

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Fachgebiet Molekulare Ernährungsmedizin

Funktionelle Charakterisierung der humanen Melanocortin-4-Rezeptor Punktmutationen W16X und V103I

Florian Bolze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Klingenspor

2. Univ.-Prof. Dr. H. Daniel

3. Univ.-Prof. Dr. B. Küster

Die Dissertation wurde am 19.07.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.11.2010 angenommen.

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropin
AGRP	Agouti-related protein
ARC	Nucleus arcuatus
AUC	Area under the curve
A ^y	Agouti yellow
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BMI	Body mass index
bp	Basenpaar
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholecystokinin
CF	Zystische Fibrose
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CRE	cAMP response element <i>oder</i> causes recombination
CREB	cAMP response element binding protein
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ES-Zelle	Embryonale Stammzelle
FCS	Fötales Kälberserum
FTO	Fat and obesity associated gene
GABA	γ -Aminobuttersäure
GT	Genotyp
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HBS	Hepes-buffered saline
HEK293	Human embryonic kidney 293
het	heterozygote Mutationsträger
HSP90	Hitzeschockprotein 90
kb	kilobase
ki	knockin
LH	Lateraler Hypothalamus
loxP	Locus of crossing over

MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger-RNA
MSH	Melanocyten-stimulierendes Hormon
MTII	Melanotan II
n.s.	nicht signifikant
neo	Neomycin-Resistenzgen
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
ob	obese
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline
PC1	Prohormonkonvertase 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PLuc	Photinus Luciferase
POMC	Pro-opiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
PYY	Polypeptid Y
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
RF	Releasing factor
RLuc	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SH2B1	SH2B Adapter Protein 1
SIM1	Single minded 1
TAE	Tris-acetat-EDTA
TK	Thymidinkinase
TMEM18	Transmembrane protein 18
tRNA	Transport-RNA
wt	Wildtyp / wildtypisch

1. Einleitung	1
1.1. Adipositas	2
1.2. Monogene und polygene Adipositas	2
1.3. Zentralnervöse Regulation des Energiehaushalts	4
1.4. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)	7
1.5. Die MC4R-Mutationen W16X und V103I	8
1.6. Stoppmutationen und erblich bedingte Krankheiten	10
1.7. Suppression von vorzeitigen Nonsensemutationen	11
1.8. Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit	13
2. Material & Methoden	15
2.1. Herstellung der Expressions- und Targetingvektoren	16
2.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)	16
2.1.2. PCR-basierte Mutagenese	17
2.1.3. Nukleinsäure-Gelelektrophorese	19
2.1.4. Aufreinigung von PCR-Produkten durch Gelextraktion	19
2.1.5. Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA	19
2.1.6. Restriktionsverdau von DNA	20
2.1.7. Klonierung von PCR-Produkten	20
2.1.8. Sequenzierung	21
2.2. <i>in vitro</i> Charakterisierung	21
2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen	21
2.2.2. Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293-Zellen	22
2.2.3. Liposomen-Transfektion von COS-7 Zellen	22
2.2.4. Verwendete Vektoren	23
2.2.5. Herstellung stabil transfizierter Zellen	23
2.2.6. Charakterisierung Mc4r exprimierender Zellen	24
2.2.7. Oberflächen-ELISA	24
2.2.8. Reportergenassay zur Messung der Mc4r-Aktivität	26
2.2.9. cAMP-Akkumulationsassay in COS-7-Zellen	28
2.2.10. Charakterisierung der Leptinvariante R105X	29
2.3. Herstellung von genetisch veränderten Mäusen	30
2.3.1. Handhabung von ES- und Feederzellen	32
2.3.2. Elektroporation von ES-Zellen	33
2.3.3. Selektion von ES-Zellen mit G-418 und Gancyclovir	33
2.3.4. Separierung resistenter Kolonien („Picken“)	34
2.3.5. Herstellung von Klon-Triplikaten / Synchronisierung	34
2.3.6. Einfrieren / Lagerung der Masterplatten A und B	35
2.3.7. Extraktion von DNA aus ES-Zellen	35
2.3.8. Restriktionsverdau von ES-Zell DNA im 96-well Format	36
2.3.9. Southern Blot Genotypisierung	36
2.3.10. Hybridisierung / Filmautoradiographie	37
2.3.11. Blastocysten Injektion und Implantation der Embryonen	37
2.3.12. Keimbahntest und Deletion der Neo-Resistenz	38

2.3.13. Extraktion der genomischen DNA aus Schwanzspitzen	39
2.3.14. PCR-basierte Genotypisierung	39
2.4. <i>in vivo</i> Charakterisierung	40
2.4.1. Tierhaltung / Besatzdichte	40
2.4.2. Registrierung des Körpergewichts	40
2.4.3. Registrierung der Körperlänge	40
2.4.4. Registrierung der Futteraufnahme und Fäzesproduktion	40
2.4.5. Bombenkalorimetrie	41
2.4.6. Registrierung der Körpertemperatur	42
2.4.7. Messung der Körperzusammensetzung	42
2.4.8. Messung der Blutglukosekonzentration (<i>ad libitum</i>)	42
2.4.9. Intraperitonealer Glukosetoleranztest	43
2.4.10. Präparation des Hypothalamus	43
2.4.11. Injektionen von Nonsense-Suppressoren	44
2.4.12. RNA-Extraktion	44
2.4.13. cDNA-Synthese	45
2.4.14. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	45
2.4.15. Statistische Auswertung und Darstellung der Daten	48
3. Ergebnisse	49
3.1. Klonierung der Expressions- und Targetingvektoren	50
3.1.1. Herstellung der Mc4r-Expressionskonstrukte	50
3.1.2. Klonierung der Leptin-RLuc Fusionskonstrukte	51
3.1.3. Klonierung der Targetingkonstrukte	51
3.2. <i>In vitro</i> Charakterisierung	53
3.2.1. Wiederherstellung der Mc4r-W16X Oberflächenexpression	53
3.2.2. Wiederherstellung der Mc4r-W16X Signaltransduktion	55
3.2.3. Wiederherstellung der Leptin-R105X Expression	55
3.2.4. Charakterisierung der Mc4r-Variante V103I	56
3.2.5. Dosis-Wirkungskurven mit verschiedenen Mc4r-Liganden	57
3.2.6. Charakterisierung der Basalaktivität	58
3.3. Herstellung der Mc4r <i>knockin</i> Mauslinien	60
3.3.1. Elektroporation von embryonalen Stammzellen	60
3.3.2. Homologe Rekombination in ES-Zellen (Strategie)	60
3.3.3. Genotypisierung von ES-Zellklonen	61
3.3.4. Blastocysteninjektion und Geburt der Chimären	65
3.3.5. Keimbahntest	66
3.3.6. PCR-basierte Genotypisierungsstrategien	66
3.3.7. Sequenzierung der Mc4r-Leserahmen	68
3.4. <i>In vivo</i> Charakterisierung	69
3.4.1. Zuchtstrategie	69
3.4.2. Genotypenfrequenz der Mc4r-W16X <i>knockin</i> Mauslinie	69
3.4.3. Körpergewichtsverlauf	70
3.4.4. Körperlänge der Mc4r-W16X <i>knockin</i> Mauslinie	71

3.4.5. Bestimmung der Körperzusammensetzung	71
3.4.6. Energieaufnahme,-assimilation und Assimilationseffizienz	72
3.4.7. Bestimmung der Körpertemperatur	73
3.4.8. Blutglukosekonzentration unter <i>ad libitum</i> Bedingungen.....	74
3.4.9. Glukosetoleranztest (intraperitoneal).....	74
3.4.10. Quantifizierung der hypothalamischen Genexpression.....	75
3.4.11. Behandlung der Mc4r-W16X <i>knockin</i> Mauslinie mit Gentamicin, Amikacin und PTC124	77
3.4.12. Genotypenfrequenz der Mc4r-V103I <i>knockin</i> Mauslinie.....	80
3.4.13. Körpergewicht der Mc4r-V103I <i>knockin</i> Mauslinie	80
3.4.14. Kumulative Futteraufnahme	81
3.4.15. Bestimmung der Körpertemperatur	82
3.4.16. Zusammenfassung der Ergebnisse	82
4. Diskussion	84
4.1. Hintergrund und Zielsetzung	85
4.2. <i>In vitro</i> Charakterisierung von Mc4r-W16X.....	86
4.3. <i>In vivo</i> Charakterisierung von Mc4r-W16X.....	88
4.4. <i>In vitro</i> Charakterisierung von Mc4r-V103I.....	98
4.5. <i>In vivo</i> Charakterisierung von Mc4r-V103I	100
4.6. Fazit	104
5. Zusammenfassung.....	106
6. Literaturverzeichnis	108
7. Danksagung.....	121

1. EINLEITUNG

1.1. Adipositas

Im Laufe der letzten Jahre hat sich die Zahl der adipösen (fettleibigen) Menschen weltweit drastisch erhöht. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) waren im Jahr 2005 etwa 400 Millionen Menschen über 15 Jahre adipös und 1,6 Milliarden übergewichtig. Die Tendenz ist steigend. So berichtet das Statistische Bundesamt im Datenreport 2008 für Deutschland, dass 35 % der Bundesbürger übergewichtig und 15 % fettleibig sind (Statistisches Bundesamt Deutschland, Datenreport 2008).

Adipositas und Übergewicht werden charakterisiert durch die überschüssige Einlagerung von Körperfett. Laut WHO liegt eine Adipositas vor, sobald der *Body Mass Index* (BMI) größer 30 kg/m² ist. Ein BMI zwischen 25 und 30 kg/m² wird als Übergewicht klassifiziert. Mit Hilfe des BMI lassen sich verschiedene Gewichtskategorien beim Menschen unterteilen. Der BMI errechnet sich aus dem Quotienten des Körpergewichts und dem Quadrat der Körpergröße.

Neben kosmetischen Aspekten und den damit verbundenen möglichen psychologischen Folgen für die Betroffenen erhöht sich durch die überschüssige Einlagerung von Körperfett auch das Risiko an Diabetes mellitus Typ II, Herz-/Kreislaufstörungen und bestimmten Krebsformen zu erkranken (Kopelman, 2000; Kopelman, 2007; Lykouras, 2008; Wyatt et al., 2006).

Eine Zunahme des Körpergewichts wird durch eine positive Energiebilanz verursacht, d.h. die Energieaufnahme ist größer als der Energieverbrauch. Eine häufig genannte Erklärung für die steigende Prävalenz von Übergewicht und Adipositas kann in veränderten Umweltbedingungen gefunden werden. Zum einen ist insbesondere im westlichen Kulturkreis der Zugang zu hochkalorischen Nahrungsmitteln nahezu unbegrenzt und zum anderen geht der heutige Lebensstil mit einer reduzierten physischen Aktivität einher. Beides fördert die Ausbildung einer positiven Energiebilanz. Die Ursachen für Übergewicht sind vielschichtig und heterogen: Adipositas ist eine multifaktorielle Stoffwechselstörung, welche u.a. durch das Ineinandergreifen von genetischen Prädispositionen, den bereits erwähnten Umweltbedingungen und individuellen Verhaltensweisen verursacht werden kann (Kopelman, 2000; Bessesen, 2008; Hebebrand and Hinney, 2009).

1.2. Monogene und polygene Adipositas

Bei monogen verursachten Krankheiten lässt sich der Phänotyp auf einen einzigen Gendefekt zurückführen. Im Menschen sind u.a. Missense, Nonsense- und Leserastermutationen mit drastischen Effektstärken in verschiedenen Genen bekannt, welche eine *monogene Adipositas* verursachen (Tab. 1). Etwa 5% der monogenen Adipositasfälle werden auf funktionsrelevante Mutationen im Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) zurückgeführt (Vaisse et al., 2000; Farooqi et al., 2000; Farooqi et al., 2003), welcher Gegenstand dieser Dissertation ist. Mutationen im

MC4R-Gen stellen somit die häufigste Ursache für monogene Fettleibigkeit dar und haben mitunter einen Effekt von 9 kg/m² auf den BMI (Dempfle et al., 2004).

Bei polygen verursachten Phänotypen leisten mehrere Gene einen Beitrag zum Erscheinungsbild des Organismus. Im Gegensatz zu seltenen Allelen, die monogene Adipositas verursachen, sind die Effektstärken von Genvarianten bei *polygener Adipositas* vergleichsweise gering. In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), welche genetische Variationen im Menschen identifizieren und mit bestimmten phänotypischen Merkmalen assoziieren, wurden Polymorphismen u.a. nahe des MC4R- und FTO-Gens (*fat mass and obesity associated gene*) entdeckt, die einen Effekt von 0,5-1 kg/m² auf den BMI haben (Loos et al., 2008; Willer et al., 2009; Thorleifsson et al., 2009). Andererseits ist das Auftreten solcher Allele in der Population häufig: Risikoallele nahe dem MC4R- und FTO-Gen haben Frequenzen von 20-40% (Loos et al., 2008; Willer et al., 2009; Thorleifsson et al., 2009). Die meisten Mutationen, die einen Beitrag zu polygener Adipositas leisten, sind einem bestimmten Gen nicht so einfach zuzuordnen: es handelt sich um Polymorphismen, welche dem in Tab. 1 aufgeführten Gen am *nächsten* liegen, wobei die Entfernung bis zu 100 kb betragen kann, so dass ein Effekt auf die Regulation der jeweiligen Gene vermutet wird. Mutationen mit polygenen Effekten, welche die Aminosäuresequenz verändern, sind z.B. für das MC4R-Gen beschrieben (siehe Abschnitt 1.4.). Eine Genvariante *per se* kann keine Gewichtszunahme verursachen. Selbst monogene Adipositas resultiert immer aus einem Wechselspiel zwischen Umweltfaktoren, Verhalten und Genen. Ein

Tab. 1 Monogene und polygene Genvarianten für Adipositas. Aufgeführt sind exemplarisch Varianten in Genen, welche im Zusammenhang mit monogener (A) und polygener (B) Adipositas im Menschen beschrieben wurden.

A Monogene Adipositas			B Polygene Adipositas	
Gen	Art der Mutation	Referenz	Gen	Referenz
Leptin	Missense/ Leserasterverschiebung	Montague et al., 1997 Strobel et al., 1998 Gibson et al., 2004	BDNF	Thorleifsson et al., 2009
Leptin-rezeptor	Nonsense/Missense/ defekter Splicedonor	Clement et al., 1998 Farooqi et al., 2007	FTO	Willer et al., 2009 Thorleifsson et al., 2009
POMC	Nonsense/Missense Leserasterverschiebung	Krude et al., 1998 & 2003 Echwald et al., 1999	NEGR1	Willer et al., 2009 Thorleifsson et al., 2009
PC1	Nonsense/Missense/ defekter Splicedonor	Jackson et al., 1997 & 2003	TMEM18	Willer et al., 2009 Thorleifsson et al., 2009
MC4R	Nonsense/Missense Leserasterverschiebung	Farooqi et al., 2003 Vaisse et al., 2000	MC4R	Loos et al., 2008 Willer et al., 2009 Thorleifsson et al., 2009
SIM1	Chromosomale Translokation	Holder et al., 2000	SH2B1	Willer et al., 2009 Thorleifsson et al., 2009

durch eine Genvariante hervorgerufene Störung des Sättigungsgefühl, welche sich in einem unkontrollierten Essverhalten manifestiert, kann nur dann zu einer positiven Energiebilanz führen, wenn in der Umwelt beispielsweise Nahrung *ad libitum* zur Verfügung steht.

1.3. Zentralnervöse Regulation des Energiehaushalts

Die Energiehomöostase wird durch ein komplexes Netzwerk im Zentralnervensystem reguliert. Sensorische und metabolische Informationen müssen mit höheren kognitiven Systemen verschaltet werden, um die Energiebilanz im Gleichgewicht zu halten. Integraler Bestandteil dieses Netzwerks sind Kerngebiete im Hypothalamus und Hirnstamm. Dort können Mutationen in Genen (vgl. Tab. 1), die relevant für die zentralnervöse Kontrolle des Energiehaushalts sind, ursächlich für ein Ungleichgewicht der Energiebalance sein und die Entstehung von Adipositas begünstigen.

Die von Kennedy in den 1950er Jahren aufgestellte lipostatische Hypothese besagt, dass das Fettgewebe ein Hormon sezerniert, welches zur gespeicherten Lipidmenge proportional ist. Dieses Hormon gelangt in das Zentralnervensystem und reguliert neuronale Regelkreise, welche die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch kontrollieren (Kennedy, 1953).

Tatsächlich wurde Leptin in den 1990er Jahren als das Hormon mit den postulierten Eigenschaften identifiziert (Zhang et al., 1994). Es zirkuliert proportional zum Körperfettgehalt im Blut und zeigt keine akuten Konzentrationsänderungen nach der Nahrungsaufnahme, so dass Leptin als Langzeitindikator für den Energiespeicherstatus eines Organismus angesehen werden kann (Maffei et al., 1995; Korbonsits et al., 1997).

Hypothalamus

Im *Nucleus arcuatus* (ARC) des Hypothalamus liegen Leptin-responsive Nervenzellen, die entweder Pro-opiomelanocortin (POMC) oder *Agouti-related protein* (AGRP) und Neuropeptid Y (NPY) exprimieren (Mercer et al., 1996; Elmquist et al., 1997; Hakansson et al., 1996; Cheung et al., 1997; Wilson et al., 1999). Beide Neuronenpopulationen projizieren auf Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) exprimierende Neurone zweiter Ordnung, welche in anderen hypothalamischen Arealen, wie z.B. dem *Nucleus paraventricularis* (PVN) liegen (Cowley et al., 1999). Die aus POMC prozessierten Neuropeptide α - und β -Melanozyten-stimulierendes Hormon (MSH) sind Agonisten des MC4R, wohingegen AGRP als inverser Agonist/Antagonist die MC4R-Aktivität hemmt (Schioth et al., 1996; Ollmann et al., 1997; Nijenhuis et al., 2001).

Ausreichende Fettreserven und damit einhergehende hohe Leptinspiegel führen zu einer vermehrten Expression von POMC (Schwartz et al., 1997; Mizuno et al., 1998). Hingegen wird die Expression von AGRP und NPY durch Leptin gehemmt (Korner et al., 2001). Diese gegenläufige Regulation von anorexigenen und orexigenen Neuropeptiden im ARC führt zur

Aktivierung des MC4R-Signalwegs, was sich in einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und einem gesteigerten Energieverbrauch manifestiert (Marsh et al., 1999; Chen et al., 2000; Hoggard et al., 2004).

Sind die Fettspeicher geleert, führt dies zu einer reduzierten Leptinsekretion in den Blutkreislauf. Es kommt zu einer gesteigerten Expression von AGRP und NPY sowie zu einer reduzierten Expression von POMC (Schwartz et al., 1997; Korner et al., 2001). Schlussendlich wird hierdurch eine verminderte MC4R-Aktivität vermittelt, mit dem Effekt, dass die Nahrungsaufnahme steigt und der Energieverbrauch reduziert wird (Fan et al., 1997; Sutton et al., 2008; Small et al., 2003).

Der in dieser Arbeit charakterisierte MC4R hat eine integrierende Funktion in diesem Netzwerk, da anorexigene wie orexigene Informationen auf dem Rezeptor konvergieren. Diese zentrale Bedeutung des MC4R verdeutlicht warum durch Mutationen verursachte MC4R-Defekte den Energiehaushalt aus dem Gleichgewicht bringen können und fast ausschließlich in adipösen Menschen gefunden werden.

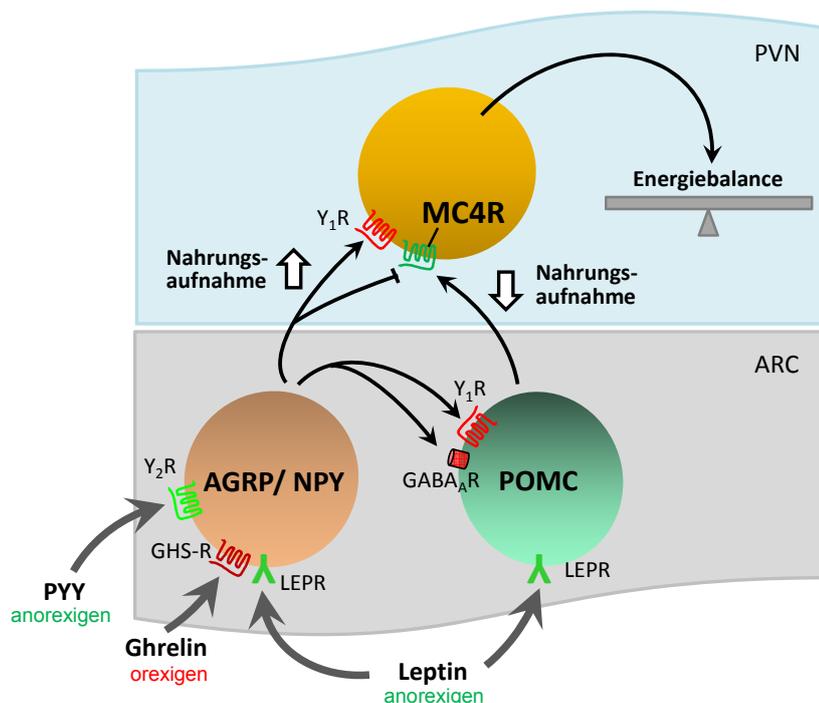


Abb. 1. Hypothalamische Regulation der Energieaufnahme. Leptin wird vom Fettgewebe, Ghrelin und Polypeptid Y (PYY) werden vom Verdauungstrakt sezerniert und beeinflussen die Aktivität der orexigenen *Agouti related-protein* (AGRP) und Neuropeptid Y (NPY) exprimierenden Neurone. Hohe Leptinspiegel aktivieren anorexigene Pro-opiomelanocortin (POMC) exprimierende Zellen und hemmen orexigene Zellen. Das führt zur Aktivierung des in dieser Arbeit untersuchten Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R). Niedrige Leptinspiegel haben den gegenteiligen Effekt.

Neben dem Langzeitindikator Leptin kann der ARC auch kurzzeitige Regulatoren der Energiehomöostase verarbeiten. Das enterale Hormon Polypeptid YY₃₋₃₆ (PYY) wird postprandial in Proportion zur aufgenommenen Nahrungs- bzw. Energiemenge freigesetzt und fungiert als Sättigungssignal (Batterham et al., 2002; Lin and Chey, 2003). Ghrelin hingegen wird

hauptsächlich vom Magen kurz vor einer Mahlzeit sezerniert und stimuliert die Nahrungsaufnahme (Cummings et al., 2002; Kojima and Kangawa, 2002). Auch Insulin aus dem Pankreas, sowie Nährstoffe wie beispielsweise Fettsäuren können im ARC die Neuronenaktivität und folglich den Energiehaushalt beeinflussen (Bruning et al., 2000; Obici et al., 2002).

Zwischen den orexigenen und anorexigenen Neuronen des ARC existiert eine asymmetrische Kommunikation: AGRP/NPY exprimierende Neurone projizieren auf anorexigene POMC Neurone und können diese durch die Ausschüttung von γ -Aminobuttersäure (GABA) inhibieren (Cowley et al., 2001). Dieser Schaltkreis kann z.B. durch Leptin moduliert werden (Cowley et al., 2001). Eine umgekehrte Projektion von POMC- auf AGRP/NPY-Neurone ist bislang nicht bekannt.

Hirnstamm

Mechanische und hormonelle Signale aus dem Gastrointestinaltrakt sowie aus dem Mund- und Rachenraum werden als Terminatoren für eine Mahlzeit angesehen. Neben dem im Hypothalamus wirkenden Peptidhormon PYY wird die Beendigung der Nahrungsaufnahme durch den Dehnungszustand des Magens und die Freisetzung des Sättigungshormons Cholecystokinin (CCK) bedingt (Gibbs et al., 1973). Diese beiden letztgenannten Informationen werden über Afferenzen des Vagus an den *Nucleus tractus solitarii* (NTS) im Hirnstamm geleitet.

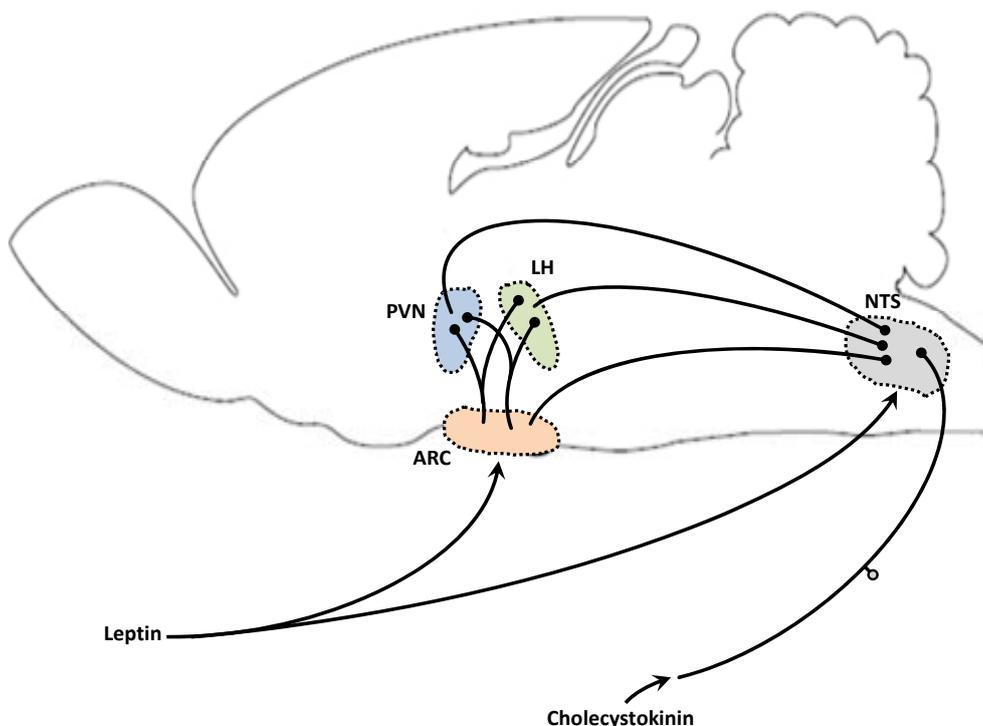


Abb. 2 Verschaltung hypothalamischer Kerngebiete mit dem Hirnstamm. Verschiedene Kerngebiete des Hypothalamus projizieren in den Hirnstamm. Diese Interaktionen ermöglichen u.a. die Integration von Langzeit- (z.B. Leptin) und Sättigungssignalen (z.B. Cholecystokinin). ARC: *Nucleus arcuatus*, LH: Lateraler Hypothalamus, PVN: *Nucleus paraventricularis*, NTS: *Nucleus tractus solitarii*

Die Energiezufuhr wird letztendlich durch eine veränderte Mahlzeitengröße oder -frequenz gesteuert. Solche Modulationen können durch die Integration von Langzeit- und Sättigungssignalen bewerkstelligt werden. Leptin beispielsweise verstärkt den sättigenden Effekt von CCK (Emond et al., 1999). Dies geschieht zum einen durch eine direkte Wirkung von Leptin auf Neurone im NTS und zum anderen durch hypothalamische Regelkreise, welche Projektionen zum Hirnstamm senden und dadurch Sättigungssignale im NTS beeinflussen (Grill et al., 2002; Morton et al., 2005). Hypothalamische Kerngebiete wie der ARC, PVN oder der Laterale Hypothalamus (LH) projizieren Richtung Hirnstamm und bilden Synapsen mit Neuronen des NTS (Morton et al., 2006) (Abb. 2). Die Aktivierung des MC4R im NTS verstärkt die CCK vermittelte Sättigung im Hirnstamm; eine Inhibition des MC4R-Signalwegs im NTS hat den gegenteiligen Effekt (Sutton et al., 2005).

