest*. **106**:271-279

32) **Fehm HL**, Smolnik R, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Born J. (2001) The Melanocortin Melanocyte-Stimulating Hormone/Adrenocorticotropin$_{4-10}$ Decreases Body Fat in Humans*. J. Clin. Endocrinol. Metab*. **86**:1144-1147

33) **Feretti L**, Sgaramella V. (1981) Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of terminiproduced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*. **9**:85-93

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

35) **Geller F**, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, Siffert W, Platzer M, Hess C, Gudermann T, Biebermann H, Wichmann HE, Schäfer H, Hinney A, Hebebrand J. (2004) Melanocortin-4 Receptor Variant V103I is Negatively Associated with Obesity. *Am. J. Hum. Genet*. **74**:572-581

36) **Gotoda T**, Scott J, Aitman TJ. (1997) Molecular Screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia* **40**:976-979

37) **Grill H**, Ginsberg A, Seeley R, Kaplan J. (1998) Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long lasting effects on feeding and body weight. *J. Neurosci.***18**:10128-10135

38) **Gu W**, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB. (1999) Identification and Functional Analysis of Novel Human Melanocortin-4 Receptor Variants. *Diabetes* **48**:635-639

39) **Hahn T**, Breininger J, Baskin D, Schwartz MW. (1998) Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neurosci*. **1**:271-272

40) **Haskell-Luevano C**, Cone RD, Monck EK, Wan YP. (2001) Structure Activity Studies of the Melanocortin-4 Receptor by *in Vitro* Mutagenesis: Identification of Agouti-Related Protein (AgRP), Melanocortin Agonist and Synthetic Peptide Antagonist Interaction Determinants. *Biochemistry* **40**:6164-6179

41) **Hinney A**, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J. (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**:1483-1486

42) **Hinney A**, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schäfer H, Gudermann T, Hebebrand J. (2003) Melanocortin-4 Receptor Gene: Case-Control Study and Transmission Disequilibrium Test Confirm that Functionally Relevant Mutations Are Compatible with a Major Gene Effect for Extreme Obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**:4258-4267

43) **Ho G**, MacKenzie RG. (1999) Functional Characterization of Mutations in Melanocortin-4 Receptor Associated with Human Obesity. *J. Biol. Chem*. **274**:35816-35822

44) **Hobbs HH**, Russel DW, Brown MB, Goldstein JL. (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Ann. Rev. Gen.* **24**:133-170

45) **Horvath TL** et al. (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J. Neurosci*. **19**:1072-1087

46) **Hu YH** et al. (1996) Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behaviour. *J. Biol. Chem*. **271**: 26315-26319

47) **Huszar D**, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. (1997) Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell* **88**:131-141

48) **Inoue H**, Nojima H, Okayama H. (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**:23-28

49) **Iqbal J**, Pompolo S, Dumont LM, Wu CS, Mountjoy KG, Henry BA, Clarke IJ. (2001) Long-term alterations in body weight do not affect the expression of melanocortin receptor -3 and -4 mRNA in the ovine hypothalamus. *Neuroscience* **105**:931-940

50) **Jacobson P**, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Lönn L, Cowan GS Jr., Sjöström L, Bouchard C. (2002) Melanocortin-4 Receptor Variations are Seldom a Cause of Human Obesity: The Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis Cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **87**:4442-4446

51) **Kalra SP**, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra P. (1991) Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:10931-10935

52) **Kask A**, Rägo L, Wikberg JES, Schiöth HB. (1998) Evidence for involvement of the melanocortin MC4 receptor in the effects of leptin on food intake and body weight. *Eur. J. Pharmacol*. **360**:15-19

53) **Kaushal S**, Khorana HG. (1994) Structure and function in rhodopsin 7. Point mutations associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Biochemistry* **33**:6121-6128

54) **Kobayashi H**, Ogawa Y, Shintani M, Ebihara K, Shiodahira M, Iwakura T, Hino M, Ishihara T, Ikekubo K,Kurahachi H, Nakao K. (2002) A Novel Homozygous Missense Mutation of Melanocortin-4 Receptor (MC4R) in a Japanese Woman With Severe Obesity. *Diabetes* **51**:243-246

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

56) **Krude H**, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters A. (2003) Obesity Due to Proopiomelanocortin Deficiency: Three New Cases and Treatment Trials with Thyroid Hormone and $ACTH_{4-10}$. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**:4633-4604

57) **Lee EJ**, Lee SH, Jung JW, Lee W, Kim BJ, Park KW, Lim SK, Yoon CJ, Baik JH. (2001) Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription and ligand selectivity by MC3R and MC4R melanocortin receptors. *Eur. J. Biochem*. **268**:582-591