1.4. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)

Der in dieser Dissertation untersuchte MC4R gehört zur Familie der Melanocortin-Rezeptoren (MCR). Die fünf klonierten Subtypen 1 bis 5 gehören alle zur Familie A der Rhodopsin-ähnlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCR) (Gantz and Fong, 2003). Die endogenen MCR-Agonisten Adrenocorticotropin (ACTH), sowie α -, β - und γ -Melanocyten stimulierendes Hormon (MSH) werden alle durch posttranslationale Prozessierung aus dem Vorläufermolekül Pro-opiomelanocortin (POMC) generiert (Eipper and Mains, 1980; Smith and Funder, 1988). Das Melanocortinsystem besitzt die einzigen bekannten endogenen Antagonisten für GPCRs: Agouti und *Agouti-related protein* (AGRP) (Ollmann et al., 1997; Gantz and Fong, 2003). Melanocortin-Rezeptoren sind primär an stimulatorische G-Proteine (G_s) gekoppelt und erhöhen nach Aktivierung die intrazelluläre Konzentration des intrazellulären Botenstoffs cAMP (Signaltransduktion siehe Abb. 11). MCRs sind an einer Vielzahl physiologischer Prozessen beteiligt und dementsprechend in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert (Tab. 2).

Tab. 2. Die fünf Melanocortin-Rezeptor Subtypen, deren Liganden, hauptsächliche Expressionsorte und physiologische Funktion. Die angegebenen Informationen stellen eine Auswahl, bzw. die jeweiligen Hauptcharakteristika der Rezeptorsubtypen dar (verändert nach Adan et al., 2006).

Subtyp	Primärer Agonist	Antagonist	Expressionsort	Phsiologische Funktion
MC1R	α -MSH	Agouti	Melanocyten	Pigmentierung der Haut
MC2R	ACTH	Agouti	Nebennierenrinde	Glucocorticoidproduktion
MC3R	γ -MSH	AGRP	Hypothalamus	Energiehomöostase
MC4R	α -/ β -MSH	AGRP, Agouti	Gehirn	Energiehomöostase
MC5R	α -MSH	Agouti	Exokrine Drüsen	Sekretion von Talg

Beteiligung des Melanocortinsystems an der Regulation der Energiehomöostase

Der erste Hinweis, dass das Melanocortinsystem in die Regulation des Körpergewichts involviert ist, ergab sich aus der Charakterisierung der *Agouti yellow* (A^y/a) Mauslinie. Dieser Mausstamm kodiert eine spontane natürliche Mutation im *Agouti*-Lokus, welche ein gelbes Fell (*agouti*), Fettleibigkeit und verstärktes Längenwachstum verursacht (Castle and Little, 1910; Barsh et al., 1999). Das *Agouti*-Protein wird normalerweise transient in der Haut exprimiert und antagonisiert den *Mclr* in Melanocyten, wodurch kurzzeitig die Herstellung von gelbem Pigment induziert wird. A^y/a -Mäuse zeigen aufgrund der Mutation eine ubiquitäre Expression des *Agouti*proteins (Bultman et al., 1992). Die gelbe Fellfärbung kann durch die chronische Inhibition des *Mclr* erklärt werden, die drastische Adipositas durch die Hemmung der *Mc4r*-Aktivität im Zentralnervensystem. Letztere Schlussfolgerung konnte aber erst aus der Charakterisierung der *Mc4r knockout* Mauslinie gezogen werden, da die Deletion des *Mc4r*-Gens einen Phänotyp verursacht, der mit dem der A^y/a -Mauslinie nahezu identisch ist, jedoch ohne Effekt auf die Fellfärbung (Huszar et al., 1997).

Mutationen im humanen Melanocortin-4-Rezeptor-Gen

Weitere Befunde, welche die Bedeutung des *MC4R* in der Regulation des Körpergewichts untermauern, stammen aus Humanstudien. Mutationen im *MC4R*-Gen stellen im Menschen die häufigste Form von monogen verursachter Adipositas dar. Ungefähr 90 funktionsrelevante *MC4R*-Mutationen sind bislang bekannt (Hinney et al., 1999; Hinney et al., 2003; Hinney et al., 2006; Farooqi et al., 2003; Lubrano-Berthelie et al., 2006; Vaisse et al., 2000). Lubrano-Berthelie et al., 2006). Die Varianten werden fast ausnahmslos in fettleibigen Personen identifiziert. Etwa 5% der monogenen Adipositasfälle werden auf Mutationen im *MC4R*-Gen zurückgeführt (Vaisse et al., 2000; Farooqi et al., 2000; Farooqi et al., 2003). Mutationen, welche in Zellkulturstudien die Funktionalität des Rezeptors beeinträchtigen, haben mitunter einen Effekt von 9 kg/m² auf den BMI bzw. 30 kg auf das Körpergewicht eines durchschnittlich großen Menschen (Dempfle et al., 2004).

Die Phänotypen von *Mc4r*-defizienten Mäusen und Menschen mit funktionsrelevanten Mutationen im *MC4R*-Gen sind ähnlich: neben der schon besprochenen Adipositas und dem gesteigerten Längenwachstum, zeigen Mutationsträger erhöhte Insulin- und Glukosespiegel sowie eine erhöhte Nahrungsaufnahme (Hyperphagie) (Huszar et al., 1997; Farooqi et al., 2003).

1.5. Die *MC4R*-Mutationen W16X und V103I

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten die im Menschen identifizierten *MC4R*-Punktmutationen W16X und V103I *in vitro* und *in vivo* funktionell charakterisiert werden.

Die im N-Terminus gelegene vorzeitige Stoppmutation W16X wurde in einer adipösen Indexpatientin ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) im Rahmen einer Fall-/Kontrollstudie identifiziert (Marti et al., 2003) (Abb. 3). Eine weitergehende Untersuchung der Familie ergab, dass die Punktmutation von der Mutter an die Tochter vererbt wurde. Neben der W16X-Variante existieren noch 6 weitere MC4R-Stoppmutationen (Y35X, Q43X, E61X, Y80X, Y287X, Q307X), welche bislang ausschließlich in adipösen Personen detektiert worden sind (Hinney et al., 1999; Yeo et al., 2003; Farooqi et al., 2003; Buono et al., 2005; Lubrano-Bertheliet et al., 2006, Promotion Harald Brumm). MC4R-Y35X stellt die häufigste bekannte Adipositas-relevante Stoppmutation dar: ungefähr 0,6% der adipösen Personen tragen Y35X heterozygot (Hinney et al., 2003; Larsen et al., 2005).

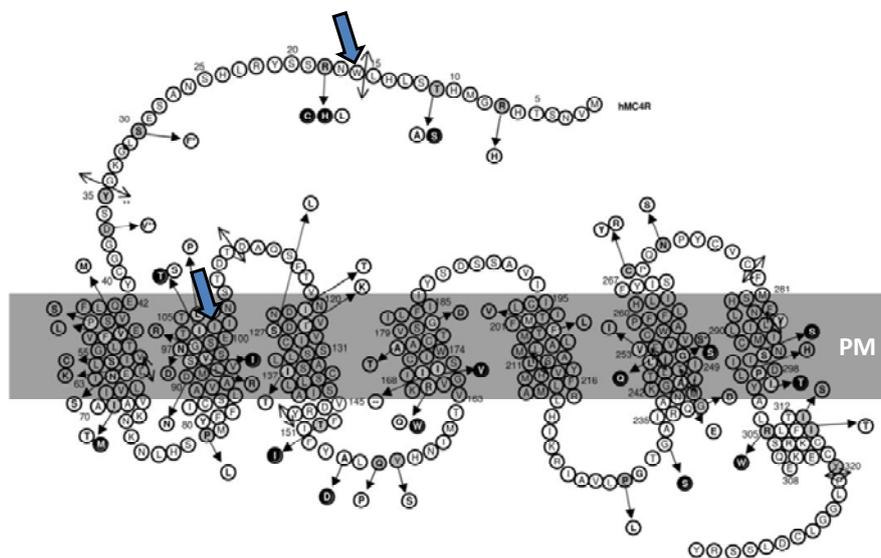


Abb. 3 Struktur des humanen MC4R. Der MC4R ist mit sieben Transmembrandomänen in der Plasmamembran (PM) verankert. Pfeile deuten Missense-, Doppelpfeile Stopp- oder Leserastermutationen an. Mit den blauen Pfeilen sind die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Mutationen W16X und V103I angezeigt. W16X befindet sich im extrazellulären N-Terminus; V103I in der zweiten Transmembranhelix (verändert nach Srinivasan et al., 2004).

Anders als die Vielzahl an MC4R-Mutationen, zeigen die Allele V103I und I251L in Fall/Kontrollstudien eine negative Assoziation mit Fettleibigkeit (Geller et al., 2004; Stutzmann et al., 2007). Die V103I-Mutation befindet sich in der zweiten Transmembranhelix (Abb. 3). Der Effekt von V103I auf das Körpergewicht ist - wie für Varianten mit polygenen Effekten charakteristisch - vergleichsweise gering: bei einer 1,80 m großen Person verursacht ein V103I-Allel eine Reduktion des Körpergewichts von 1,6 kg oder anders ausgedrückt eine Verminderung des BMI um $0,5 \text{ kg/m}^2$ (Geller et al., 2004).

Die negative Assoziation von V103I mit Adipositas konnte aufgrund der schwachen Effektstärke erst durch eine Metaanalyse festgestellt werden: Um den protektiven Effekt des V103I-Allels zu

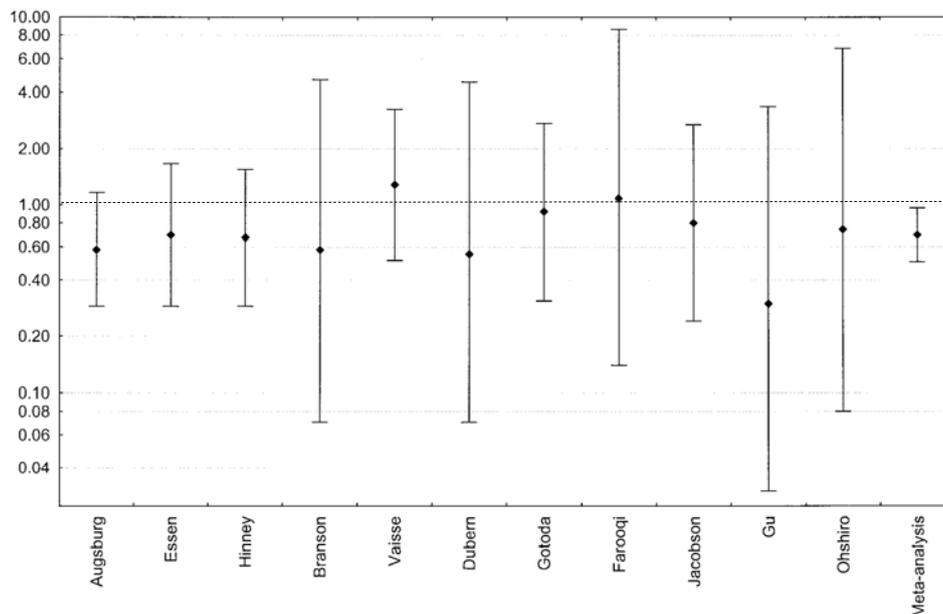


Abb. 4 Metaanalyse zur Identifizierung des protektiven Effekts des MC4R-V103I Allels. Dargestellt sind die *Odds-Ratios* der V103I-Variante verschiedener Einzelstudien und der Metaanalyse, welche die einzelnen Untersuchungen zusammenfasst und erneut analysiert. Die *Odds-Ratio* gibt die Wahrscheinlichkeit an von einem bestimmten Phänotypen (Adipositas) betroffen zu werden. Ist der Wert kleiner 1 ist das Risiko unterhalb dem der Durchschnittsbevölkerung (verändert nach Geller et al., 2004).

detektieren, wurden die Gen- und Phänotypen von mehreren tausend Probanden aus unterschiedlichen Studien zusammengefasst und analysiert (Abb. 4). V103I stellt die häufigste MC4R-Variante dar und findet sich heterozygot in etwa 2 % der adipösen jedoch in 3,5 % der normalgewichtigen Probanden (Geller et al., 2004). Die negative Assoziation des V103I-Allels mit Adipositas konnte in einer Vielzahl an Studien bestätigt werden (Heid et al., 2005; Rong et al., 2006; Young et al., 2007; Wang et al., 2010).

1.6. Stoppmutationen und erblich bedingte Krankheiten

Etwa 10 % aller in verschiedenen Erbkrankheiten des Menschen identifizierten Mutationen führen zur Bildung eines vorzeitigen Nonsensekodons (Krawczak et al., 2000; Mort et al., 2008). Beispiele für erblich bedingte Krankheiten, welche durch Stoppmutationen verursacht werden, sind Zystische Fibrose, Hurler-Syndrom, Diabetes insipidus und Muskeldystrophie (Tsui, 1992; Scott et al., 1992; Wildin et al., 1994; Prior et al., 1995). Durch Stoppmutationen endet die Proteinbiosynthese vor dem endogenen Terminationskodon der mRNA und ein verkürztes, funktionsbeeinträchtigt Protein wird produziert, was ursächlich für die Ausbildung einer Erkrankung sein kann (Abb. 5). Monogene Adipositas kann ebenfalls durch Nonsensemutationen herbeigeführt werden: neben den oben erwähnten Stoppmutationen im MC4R-Gen wie beispielsweise W16X, existieren derartige Mutationen auch in anderen für die Gewichtsregulation bedeutenden Genen (vgl. Tab. 1). Ein bekanntes Tiermodell der

Adipositasforschung ist die ob/ob Mauslinie. Diese natürliche Mutante ist Leptin-defizient aufgrund einer Stoppmutation im Leptingen (Zhang et al., 1994).

1.7. Suppression von vorzeitigen Nonsensemutationen

Die denkbaren Behandlungsoptionen von Krankheiten, die aufgrund von Nonsensemutationen hervorgerufen werden, erstrecken sich von gentherapeutischen Ansätzen bis hin zum Einsatz von Medikamenten, welche ein Überlesen des vorzeitigen Stoppkodons während der Translation bewirken können.

Seit Jahrzehnten sind aminoglykosidische Antibiotika dafür bekannt, dass sie die Genauigkeit der Proteinbiosynthese in verschiedenen Spezies beeinflussen und dadurch ein Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons während der Translation vermitteln können (DAVIES et al., 1964a; Palmer et al., 1979; Burke and Mogg, 1985). Aminoglykoside sind effektive Antibiotika aufgrund ihrer Eigenschaft an prokaryotische Ribosomen zu binden und die Translation von Bakterien zu stören. Aminoglykoside können aber auch mit geringer Affinität an eukaryotische Ribosomen binden und dadurch das Überlesen von vorzeitigen Stoppmutationen induzieren (Manuvakhova et al., 2000; Keeling and Bedwell, 2002).

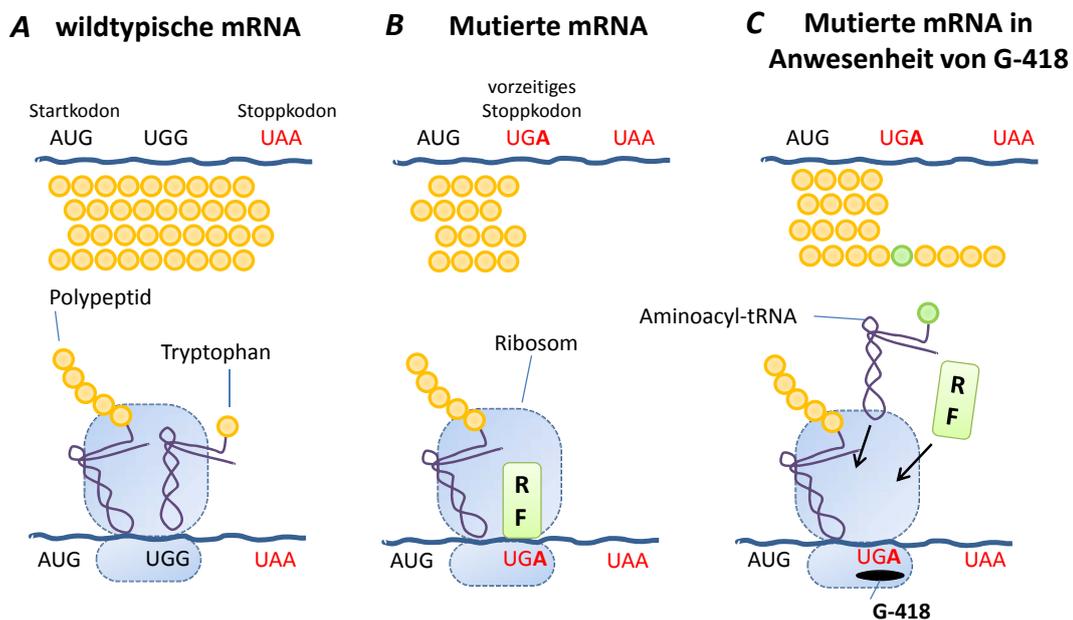


Abb. 5 Suppression von vorzeitigen Stoppkodons durch das Aminoglykosid G-418. A Während der Proteinbiosynthese wird am Ribosom die genetische Information der mRNA in Protein der vollen Länge übersetzt. B Eine vorzeitige Stoppmutation (UGA) unterbricht die Translation, so dass ein verkürztes Protein gebildet wird, da ein *Releasing Factor* (RF) an das Stoppkodon bindet und die Dissoziation der Translationsmaschinerie verursacht. C In der Anwesenheit von G-418 kann eine Konkurrenz zwischen dem RF und einer Aminoacyl-tRNA stattfinden. Anstatt des RF kann nun in seltenen Fällen eine tRNA das vorzeitige Nonsensekodon erkennen und ein Überlesen der Mutation bewirken, so dass wieder ein Protein der vollen Länge synthetisiert wird.

Dieser Effekt wird vermutlich durch eine lokale Konformationsänderung der 16S bzw. 18S rRNA bewirkt (Vicens and Westhof, 2001), so dass ein Stoppkodon anstatt eines Terminationsfaktors,

der die Dissoziation des Translationskomplexes herbeiführt vom Antikodon einer Aminoacyl-tRNA erkannt werden kann (Abb. 5).

Die Überleserate eines vorzeitigen Stoppkodons ist abhängig von dessen Sequenz und dem Nukleotidkontext, welcher das Kodon umgibt (Manuvakhova et al., 2000; Keeling and Bedwell, 2002). Insofern haben Aminoglykoside keinen Einfluss auf die Termination am endogenen Stoppkodon. Der Sequenzkontext vom endogenen Stoppkodon ist dahingehend optimiert, eine effiziente Beendigung der Proteinbiosynthese zu gewährleisten (Bonetti et al., 1995). Vorzeitige Stoppmutationen werden von solchen Sequenzen gewöhnlich nicht umgeben, daher kann hier eine geringe Überleserate durch aminoglykosidische Antibiotika erzielt werden.

Eine Vielzahl von *proof-of-concept* Studien zeigen, dass die Anwendung von unterschiedlichen Aminoglykosiden ein Überlesen von krankheitsrelevanten Stoppmutationen bewirken kann (Tab. 3). Bisherige Publikationen haben sich mit dem Phänotyp Adipositas als Folge einer Stoppmutation nicht beschäftigt. Diese Promotion versucht durch die Anwendung von Nonsense-Suppressoren diese Lücke zu schließen.

Tab. 3 Anwendung von Stoppmutations-Suppressoren *in vivo*. Angegeben sind Krankheiten, welche durch vorzeitige Stoppmutationen im aufgeführten Gen verursacht werden.

Krankheit	Gen mit Stoppmutation	Wirkstoff	Spezies	Referenz
Zystische Fibrose	<i>CF transmembrane conductance regulator</i> (CFTR)	Gentamicin	Maus	Du et al., 2002
			Mensch	Wilschanski et al., 2000/2003
		Amikacin	Maus	Du 2006
		PTC124	Maus Mensch	Du et al., 2008 Kerem et al., 2008
Dycheenne Muskeldystrophie	Dystrophin	Gentamicin	Maus	Barton Davis et al., 1999
		Negamycin	Maus	Arakawa et al., 2003
		PTC124	Maus	Welch et al., 2007
Diabetes insipidus	V2 Vasopressin Rezeptor	G-418	Maus	Sangkuhl et al., 2004

Die klinische Anwendung von Aminoglykosiden unterliegt mehreren Limitationen: zum einen ist die Verabreichung von Aminoglykosiden nur durch intramuskuläre oder intravenöse Infusionen möglich; zum anderen schränken unter Umständen irreversible Schädigungen des Innenohrs bzw. der Nieren die Langzeitanwendung ein (Hutchin and Cortopassi, 1994; Mingeot-Leclercq and Tulkens, 1999). Aminoglykoside werden daher nur in der intensivmedizinischen Behandlung von Infektionskrankheiten angewendet. Die chronische Verabreichung an Patienten mit vorzeitigen Stoppmutationen ist daher wenig realistisch.

Aufgrund der eingeschränkten Anwendungsmöglichkeiten besteht ein Bedarf an Medikamenten mit ähnlichen therapeutischen Eigenschaften, aber ohne die genannten schädigenden

Nebenwirkungen. Eine Substanz, die diese Forderungen möglicherweise erfüllen kann, ist die Oxadiazolverbindung PTC124 (Ataluren) (Abb. 6). Der Wirkstoff wurde in einem Hochdurchsatzverfahren als Stoppmutations-Suppressor identifiziert und seine Wirksamkeit konnte *in vitro* und *in vivo* demonstriert werden ohne schädliche Nebenwirkungen herbeizuführen (Welch et al., 2007; Hirawat et al., 2007; Du et al., 2008).

Negamycin gehört zur Klasse der Peptidantibiotika und konnte im Mausmodell das Überlesen eines vorzeitigen Nonsensekodons bewirken (Arakawa et al., 2003) (Abb. 6). Die Nebenwirkungen für Negamycin sind im Vergleich zu denen der Aminoglykoside weniger drastisch (Arakawa et al., 2003).

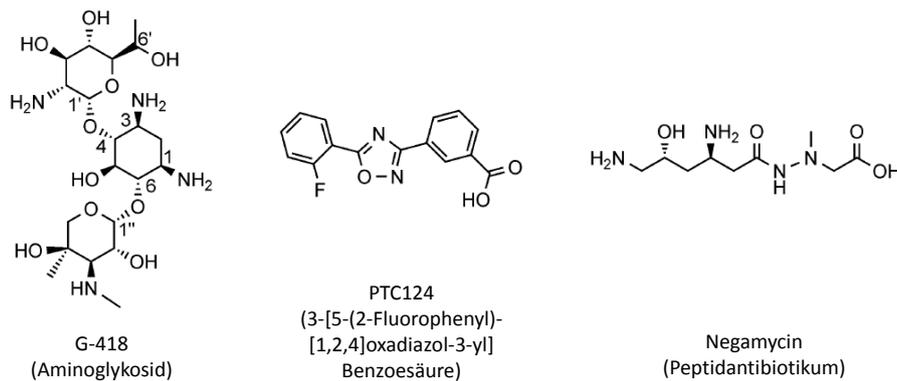


Abb. 6 Strukturformeln von Nonsense-Suppressoren. Die Substanzen können während der Proteinbiosynthese das Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons bewirken (verändert nach Hermann, 2007). Anhand der Strukturformeln lässt sich erkennen, dass die aufgeführten Substanzen zu unterschiedlichen Molekülklassen (aufgeführt in Klammern) gehören.

1.8. Ziele und Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Gegenstand der Dissertation sind zwei Punktmutationen in der kodierenden Sequenz des MC4R-Gens, die mit Hilfe von Zellkultur-basierten Experimenten und *knockin* Mausmodellen untersucht wurden. Durch die *in vitro* und *in vivo* Phänotypisierung wurde ein komplementärer Ansatz verfolgt, welcher die Identifizierung funktioneller Konsequenzen auf zellulärer und organismischer Ebene erlaubt. Durch die verwendeten Methoden sollte, eine potentielle Therapieoption mit Nonsense-Suppressoren evaluiert werden (Mc4r-W16X), zudem wurde eine im Menschen identifizierte Genvariante mit polygenem Effekt im Hinblick auf Adipositas charakterisiert (Mc4r-V103I). Die detaillierten Zielsetzungen für die jeweilige Mutation werden im Folgenden beschrieben:

Mc4r-W16X

Stoppmutationen führen zum vorzeitigen Abbruch der Proteinbiosynthese, so dass ein verkürztes Protein mit partieller oder totaler Funktionsbeeinträchtigung produziert wird. Durch Nonsense-Suppressoren lassen sich die Effekte von Stoppmutationen unterdrücken und eine Reaktivierung

der Genfunktion induzieren. Viele Publikationen beschäftigen sich damit, Erbkrankheiten wie Zystische Fibrose oder Muskeldystrophie durch Nonsense-Suppressoren zu behandeln (vgl. Tab. 3). Der Phänotyp Adipositas wurde bisher nicht als Ziel einer solchen Behandlung in Betracht gezogen. Diese Lücke versuchte die vorliegende Arbeit zu schließen, indem in Zellkultur wie auch in einem eigens für diesen Therapieansatz hergestellten Mc4r-W16X *knockin* Mausmodell Nonsense-Suppressoren zum Einsatz kamen, um die funktionellen Konsequenzen der W16X-Mutation zu lindern. Es handelt sich um den ersten Versuch Nonsense-Suppressoren als Therapieoption an einem fettleibigen Mausmodell zu evaluieren. Andere bereits publizierte Mc4r-defiziente Mausmodelle sind ungeeignet diesen Therapieansatz zu verfolgen, da diese Linien keine Stoppmutationen sondern Insertionskassetten oder *missense* Mutationen im Mc4r-Gen tragen (Huszar et al., 1997; Balthasar et al., 2005; Meehan et al., 2006; Grosse et al., 2006). Als weitere Adipositas-relevante Stoppmutation wurde Leptin-R105X in einem zellkulturbasierten System charakterisiert. Diese Punktmutation wurde in der ob/ob-Mauslinie identifiziert und ist ursächlich für die Leptindefizienz der Mutationsträger (Zhang et al., 1994).

Mc4r-V103I

Die negative Assoziation des MC4R-Polymorphismus V103I mit Adipositas wurde in verschiedenen Veröffentlichungen mehrfach bestätigt (Geller et al., 2004; Heid et al., 2005; Rong et al., 2006; Young et al., 2007; Wang et al., 2010). Zu Beginn dieser Dissertation lagen keine funktionellen Daten vor, die den protektiven Effekt der V103I-Variante im Hinblick auf Fettleibigkeit erklären konnten. Neben der Untersuchung der Signaltransduktion in Zellkultur wurde eine *knockin* Mauslinie generiert, welche die V103I-Mutation im Mc4r-Gen trägt. Die Herstellung der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie stellt den ersten Ansatz dar, eine im Menschen identifizierte Genvariante mit polygenem Effekt für Adipositas in einem Tiermodell zu überprüfen.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1. Herstellung der Expressions- und Targetingvektoren

Um die ausgewählten Genvarianten in Zellkulturexperimenten und im Mausmodell charakterisieren zu können, wurden Expressions- und Targetingkonstrukte kloniert. Durch PCR-basierte Mutagenese wurden die jeweiligen Mutationen eingefügt. Anschließend konnten die PCR-Produkte in die jeweiligen Zielvektoren kloniert werden (Abb. 7).

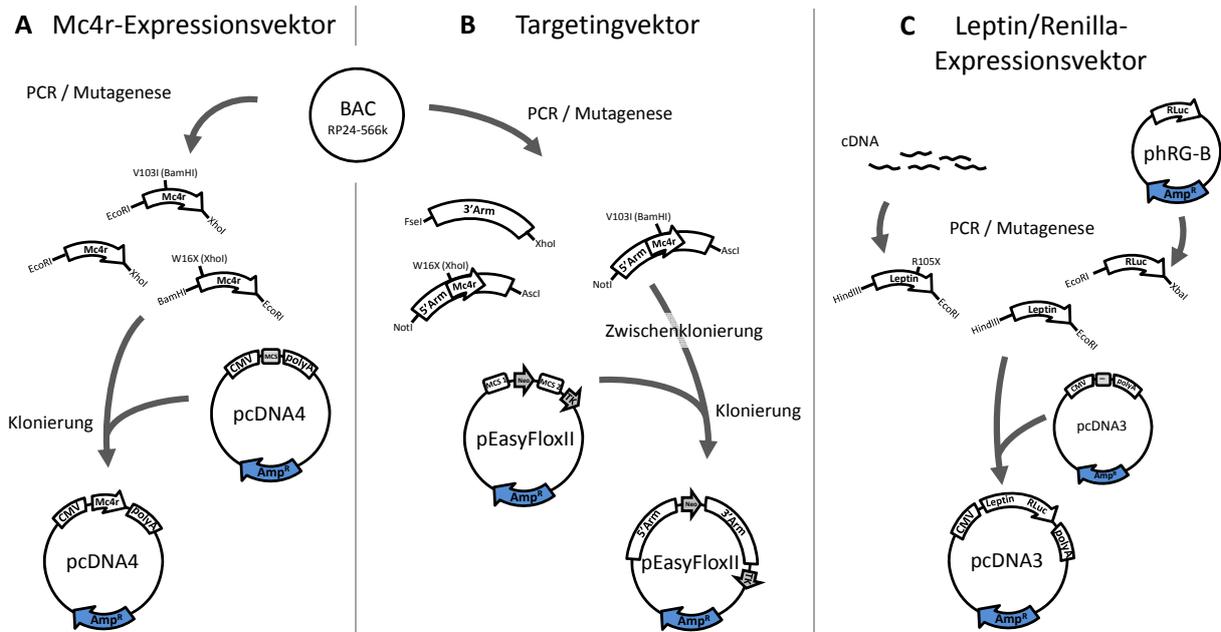


Abb. 7 Klonierungsstrategie für die DNA-Konstrukte. Durch Überhänge an den Primern wurden die Zielsequenzen mit Erkennungsschnittstellen markiert. **A** Herstellung der Expressionsvektoren. Nach der PCR-Amplifizierung wurden die Mc4r-Leserahmen direkt in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4 kloniert. **B** Herstellung der Targetingvektoren. Im Anschluß an die PCR-basierte Synthese der Homologiearme erfolgte zunächst die Zwischenklonierung in den TA-Klonierungsvektor pGEMTeasy (nicht dargestellt). Hiernach wurden die Fragmente in den Zielvektor pEasyFloxFII kloniert. **C** Herstellung des Leptin/Renilla Fusionkonstruktes. Um einen durchgängigen Leserahmen zu erhalten wurde das endogene Leptin-Stoppkodon, sowie das Startkodon der *Renilla*-Luciferase (RLuc) entfernt. Als Vektor wurde pcDNA3 verwendet.

2.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Mittels PCR wurden die wildtypischen Mc4r- und Leptin-Leserahmen der Maus, die *Renilla reniformes* Luciferase (RLuc) für die Expressionskonstrukte sowie der 3'-Homologiearm für die Targetingvektoren hergestellt. Für den wildtypischen Mc4r-Leserahmen und den 3'-Homologiearm wurde BAC- (*bacterial artificial chromosome*) DNA als Matrize verwendet, für den Leptin-Leserahmen cDNA aus weißem Fettgewebe (bereitgestellt von Dr. Tobias Fromme) und für die *Renilla reniformes*-Luciferase der kommerzielle Reportergenvektor phRG-B (PROMEGA). Es wurde ein DNA-Polymerase-Mix mit *Proofreading*-Funktion verwendet. Die Primer hatten Überhänge mit Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (Abb. 7). (Vorgehen siehe Tab. 4)

2.1.2. PCR-basierte Mutagenese

Die Mutagenesestrategie beruht auf dem Prinzip der überlappenden PCR. Mit dieser Methode wurden die mutierten Mc4r- und Leptin-Leserahmen für die Expressionsvektoren sowie die mutationstragenden 5'Arme für die Targetingkonstrukte hergestellt (Abb. 8). Für diese Strategie ist es notwendig, zwei zueinander komplementäre Mutagenese-Primer (P2/P3) auszuwählen, welche an der gewünschten Position die relevante Punktmutation tragen. Durch zusätzliche stille Mutationen wurden Restriktionsschnittstellen generiert. Hierdurch wurde die Identifizierung der DNA-Konstrukte und die Genotypisierung der *knockin* Mäuse vereinfacht. Des Weiteren sind zwei äußere Primer (P1 bzw. P4) erforderlich, welche stromauf- bzw. stromabwärts der Mutageneseposition binden und Überhänge mit Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme tragen. Mit jeweils einem Mutagenese-Primer und dem entsprechenden äußereren Primer können in zwei separaten PCR Ansätzen (PCR 1/PCR 2) der 5' und 3' Bereich der zu mutierenden Sequenz amplifiziert werden.

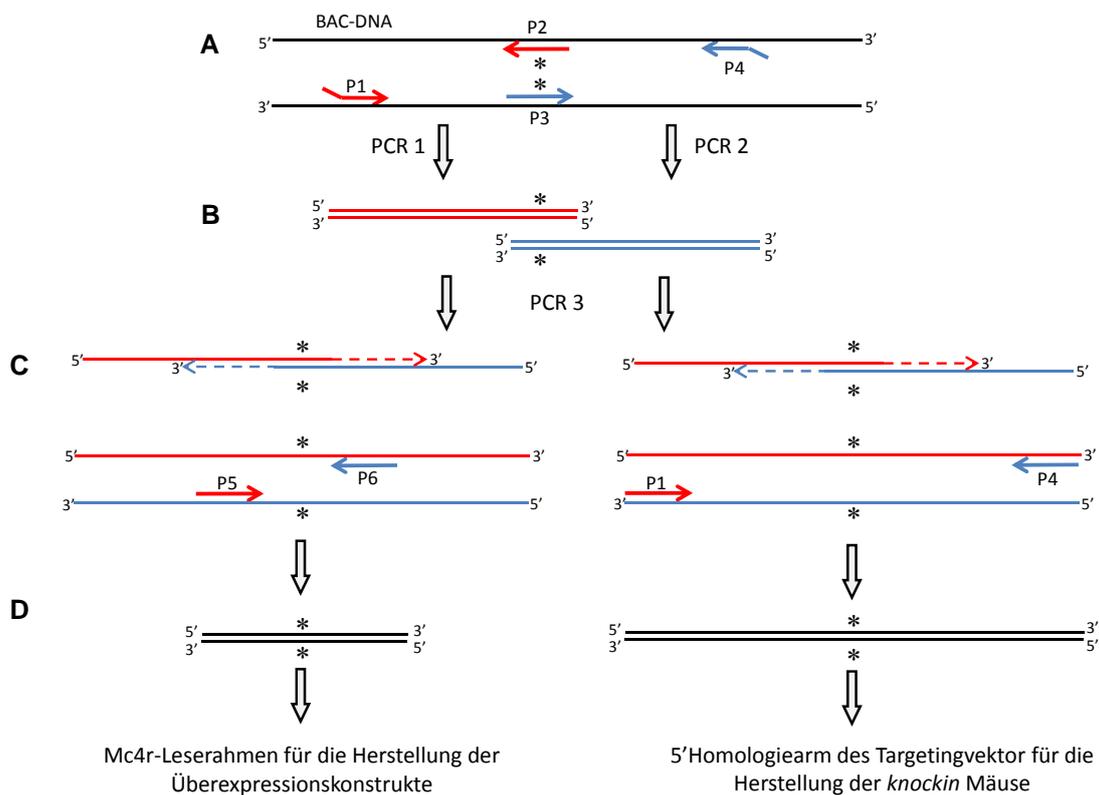


Abb. 8 In vitro Mutagenese durch überlappende PCR. **A** In zwei separaten PCRs wurden die zwei Hälften der zu mutierenden Sequenz amplifiziert. Die Mutation wird durch ein Sternchen (*) symbolisiert. **B** und **C** Die PCR-Produkte aus den ersten beiden Ansätzen wurden für PCR 3 in äquimolaren Mengen vereinigt. Aufgrund der Komplementarität konnten die Fragmente hybridisieren. **D** Endprodukte mit der gerichtet eingefügten Punktmutation.

In den ersten 5 Zyklen wurde eine niedrige Annealing-Temperatur gewählt, da die äußeren Primer aufgrund ihrer Überhänge zunächst nicht vollständig an die DNA-Matrize binden können (Tab. 4). Es wurde ein DNA-Polymerase-Mix mit *Proofreading*-Funktion verwendet.

Tab. 4: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm für die PCR 1 / 2

Komponente	Volumen [µl]	Schritt	Temp. [°C]	Dauer [s]
10x PCR-Puffer	5	1. Initiale Denat.	95	60
dNTP-Mix (10mM)	4	2. Denaturierung	95	30
DNA-Polymerase	1	3. Annealing	55	20
Matrizen -DNA	1	4. Elongation	68	180
For (10µM)	1		5x zurück zu Schritt 2	
Rev (10µM)	1	5. Denaturierung	95	30
Bidest.	37	6. Anneal./Elong.	68	180
Σ	50		25x zurück zu Schritt 5	
		7. Finale Elongation	68	300

Die Elongationszeit (Schritt 4 und 6) für den wildtypischen Mc4r, Leptin und rLuc betrug 60 Sekunden; für den 3'-Homologiearm betrug die Elongationszeit 240 Sekunden.

In einer dritten PCR wurden äquimolare Mengen der Produkte aus PCR 1 und PCR 2 eingesetzt: Da die Amplifikate im Bereich der Mutagenese-Primer komplementär zueinander sind, konnten die Fragmente hybridisieren, so dass jedes Fragment sowohl als Matrize, als auch als Primer fungierte. Nach PCR 3 lagen die für die Klonierung notwendigen Endprodukte vor.

Tab. 5: Reaktionsansatz und Temperaturprogramm für PCR-Ansatz 3

Komponente	Volumen [µl]	Schritt	Temp. [°C]	Dauer [s]
10x PCR-Puffer	5	1. Initiale Denat.	95	6
dNTP-Mix (10mM)	4			
DNA-Polymerase	1	2. Denaturierung	95	30
Produkt PCR1	äquimolare			
Produkt PCR2	Mengen	3. Anneal./Elong.	68	60/240
For (10µM)	1			
Rev (10µM)	1	4. Finale Elongation	68	300
Bidest.	auf 50		12 x zurück zu Schritt 2	
Σ	50			

Material

BD Advantage 2 Polymerase Mix mit *Proofreading*-Funktion (BD BIOSCIENCE)
dNTPs (INVITROGEN)

(Die Bezeichnungen der nachstehenden Primersequenzen stimmen mit denen in Abb. 8 überein.)

Äußere Primer für den 5'-Homologiearm der Mc4r-W16X- und Mc4r-V103I-Targetingkonstrukte

P1 (for) 5'-GATCGCGCCCGCTCGCCATTGGAGAAAGTGTGAAAAG-3'

P4 (rev) 5'-CATGGGCGCGCCGGAACCAGATCCCTGGTAAGAAGCC-3'

Äußere Primer für die Leserahmen des Mc4r-W16X Expressionskonstruktes

P5 (for) 5'-GGATCCCAACTCCACCCACCACCATGGCATGTATAC-3'

P6 (rev) 5'-GAATTCTTAATACCTGCTAGACAACCTCACAGATGCCTC-3'

Äußere Primer für die Leserahmen des wildtypischen und des Mc4r-V103I Expressionskonstruktes

P5 (for) 5'-GAATTCAACTCCACCCACCACCATGGCATGTATAC-3'

P6 (rev) 5'-CTCGAGTTAATACCTGCTAGACAACCTCACAGATGCCTC-3'

Äußere Primer für die Leserahmen des wildtypischen und und Leptin-R105X Expressionskonstruktes

P5 (for) 5'-AAGCTTATGTGCTGGAGACCCCTGTGTCGGTTCC-3'

P6 (rev) 5'-GAATTCTCGCCCCCTCCGCCACCCCTCCGCCACCGCATTCAAGGGCTAACATCCAAGTGTG-3'

Mutagenese-Primer Mc4r-W16X

P2 (for) 5'-CCGTAGCTCGAGCGGTTTCAGAGGTGGAGGGAAG-3'

P3 (rev) 5'-CTTCCCTCCACCTCTGAAACCGCTCGAGCTACGG-3'

Mutagenese Primer Mc4r-V103I

P2 (for) 5'-CAGGGTAATGATGATGGTTTCGGATCCATTTCGAAACGC-3'

P3 (rev) 5'-GTTTCGAATGGATCCGAAACCATCATCATTACCCTG-3'

Mutagenese Primer Leptin-R105X

P2 (for) 5'-GACCTGGAGAATCTCTGAGACCTCCTCCATC-3'

P3 (rev) 5'-GATGGAGGAGGTCTCAGAGATTCTCCAGGTC-3'

Primer für den 3' Homologiearm der Mc4r-W16X- und Mc4r-V103I-Targetingkonstrukte

For 5'-TAGCGGCCCGCCTACAGAAAGGTCTAGAACAGCTCCC-3'

Rev 5'-ATGCCTCGAGAAGATATTTTCATGGGGACAGGGGAGAG-3'

2.1.3. Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA und RNA erfolgte im nativen Agarosegel. Für die Visualisierung der Nukleinsäuren wurde der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt.

Lösungen

0,8-2% (w/v) Agarosegel: QBT-Agarose (ROTH) in 1x TAE-Puffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (ROTH)

50x TAE-Puffer: 2M Tris-Acetat, 100 mM EDTA

6x Farbpuffer: 400 µl ddH₂O; 500 µl Glycerin; 100 µl Bromphenolblau, 2,5 % (w/v)

2.1.4. Aufreinigung von PCR-Produkten durch Gelextraktion

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese identifizierte PCR-Produkte konnten aus dem Gel extrahiert werden. Dadurch wird die korrekte DNA-Bande von Fragmenten anderer Größe sowie von Kontaminationen befreit.

Material

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA)

2.1.5. Photometrische Quantifizierung von DNA und RNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Photometer (Ultraspec 2100 pro, AMERSHAM bzw. Geesys 10 Bio, SPECTRONIC). Die Probe wurde 1:20 bis 1:80 verdünnt und in eine Quarzküvette überführt. Das Photometer errechnete die Konzentration und die Ratio OD₂₆₀ /

OD₂₈₀. Alternativ erfolgte die Konzentrationsbestimmung von unverdünnten Nukleinsäurelösungen im NanoDrop 1000 (PEQLAB).

2.1.6. Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme erkennen je nach Spezifität vier bis acht Basenpaare in einem DNA-Strang und zerschneiden unter den richtigen Pufferbedingungen nur diese spezifische Zielsequenz. Für 1 µg DNA wurden 1-3 Units Restriktionsenzym verwendet. Bei 37°C wurde 1-3 Stunden im Wasserbad inkubiert.

Material

Restriktionsenzyme und entsprechende Puffer (AMERSHAM, NEW ENGLAND BIOLABS, PROMEGA)

2.1.7. Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung, der durch PCR hergestellten DNA-Fragmente in den Zielvektor und die darauffolgende Transformation in kompetente Bakterien, ermöglichte eine biologische Amplifikation der Konstrukte in größeren Mengen. Die PCR-Produkte für die Expressionskonstrukte wurden mit Restriktionsenzymen behandelt und direkt in den Zielvektor pcDNA4 kloniert.

Die Homologiearme für die Targetingkonstrukte wurden zunächst in den TA-Klonierungsvektor pGEMTeasy zwischenkloniert. Nach erfolgreicher Zwischenklonierung erfolgte der Transfer des Inserts in den Zielvektor pEasyFloxII.

Bei der Ligation wurden Insert und Vektor im molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die entsprechenden DNA-Volumina wurden mit 10x Ligationspuffer und 10 Units T4-Ligase versetzt. Für die Transformation wurden 50 µl chemisch kompetente *E.coli* Zellen auf Eis mit 2 µl der Ligrationsreaktion vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C für 20 Sekunden. Die Zellen wurden danach für weitere 2 Minuten auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden 950 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen für 60 min bei 37°C auf einem Laborschüttler (Heidolph unimax 2010, HEIDOLPH) (225rpm) inkubiert. Die Bakterienkultur wurden anschließend auf eine LB-Amp-Agarplatte (Ampicillin-Endkonzentration: 50 µg/ml) ausplattiert. Bakterienkolonien wurden in LB-Flüssigmedium überführt und die Plasmid-DNA mit kommerziellen Kits aufgereinigt. Die Analyse der DNA erfolgte durch Restriktionsverdau und Sequenzierung.

Material

TA-Klonierungsvektor pGEMTeasy (PROMEGA)
T4-Ligase / 10x Ligationspuffer (PROMEGA)

Bakterien: *Escherichia coli* DH5 α ; *Escherichia coli* Top10 (beide INVITROGEN)

SOC-Flüssigmedium: 4,0 g Trypton/Pepton; 1,0 g Hefeextrakt; 0,1 g NaCl; 2 ml 250 mM KCl;
170 mL ddH₂O; 4 ml 1 M Glucoselösung (Substanzen von ROTH)

LB-Medium: 10 g NaCl; 10 g Trypton / Pepton; 5 g Hefeextrakt; 50 μ g/ml Ampicillin;
1000 ml Bidest. H₂O (Substanzen von ROTH)

LB-Platten: LB-Medium mit Agar (1,5% w/v)

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA) für DNA-Aufreinigungen im kleinen und PureYield Plasmid Midiprep System (PROMEGA) für DNA-Aufreinigungen im größeren Maßstab

2.1.8. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Targeting- und Expressionskonstrukte wurde zum einen durch kommerzielle Anbieter gewährleistet (MWG-BIOTECH, SEQUISERV), zum anderen durch den Kooperationspartner Dr. Klaus Huse (Fritz-Lippmann Institut in Jena).

2.2. *in vitro* Charakterisierung

Für die *in vitro* Phänotypisierung der Punktmutationen wurden Transfektionsexperimente mit *human embryonic kidney* (HEK) 293- oder COS-7-Zellen durchgeführt. HEK293-Zellen sind humanen Ursprungs und wurden aus embryonalem Tumorgewebe der Niere generiert (Graham et al., 1977). Die Zelllinie COS7 stammt aus Nierengewebe der Grünen Meerkatze (Gluzman 1981). Sämtliche Experimente an COS-7 Zellen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Dr. Harald Brumm (Charité Berlin im Labor von PD Dr. Heike Biebermann.)

Da die verwendeten Zelllinien den Mc4r nicht exprimieren, erfolgte die Charakterisierung somit in einem heterologen Expressionssystem. Heterologe Expression bezeichnet die Synthese von exogenen Proteinen in einer Zelllinie.

2.2.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

Um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden, fanden alle Arbeiten unter einer Sterilbank (NSF49, CLEANAIR) statt. Medien und Puffer wurden autoklaviert bzw. steril filtriert (SCHLEICHER & SCHUELL). Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank (FORMA SCIENTIFIC) bei 37°C und 5% CO₂. HEK293-Zellen haben eine Verdopplungszeit von 24-30 Stunden. COS-7-Zellen wachsen etwas langsamer: sie verdoppeln sich alle 36-48 Stunden. Zum Passagieren der Zellen erfolgte zuerst ein kurzer Waschschrift mit PBS und dann das Ablösen der Zellen mit Trypsinpuffer. Anschließend wurden die Zellen auf 7 neue Platten verteilt. Wenn nötig wurde die Zellzahl mit einer Thomazählkammer bestimmt.

Medien

Medium HEK293-Zellen: DMEM-Flüssigmedium (GIBCO); 10% Fötale Kälberserum (BIOCHROM);
 Medium COS-7-Zellen: DMEM-Flüssigmedium (GIBCO); 5% Fötale Kälberserum (BIOCHROM),
 20 mM Glutamin (GIBCO); (optional für beide Linien: 50 µg/ml Gentamycin
 (GIBCO); 0,25 µg/ml Amphotericin B (GIBCO)

1x PBS hergestellt aus PBS-Tabletten (SIGMA)
 0,25% Trypsin-EDTA-Puffer (GIBCO)

2.2.2. Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293-Zellen

Am Vortag der Transfektion wurden HEK293-Zellen trypsinisiert und mit 30-60%iger Konfluenz auf eine neue 10cm Schale bzw. 12-*well* Platte überführt. Am Tag der Transfektion wurde das Medium 3 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Nachdem Wasser, DNA und CaCl₂ und gemischt wurden, erfolgte die Zugabe des 2-fachen HBS-Puffers auf einem Vortex-Mixer (Tab. 6). Am Folgetag der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Tab. 6 Herstellung der DNA-Präzipitate*

	<u>Ansatz "10 cm Schale"</u>	<u>Ansatz "12-<i>well</i> Platte"</u>
DNA	10-20 µg	2,5 µg
CaCl ₂	62 µl	12,5 µl
Wasser	ad 500 µl	ad 100 µl
2x HBS	500 µl	100 µl

*angegeben sind die Mengen/Volumina pro 10 cm Schale bzw. *well*

Material

Transfektionskit Profection Mammalian (PROMEGA)

2.2.3. Liposomen-Transfektion von COS-7 Zellen

Vorbereitung der Zellen: Am Vortag der Transfektion wurden COS-7 Zellen in 12-*well* Platten in einer Dichte von 2×10^5 Zellen pro *well* überführt. Für eine 12-*well* Platte wurden 1,5 ml Mangelmedium mit 3 µg Mc4r-Expressionsvektor (Röhrchen 1) und 1,5 ml Mangelmedium mit 15 µl Metafectene (Röhrchen 2) angesetzt. Durch Pipettieren wurden die beiden Ansätze vermischt und anschließend zusammengeführt. Nach 20min Inkubationszeit wurden 250 µl von diesem Ansatz und 250 µl neues Mangelmedium zu jedem *well* gegeben.

Material

Metafectene Transfektionsreagenz (BIONTEX)
 Mangelmedium für COS-7-Zellen: DMEM-Flüssigmedium (GIBCO) ohne Zusätze

2.2.4. Verwendete Vektoren

HEK293- und COS-7-Zellen wurden mit den folgenden Plasmiden transfiziert.