58) **Lichtmann AH**, Cravatt BF. (2005) Food for thought: endocannabinoid modulation of lipogenesis. *J. Clin. Invest*. **115**:1130-1133

59) **Lu D**, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Woychik RP, Wikison WO, Cone RD. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte stimulating- hormone receptor. *Nature* **371**:799-802

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

61) **Ma L**, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ. (2004) Melanocortin 4 Receptor Gene Variation Is Associated With Severe Obesity in Pima Indians. *Diabetes* **53**:2692-2699

62) **Marks DL**, Cone RD. (2001) Central melanocortins and the regulation of weight during acute and chronic disease. *Recent Prog. Horm. Res*. **56**:359-375

63) **Marsh DJ**, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. (1999) Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nature Genet*. **21**:119-121

64) **McNulty JC**, Thompson DA, Bolin KA, Wilken J, Barsh GS, Millhauser GL. (2001) High Resolution NMR Structure of the Chemically-Synthesized Melanocortin Receptor Binding Domain AgRP (87-132) of the Agouti-Related Protein. *Biochemistry* **40**:15520-15527

65) **Meister B** et al. (1989) Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp. Brain Res*. **76**:343-368

66) **Mergen M**, Mergen H, Ozata M, Oner R, Oner C. (2001) A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **86**:3448

67) **Milligan G**, Stevens PA, Ramsay D, McLean AJ. (2002) Ligand rescue of costitutively active mutant receptors. *Neurosignals* **11**:29-33

68) **Milligan G**, Bond RA. (1997) Inverse agonism and the regulation of receptor number. *Trends Pharmacol. Sci*. **18**:468-474

69) **Millington GW**, Tung YC, Hewson AK, O´Rahilly S, Dickson SL. (2001) Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat. *Neuroscience* **108**:437-445

70) **Miraglia Del Guidice E**, Cirillo G, Nigro V, Santoro N, D´Urso L, Raimondo P, Cozzolino D, Scafato D, Perrone L. (2002) Low frequency of melanocortin-4 receptor (MC4R) mutations in a mediterranean population with early onset obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **26**:647-651

71) **Montague CT**, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Early AR, Barnett AH, Prins JB , O´Rahilly S. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* **387**:903-908

72) **Mountjoy K**, Mortrud M, Low M, Simerly R, Cone RD. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol*. **8**:1298-1308

73) **Mullis KB**, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. **155**:335-350

74) **Nam SY**, Kratzsch J, Kim KW, Kim KR, Lim SK, Marcus C. (2001) Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of leptin, NPY, and alpha-MSH in obese women and their relationship to negative energy balance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**:4849-4853

75) **Nijenhuis WAJ**, Oosterom J, Adan RAH. (2001) AgRP (83-132) acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor*. Mol. Endocrinol*. **15**:164-171

76) **Ollmann M** et al. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**:135-138

77) **Oomura Y**, Ono T, Ooyama H, Wayner MJ. (1969) Glucose and osmosensitive neurons of the rat hypothalamus. *Nature* **222**:282-284

78) **Oosterom J**, Garner KM, den Dekker WK, Nijenhuis WAJ, Gispen WH, Burbach JPH, Barsh GS, Adan RAH. (2001) Common Requirements for Melanocortin-4 Receptor Selectivity of Structurally unrelated Melanocortin Agonist and Endogenous Antagonist, Agouti Protein. *J. Biol. Chem*. **276**:931-936

79) **Osei-Hyiaman D**, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, Kunos G. (2005) Endocannabinoid activation at hepatic CB_1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **115**:1298-1305

80) **Ohshiro Y**, Sanke T, Ueda K, Shimajiri Y, Nakagawa T, Tsunoda K, Nishi M, Sasaki H, Takasu N, Nanjo K. (1999) Molecular scanning for mutations in the melanocortin-4 receptor gene in obese/diabetic Japanese. *Ann. Hum. Genet*. **63**:483-487

81) **Qu D** et al. (1996) a role for melanin-cocentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* **380**:243-247

82) **Roberts RJ**. (1983) Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res*. **11**:135-167

83) **Roselli-Rehfuss L** et al. (1993) Identification of a receptor for melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8856-8860

84) **Saito Y** et al. (1999) Molecular characterization of the melanin-concentrating-hormone receptor. *Nature* **400**:265-269

85) **Sambrook J**, Russel DW. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.