- *Mus musculus* Mc4r (wildtyp) in pcDNA4
- *Mus musculus* Mc4r-W16X in pcDNA4
- *Mus musculus* Mc4r-V103I in pcDNA4
- pcDNA4 „leer“ (INVITROGEN)
- pAD-CRE-PLuc, *Photinus pyralis* Luciferase unter der Kontrolle eines cAMP-*response-element* (freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Andreas Breit)
- Leptin-RLuc in pcDNA3 (INVITROGEN)
- pGL3 Promotor, *Photinus pyralis* Luciferase unter der Kontrolle eines SV40 Promotors (PROMEGA)

2.2.5. Herstellung stabil transfizierter Zellen

Um klonale Zelllinien herzustellen, welche stabil verschiedene Varianten des murinen Mc4r exprimieren, wurden HEK293 Zellen mit Mc4r-kodierenden pcDNA4-Expressionsvektoren transfiziert. Das Plasmid pcDNA4 trägt neben dem klonierten Mc4r-Leserahmen zudem eine Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin. Zellen, die zufällig den Mc4r-Expressionsvektor ins Genom integriert haben, bilden eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum aus und überleben die anschließende Selektion mit Zeocin.

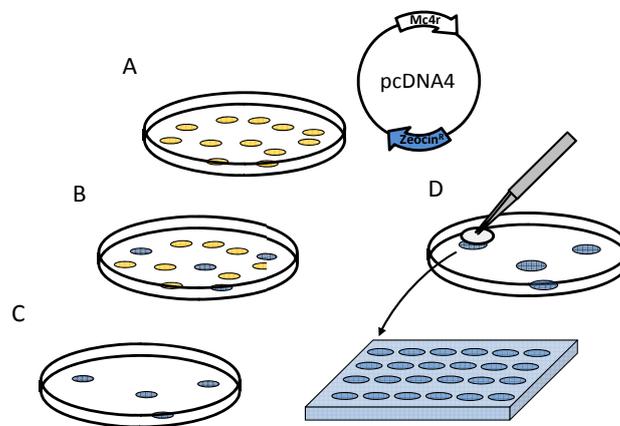


Abb. 9 Herstellung stabil transfizierter Zellen. A HEK293-Zellen werden unter Verwendung eines Mc4r-Expressionsvektors transfiziert. B Die zufällige Integration des Vektors in das Zellgenom führt zur Ausbildung einer Zeocin-Resistenz. C Folglich können solche Zellen die Zeocin-Selektion überleben. D Resistente Klone werden anschließend vereinzelt und separat kultiviert. Sobald die Zellen auf 10 cm Platten wachsen, werden die Zellen konserviert und per Oberflächen-ELISA auf Mc4r-Expression untersucht.

Die Vektor-DNA wurde mittels Calciumphosphat-Transfektion in die Zellen eingebracht. Eine 10 cm Schale wurde mit 10 µg Vektor-DNA transfiziert. Am Folgetag der Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert und auf vier neue 10 cm Platten verteilt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium mit 400 µg/ml Zeocin supplementiert. Alle 3-4 Tage musste das Zeocin-haltige Medium erneuert werden bis sich einzelne resistente Kolonien mit einem Durchmesser

von etwa 3 mm ausgebildet haben. Die Prozedur erfolgte über einen Zeitraum von etwa 4 Wochen.

Nach der Selektion wurden die Kolonien vereinzelt und separat in Multiwellplatten kultiviert. Die Vereinzlung wurde mit Membranplättchen durchgeführt. Mit einer Lockzange wurden aus einer Nylonmembran Fragmente ausgestanzt, welche in Trypsinpuffer getränkt wurden. Diese Plättchen wurden mit einer Pinzette für wenige Minuten auf die resistenten Zellkolonien platziert und anschließend in ein *well* einer 96-*well* Platten überführt. Bei erfolgreicher Überführung war das *well* nach 3 Tagen dicht bewachsen, so dass die Zellen dann in ein *well* einer 24-*well* Platte überführt werden konnten. Das nächstgrößere Format für die Kultivierung war eine 12-*well* Platte. Sobald die Zellen auf 10 cm Schalen wuchsen, waren die Zellen bereit für die Charakterisierung der Mc4r Plasmamembranexpression mittels Oberflächen-ELISA.

Material

Zeocin (INVITROGEN)

Hybond N+ Nylonmembran (AMERSHAM)

2.2.6. Charakterisierung Mc4r exprimierender Zellen

Die funktionelle Charakterisierung von Mc4r exprimierenden Zellen erfolgte durch zwei Methoden: zum einen durch Quantifizierung der Mc4r-Plasmamembranexpression mit Hilfe eines Oberflächen-ELISAs, zum anderen durch Messung der Mc4r-Aktivität mittels eines Reporterassays bzw. eines cAMP-Akkumulationsassays.

2.2.7. Oberflächen-ELISA

Der Oberflächen-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ist eine immunologische Detektionsmethode, die es erlaubte die Plasmamembranexpression der verschiedenen Mc4r-Varianten zu quantifizieren. Der Mc4r wurde mit einem Xpress-Epitope markiert. Die Nukleinsäuresequenz für das Epitop wurde auf dem Expressionsvektor pcDNA4 kodiert. Bei vorhandener Oberflächenexpression konnte der primäre anti-Xpress-Antikörper das Mc4r-gekoppelte Epitop binden. Die Zugabe eines Peroxidase-gebundenen Sekundärantikörpers erlaubte die Katalyse einer Farbreaktion. Der Farbumschlag konnte im Photometer quantifiziert werden und war im linearen Bereich proportional zur Anzahl der Rezeptoren in der Plasmamembran (Abb. 10).

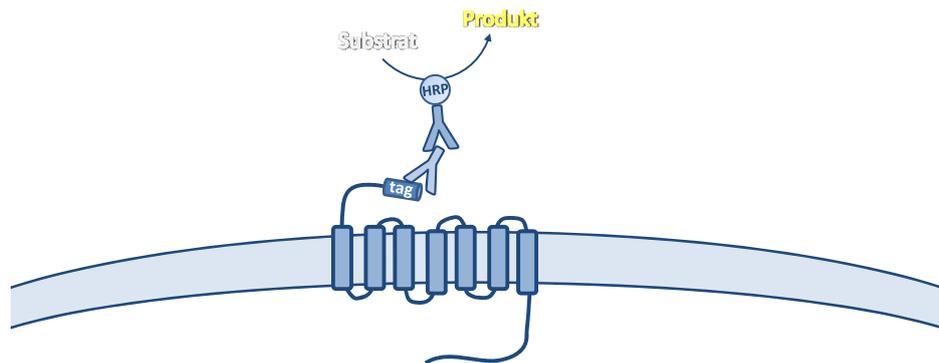


Abb. 10 Prinzip des Oberflächen-ELISA. Die Markierung des Mc4r mit einem N-terminalen Xpress-Epitop-Tag erlaubt die Quantifizierung der Plasmamembran-Expression.

Um ein Ablösen der Zellen zu verhindern wurden *12-well* Platten mit Poly-D-Lysin beschichtet. Etwa 6×10^5 Zellen/*well* wurden ausgesät. 24 Stunden nach dem Aussäen von stabil transfizierten Zellen startete die Immundetektion; bei transienten Transfektionen ($2,5 \mu\text{g}$ Vektor-DNA / *well*) erfolgte die Immunfärbung 48 Stunden nach der Zugabe der Präzipitate. Sollte die Wirkung von Nonsense-Suppressoren auf die Mc4r-W16X Reaktivierung untersucht werden, erfolgte die Zugabe der Substanzen 24 Stunden nach der Transfektion.

Tab. 7: Immundetektion (Oberflächen-ELISA)

Schritt	Lösung	Volumen [μl]	Dauer [min]
Waschen	Waschpuffer 0,1% BSA in PBS	500	5
Fixierung	4% PFA in PBS	500	10
Waschen (2x)	Waschpuffer 0,1% BSA in PBS	1000	5
Blocken	Blockpuffer 1% BSA in PBS	500	10
Inkubation mit Primärantikörper	anti-Xpress-Antikörper 1/2500 in 0,1% BSA in PBS	400	120
Waschen (2x)	Waschpuffer 0,1% BSA in PBS	1000	5
Blocken	Blockpuffer 1% BSA in PBS	500	2
Inkubation mit Sekundärantikörper	anti-Maus-Antikörper 1/2500 in 0,1% BSA in PBS	400	60
Waschen (3x)	Waschpuffer 0,1% BSA in PBS	1000	5

Nach dem letzten Waschschrift wurden $750 \mu\text{l}$ Peroxidasesubstrat zu den Zellen gegeben. 5-15 Minuten später erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von $250 \mu\text{l}$ 3N Salzsäure. Im Anschluss daran konnte der Farbumschlag im Photometer bei 492 nm quantifiziert werden.

Lösungen

0,1mg/ml Poly-D-Lysin-Lösung (SIGMA)

Primärantikörper: anti-Xpress-Antikörper aus der Maus (INVITROGEN)

Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege (DIANOVA)

Waschpuffer: 1xPBS mit 0,1% BSA (w/v) (BSA von ROTH)

Blockpuffer: 1xPBS mit 1% BSA (w/v)

Peroxidasesubstrat: 0,5 mg/ml o-Phenylendiamin Dihydrochlorid (SIGMA) in PBS pH 6,0;

4 μl 31% H_2O_2 pro 10 ml Substratlösung

3 N Salzsäure (ROTH)

2.2.8. Reporterassay zur Messung der Mc4r-Aktivität

Die Charakterisierung der Mc4r-Aktivität erfolgte in HEK293-Zellen unter Verwendung eines Luciferase-Reporterassays. Der Mc4r ist ein membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptor (*G-protein coupled receptor, GPCR*), welcher den cAMP Signalweg in der Zelle anschalten kann. Die Aktivierung eines GPCR führt letztendlich zur Aktivierung der Genexpression durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP-response element binding protein*). Die *Photinus phyllalis* Luciferase (PLuc) steht unter der Kontrolle des *cAMP response element* (CRE). Die Aktivierung der Signalkaskade führt zur Expression des Luciferase-Reporters, welcher im Anschluss quantifiziert werden kann (Abb. 11)

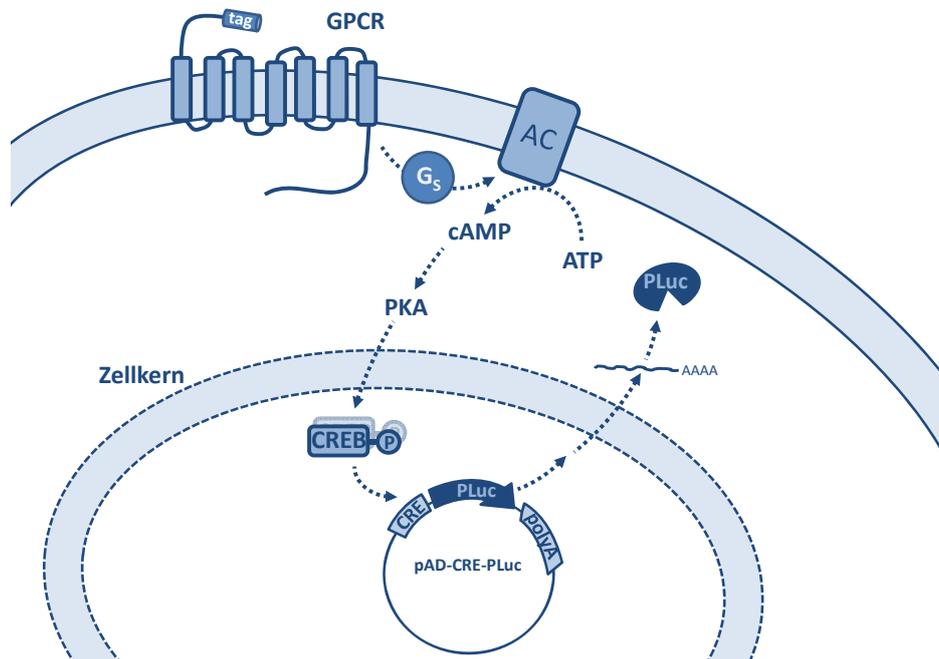


Abb. 11 Reporterassays für die Messung der Mc4r-Aktivität. Durch transiente Transfektion wird der Luciferase Reportergenvektor pAD-CRE-PLuc in stabil transfizierte HEK293-Zellen eingebracht. Die Aktivierung des Rezeptors über die dargestellte Signalkaskade führt zur Expression der *Photinus*-Luciferase (PLuc). Die Menge der Luciferase ist proportional zur Aktivität des Rezeptors. GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor, G_s: G-Protein, AC: Adenylatcyclase, PKA: Protein-Kinase A, CREB: cAMP response element binding protein

1) Erstellung von Dosis-Wirkungskurven unter Verwendung verschiedener Mc4r-Liganden: HEK293-Zelllinien mit stabiler Mc4r-Expression wurden transient mit dem Reportergenvektor pAD-CRE-PLuc transfiziert. Für die Generierung einer Dosis-Wirkungskurve unter Anwendung eines Mc4r-Liganden wurden zwei 10 cm Schalen je Genotyp transfiziert. Je Schale wurden für die Herstellung der DNA-Präzipitate 5 µg Reportergenvektor und 5 µg pcDNA4 „leer“ verwendet. Am Folgetag der Transfektion wurden die Zellen auf Poly-D-Lysin behandelte 12-well Platten transferiert. Die Zellen von zwei 10 cm Schalen eines Genotyps wurden auf drei 12-well Platten verteilt. 4 Stunden nach der Trypsinierung wurden die Zellen für 12 Stunden in serumfreien

Mangelmedium kultiviert. Hiernach erfolgte für 12 Stunden die Stimulation mit Mc4r-Liganden in verschiedenen Konzentrationen und Forskolin (100 μ M) in Mangelmedium.

2) *Messung der Agonisten-unabhängigen Basalaktivität:* Die Messung der Basalaktivität erfolgte an HEK293-Zellen, die transient mit verschiedenen Mengen Mc4r-Expressionsvektor (0,1 bis 2 μ g) und konstanten Mengen Reportergernevektor (5 μ g) transfiziert wurden. Mit pcDNA4 „leer“ wurde der Ansatz auf 10 μ g aufgefüllt. Die Transfektion erfolgte auf 10 cm Platten wie oben beschrieben. Am Folgetag der Transfektion wurden die Zellen einer Platte auf eine Poly-D-Lysin beschichtete 12-well Platte überführt. 4 Stunden nach der Verteilung auf 12-well Platten wurden die Zellen für 12 Stunden in serumfreien Mangelmedium kultiviert. Hiernach erfolgte ein Wechsel des Mediums: entweder erhielten die Zellen frisches Mangelmedium zur Bestimmung der Basalaktivität oder Mangelmedium mit Forskolin. Die Inkubation dauerte 12 Stunden.

Biolumineszenz-Messung: Das Medium wurde von den Zellen entfernt und der Zellaufschluss erfolgte mit 250 μ l Lysepuffer je well. Nach 20-minütiger Inkubation wurden 180 μ l des Zelllysats in spezielle 96-well Biolumineszenz Platten (BMG LABTECH) überführt. Die Messung erfolgte well-weise in einem Plattenlesegerät mit Injektionspumpe (Polarstar Optima, BMG LABTECH). Nach der Injektion des *Photinus*-Substrats LARII wurde die Platte 5 Sekunden geschüttelt. Nach 2 Sekunden Latenzzeit erfolgte die 10 Sekunden dauernde Messung der Lichtemission. Für jede Sekunde wurde ein Messwert ausgegeben.

Normalisierung / Datenauswertung: Die durch Mc4r-Liganden induzierten Luciferase-Messwerte wurden auf die Forskolin-induzierten Luciferase-Messwerte bezogen. Während jeder Messung wurde ein separates Triplikat mit dem Adenylatzyklase-Agonisten Forskolin stimuliert (Mc4r- bzw. GPCR-unabhängige cAMP-Produktion). Die durch Forskolin vermittelte Luciferaseaktivität ist nur abhängig von der Transfektionseffizienz und der Zellzahl. Technische Schwankungen zwischen Assays verschiedener Versuchstage können durch die Forskolinstimulation heraus gerechnet werden.

Tab. 8 Normalisierung der Reportergerndaten am Beispiel von α -MSH. Die α -MSH-induzierten Luciferase-Messwerte (PLuc ^{α -MSH}) einer bestimmten Konzentration wurden gemittelt und mit dem Mittelwert der Forskolin-induzierten Luciferase-Messwerte (PLuc^{Fsk}) normalisiert (PLuc ^{α -MSH}/PLuc^{Fsk}).

α -MSH [μ M]	PLuc-1	PLuc-2	PLuc-3	Mittelwert	PLuc ^{α-MSH} /PLuc ^{Fsk}
0 (basal)	21512	21599	21634	21582	0,22
0,0001	45319	48661	38790	44257	0,44
0,001	183949	160884	143997	162943	1,63
0,01	137781	139524	152238	143181	1,43
0,1	151321	138969	142434	144241	1,44
1	128143	143366	139118	136876	1,37
Forskolin	105615	93846	100158	99873	

Im Anschluss wurden die normalisierten Daten ($PLuc^{Mc4r-Ligand}/PLuc^{Fsk}$) mit der Graphik-/Analysesoftware Prism4 (GRAPHPAD) gegen die Dosis des Liganden aufgetragen und ausgewertet. Es wurde eine sigmoidale Kurvenanpassung gewählt. Die mittlere effektive Dosis (EC_{50}), die Agonisten-unabhängige Basalaktivität sowie die maximale Aktivierbarkeit (E_{max}) des Rezeptors wurden für jede Einzelmessung separat berechnet und nach Abschluss der Messreihe wurden die Daten der Einzelmessungen gemittelt.

Material

Mc4r-Liganden (PHOENIX PEPTIDES):

α -MSH	S-Y-S-M-E-H-F-R-W-G-K-P-V (Maus, Ratte, Mensch)
β -MSH	A-E-K-K-D-E-G-P-Y-R-M-E-H-F-R-W-G-S-P-P-K-D (Mensch)
AGRP	S-P-R-R-C-V-R-L-H-E-S-C-L-G-Q-V-P-C-C-D-P-C-A-T-C-Y-C-R-F-F-N-A-F-C-Y-C-R-K-L-G-T-A-T-N-L-C-S-R-T (Maus)

Adenylatcyclase-Agonist Forskolin (CALBIOCHEM)

1x Passive Lysis Buffer (PROMEGA)

Luciferase Assay reagent (LAR) II (PROMEGA)

2.2.9. cAMP-Akkumulationsassay in COS-7-Zellen

Die Untersuchung der Rezeptoraktivität der Variante Mc4r-X16 in COS-7 erfolgte mit Hilfe eines cAMP-Akkumulationsassays. Hierfür müssen die Zellen zunächst mit radioaktivmarkiertem 3H -Adenin markiert werden, welches in ATP eingebaut wird. Aufgrund der zyklischen Eigenschaften ist es möglich cAMP selektiv an das Dowex-Säulenmaterial zu binden und von anderen ebenfalls radioaktivmarkierten Molekülen zu trennen (Abb. 12). (Die Untersuchung der Mc4r-W16X Aktivität erfolgte per cAMP-Akkumulationsassay und nicht per Luciferaseassay, da die erstgenannte Methode im Labor von PD Dr. Heike Biebermann verwendet wird.)

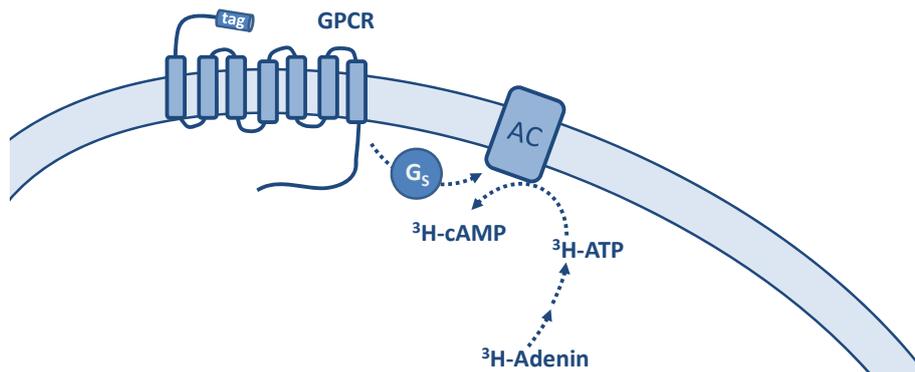


Abb. 12 Prinzip des cAMP Akkumulationsassays. Zellen werden mit radioaktivem 3H -Adenin markiert, welches in ATP eingebaut wird. Die Aktivierung der Signalkaskade führt zur Umsetzung zu 3H -cAMP. Nach der Zellyse kann 3H -cAMP aufgereinigt werden. Die Radioaktivität dient als Maß für die Aktivität des Rezeptors (GPCR: G-Protein gekoppelter Rezeptor).

Auf 12-well Platten wurden 2×10^5 Cos7-Zellen mit $3 \mu g$ Vektor-DNA / well transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden mit 3H -Adenin markiert. Die Behandlung mit dem Aminoglykosid G-418 erfolgte parallel zur 3H -Adenin Markierung. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX in

Mangelmedium gewaschen. Die Stimulation mit α -MSH dauerte 1 Stunde und erfolgte in Mangelmedium. Durch Zugabe von Trichloressigsäure wurden die Zellen aufgeschlossen. Die Lysate wurden auf Dowex-Säulen überführt und zweimal mit 10 ml bidest. Wasser gewaschen. Das an die Säule gebundene ^3H -cAMP wurde mit 0,1 M Imidazol eluiert. Der Durchfluss konnte anschließend in 14 ml Szintillationsflüssigkeit aufgenommen werden und die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler quantifiziert. Die Daten wurden im Computerprogramm Prism4 (GRAPH PAD) analysiert und dargestellt.

Material

Cos-7 Mangelmedium mit 1mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin IBMX (SIGMA)
 ^3H -Adenin (PERKIN ELMER)
 Dowex AG 1-X8-Säulen (BIORAD)
 0,1 M Imidazol (MERCK)
 Trichloressigsäure (ROTH)

2.2.10. Charakterisierung der Leptinvariante R105X

Die Messung der durch G-418 induzierten Überleserate der in ob/ob Mäusen vorkommende Leptin-R105X Variante erfolgte mit Hilfe eines Reporterassays. Hierfür wurden pcDNA3-Expressionskonstrukte kloniert, die am 3'-Ende des Leptingens eine *Renilla*-Luciferase tragen (siehe Abschnitt 2.1) Das Startkodon der Luciferase sowie das endogene Stoppkodon von Leptin wurden entfernt. Das Prinzip des Assays beruht darauf, dass an der vorzeitigen Stoppmutation die Proteinbiosynthese zum Abbruch kommt. Die am 3'-Ende des Mc4r- bzw. Leptin-Leserahmens befindliche *Renilla*-Luciferase wird nicht translatiert. Ein Überlesen des Stoppkodons durch die Zugabe von G-418 kann über einen Anstieg in der *Renilla*-Luciferase vermittelten Biolumineszenz bestimmt werden. (Abb. 13). Zum Normalisieren der Daten wurde ein Reportervektor kotransfiziert, der die *Photinus*-Luciferase unter der Kontrolle eines konstitutiven SV40 Promotors kodiert.

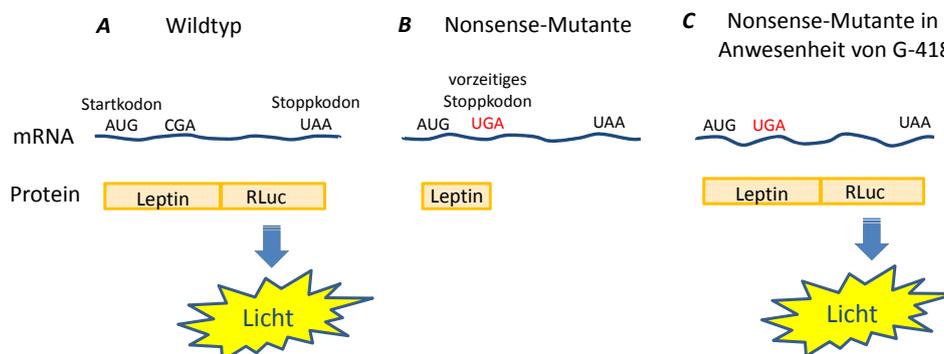


Abb. 13 Prinzip des Reporterassays zur Messung der Überleserate von vorzeitigen Stoppmutationen. In den Expressionsvektor pcDNA3 wurde ein Insert bestehend aus der Leptin und *Renilla*-Luciferase (RLuc)-cDNA kloniert. **A** Die wildtypische mRNA wird vollständig translatiert, so dass ein Fusionsprotein entsteht. **B** Die vorzeitige Stoppmutation führt zum Abbruch der Translation. Es wird kein Fusionsprotein synthetisiert. **C** In Anwesenheit von G-418 kann die Stoppmutation überlesen werden. Die Überleseeffizienz kann anhand der RLuc-vermittelten Biolumineszenz gemessen werden.

HEK293-Zellen wurden transient mit 1,5 µg Fusionskonstrukt und 1,0 µg pGL3-Normalisierungsvektor mittels der Calcium-Phosphat-Methode (Ansatz „12-well Platte“) transfiziert. Drei Stunden vor der Zugabe der DNA-Präzipitate erfolgte ein Wechsel des Mediums, welches verschiedene Konzentrationen G-418 beinhaltet. Die Inkubation mit G-418 dauerte 24 Stunden. Dann erfolgte die Messung der Biolumineszenz.

Die Zellen wurden für 20 Minuten in 250 µl Lysepuffer inkubiert. 50 µl *Photinus*-Substrat (LARII) wurde in Luminometerröhrchen vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl Zelllysate erfolgte die 10 Sekunden dauernde Messung der Lumineszenz in einem *Single-tube luminometer* (SIRIUS). Danach erfolgte die Zugabe des *Renilla*-Substratpuffers (Stop & Glo), welcher gleichzeitig die Aktivität der *Photinus*-Luciferase inhibiert. Die *Renilla*-Messwerte (RLuc) wurden auf die *Photinus*-Messwerte (PLuc) normalisiert (RLuc/PLuc). Anschließend wurde für jede G-418-Konzentration prozentual die Aktivität der Mutante auf den Wildtyp bezogen, d.h. RLuc/PLuc (R105X) dividiert durch RLuc/PLuc (wt) multipliziert mit 100.

Material

Dual-Luciferase Assay System (PROMEGA)

2.3. Herstellung von genetisch veränderten Mäusen

Allgemeines: Die Herstellung von *knockin* Mauslinien beruht auf dem gerichteten Einfügen einer gewünschten Punktmutation durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Pluripotente ES-Zellen müssen mit dem mutationstragenden Targetingvektor transfiziert werden. Durch positive und negative Selektion der Zellen mit entsprechenden Chemikalien ist es möglich ES-Zellklone mit der gewünschten Punktmutation anzureichern. Die Genotypisierung der isolierten ES-Zellklone erfolgt durch Southern Blot und Sequenzierung. Nach erfolgreicher Genotypisierung können die manipulierten ES-Zellen in Mausembryonen (Blastocystenstadium) transferiert werden. Partizipieren die injizierten ES-Zellen an der Ontogenese des Embryos entstehen sogenannte F0-Chimären. Chimären sind Organismen, die aus genetisch unterschiedlichen Zellen entstanden sind (endogene ES-Zellen der Blastocyste und exogene ES-Zellen aus dem Transfektionsexperiment). Kodieren die endogenen ES-Zellen und die injizierten ES-Zellen eine unterschiedliche Fellfarbe so tragen die F0-Nachkommen ein gemustertes Fell. Die Verpaarung der F0-Chimären mit wildtypischen Mäusen wird als Keimbahntest bezeichnet (Abb. 14). Zeigt die Genotypisierung der F1-Generation die Anwesenheit der gewünschten Mutation so haben die manipulierten ES-Zellen zur Entwicklung der Keimbahn beigetragen. Durch die weitere Verpaarung der F1-Generation kann eine Zuchtkolonie etabliert werden. Die ersten homozygoten Mutationsträger können in der F2-Generation auftreten.

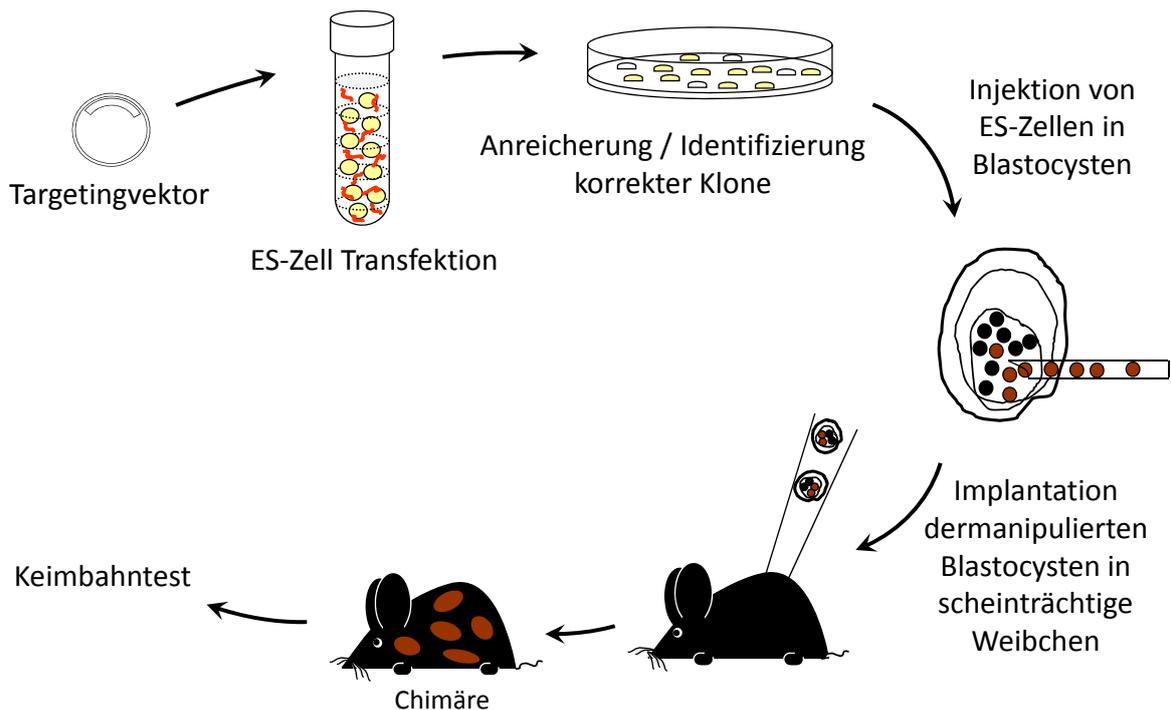


Abb. 14 Herstellung genetisch veränderter *knockin* Mäuse. Die Herstellung von *knockin* Mäusen kann in mehrere Teilschritte untergliedert werden. Ein mutationstragender Targetingvektor wird für die Transfektion von embryonalen Stammzellen (ES) verwendet. Nach der Identifizierung eines geeigneten ES-Klons erfolgt die Injektion in Blastocysten in scheinträchtige Weibchen, welche chimären Nachkommen werfen. Haben die transfizierten ES-Zellen die Keimbahn besiedelt kann die Mutation an Folgegenerationen vererbt werden.

Die Besonderheit von ES-Zellen liegt in ihren pluripotenten Eigenschaften, d.h. sie können sich in jeden Zelltyp eines Organismus differenzieren. Daher ist es von absoluter Priorität die Pluripotenz von ES-Zellen während der Kultivierung *in vitro* zu bewahren. Sollte diese Eigenschaft verloren gehen, ist es nicht mehr möglich, dass die in Blastocysten injizierten ES-Zellen zur Entwicklung einer Maus beitragen. ES-Zellen sind adhärent, wachsen in einzelnen Kolonien und müssen auf sogenannten *Feederzellen* (embryonale Fibroblasten) kultiviert werden. Durch chemische Behandlung (Mitomycin C) sind *Feederzellen* nicht mehr teilungsfähig. Bedeutung haben diese Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft Wachstumsfaktoren, Nährstoffe und den Leukämie inhibierenden Faktor (LIF) zu sezernieren. Das Zytokin LIF ist dafür bekannt das Ausdifferenzieren der ES-Zellen zu unterbinden. Im Experiment wurden F1 V6.5 ES-Zellen verwendet. Diese etablierte Linie stammt aus den Blastocysten einer C57BL/6J x 129SvEvTac Verpaarung. Die Kultivierung von ES-Zellen muss täglich mit dem Mikroskop beurteilt werden. Wachsen die Zellen zu dicht, können ES-Kolonien zueinander in Kontakt kommen, ausdifferenzieren und ihre Pluripotenz verlieren. Die Kultivierung von ES-Zellen verläuft nach einen striktem Vorgehen (Abb. 15).

Die Herstellung der beiden Mc4r *knockin* Mauslinien erfolgte in Kollaboration mit Dr. Ralf Kühn (Helmholtz Zentrum München).

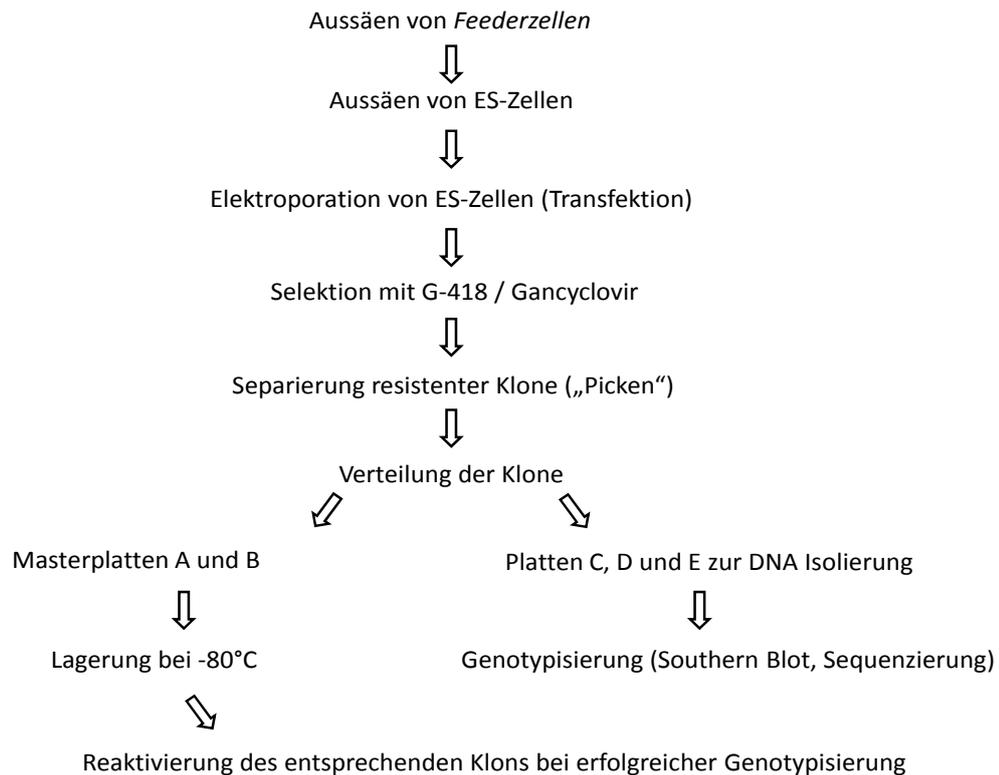


Abb. 15 Kultivierung von embryonalen Stammzellen (ES). Um die gewünschte Mutation in das Genom der *knockin* Mäuse einzufügen, müssen ES-Zellen transfiziert werden. Nach erfolgreicher Anreicherung und Identifikation geeigneter Klone können diese reaktiviert werden und für die weitere Herstellung der Mäuse verwendet werden.

2.3.1. Handhabung von ES- und Feederzellen

Für die Kultivierung der ES- und Feederzellen gelten dieselben Grundsätze wie für andere eukaryotische Zellen auch (vgl. 2.2.1). ES-Zellen erhielten täglich, *Feederzellen* wöchentlich frisches Medium. Da ES-Zellen immer auf *Feederzellen* wachsen (Abb. 16), müssen immer ausreichend mitotisch inaktivierte *Feederzellen* vorbereitet werden. Hierfür wurden konfluent bewachsene 10 cm Schalen mit 1 mg/ml Mitomycin C (MMC) supplementierten Medium für 2 Stunden inkubiert. Hiernach wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen. Nach der Trypsinierung erfolgte das Ausplattieren der Zellen auf dieselbe Anzahl an Zellkulturplatten. Am Folgetag waren die MMC behandelten Fibroblasten bereit für die Kultivierung mit ES-Zellen.

Material

Feeder-Medium: DMEM (INVITROGEN); 10% FCS (PAA); 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (INVITROGEN); 2 mM L-Glutamin (INVITROGEN)

F1 V6.5 ES-Zell-Medium: DMEM (INVITROGEN); 15% FCS (PAN BIOTECH); 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (INVITROGEN); 3 mM L-Glutamin (INVITROGEN); 10 mM HEPES (INVITROGEN); 0,1 mM Mercaptoethanol (INVITROGEN); 10^7 Units/ml Leukämie inhibierender Faktor (CHEMKON)

1x PBS (INVITROGEN)

0,05% Trypsinpuffer in Tris/EDTA Puffer (GIBCO)

Mitomycin C (SIGMA)

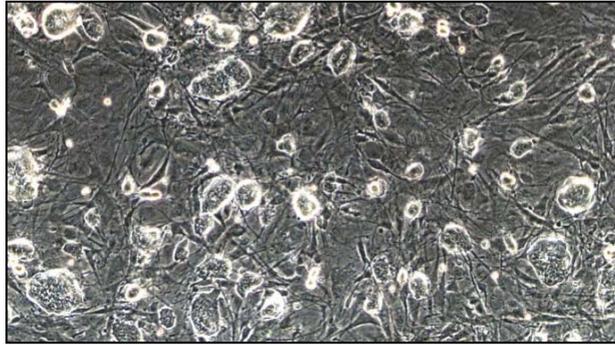


Abb. 16 Kultivierte embryonale Stammzellen. ES-Zellen wachsen als einzelne Kolonien auf einem konfluenten Monolayer *Feederzellen* (Foto von Dr. Ralf Kühn).

2.3.2. Elektroporation von ES-Zellen

Etwa 40×10^6 ES-Zellen wurden mittels Elektroporation mit $200 \mu\text{g}$ AflII-linearisiertem Targetingvektor transfiziert. 6 Stunden vor der Transfektion erfolgte der Wechsel des Mediums. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert; der Überstand nach der Zentrifugation wurde entfernt und die Zellen wurden in PBS gewaschen. Nach einer weiteren Pelletierung der ES-Zellen wurde der PBS-Puffer abgesaugt und die Zellen in $3,2 \text{ ml}$ frischem PBS inklusive des lineasierten Vektors resuspendiert. Vier Elektroporationsküvetten wurden mit jeweils $800 \mu\text{l}$ der Zellsuspension gefüllt. Die Transfektion erfolgte bei 300 V im Elektroporator. Hiernach wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann auf 14 neue 10 cm Platten mit MMC-behandelten *Feederzellen* ausgesät.

Material

Linearisierter Targetingvektor (mit dem Restriktionsenzym AflII)
Elektroporator (*Gene Pulser* von BIO RAD)
Gene Pulser Elektroporationsküvetten (BIO RAD)

2.3.3. Selektion von ES-Zellen mit G-418 und Gancyclovir

Der Targetingvektor trägt zwischen den Homologiearmen ein Neo-Resistenzgen. Wurde der Vektor gerichtet oder zufällig in das ES-Zell Genom integriert, kann das Resistenzgen exprimiert werden und die Zellen überleben die Selektion mit dem Aminoglykosid G-418. Um Klone mit einer gerichteten Integration des Vektor anzureichern wurden die ES-Zellen zusätzlich mit dem Nukleosid-Analogen Gancyclovir behandelt. Nach homologer Rekombination werden *nur* Sequenzbereiche zwischen den Homologiearmen in das Genom eingebaut. Das Gen für die Thymidinkinase (TK) befindet sich stromabwärts des 3' Homologiearmes. Bei einer ungerichteten Integration des Konstruktes kann auch das TK-Gen in das Genom eingebaut werden. Dadurch kommt es zu einer Phosphorylierung d.h. Aktivierung von Gancyclovir. Erst in der aktiven Form ist es toxisch für die Zellen. Zwei Tage nach der Elektroporation wurde die Selektion mit $140 \mu\text{g/ml}$ G-418 gestartet. Fünf Tage nach der Transfektion erfolgte die Zugabe

von 2 mM Gancyclovir. Täglich wurde das G-418 / Gancyclovir supplementierte Medium erneuert. Acht bis 10 Tage nach der Elektroporation wurden die überlebenden Klone isoliert und separat kultiviert.

Material

G-418 (GIBCO)
Gancyclovir (SYNTEX)

2.3.4. Separierung resistenter Kolonien („Picken“)

Etwa 8-10 Tage nach der Transfektion wurden die G-418 / Gancyclovir selektierten ES-Kolonien „gepickt“. Hierzu wurden MMC-behandelte *Feederzellen* tags zuvor auf 96-well Platten ausgesät. (Aus einer 10 cm Platte konnte eine 96-well Platte generiert werden.). Am Tag der Separierung erfolgte zunächst ein Mediumwechsel der *Feederplatte*: Das *Feedermedium* wurde durch 100 µl / well ES-Medium ersetzt. In einem nächsten Schritt erfolgte die Füllung einer V-förmigen 96-well Platte (NUNC) mit je 50 µl / well Trypsinpuffer. Das Medium auf den 10 cm Schalen mit den resistenten Kolonien wurde durch PBS ersetzt. Unter einem Binokular erfolgte dann das „Picken“ der Kolonien. Hierfür wurden durch schnelles Loslassen des Kolbenhubs der Pipette die gewünschte ES-Kolonie vom *Feeder*-Monolayer abgerissen. Die Kolonie konnte dann in der V-förmigen Multiwellplatte in Trypsinpuffer inkubiert werden. Nach Zugabe von 50 µl ES Medium wurden die Zellen der Kolonien durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend wurden diese Zellen auf die 96-well *Feederplatte* überführt. Befanden sich weitere Kolonien auf der Platte, die jedoch noch zu klein zum Separieren waren, wurden die Platten für 1-2 weitere Tage in ES-Medium ohne G-418 / Gancyclovir inkubiert und die beschriebene Prozedur wurde später wiederholt.

2.3.5. Herstellung von Klon-Triplikaten / Synchronisierung

Zwei bis drei Tage nach der Separierung der resistenten Kolonien wurden die Zellen trypsiniert und auf drei neue 96-well Platten verteilt: zwei dieser Platten enthielten *Feederzellen* (Masterplatten A und B), die dritte Platte C (ohne *Feederzellen*) wurde zuvor mit Gelatine-Lösung behandelt, um das Anhaften der ES-Zellen zu gewährleisten. ES-Zellen auf Platte C konnten ohne *Feederzellen* kultiviert werden, da diese Zellen für die Genotypisierung per Southern Blot verwendet wurden und pluripotente Eigenschaften hierfür nicht nötig waren.

Die Herstellung von Triplikaten bedarf einer Synchronisierung der Zellen. Die einzelnen Wells der 96-well *Feeder*-Platte waren 1-2 Tage nach dem „Picken“ unterschiedlich dicht bewachsen. Aufgrund des Multiwellformats ist es jedoch nicht möglich einzelne Klone zu versorgen; sondern nur gesamte Platten. Daher ist es notwendig die verschiedenen Klone durch entsprechende verdünnen in ihrer Dichte und somit in ihrem Wachstum einander anzugleichen. Nachdem die

Zellen mit 50 μl / *well* Trypsin vom Plattenboden abgelöst wurden, erfolgte die Zugabe von 100 μl ES-Medium. Zellen, die sehr dicht gewachsen waren, wurden zusätzlich mit 50 oder 100 μl Medium verdünnt. Im Anschluss wurden jeweils 50 μl auf die drei neuen Platten A-C transferiert. Sobald die Platten A und B dicht genug bewachsen waren, wurden die Platten weggefroren (Abb. 15). Von Platte C wurden bei Konfluenz Triplikate angefertigt, die zur Verwendung für die Genotypisierung bei -20°C gelagert wurden (Platten C-E).

Material

0,1 % Gelatine-Lösung (SIGMA)

2.3.6. Einfrieren / Lagerung der Masterplatten A und B

Sobald die ES-Zellen auf den Masterplatten A und B dicht genug gewachsen waren, wurden die Platten bei -80°C für maximal 3 Monate eingefroren. Hierfür wurden die Zellen mit 50 μl / *well* Trypsinpuffer vom Plattenboden abgelöst. Anschließend wurden 150 μl Cryomedium zugegeben.

Material

Cryomedium: F1-ES-Medium mit 15% DMSO

2.3.7. Extraktion von DNA aus ES-Zellen

Für die Genotypisierung per Southern Blot musste zunächst die genomische DNA der ES-Zellen von gelatinisierten 96-*well* Platten extrahiert werden. Die Zellen wurden auf der 96-*well* Platte aufgeschlossen und die DNA ebenda präzipitiert.

Je *well* wurde 50 μl Lysepuffer zu den ES-Zellen gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte über Nacht bei 55°C . Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von eiskaltem 100%igem Ethanol. Für eine optimale DNA-Fällung wurden die Platten 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Unter dem Mikroskop konnte bei erfolgreicher Präzipitation die DNA als filamentöses Netzwerk identifiziert werden. Der Ethanol wurde durch Dekantieren entfernt. Hierzu wurden die Platten invertiert und auf Zellstoff gedrückt. Im Anschluss wurde die genomische DNA 3-mal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte bei Raumtemperatur unter einem Abzug für 15 Minuten getrocknet, um restliche Ethanolrückstände zu entfernen. Nun war die DNA bereit für die Behandlung mit Restriktionsenzymen.

Wurde genomische DNA im größeren Maßstab (10 cm Platte) extrahiert, wurde ein kommerzielles Kit verwendet, das auf einer Säulenaufreinigung beruhte.

Material

Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 0,5% Sarcosyl; 1 mg/ml Proteinase K
Wizard genomic DNA Purification Kit (PROMEGA)

2.3.8. Restriktionsverdau von ES-Zell DNA im 96-well Format

Der Restriktionsverdau der genomischen ES-Zell-DNA im 96-well Format erfolgte über Nacht bei 37°C. Jedes well wurde mit 35 µl Restriktionsansatz versehen. Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Material

Restriktionsmix: 40 Units Restriktionsenzym (FERMENTAS); 1x Restriktionspuffer mit BSA (für das entsprechende Enzym); 4 mM Spermidin (SIGMA); 100 µg/ ml RNase A (SIGMA)

2.3.9. Southern Blot Genotypisierung

Um festzustellen, ob eine homologe Rekombination am Mc4r-Lokus erfolgte, wurde eine Southern Blot Genotypisierung vollzogen. Nach erfolgreicher homologer Rekombination wurden zusätzliche auf dem Targetingvektor befindliche Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme in den Mc4r-Lokus integriert. Dadurch veränderten sich nach homologer Rekombination die Fragmentgrößen im Vergleich zum wildtypischen Allel.

Das Agarosegel zur Auftrennung der Restriktionsfragmente wurde nach Beendigung der Elektrophorese fotografiert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der DNA mit alkalischem Denaturierungspuffer. Die Inkubation dauerte 30 Minuten und fand auf einem Orbitalschüttler statt. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte durch das Kapillarblot-Verfahren unter Verwendung des Denaturierungspuffer über Nacht (Abb. 17). Nach Beendigung des DNA-Transfers wurde die Nylonmembran in Neutralisierungspuffer geschwenkt. Um die transferierte DNA kovalent an die Membran zu binden, wurde die Membran für 2 Stunden bei 80°C im Wärmeschrank gebacken.

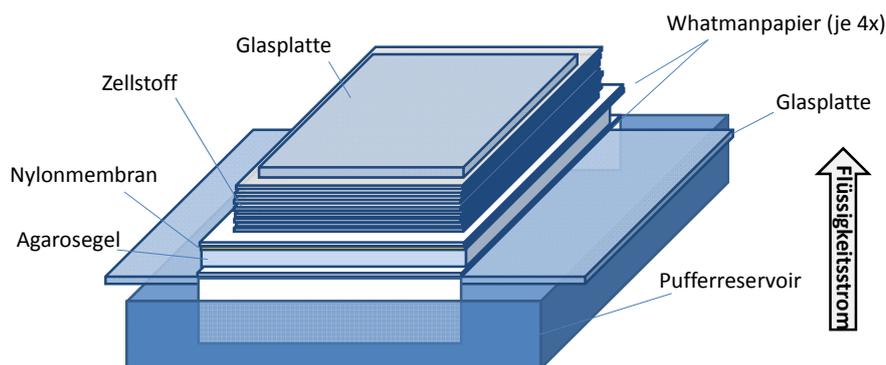


Abb. 17 Aufbau Southern Blot. Die selektierten ES-Zellklone wurden mittels Southern Blot genotypisiert. Durch einen vom Pufferreservoir ausgehenden Flüssigkeitsstrom wird die im Agarosegel befindliche DNA zur Nylonmembran transportiert (Kapillarblot).

Material

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl; 0,5 NaOH
 Neutralisierungspuffer; 0,2 M Tris-HCl pH 7,8; 0,5 M NaCl
 Hybond-XL Nylonmembran (GE HEALTHCARE)

2.3.10. Hybridisierung / Filmautoradiographie

Komplementäre DNA-Einzelstränge können miteinander hybridisieren. Diese Eigenschaft erlaubt es bestimmte DNA-Fragmente auf einer Membran zu identifizieren, in dem eine radioaktivmarkierte, denaturierte Sonde zur Membran gegeben wird.

Der Southern Blot wurde mit 10 ml Hybridisierungslösung bei 64°C für ein Stunde rollend prähybridisiert. Die durch PCR hergestellte Sonde konnte mit Hilfe der *random primed labeling* Methode mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markiert werden. 100 ng PCR-Produkt wurden für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Danach erfolgte die Abkühlung auf Eis für 5 Minuten.

Tab. 9: Radioaktive Markierung der DNA-Sonde

<u>Komponente</u>	<u>Volumen [μl]</u>
DNA-Sonde	x
Bidest. Wasser	add 11
High Prime Mix	4
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	5 (50 μCi)
Σ	20

Die Markierung erfolgte bei 37°C im Heizblock. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über eine Säule aufgereinigt, um nicht inkorporiertes $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP zu entfernen. Vor der Hybridisierung über Nacht wurde die Sonde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Der Blot wurde im Anschluss an die Hybridisierung mit 1x SSC-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Zunächst wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem horizontal Schüttler gewaschen. Anschließend wurde die Temperatur auf 65°C erhöht und es wurde für weitere 15 Minuten gewaschen. Danach wurde der Southern Blot in Folie eingeschlagen. Die Membran wurde mit einem Röntgenfilm in eine Expositionskassette einsortiert und für 3-6 Tage bei -80°C gelagert. Hiernach konnte der Film in einer Kodak-Maschine entwickelt und ausgewertet werden.