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

87) **Satoh N** et al. (1997) The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci. Lett*. **224**:149-152

88) **Schöth HB**, Muceniece R, Wikberg JES. (1996) Characterisation of the Melanocortin 4 Receptor by Radioligand Binding. *Pharmacol. Toxicol*. **79**:161-165

89) **Schwartz MW**, Woods SC, Porte D Jr., Seeley RJ, Bashkin DG. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**:661-671

90) **Schwartz MW** et al. (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in human. *Nature Med*. **2**:589-593

91) **Schwartz MW** et al. (1997) Leptin increases hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* **46**:2119-2123

92) **Seidah NG** et al. (1999) The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7b2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann. NY. Acad. Sci.* **885**:57-74

93) **Shimada M**, Tritos N, Lowell B, Flier J, Maratos-Flier E. (1998) Mice lacking melanin- concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* **39**:670-674

94) **Sina M**, Hinney A, Ziegler A, Neupert T, Mayer H, Siegfried W, Blum WF, Remschmidt H, Hebebrand J. (1999) Phenotypes in Three Pedigrees with Autosomal Dominant Obesity Caused by Haploinsufficiency Mutations in the Melanocortin-4 Receptor Gene. *Am. J. Hum. Genet*. **65**:1501-1507

95) **Sindelar D** et al. (1999) Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes* **48**:1275-1280

96) **Srinivasan S**, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin BR, Vaisse C. (2004) Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J. Clin. Invest*. **114**:1158-1164

97) **Stanley BG**, Kyrkouli SE, Lampert S, Leibowitz SF. (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* **7**:1189-1192

98) **Stanley BG**, Willet VL III, Donias HW, Ha LH, Spears LC. The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res*. **630**:41-49

99) **Ste. Marie L**, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. (2000) A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:12339-12344

100) **Stephens TW** et al. (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* **377**:530-534

101) **Sung CH**, Tai AW. (2000) Rhodopsin trafficking and its role in retinal dystrophies. *Int. Rev. Cytol*. **195**:215-267

102) **Tarnow P**, Schöneberg T, Krude H, Grüters A, Biebermann H. (2003) Mutationally Induced Disulfide Bond Formation within the Third Extracellular Loop Causes Melanocortin 4 Receptor Inactivation in Patients with Obesity. *J. Biol. Chem*. **278**:48666-48673

103) **Tartaglia LA** et al. (1995) Identification and expression cloning of a leptin receptor OB-R. *Cell* **83**:1263-1271

104) **Tritos NA**, Maratos-Flier E. (1999) Two important systems in energy homeostasis: melanocortins and melanin-concentrating hormone. *Neuropeptides* **33**:339-349

105) **Unger J** et al. (1989) Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience* **31**:148-157

106) **Vaisse C**, Clément K, Guy-Grand B, Froguel P. (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat. Genet*. **20**:113-114

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

108) **Vergoni AV**, Bertolini A, Guidetti G, Karefilakis V, Filaferro M, Wikberg JES, Schiöth HB. (2000) Chronic melanocortin 4 receptor blockage causes obesity without influencing sexual behaviour in male rats. *J. Endocrinol*. **166**:419-426

109) **Wang J**, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rosetti L. (1998) A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* **393**:684-688

110) **Williams G**, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. (2001) The hypothalamus and the control of energy homeostasis, different circuits, different purposes. *Physiology and Behavior* **74**:683-701

111) **Wilson B** et al. (1999) Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* **140**:2387-2397

112) **Wilson GG**, Murray NE. (1979) Molecular cloning of the DNA ligase gene from from bacteriophage T4.I.Characterization of the recombinants. *J. Mol. Biol*. **132**:471-491

113) **Whitfeld PC** et al. (1982) The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence and interspersion with repetitive DNA. *DNA* **1**:133-143

114) **Woods S**, Lotter E, McKay L, Porte DJ. (1979) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**:503-505

115) **Woods S**, Seeley R, Porte DJ, Schwartz MW. (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**:1378-1383

116) **Yang Y**, Chen M, Lai Y, Gantz I, Georgeson KE, Harmon CM. (2002) Molecular Determinants of Human Melanocortin-4 Receptor Responsible for Antagonist SHU9119 Selective Activity. *J. Biol. Chem*. **277**:20328-20335

117) **Yeo GSH**, Siddle K. (2003) Attractin´ more attention - new pieces in the obesity puzzle?
Biochem. J. **376**:e7-e8

118) **Yeo GSH** et al. (2003) Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum. Mol. Genet*. **12**:145-153

119) **Zhang Y** et al. (1994) Positional cloning of the obese gene and its human homologue. *Nature* **372**: 425-432

8. Publikationsliste

a) Originalarbeiten

Hinney A**,** Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schäfer H, Gudermann T, Hebebrand J. (2003) Melanocortin-4 Receptor Gene: Case-Control Study and Transmission Disequilibrium Test Confirm that Functionally Relevant Mutations Are Compatible with a Major Gene Effect for Extreme Obesity. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* **88**:4258-4267

b) Kongreßbeiträge

Hebebrand J, Hohmann S, Hess C, Gudermann T, Remschmidt H, Geller F, Schäfer H, Hinney A. Melanocortin-4 Receptor Gene Mutations and Obesity: Major Gene Effect? 9th International Congress on Obesity, Sao Paolo, 24-29 August 2002

Hohmann S, Hess C, Hinney A, Hebebrand J, Gudermann T. Functional consequences of MC4R mutations identified in obese humans. Disorders of Body Weight Regulation-Clinical Aspects and Identification of Novel Drug Targets. Partnering Day, Marburg, 29.-31. Januar 2003 (Suppl.)