Material

Hybridisierungslösung: 0,5 M Natriumphosphat pH 7,0; 1mM EDTA; 7% SDS (w/v); 1% BSA (w/v)

Prime 3'-Sonde: For 5'-GTATTTTGCTTTGAGGGACTTGAG-3'
Rev 5'-ATTGGTGGCCTTAGATTGATG-3'

High Prime Mix (ROCHE); $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (HARTMANN); Probe Quant G-50 Aufreinigungssäulchen (GE HEALTHCARE); 1x SSC Puffer mit 0,5% SDS (w/v); Biomax Filme (KODAK)

2.3.11. Blastocysten Injektion und Implantation der Embryonen

ES-Zellklone mit der gewünschten Mutation wurden in Blastocysten injiziert. Dies war eine Dienstleistung der *transgenic unit* unter der Leitung von Dr. Ralf Kühn (Helmholtz Zentrum

München). 20-25 ES-Zellen wurden dabei in die Blastocystenhöhle von 3,5 Tage alten C57BL/6J-Blastocysten injiziert. Für die Herstellung beider *Mc4r knockin* Mauslinien wurden jeweils 80 Blastocysten verwendet, wobei jede Blastocyste mit 20 bis 30 manipulierten F1 ES-Zellen injiziert wurde. Die manipulierten Blastocysten wurden in scheinträchtige Weibchen implantiert. Durch einen Schnitt im Rücken konnte der Uterus freipräpariert werden und der Transfer ins Infundibulum des Eileiters erfolgte.

2.3.12. Keimbahntest und Deletion der Neo-Resistenz

Aus der Manipulation von Blastocysten können sogenannte F0-Chimären entstehen, da die injizierten ES-Zellen und die ES-Zellen der Blastocysten von unterschiedlichen Mausstämmen stammen. Die verwendeten F1-ES-Zellen haben einen gemischten genetischen Hintergrund bestehend aus C57BL/6J und 129SvEvTac und kodieren ein agoutifarbenes Fell. Die endogenen ES-Zellen der C57BL/6J Blastocysten hingegen kodieren ein schwarzes Fell. Beide ES-Zellpopulation können zur Entwicklung der Maus beitragen. Folglich haben Mauschimären ein gemustertes Fell. Je größer der Agoutianteil des Fells, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass auch die Keimbahn von den F1-ES-Zellen besiedelt wurde. Die Keimbahntransmission der transfizierten F1-ES-Zellen ist unabdingbar für die Herstellung einer Mausmutantenlinie, da nur dann die Mutation von Generation zu Generation vererbt werden kann.

Für den Keimbahntest wurden F0-Chimären mit dem höchsten Chimärismusgrad mit C57BL/6J Mäusen verpaart. Haben die manipulierten ES-Zellen die Keimbahn kolonisiert, sollte das agoutifarbene Fell und die gewünschte Punktmutation in der F1-Generation identifiziert werden. Die Bestätigung der Keimbahntransmission der Mutationen erfolgte durch PCR und Sequenzierung.

Insbesondere die regulatorischen Bereiche (Promotor, Polyadenylierungssignal) des Neo-Resistenzgens können Interferenzen auslösen, wodurch die Expression benachbarter Gene beeinflussen werden kann. Um solche Effekte zu minimieren, wurde die Neo-Resistenz durch das Cre/loxP-System *in vivo* aus dem Mausgenom eliminiert. Die Cre-Rekombinase (*causes recombination*) erkennt loxP-Sequenzen (*locus of X-over*) und deletiert den dazwischen liegenden Bereich. Heterozygote *Mc4r knockin* Mäuse der F1-Generation wurden mit *Rosa-Cre deleter* Mäusen verpaart, welche die Cre-Rekombinase heterozygot im *Rosa26-Locus* tragen und konstitutiv in allen Geweben exprimieren. Folglich tragen Tiere der F2-Generation den gewünschten *Mc4r-Locus* mit der Punktmutation und einer im Genom verbleibenden loxP-Sequenz im 3'-Bereich des *Mc4r-Gens*. Die Neo-Deletion wurde mittels PCR nachgewiesen.

Mäuse

Wildtypische C57BL/6J Mäuse; *Rosa-Cre deleter* Mäuse C57BL/6-*Gt(ROSA)26Sor tm16(Cre)Arte* (TACONIC ARTEMIS)

2.3.13. Extraktion der genomischen DNA aus Schwanzspitzen

Während des Absetzens vom Muttertier erfolgte die Markierung der Mäuse durch Ohrlöcher. Zusätzlich wurde ein ungefähr 0,5 cm langes Stück vom Schwanz abgeschnitten. Die Schwanzspitze wurde in 700 µl Proteinase K-haltigem Puffer bei 55°C über Nacht aufgeschlossen. Zelltrümmer und Haare wurden in der Zentrifuge für 3 Minuten bei Raumtemperatur und 14000g pelletiert. Der Überstand wurde dann mit 600 µl Isopropanol versetzt (DNA-Fällung). Die DNA wurde in der Zentrifuge pelletiert. Anschließend wurde das DNA-Pellet mit 600 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet getrocknet. Die Resuspendierung der DNA erfolgte in 75 µl Nuklease-freiem Wasser bei 55°C für 2 Stunden. Die DNA konnte nun für die Genotypisierung eingesetzt werden.

Material:

Tail-Puffer nach Laird: 100 mM Tris, pH 8,5; 5mM EDTA (pH 8); 0,2% SDS; 200 mM NaCl (Substanzen von ROTH); 0,4 mg/ml Proteinase K (FERMENTAS)

2.3.14. PCR-basierte Genotypisierung

Die Genotypisierung von Mäusen und rekombinanten ES-Zellen erfolgte mittels PCR. Es wurde ein kommerzieller PCR-Mix verwendet (Tab 10). Für den Nachweis der eingefügten Restriktionsschnittstelle im Mc4r-Gen musste das PCR-Produkt mit dem entsprechenden Restriktionsenzym behandelt werden. Nach Abschluss der PCR wurden direkt 10 Units Enzym, 2,5 µl 10 x Restriktionspuffer und Wasser zum Ansatz gegeben (Gesamtvolumen 25 µl). Der Verdau dauerte 1,5 Stunden im Wasserbad bei 37°C.

Tab. 10: Reaktionsansatz und Programm für die Genotypisierung

Komponente	Volumen [µl]	Schritt	Temp [°C]	Dauer [s]
Immomix	10	1. Initiale Denat.	95	420
For	1	2. Denaturierung	95	10
Rev	1	3. Anealing	55 [#] / 60 [*]	20
DNA	1,5	4. Elongation	72	30
Bidest.	5,5	35x zurück zu Schritt 2		
Σ	20	5. Finale Elong.	72	180

[#]Nachweis der eingefügten Schnittstellen und des Cre-Gens, ^{*}Nachweis der loxP-Sequenz

Material

Immo-PCR Mastermix (BIOLINE)

Primer:

EcoRV-Genotypisierung: For 5'-GCTCAACTATGTTTCATAGCAAG-3'
Rev 5'-CTCAGGATACGTTTTCTAGTTC-3'

Cre-Genotypisierung:	For	5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3'
	Rev	5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3'
loxP-Genotypisierung:	For	5'-CCTATGCCAAATGATACCCCACC-3'
	Rev	5'-CTCTAAGATGAAATGAACGCTGGACC-3'
Mc4r-W16X (XhoI)-Genotypisierung:	For	5'-CTACAGGCATACAGACTGGGAG-3'
	Rev	5'-GTACATGGGTGAGTGCAGGTTC-3'
Mc4r-V103I (BamHI)-Genotypisierung	For	5'-ACCATGGCATGTATACTTCCCTCCACC-3'
	Rev	5'-GGATGCGAGCAAGGAGCTACAGATC-3'

2.4. *in vivo* Charakterisierung

2.4.1. Tierhaltung / Besatzdichte

Die Mäuse (*Mus musculus*) wurden bei einer Raumtemperatur von etwa 22°C und einer relativen Luftfeuchte von 50-60% gehalten. Die Mäuse lebten auf Sägespän-Einstreu und hatten Nistmaterial (Laborpapier) zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Wasser und Futter. Das verwendete Futter (R/M-H Haltungsfutter, SSNIFF) enthielt 58% Energieprozent aus Kohlenhydraten, 33% aus Protein und 9% aus Fett. Der Energiegehalt betrug 17 kJ/g. Im Alter von 21 Tagen wurden Jungtiere von der Mutter abgesetzt, markiert und genotypisiert. Es wurden maximal 4 bzw. 8 Mäuse in Makrolonkäfigen des Typs II (360 cm²) bzw. des Typs III (810 cm²) gehalten. Die beiden Mauslinien wurden an zwei verschiedenen Standorten der TU München gehalten, so dass es Unterschiede in der Lichtperiode gab. Mc4r-W16X *knockin* Mäuse hatten 12h Licht und 12h Dunkelheit; Mc4r-V103I *knockin* Mäuse hatten hingegen 14h Licht und 10h Dunkelheit.

2.4.2. Registrierung des Körpergewichts

Die Messung des Körpergewichts erfolgte über die gesamte Lebensdauer der Mäuse 1-mal in der Woche auf einer Laborwaage (DENVER INSTRUMENTS).

2.4.3. Registrierung der Körperlänge

Für die Messung der Körperlänge wurden die Mäuse kurzzeitig mit Chloroform „im Topf“ narkotisiert. Die narkotisierte Maus wurde auf den Rücken gedreht und die Distanz Schnauze-Anus wurde per Lineal registriert.

2.4.4. Registrierung der Futteraufnahme und Fäzesproduktion

Die Messung von Futteraufnahme und Fäzesproduktion erfolgte in Einzelhaltung in Makrolonkäfigen des Typs II. Zunächst wurden die Tiere für drei Tage an die neue Umgebung

gewöhnt. Danach wurden die Mäuse in neue Käfige umgesetzt und über 5-7 Tage wurde täglich die in der Raufe verbliebene Futtermenge gewogen. Am Ende wurden die Fäzes aussortiert.

2.4.5. Bombenkalorimetrie

Die assimilierte Energie E_{ass} berechnet sich aus der aufgenommenen Energie E_{in} (durchschnittliche Futteraufnahme/Tag x Energiegehalt des Futters) und der abgegebenen Energie des Kots E_{Kot} (durchschnittliche Kotproduktion/Tag x Energiegehalt des Kots):

$$E_{\text{ass}} = E_{\text{in}} - E_{\text{Kot}}$$

Die aufgenommene und abgegebene Energie kann durch direkte Kalorimetrie im Bombenkalorimeter bestimmt werden. Eine Probe wird unter Sauerstoffüberschuss und hohem Druck (30 bar) vollständig verbrannt. Die durch die Verbrennung freiwerdende Wärme wird durch das Wasser im Behälter absorbiert. Diese Temperaturänderung ΔT wird gemessen.

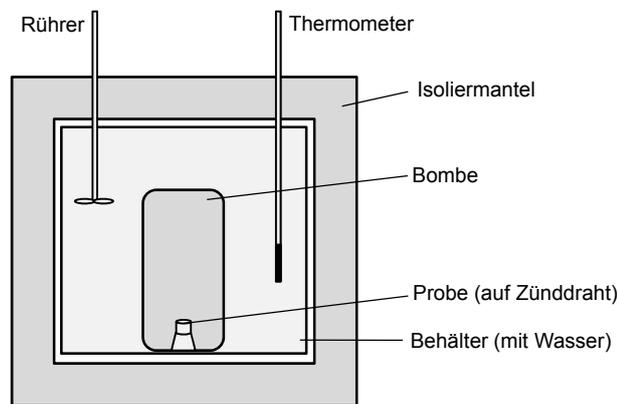


Abb. 18 Schematische Darstellung des Bombenkalorimeters. Durch direkte Kalorimetrie im Bombenkalorimeter erfolgte die Bestimmung des Energiegehalts von Futter- und Kotproben.

Im Versuch wurde ein isoperiboles Kalorimeter verwendet, d.h. die Manteltemperatur wird während der Messung konstant gehalten. Vor der eigentlichen Messung einer Probe wurde das Bombenkalorimeter kalibriert, indem Benzoesäure mit bekanntem Energiegehalt (26,5 kJ/g) verbrannt wurde. Hierbei wurde der Energieäquivalenzwert W des Kalorimeters ermittelt, welcher die Summe aller Wärmekapazitäten der Kalorimeterkomponenten darstellt. Mit der folgenden Gleichung konnte im Kalorimeter der Energiegehalt einer unbekanntenen Probe errechnet werden:

$$\text{Brennwert (J/g)} = \frac{W \times \Delta T}{G}$$

wobei W = Energieäquivalenzwert des Kalorimeters (J/K)
 ΔT = Temperaturerhöhung (K)
 G = Probengewicht (g)

Für die Verbrennung wurden die gesammelten Kot- und Futterproben im Wärmeschrank bei 60°C bis zum Erreichen eines konstanten Gewichts getrocknet. Anschließend erfolgte die Vermahlung der Proben mit einer handelsüblichen Kaffeemühle (KRUPPS), um eine Homogenität der Proben zu gewährleisten. Danach wurde etwa 1 g Probe mit einer Presse zu einer Tablette komprimiert. Das exakte Gewicht wurde registriert, in das Kalorimeter eingegeben und die Verbrennung im Bombenkalorimeter (6300 Calorimeter, PARR) konnte durchgeführt werden.

2.4.6. Registrierung der Körpertemperatur

Die rektale Körpertemperatur wurde mit einem Präzisionsthermometer (Almemo 2490, AHLBORN) mit einer Meßgenauigkeit von $\pm 0,03\%$ registriert. Innerhalb von 5 Tagen wurde bei jedem Versuchstier 2- bis 3-mal die Temperatur gemessen. Aus den Replikaten wurde der Mittelwert für ein Individuum gebildet. Die Messungen erfolgten immer zur selben Tageszeit etwa gegen 11 Uhr (Mc4r-W16X) bzw. 13 Uhr (Mc4r-V103I).

2.4.7. Messung der Körperzusammensetzung

Die Körperzusammensetzung der Mäuse wurde mittels Computertomographie (CT) bestimmt. Bei diesem bildgebenden Verfahren werden Röntgenbilder eines Versuchsobjekts aus vielen unterschiedlichen Richtungen aufgenommen und am Computer zu einem dreidimensionalen Bild rekonstruiert.

Im Versuch wurden 25 Wochen alte Mäuse untersucht. Die Messung erfolgte in einem LaTheta Micro CT-Scanner (ECHO MEDICAL SYSTEMS) an der Deutschen Mauslinik (Helmholtz Zentrum München). Bei der Untersuchung wurde der Abdominalbereich (Lendenwirbel L1 bis L6) gescannt. Es konnte zwischen Fettgewebe und fettfreier Masse unterschieden werden. Diese Unterscheidung ist möglich, da verschiedene Gewebetypen Röntgenstrahlung unterschiedlich absorbieren. Zusätzlich konnte differenziert werden zwischen subkutanem und viszeralem Fett sowie zwischen Knochen und fettfreiem Gewebe (Muskel, innere Organe).

2.4.8. Messung der Blutglukosekonzentration (*ad libitum*)

Die Blutglukosekonzentration der Mäuse wurde mit einem handelsüblichen Blutzuckermessgerät mit zugehörigen Messstreifen (FreeStyle Lite, ABBOTT) für Diabetiker durchgeführt. Die Untersuchung fand in vier verschiedenen Altersstufen statt: 3-4, 10-12, 18-20 und 25-28 Wochen. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser. Die Messungen erfolgten immer gegen 16 Uhr.

Für die Messung wurde den Mäusen ein etwa 0,5 mm langes Stück der Schwanzspitze mit einer Schere entfernt. Der sich bildende Blutstropfen konnte dann mit dem Blutzuckermessgerät untersucht werden.

2.4.9. Intraperitonealer Glukosetoleranztest

Vor der Glukoseinjektion (2 g/kg) wurde den Tieren für 6 Stunden das Futter entzogen. Für die Injektion wurden die Tiere im Nacken fixiert und die Glukoselösung wurde mit einer Spritze intraperitoneal verabreicht. Kurz vor (Basalwert), 15 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min nach der Glukoseladung erfolgte die Blutentnahme am Schwanz und die Messung der Blutglukose. Mit Hilfe der Software Prism4 (GRAPHPAD) erfolgte die Berechnung der *Area under the curve* (AUC)(Abb. 19).

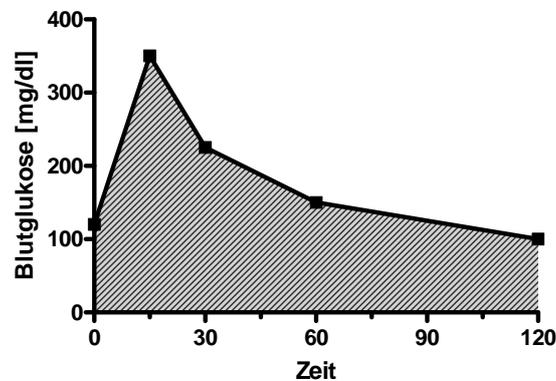


Abb. 19 Berechnung der *Area under the curve* (AUC). Für die Ermittlung der AUC (schraffierte Fläche) wurde der Bereich bis $y = 0$ mit einbezogen, d.h. die Basalglukosewerte wurden nicht subtrahiert.

Material

20% Glukose in 0,9% NaCl
Myjector-Insulinspritze (TERUMO)

2.4.10. Präparation des Hypothalamus

Um eine standardisierte Entnahme des Hypothalamus zu gewährleisten wurde der *Brainblocker* verwendet. Die Tiere wurden mit Kohlendioxid betäubt und durch Dekaptierung getötet. Nach Entfernung der Schädeldecke durch zwei laterale Inzisionen wurde das Gehirn mit einer Pinzette aus dem Schädel entfernt. Nervenverbindungen mussten durchtrennt werden. Anschließend wurde das Gehirn mit der dorsalen Seite nach unten im *Brainblocker* positioniert (Abb. 20). Es wurde ein etwa 5 mm dicker Coronalchnitt angefertigt, aus dem mit einer Stanze der Hypothalamus entfernt wurde (Abb. 20). Das Gewebefragment wurde in einem Schraubdeckelgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

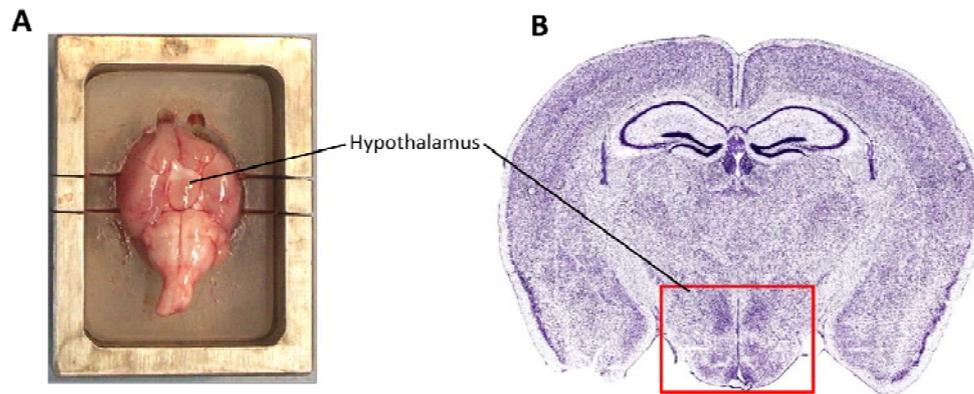


Abb. 20 Präparation des Hypothalamus. A Ventrale Sicht auf ein Mausgehirn im *Brainblocker*. B Nisselfärbung eines koronalen Schnitts durch ein Mausgehirn. Der rotumrandete Bereich (Hypothalamus) wird mit einer Stanze aus dem Gehirn geschnitten (www.braininfo.org).

2.4.11. Injektionen von Nonsense-Suppressoren

Die Nonsense-Suppressoren wurden den Mäusen subkutan injiziert. Hierfür wurden die Tiere mit einem Handtuch bedeckt, so dass der untere Rücken noch zugänglich war. Das Abdecken mit dem Handtuch war notwendig, um den Experimentator vor Bissen zu schützen. Eine Fellfalte wurde zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert und die Testsubstanz konnte injiziert werden. Die Injektion der Aminoglykoside erfolgte 1-mal täglich etwa 1 Stunde vor der Dunkelphase. Bei der Verabreichung von PTC124 erfolgte zusätzlich eine Injektion morgens ungefähr 2 Stunden nach Ende der Dunkelphase.

Material

Amikacin (SIGMA)	40 mg/ml Amikacin in physiologischer Kochsalzlösung
Gentamicin (HEXAL)	40 mg/ml Gentamicin (Medikament für die Veterinärmedizin)
PTC124 (SICHEM)	6 mg/ml PTC124 in 5% Glukose und 5% Ethanol (resuspendiert mit einem Ultraturax)
Myjector-Insulinspritze (TERUMO)	

2.4.12. RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte durch eine Kombination aus einem TRIsure-basierten Aufschluss des Gewebes und einer Silikasäulen-Aufreinigung. Pro Hypothalamusprobe (ca. 20 mg) wurden 800 µl TRIsure (BIOLINE) in 5 ml Reagenzröhrchen vorgelegt. Das Gewebe musste im gefrorenen Zustand in das Reagenz überführt werden. Die Homogenisation mit einem Ultraturax (IKA LABORTECHNIK) erfolgte bis zur vollständigen Auflösung des Gewebes. Um eine Phasenseparation zu erreichen, wurde die homogenisierte Probe 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 160 µl Chloroform zugegeben und die Reaktion wurde für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer 3 Minuten dauernden Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 12000g und 4°C.

Die Probe trennte sich in eine grünliche organische Phenol / Chloroform-Phase, eine Zwischenphase und eine obere wässrige Phase, welche die DNA enthielt.

Die RNA-haltige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß mit 500 µl 75%igem Ethanol überführt und gemischt. Die Probe wurde nun auf die Säule transferiert und für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die an die Säule gebundene RNA wurde mit 600 µl Waschlösung gewaschen. Nach dem der Durchfluss nach der Zentrifugation verworfen wurde, erfolgte die Behandlung mit DNaseI für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Die DNase-Reaktion wurde durch DNase-Stopp-Lösung beendet. Hiernach wurde die RNA zweimal mit 700 bzw. 500 µl Waschlösung gewaschen. Die Elution der RNA erfolgte mit 50 µl Nuklease-freiem Wasser.

Material

Trisure (BIOLINE), SV total RNA Isolation System (PROMEGA)

2.4.13. cDNA-Synthese

Durch die Verwendung der Reversen Transkriptase (RT) kann zu einzelsträngiger RNA ein komplementärer (*complementary*) cDNA Strang synthetisiert werden. Dabei werden RNA-Spezies anteilig in cDNA umgeschrieben. Es wurde ein Primermix verwendet, welcher Oligo-dT- und sogenannte *random* Primer enthielt, so dass möglichst alle Bereiche eines Transkripts durch einen cDNA-Strang repräsentiert wurden. Vor der cDNA-Synthese wurde die Qualität der RNA im Agarosegel überprüft. Für die Synthese wurde ein kommerzielles Kitsystem verwendet (Tab. 11).

Tab. 11 Reverse Transkription

Komponente	Volumen [µl]
RNA (500ng)	x
gDNA wipeout buffer	1
Nuklease-freies Wasser	ad 7
	3 min 42°C
Reverse Transkriptase	0,5
5x RT-Puffer	2
Primermix	0,5
	30 min 42°C
	3 min 95°C

Material

QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN)

2.4.14. Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die Untersuchung der hypothalamischen Genexpression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) vollzogen. Mit dieser Methode können relative Unterschiede der

Transkriptmenge in verschiedenen Proben detektiert werden. Das Prinzip der Methode beruht auf einer herkömmlichen PCR, jedoch wird bei der qRT-PCR in jedem Zyklus eine fluorometrische Quantifizierung des PCR-Amplifikats vollzogen. Hierfür wird der Fluoreszenzfarbstoff Sybr-Green zur Reaktion gegeben, welcher die Eigenschaft hat in die DNA-Doppelhelix zu interkalieren und dabei seine Fluoreszenz zu erhöhen. Es werden keine absoluten, sondern relative Konzentrationen bestimmt.

Prinzip der Quantifizierung

Die Quantifizierung beruht letztendlich auf der Bestimmung des sogenannten Ct-Werts (*cycle threshold*) einer Probe, der den Schwellenwertzyklus angibt bei dem das Fluoreszenzsignal erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je höher die Startkonzentration einer cDNA ist, desto früher wird der Ct-Wert im Laufe der Amplifikation erreicht. Um einem Ct-Wert eine relative Startkonzentration zuordnen zu können, muss eine Standardkurve generiert werden. Hierfür verwendet man eine 6-stufige 2^n Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:64), zu gleichen Teilen bestehend aus allen cDNA-Proben, die quantifiziert werden sollen (Abb. 21). Die Verdünnung der unbekannt Proben war 1:10. Alle Primer wurden so entworfen, dass die Amplifikat eine maximale Länge von 250 bp hatten, und dass die optimale Annealingtemperatur bei 52°C lag.

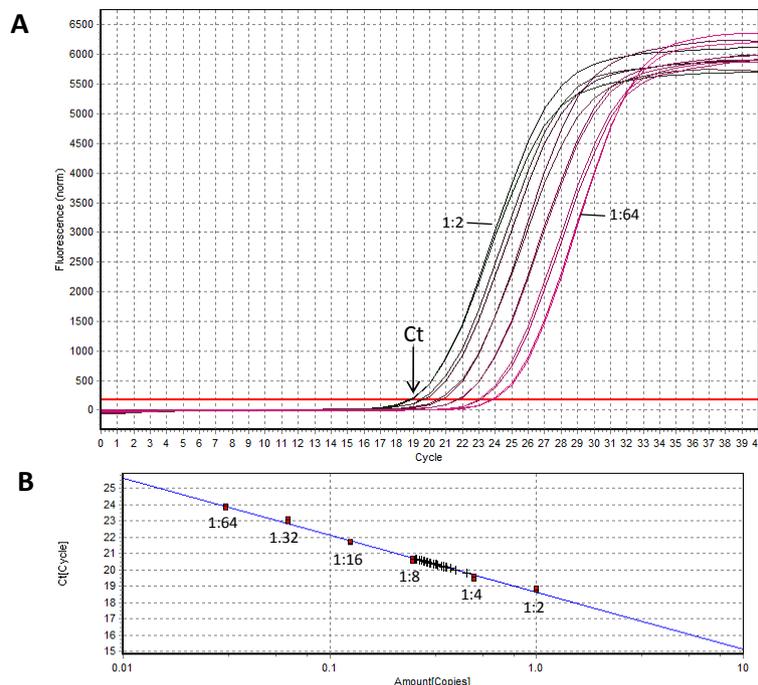


Abb. 21 Erstellung einer Standardkurve am Beispiel von Hsp90. A Amplifikationsverlauf. Dargestellt ist der Verlauf einer 6-stufigen Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:64) zur Generierung einer Standardgeraden. Je stärker die Verdünnungsstufe, desto größer ist der Ct-Wert. **B** Standardkurve. Die Ct-Werte werden mit der relativen Startkonzentration korreliert. Anhand der Geradengleichung kann nun die Abundanz von unbekannt Proben (+) ermittelt werden.

Technische Schwankungen können die Zuverlässigkeit der gewonnen Daten beeinflussen. Um dem entgegenzutreten, wurden sogenannte *house keeping* Gene herangezogen. Diese konstitutiv

exprimierten Gene sollten durch eine Behandlung oder durch einen bestimmten Genotyp nicht in ihrer Abundanz beeinflusst werden. Unterschiede in den *house keeping* Genen rühren daher aus technischen Schwankungen.

Bestimmung der Spezifität

Die Spezifität der Primer wurde *in silico* per Primerblast überprüft (<http://genome.ucsc.edu/>). Vor der qRT-PCR wurden die Primer in einer herkömmlichen PCR verwendet und die Amplifikate im Agarosegel aufgetragen. Nur Primer, die eine definierte Bande in der korrekten Größe generierten, wurden für die qRT-PCR verwendet.

Am Ende der qRT-PCR wurde eine Schmelzkurve generiert. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich von 60 auf 95°C erhöht. Hierbei kommt es zum Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA und zur Freisetzung des Sybr-Green Farbstoffs, wobei dieser seine Fluoreszenzeigenschaft verliert. Die Temperatur bei der die DNA-Helix aufgeschmolzen wird, ist spezifisch für ein bestimmtes PCR-Amplifikat.

Tab. 12 Reaktionsmix und Temperaturprogramm für die qRT-PCR

Komponente	Volumen [µl]	Schritt	Temp [°C]	Dauer [s]
2x Sensimix	12,5	1. Initiale Denat.	95	420
cDNA	1	2. Denaturierung	95	10
Sybr-Green (50x)	0,5	3. Annealing	52	10
For (10 µM)	1	4. Elongation	72	20
Rev (10 µM)	1	40x zurück zu Schritt 2		
Bidest.	9	5. Denaturierung	95	15
Σ	25	6. Schmelzkurve	60 - 95	1200

Material

Sensimix (QUANTACE)

Sybr-Green (QUANTACE)

Primer:

β-Actin:	For	5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'
	Rev	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'
Heat shock protein 90 (Hsp90):	For	5'-AGGAGGGTCAAGGAAGTGGT-3'
	Rev	5'-TTTTTCTTGTCTTTGCCGCT-3'
Agouti-related protein (Agrp):	For	5'-TCCCAGAGTTCCCAGGTCTAAGTC-3'
	Rev	5'-GCGGTTCTGTGGATCTAGCACCTC-3'
Brain derived neurotrophic factor (Bdnf):	For	5'-CCTGCATCTGTTGGGGAGAC-3'
	Rev	5'-GCCTTGTCCGTGGACGTTTA-3'
Fat and obesity associated gene (Fto):	For	5'-ATTCTGTCTGCCATCCTGGT-3'
	Rev	5'-GGAAACCACGTCTGTGAGGT-3'
Melanocortin-4-Rezeptor (Mc4r):	For	5'-CGTCATCGACCCTCTCATTT-3'
	Rev	5'-CACAGAAGAGGCAGCTGTTG-3'
Neuropeptid Y (Npy):	For	5'-GGCAAGAGATCCAGCCCTG-3'
	Rev	5'-CCAGCCTAGTGGTGGCATGC-3'

Pro-opiomelanocortin (Pomc):	For	5'-CCCTCCTGCTTCAGACCTC-3'
	Rev	5'-CGTTGCCAGGAAACACGG-3'
SH2B adapter protein 1 (Sh2b1):	For	5'-GAGGGCGACCGATGCTAC-3'
	Rev	5'-GCCCGCTTTCTCTTTCTCTT-3'
Single minded 1 (Sim1):	For	5'-CGAGGCAGGCAGGTACTTC-3'
	Rev	5'-GAGCTGACCACACTATCTTCATC-3'

2.4.15. Statistische Auswertung und Darstellung der Daten

Die Ergebnisse werden größtenteils in Form von Punktdiagrammen dargestellt, wobei jeder Punkt eine Stichprobe (z.B. ein Einzeltier) angibt. Der Mittelwert wird durch eine horizontale Linie repräsentiert. Alternativ werden die Daten als Säulendiagramme angezeigt, welche den Mittelwert \pm Standardabweichung (Stabw) angeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat 3.1. (SYSTAT SOFTWARE). Es wurden einfaktorielle, zweifaktorielle Varianzanalysen (Anova) mit anschließendem Posthoc-Tests (Holm-Sidak), sowie Mann-Whitney U-Tests und nicht-parametrische Friedmantests vollzogen. Als Signifikanzgrenze diente ein p-Wert kleiner 0,05. Es wurden nur dann Signifikanztests durchgeführt, wenn mindestens eine Stichprobengröße von $n \geq 4$ vorlag.

3. ERGEBNISSE

3.1. Klonierung der Expressions- und Targetingvektoren

3.1.1. Herstellung der Mc4r-Expressionskonstrukte

Die Leserahmen der Mc4r-Varianten wurden gerichtet in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4 kloniert. Der wildtypische Mc4r und der Mc4r-V103I wurden mit identischen Restriktionsenzymen in pcDNA4 eingefügt (Abb. 22). Durch das Primerdesign wurde das endogene Startkodon aus dem jeweiligen Leserahmen entfernt, da der Vektor selber ein Startkodon besitzt, welches vor einem Xpress-Epitop liegt. Durch die Epitop-Markierung war es möglich die Expression des Rezeptors immunologisch mittels Oberflächen-ELISA zu quantifizieren.

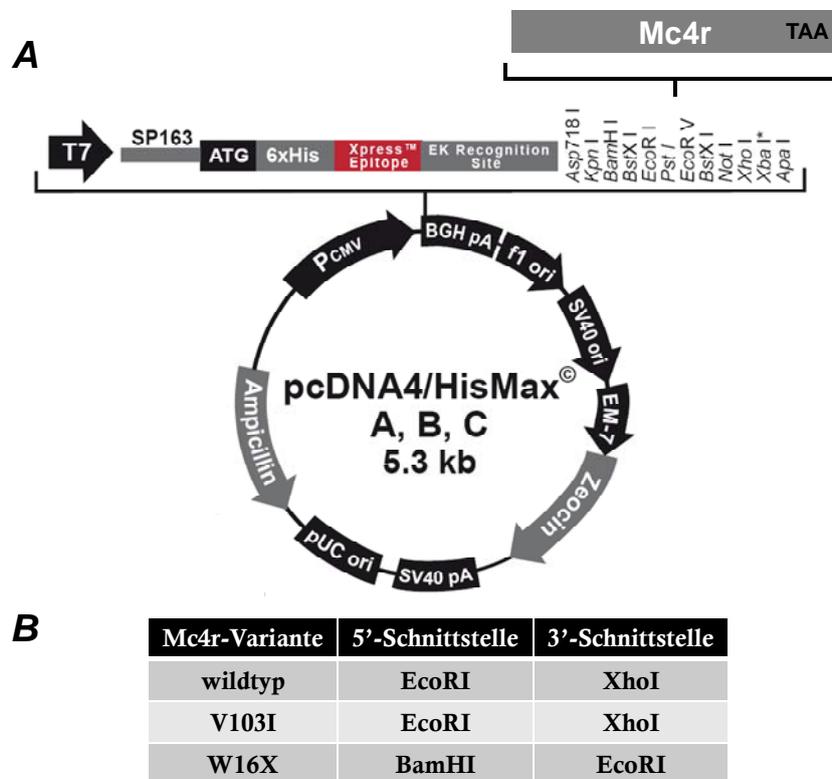


Abb. 22 Mc4r-Expressionskonstrukte. **A** Schematische pcDNA4-Vektorkarte. Die durch PCR-amplifizierten Mc4r-Leserahmen wurden gerichtet in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4 kloniert. **B** Verwendete Restriktionsschnittstellen.

Die erfolgreiche Integration der Mc4r-Leserahmen in den Vektor wurde durch Restriktionsanalysen überprüft. Klone mit dem korrekten Bandenmuster wurden anschließend durch kommerzielle Anbieter sequenziert. Die Sequenzen konnten bestätigt werden. Die Vektoren konnten nun für die funktionelle *in vitro* Charakterisierung verwendet werden.

3.1.2. Klonierung der Leptin-RLuc Fusionskonstrukte

Die Leptin- und *Renilla*-Luciferase-Leserahmen wurden gerichtet in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (Abb. 23). Die *Renilla*-Luciferase in pcDNA3 wurde von Kerstin Haas bereitgestellt. Zwischen dem Leptin- und *Renilla*-Leserahmen wurde die Sequenz für einen Linker bestehend aus 10 Glycinresten eingefügt, um eine Drehbarkeit zwischen den beiden fusionierten Proteinen zu erlauben. Der Glycinlinker wurde vom reversen Leptinprimer (Primer P6) kodiert. Um die Leserahmen der beiden Insertionen zu vereinen wurde das endogene Stoppkodon des Leptingens entfernt. Zusätzlich wurde das Startkodon der RLuc eliminiert. RLuc wurde mit EcoRI und XbaI, Leptin mit HindIII und EcoRI kloniert.

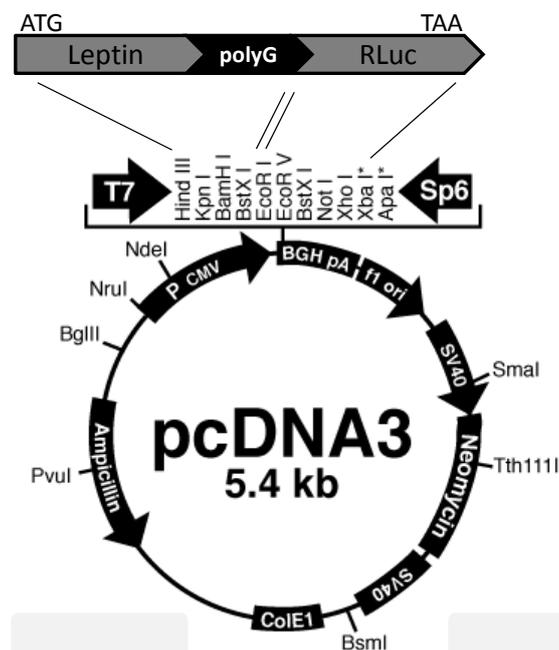


Abb. 23 Leptin-RLuc Fusionskonstrukt. Die beiden Insertionen wurden nacheinander in den Vektor kloniert. Das endogene Stoppkodon von Leptin und das Startkodon von RLuc wurden entfernt um eine Fusion der beiden Leserahmen zu ermöglichen. Zwischen den beiden Genen befindet sich ein Linker bestehend aus 10 Glycinresten (PolyG), um eine Drehbarkeit zwischen den beiden Komponenten des Proteins zu gewährleisten.

Die Klonierung wurde mit unterschiedlichen Restriktionsansätzen kontrolliert. Klone mit dem richtigen Bandenmuster wurden sequenziert. Im Anschluss konnten die Konstrukte für die Untersuchung der Überleseeffizienz der Leptinvariante R105X in einem Reporterassay verwendet werden.

3.1.3. Klonierung der Targetingkonstrukte

Die durch PCR synthetisierten 5'- und 3'-Homologiearme hatten eine Länge von etwa 3800 bp und wurden im pGEMTeasy-Vektor zwischenkloniert. Zunächst erfolgte die Klonierung des Targetingkonstrukts für die Herstellung der Mc4r-W16X *knockin* Maus. Der 3'-Homologiearm musste zuerst in den Zielvektor pEasyFloxII kloniert werden, aufgrund der Restriktionsenzyme

FseI und XhoI, da die Stoppmutation W16X im 5'-Homologiearm mit einer XhoI-Schnittstelle markiert wurde. Geplant war eigentlich die gerichtete Klonierung des Homologiearms in pEasyFloxII mit den Enzymen NotI / AscI. Das Klonieren mit diesen beiden Enzymen funktionierte jedoch nicht, vermutlich aufgrund der Nähe der beiden Schnittstellen im Vektor, so dass die Integration des mutationstragenden 5'-Homologiearms ungerichtet mit NotI erfolgte. Dies war möglich, da der TA-Klonierungsvektor pGEMTeasy beidseitig im Polylinker Schnittstellen für das Enzym NotI trägt.

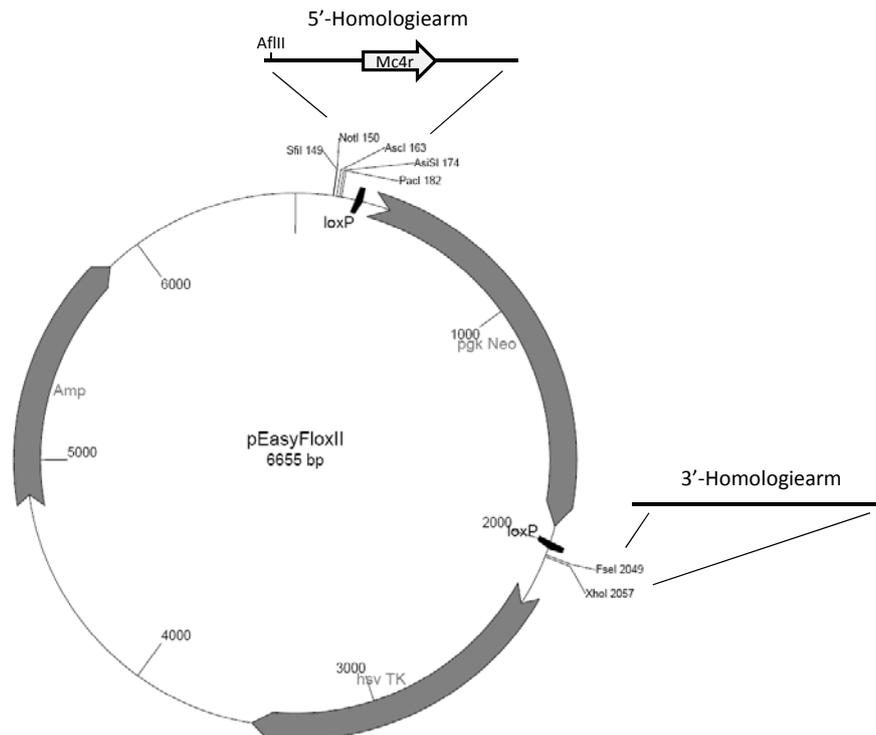


Abb. 24 Schematische Darstellung des Targetingvektors pEasyFloxII. Der 5'-Homologiearm wurde in den ersten, der 3'-Homologiearm in den zweiten Polylinker kloniert. Die Polylinker flankierten das Neo-Resistenzgen (Neo), welches unter der Kontrolle eines Phosphoglyceratkinase (pgk)-Promotors stand. Stromabwärts des 3'-Arms befindet sich außerhalb der Homologiebereiche das Thymidinkinase-Gen (HSV-TK) aus dem Herpes-simplex-Virus. Das Neo-Gen wurde von zwei loxP-Sequenzen begrenzt. Vor der ES-Zell-Transfektion wurde der Vektor mit AflII linearisiert. Die Schnittstelle war Bestandteil des 5'-Homologiearms.

Die Orientierung des Homologiearms und die Anwesenheit der Stoppmutation wurden durch verschiedene Restriktionsanalysen überprüft. Anschließend wurde das Targetingkonstrukt für die Mc4r-W16X *knockin* Maus von Dr. Klaus Huse (Fitz Lipmann Institut, Jena) sequenziert. Die Sequenzierung beinhaltete den 5'-Arm, das Neo-Resistenzgen, den 3'-Arm und den 5'-Bereich der Thymidinkinase. Die Sequenz konnte bestätigt werden. Es wurde aber eine zusätzliche Insertion des pGEMTeasy-Vektors von mindestens 400 bp stromaufwärts der AflII-Schnittstelle festgestellt. Diese zusätzliche Sequenz kann keinen Einfluss auf die Funktionalität des Konstrukts ausüben. Targetingvektoren müssen vor der ES-Zell-Transfektion durch Restriktionsverdau linearisiert werden. Dies erfolgte mit dem Enzym AflII, welches exklusiv im 5'-Homologiearm

schneidet. Folglich hängt die zusätzliche pGEMTeasy Insertion am Rückgrat des pEasyFloxII-Vektors ohne die Abfolge der Homologiebereiche zu zerstören.

Im Anschluss wurde das Konstrukt für die Mc4r-X16 *knockin* Maus als Ausgangsvektor für die Klonierung des Targetingvektors für die Mc4r-V103I *knockin* Maus verwendet. Hier erfolgte ein gerichteter Austausch des 5'-W16X-Homologiearms mit den Restriktionsenzymen NotI und AscI, wobei die Sequenz des 5'-V103I Homologiearms bereits im Zwischenklonierungsvektor bestätigt werden konnte. Die richtige Integration des 5'-Arm und die Anwesenheit der Punktmutation wurde durch verschiedene Restriktionsanalysen überprüft. Zusätzlich wurde von der Neo-Resistenz ausgehend der 3'-Bereich des 5'-Homologiearms sequenziert.

Die Klonierungsarbeiten waren äußerst zeitaufwendig. Zur Aufnahme der Vektoren wurde zunächst der Bakterienstamm *E.coli* DH5 α verwendet, der standardmäßig in unserem Labor Verwendung findet. Sequenzierungen ergaben Rearrangierungen der Homologiebereiche vermutlich vermittelt durch eukaryotische Sequenzbereiche wie z.B. Mini-, Mikrosatelliten, die in prokaryotischen Zellen nicht vorkommen. Es kam zu Deletionen von bis zu 1000 bp, so dass die Vektoren nicht zur Verwendung kommen konnten. Daher wurde auf Empfehlung von Dr. Klaus Huse auf einen anderen Bakterienstamm gewechselt. Die Klonierungsarbeiten wurden mit diesem Bakterienstamm komplett wiederholt. *E.coli* Top10-Zellen waren in der Lage die Konstrukte stabil aufzunehmen, so dass die Klonierungsarbeiten für die Targetingvektoren erfolgreich abgeschlossen werden konnten. Die Vektoren standen dann für die weitere Herstellung der beiden Mc4r *knockin* Mauslinien zur Verfügung.

3.2. *In vitro* Charakterisierung

3.2.1. Wiederherstellung der Mc4r-W16X Oberflächenexpression

Behandlung mit dem Aminoglykosid G-418

Aminoglykoside haben die Eigenschaft ein Überlesen von vorzeitigen Stoppmutationen zu vermitteln. In einem ersten Versuchsansatz wurde durch die Verwendung des aminoglykosidischen Antibiotikums G-418 (Geneticin) die Oberflächenexpression der Variante Mc4r-W16X wiederhergestellt. Hierfür wurden HEK293 Zellen im 12-*well* Format transient transfiziert (2,5 μ g Vektor / *well*). 24 Stunden nach der Transfektion startete die Inkubation mit G-418 (75 μ g/ml) für 24 Stunden. Die Quantifizierung der Mc4r-Plasmamembranexpression erfolgte mittels Oberflächen-ELISA.

Die Variante Mc4r-W16X zeigte unter Kontrollbedingungen keine Oberflächenexpression. Das ELISA-Signal war identisch mit dem der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Negativkontrolle).

Durch die Behandlung mit G-418 konnte eine partielle Wiederherstellung der Mc4r-W16X Oberflächenexpression erreicht werden. Im Gegensatz dazu zeigte der wildtypische Rezeptor keine Veränderung der Membranexpression nach der Aminoglykosidinkubation (Abb. 25).

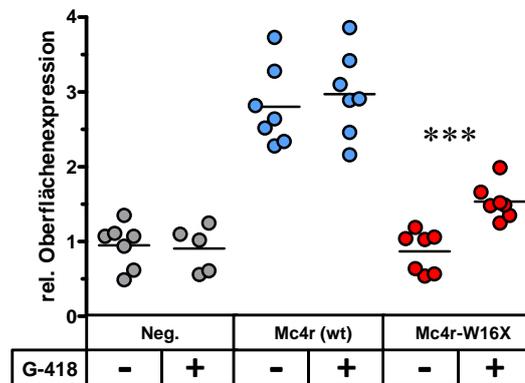


Abb. 25 Wiederherstellung der Mc4r-W16X Oberflächenexpression durch G-418 (n=5-7, Mittel- & Einzelwerte). Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden für 24 Stunden mit dem Aminoglykosid G-418 (75µg/ml) inkubiert. Die Expression wurde mittels Oberflächen-ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die jeweiligen Einzelmesswerte (neg: nicht-transfizierte Zellen) (Mann-Whitney-Test; ***p<0,001).

Behandlung mit dem Fluorobenzen PTC124

In einem weiteren Versuchsansatz wurde das Fluorobenzen PTC124 verwendet. PTC124 soll wie Aminoglykoside auch eine Suppression von Stoppmutationen bewirken (Auld et al., 2009). Das experimentelle Vorgehen war mit dem oben beschriebenen für G-418 identisch, jedoch wurden unterschiedliche Konzentrationen der Substanz angewendet (Abb. 26). Im Gegensatz zu G-418 war kein Effekt von PTC124 auf die Oberflächenexpression der Variante Mc4r-W16X zu beobachten. Jedoch war eine positive Korrelation der Oberflächenexpression und der PTC124-Konzentration beim wildtypischen Mc4r zu verzeichnen, was durch eine gesteigerte Translationsrate ausgelöst durch PTC124 erklärt werden könnte.

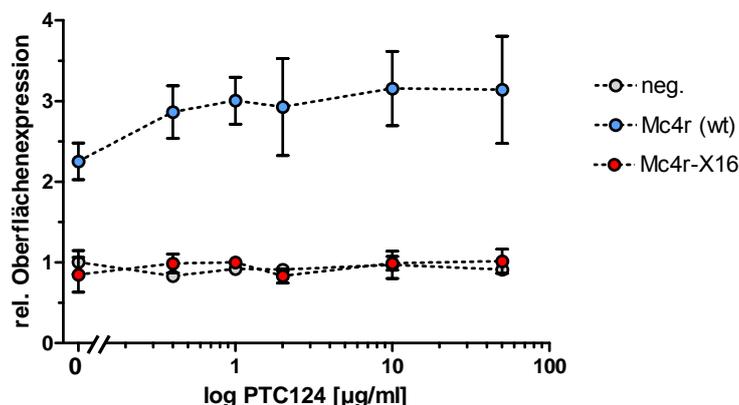


Abb. 26 Mc4r-Oberflächenexpression nach PTC124-Behandlung (n=2-4, Mittelwerte ± Stabw). Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen PTC124 inkubiert. Die Expression wurde mittels Oberflächen-ELISA quantifiziert.

3.2.2. Wiederherstellung der Mc4r-W16X Signaltransduktion

Durch den Oberflächen-ELISA konnte gezeigt werden, dass G-418 eine Wiederherstellung der Mc4r-W16X Oberflächenexpression bewirkt (Abb. 25). In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die G-418-Behandlung zu einer Reaktivierung der Signaltransduktion führt. Der nachstehende Versuch wurde in Kooperation mit Dr. Harald Brumm (Charité, Berlin) durchgeführt. Cos-7-Zellen wurden auf 12-well Platten transient mit den Mc4r-Expressionskonstrukten transfiziert (3 µg Vektor / well). Nach der Stimulation der Zellen mit dekadisch ansteigenden Konzentrationen des Mc4r-Agonisten α -MSH erfolgte die Messung der Rezeptoraktivität mit einem radioaktiven cAMP-Akkumulationsassay. Der Mc4r-W16X zeigte keine Aktivität nach Stimulation mit α -MSH. Erst die Koapplikation mit G-418 führte zu einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve. Ein Effekt von G-418 auf die Aktivität des wildtypischen Rezeptors war nicht zu beobachten (Abb. 27).

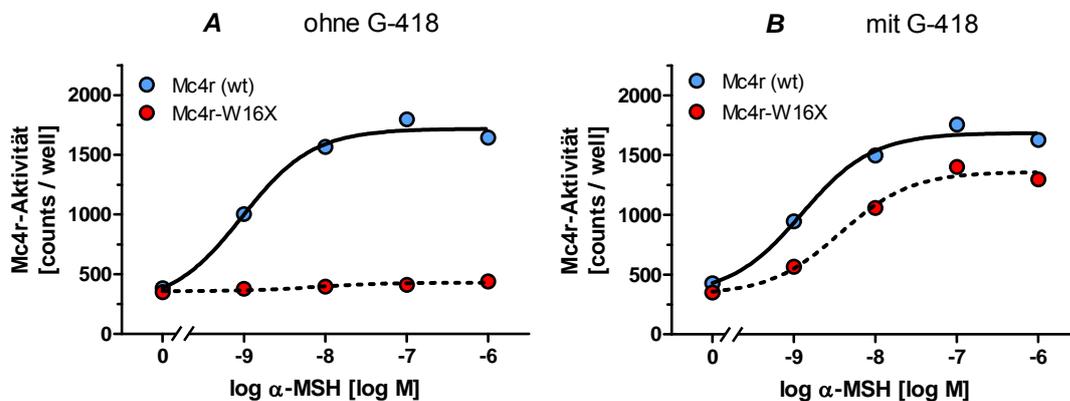


Abb. 27 Wiederherstellung der Mc4r-W16X-Aktivität durch G-418. Transient transfizierte Cos7-Zellen wurden für 24 Stunden mit G-418 (75 µg/ml) inkubiert. Die Rezeptoraktivität wurde mit einem radioaktiven cAMP-Akkumulationsassay gemessen. **A** Dosis-Wirkungskurven ohne G-418 **B** Dosis-Wirkungskurven von G-418 behandelten Zellen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch.