Hohmann S, Hess C, Hinney A, Hebebrand J, Gudermann T. Functional consequences of Melanocortin-4 receptor mutations in obese patients. 44. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 17.-20. März 2003, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. **367** (Suppl)

9 Abkürzungen

5 HT_3	Serotonin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	Agouti-related Protein
α-MSH	α-Melanozyten stimulierendes Hormon
ATP	Adenosin-Triphosphat
bp	Basenpaare
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CART	Cocaine/Amphetamine regulated Transcript
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor
HA	Hämagglutinin
^3H	Tritium
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
M	molar
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	Melanin Concentrating Hormone
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
NPY	Neuropeptid Y
Ob	obese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
POMC	Proopiomelanocortin
WT	Wildtyp

10 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem und in erster Linie Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann für die Überlassung des für mich sehr interessanten Themas und die Unterstützung in sämtlichen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Für die praktische Betreuung während des Projektes möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Hess bedanken, die mich in sämtliche Methoden einführte und mir immer tatkräftig zur Seite stand. Auch Herrn Dr. Vladimir Chubanov bin ich zu Dank verpflichtet für die Unterstützung bei den Immunfluoreszenz- und FRET-Untersuchungen. Für die Überlassung der DNA-Proben der Probanden und die stetige konstruktive Zusammenarbeit bedanke ich mich außerdem bei Frau Dr. Anke Hinney und Herrn Prof. Dr. Johannes Hebebrand, ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht unerwähnt bleiben sollen bei dieser Danksagung jedoch auch alle die Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, welche zwar nicht unmittelbar an meinem Projekt beteiligt waren, jedoch einen großen Anteil daran hatten, dass die Arbeit im Labor für mich sehr wichtig geworden ist. 1000 Dank deshalb an Silke Kaske und Herrmann Kalwa, die mir bei Problemen (fast) immer weiterhelfen konnten. Danke an Herrn Dr. Thomas Hofmann, Herrn PD Dr. Alexander Dietrich und Pascal Nurwakagari für stetige fachliche Beratung und Geduld. Herzlichsten Dank an Frau Tanja Pfeffer-Eckel und an Herrn Winfried Lorenz für die Bereicherung meiner Tage während der Kaffee-Pausen. Und natürlich Danke an alle, die ich in diesem Rahmen nicht erwähnen konnte...

Schließlich möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung ich weder mein Studium noch die vorliegende Arbeit hätte realisieren können. Auch gilt mein Dank meinem Freund Tobias für seine unendliche Geduld, sowie meinen Freunden und Kommilitonen für ihre Nachsicht mit mir während der vergangenen Jahre. Ohne Euch wäre ich nicht da wo ich bin, Danke!

11 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Hohmann
Vorname	Sarah
Geburtsdatum	20.02.1978
Geburtsort	Frankfurt am Main
Anschrift	Häusserstr. 9 69115 Heidelberg

Schulausbildung

1984-1988	Grundschule, Rossertschule Kelkheim
1988-1997	Gymnasium, St. Angela-Schule Königstein
1997	Abitur, Note 1,3

Studium

WS 1997/98	Studium der Biologie, Goethe-Universität Frankfurt
SS 1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
03/2000	Ärztliche Vorprüfung
03/2001	Erster Teil d. ärztlichen Prüfung
08/2003	Zweiter Teil d. ärztlichen Prüfung
11/2004	Dritter Teil d. ärztlichen Prüfung
12/2004	Erteilung der Vollapprobation durch das Hessische Landesprüfungsamt für Heilberufe

Weiterbildung / Beruf

Seit 02/2005	Weiterbildung zur Fachärztin für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie, Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim

12 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Baier
Barth
Goerg
Gudermann
Grau
Hebebrand
Köhler
Koolmann
Maisch
Martin
Neubauer
Peter
Remschmidt
Röhm
Steininger
Westermann

Meine akademischen Lehrer in Sevilla waren die Herren:

Cantillana
Ortega-Bevia
Saenz-Lopez de Rueda

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Funktionelle Konsequenzen von Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen bei adipösen Kindern und Jugendlichen“ im Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. T. Gudermann mit Unterstützung von Frau Dr. C. Hess ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden im Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism veröffentlicht.

Heidelberg, den