Durch die G-418-Inkubation konnte die Maximalaktivität (E_{max}) des Mc4r-W16X auf nahezu 80% der wildtypischen Aktivität wiederhergestellt werden. Die Agonistenkonzentration bei der die halbmaximale Rezeptoraktivität (EC_{50} -Wert) zu beobachten war, lag bei G-418-behandelten Mc4r-W16X exprimierenden Zellen bei 0,4 nM und bei Zellen, welche den wildtypischen Rezeptor exprimierten bei etwa 0,10 nM unabhängig von der Behandlung.

3.2.3. Wiederherstellung der Leptin-R105X Expression

Die Verwendung des cAMP-Assays und des Oberflächen-ELISAs konnte die Wiederherstellung der Mc4r-W16X Variante nach der Applikation des Aminoglykosids G-418 nachweisen. Diese beiden Ansätze erlauben nur die Charakterisierung von Mc4r-Varianten. Im Laufe der Arbeit richtete sich die Aufmerksamkeit auf die ob/ob Mausmutante, welche aufgrund der R105X-

Stoppmutation im Leptingen kein Leptin produzieren kann. Um eine Methode zu etablieren, welche die Untersuchung von Stoppmutationen in unterschiedlichen Genen erlaubt, wurden

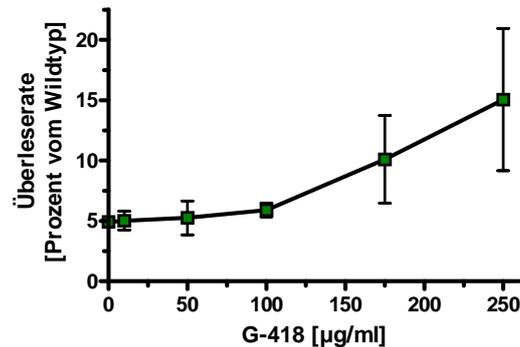


Abb. 28 Wiederherstellung der Leptinvariante R105X durch G-418 (n=4, Mittelwert \pm Stabw). An den C-Terminus des Leptingens wurde die *Renilla*-Luciferase fusioniert. Es wurden Fusionskonstrukte für das wildtypische und das stoppmutierte Leptin-R105X hergestellt. Die Aktivität der Mutante wurde für jede G-418-Konzentration prozentual auf den Wildtyp bezogen.

pcDNA3-Expressionskonstrukte kloniert, die am 3'-Ende des Leptingens eine *Renilla*-Luciferase (RLuc) trugen. HEK293-Zellen wurden auf 12-well Platten mit dem Expressionskonstrukt transfiziert (2,5 µg Vektor / well). Durch die vorzeitige Stoppmutation im Leptingen erfolgte ohne G-418 (basal) nur eine geringe Expression der RLuc im Vergleich zu den wildtypischen Konstrukten. Die Zugabe von G-418 führte zu einer Dosis-abhängigen Wiederherstellung der Luciferaseaktivität (Abb. 28). Im Vergleich zum Oberflächen-ELISA für die Analyse der Mc4r-W16X Variante waren bei diesem Experiment höhere G-418-Konzentrationen notwendig um ein Funktionswiederherstellung zu erzielen.

3.2.4. Charakterisierung der Mc4r-Variante V103I

Für die Charakterisierung der Rezeptorvariante Mc4r-V103I wurden HEK293 stabil mit den entsprechenden pcDNA4-Konstrukten transfiziert. Nach der Selektion der Zellen mit Zeocin wurden 20 resistente Kolonien für jeden Genotyp (wildtypischer Mc4r bzw. Mc4r-V103I) isoliert.

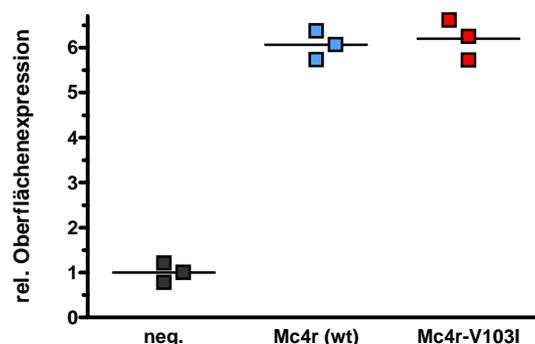


Abb. 29 Oberflächen-ELISA (n=3). Mit Hilfe des Oberflächen-ELISAs konnte die Mc4r-Expression in der Plasmamembran quantifiziert werden. Dargestellt ist die Expression zweier HEK293-Klone, die den wildtypischen Mc4r bzw. den Mc4r-V103I stabil exprimieren. Die beiden Klone wurden für die folgenden Reporterassays verwendet. Als Negativkontrolle (neg.) wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen verwendet.

Nach der Vereinzelung und Vermehrung der Kolonien erfolgte die Messung der Mc4r-Expression anhand des Oberflächen-ELISAs. Für die folgenden Luciferaseassays war es von Bedeutung Klone mit möglichst identischer Oberflächenexpression zu verwenden, da die Aktivität des Reportergens nicht nur von der Aktivität der Rezeptorvariante, sondern auch von der Mc4r-Expressionsstärke abhängt. Aus den Zeocin-resistenten Klonen war es möglich zwei Klone mit nahezu identischer Mc4r-Oberflächenexpression zu identifizieren (Abb. 29). Diese zwei Klone wurden für die folgenden Reporterassays herangezogen.

3.2.5. Dosis-Wirkungskurven mit verschiedenen Mc4r-Liganden

Die stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden für die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven mit verschiedenen Mc4r-Liganden verwendet. Es wurden die Rezeptoragonisten α - und β -Melanozyten stimulierendes Hormon (MSH), sowie der inverse Agonist *Agouti-related protein* (AGRP) der Maus getestet. Hierfür wurden die stabilen Linien zusätzlich transient mit einem Reporter-genvektor transfiziert, der die *Photinus* Luciferase unter der Kontrolle eines *cAMP response element* (CRE) Promotor exprimiert (Abb. 30).

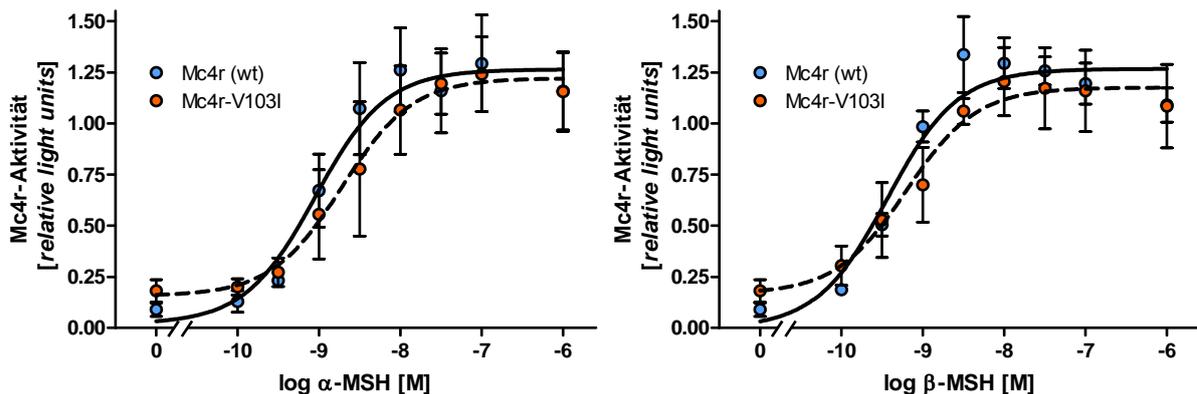


Abb. 30 / Tab. 13 Dosis-Wirkungskurven unter Verwendung von α - und β -MSH (n=4-5, Mittelwerte \pm Stabw). Stabil transfizierte, Mc4r exprimierende HEK293-Zellen wurden transient mit einem CRE-PLuc Reporter-genvektor transfiziert. Die Rezeptoraktivität wird in *relative light units* (RLU) angegeben. Die Normalisierung der Messdaten erfolgte durch die Stimulation der Zellen mit Forskolin. (Tabelle: Mann-Whitney-Test).

	Basal [RLU]	α -MSH		β -MSH	
		E_{\max} [RLU]	EC_{50} [nM]	E_{\max} [RLU]	EC_{50} [nM]
Mc4r (wt)	0,09 \pm 0,03	1,24 \pm 0,21	0,95 \pm 0,17	1,24 \pm 0,08	0,45 \pm 0,05
Mc4r-V103I	0,18 \pm 0,05	1,21 \pm 0,16	2,35 \pm 1,77	1,19 \pm 0,23	0,72 \pm 0,39
p-Wert	0,03*	1,00	0,22	0,49	0,34

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen wildtypischem Mc4r und Mc4r-V103I bezüglich der Aktivierbarkeit durch α - und β -MSH beobachtet werden. Weder bei den EC_{50} -Werten noch bei der maximalen Aktivierung (E_{\max}) waren genotypenspezifische Unterschiede

ersichtlich. Jedoch hatte der Mc4r-V103I eine signifikant höhere Agonisten-unabhängige Basalaktivität als der wildtypische Mc4r.

Verwendung des inversen Agonisten Agrp

Ein inverser Agonist kann die Basalaktivität reduzieren und hat somit einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität eines Rezeptors. Die Basalaktivität der V103I-Variante war in diesem Versuchsansatz wiederum höher als die des wildtypischen Mc4r. Der inverse Mc4r-Agonist Agrp konnte die Aktivität von beiden Varianten reduzieren. Die maximale Inhibition (I_{\max}) war bei beiden Varianten ähnlich (Abb. 31), wodurch die Mc4r-Spezifität der erhöhten Basalaktivität der Mc4r-V103I-Variante verdeutlicht wurde. Zudem war der IC_{50} -Wert, d.h. die Agrp-Konzentration bei der die halbmaximale Inhibition vorliegt, bei Mc4r-V103I höher, was eine geringere Sensitivität der V103I-Variante gegenüber Agrp andeutet.

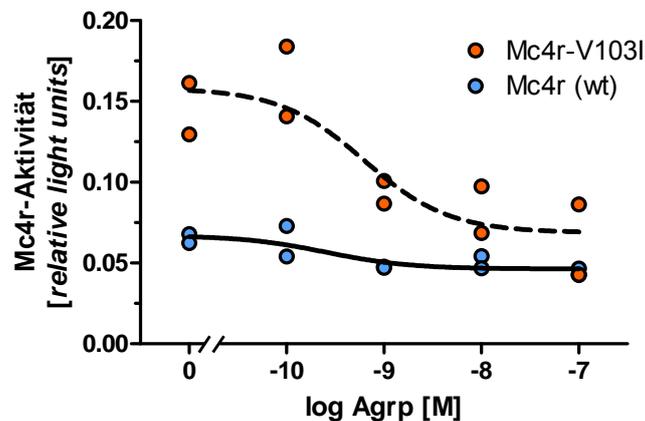


Abb. 31 / Tab. 14 Dosis-Wirkungskurve unter Verwendung von Agrp (n=2). Stabil transfizierte, Mc4r exprimierende HEK293-Zellen wurden transient mit einem CRE-PLuc Reportergenvektor transfiziert. Die Rezeptoraktivität wird in *relative light units* (RLU) angegeben. Die Normalisierung der Messdaten erfolgte durch die Stimulation der Zellen mit Forskolin. Angegeben sind die Datenpunkte bzw. Parameter für jede Einzelmessung.

	Agrp		
	Basal [RLU]	I_{\max} [RLU]	IC_{50} [nM]
Mc4r (wildtyp)	0,06 / 0,07	0,04 / 0,05	0,10 / 0,12
Mc4r-V103I	0,13 / 0,16	0,04 / 0,09	0,54 / 1,00

3.2.6. Charakterisierung der Basalaktivität

Um in einem weiteren Experiment die Basalaktivität zu charakterisieren, wurden HEK293-Zellen transient mit verschiedenen Mengen an Mc4r-Expressionsvektoren transfiziert. Mehrere Publikationen konnten mit diesem experimentellen Vorgehen Unterschiede in der Basalaktivität zwischen verschiedenen humanen MC4R-Varianten aufdecken (Srinivasan et al., 2004; Proneth et al., 2006). Bei beiden Genotypen stieg mit zunehmender Mc4r-Kopienzahl die

Rezeptoraktivität an. Dabei war die Zunahme der Basalaktivität bei der V103I-Variante im Vergleich zum Wildtyp höher (Abb. 32).

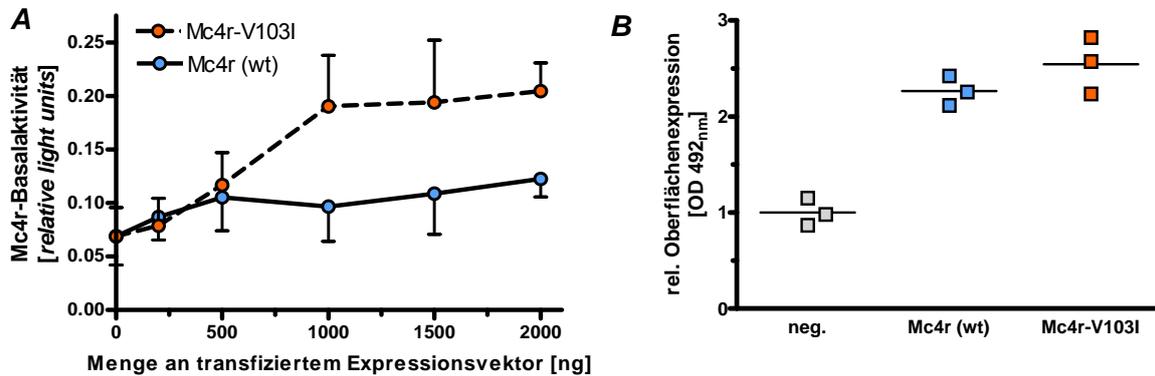


Abb. 32 Charakterisierung der Mc4r-Basalaktivität. **A** Mc4r-Basalaktivität (n=3-5, Mittelwerte \pm Stabw). HEK293-Zellen wurden transient mit steigenden Mengen Mc4r-Expressionsvektor (pcDNA4) und gleichbleibenden Mengen CRE-PLuc-Reportergenvektor kotransfiziert. Die Rezeptoraktivität wird in *relative light units* angegeben. Die Normalisierung erfolgte durch die Stimulation der Zellen mit Forskolin. **B** Oberflächen-ELISA an transient transfizierten HEK293-Zellen (n=3). Mit Hilfe des Oberflächen-ELISAs wurde die Mc4r-Expression in der Plasmamembran relativ quantifiziert. Als Negativkontrolle (neg.) wurden nicht transfizierte Zellen verwendet.

Um auszuschließen, dass die gesteigerte Basalaktivität des Mc4r-V103I durch eine unterschiedliche Oberflächenexpression gegenüber dem wildtypischen Mc4r verursacht wurde, erfolgte die Quantifizierung der Rezeptorzahl in der Plasmamembran mittels Oberflächen-ELISA in einem weiteren unabhängigen Experiment. Hierfür wurden 5 μ g Vektor-DNA für die Transfektion von Zellen auf 10 cm Platten verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte das Umsetzen der Zellen auf 12-Well Platten. 48 Stunden nach der Transfektion startete der Oberflächen-ELISA. Es konnte nur ein minimaler Unterschied in der Oberflächenexpression zwischen dem wildtypischen und dem mutierten Mc4r gefunden werden (Abb. 32).

3.3. Herstellung der Mc4r *knockin* Mauslinien

Das Einfügen der gewünschten Punktmutationen in den Mc4r-Lokus sollte durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (*gene targeting*) erfolgen; die Deletion des Neo-Resistenzgens durch das Cre/loxP-System. Nach einer Cre-vermittelten Eliminierung eines DNA-Fragments verbleibt immer eine loxP-Sequenz im Genom. Um mögliche Interferenzen mit der Mc4r-Expression zu minimieren, sollte die Lokalisation der loxP-Sequenz außerhalb bekannter regulatorischer Bereiche erfolgen.

Für die Planung des Targetingkonstrukts bzw. der *Gene Targeting*-Strategie wurden Informationen zu regulatorischen Bereichen im Mc4r-Gen aus der Publikation von Dumont *et al.* (2001) herangezogen. Hierin wurden durch 5'- und 3'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) Experimente das Mc4r-Gen der Maus auf den Transkriptionsstart und potentielle Polyadenylierungssignale hin charakterisiert. Der Transkriptionsstartpunkt wurde 429 bp stromaufwärts vom Startkodon identifiziert; ein klassisches Polyadenylierungssignal (AATAAA), sowie drei funktionelle Varianten davon (ATTAAA) konnten im Bereich von 276 bis 505 Nukleotiden stromabwärts vom Stoppkodon im 3'-Bereich des Mc4r-Lokus nachgewiesen werden (Dumont *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Publikation wurde die Targeting-Strategie so gewählt, dass die zu verbleibende loxP-Sequenz etwa 1000 bp stromabwärts des endogenen Stoppkodons, d.h. 500 bp stromabwärts der Polyadenylierungssignale im Genom verbleibt. Eine *in silico* Analyse des modifizierten Mc4r-Gens zeigte, dass durch die beschriebene Lokalisation der loxP-Sequenz keine zusätzlichen Polyadenylierungssignale in den Mc4r-Lokus eingefügt werden.

3.3.1. Elektroporation von embryonalen Stammzellen

ES-Zellen der Linie F1 V6.5 wurden durch Elektroporation transfiziert. Es wurden 40×10^6 Zellen und 200 µg AflII-linearisierter Targetingvektor verwendet. Mit jedem Targetingvektor wurden 2 separate Elektroporationen angesetzt. Unter Verwendung des Mc4r-W16X Konstrukts konnten insgesamt 350 G-418 und Gancyclovir resistente ES-Zellkolonien vereinzelt und anschließend genotypisiert werden. Die Gesamtzahl der doppelt resistenten Klone lag bei der Verwendung des Mc4r-V103I Targetingvektors bei 260.

3.3.2. Homologe Rekombination in ES-Zellen (Strategie)

Durch das Einbringen der linearisierten Targetingkonstrukte in die ES-Zellen konnte es zu einem gerichteten Sequenzaustausch zwischen den Homologiearmen des Vektors und der genomischen DNA der Zellen kommen (homologe Rekombination). Durch *Crossingover*-Ereignisse im Bereich der beiden Homologiearme konnte gezielt der Mc4r-Lokus modifiziert werden (Abb. 33). Die

Strategie war für beide Mauslinien identisch, da sich die Homologiearme der beiden Targetingvektoren nur in der jeweiligen Punktmutation im 5'-Arm unterschieden.

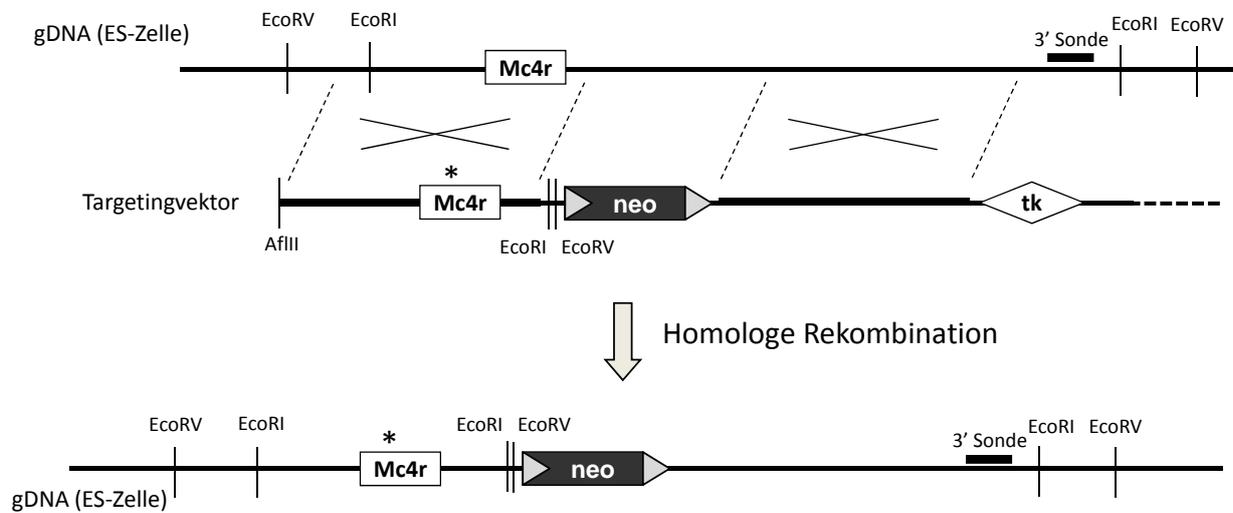


Abb. 33 Targetingstrategie für die Herstellung der beiden Mc4r knockin Mauslinien. An den Homologiearmen des AflIII-linearisierten Targetingvektors kann es jeweils zu einem *Crossingover* (X) kommen (oben), wodurch dazwischen liegende Sequenzbereiche in das Genom der ES-Zelle integriert werden. Die für die Southern Blot Analyse relevanten Restriktionsschnittstellen EcoRI und EcoRV, sowie die Bindeposition der externen 3'-Sonde sind dargestellt. Die Punktmutation im Mc4r-Gen ist mit einem Stern (*) markiert.

3.3.3. Genotypisierung von ES-Zellklonen

Der Nachweis der homologen Rekombination erfolgte durch einen Southern Blot. Durch erfolgreiche homologe Rekombination des Targetingvektors mit der genomischen DNA der ES-Zelle wurden zusätzliche EcoRI- und EcoRV-Restriktionsschnittstellen in den Mc4r-Lokus eingefügt. Es wurde eine externe Sonde verwendet, d.h. die Sonde hybridisiert mit einem Bereich außerhalb der Homologiearme des Vektors. *In silico* konnte auf Grundlage von C57BL/6J DNA die Größe der DNA-Fragmente für den wildtypischen, wie auch für den rekombinierten Mc4r-Lokus bestimmt werden (Abb. 34). Vor der eigentlichen Genotypisierung der ES-Zellen erfolgte ein Spezifitätstest der Sonde unter Verwendung von C57BL/6J-DNA. Dabei konnten die wildtypischen EcoRI- und EcoRV-Fragmente in der erwarteten Größe identifiziert werden (nicht gezeigt).

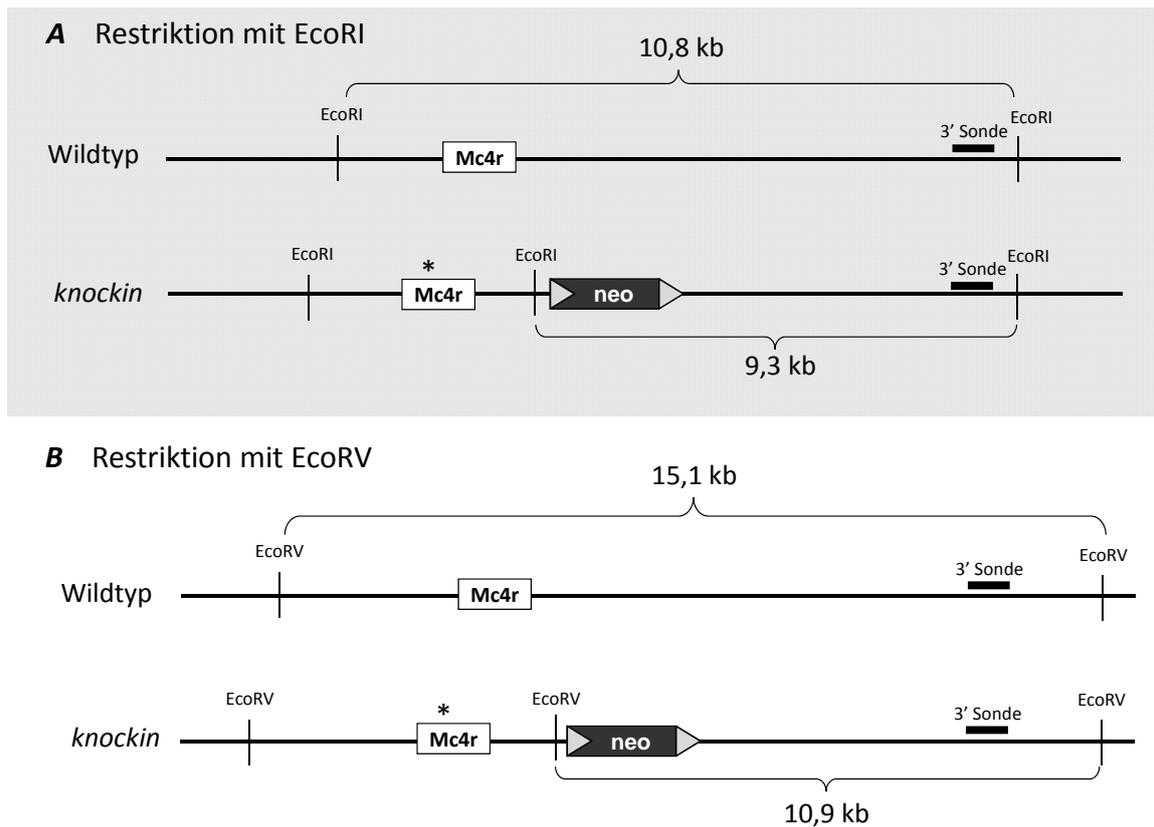


Abb. 34 Erwartete Fragmentgrößen im Southern Blot nach Restriktion mit EcoRI (A) und EcoRV (B). Dargestellt ist der mutierte Locus nach erfolgreicher homologer Rekombination bzw. der wildtypische nicht rekombinierte Mc4r-Locus. Durch das zusätzliche Einbringen von EcoRI- und EcoRV-Schnittstellen, welche auf dem Vektor vorhanden sind, verkürzt sich das nachzuweisende DNA-Fragment. Mit der ausgewählten 3'-Sonde war eine Unterscheidung zwischen wildtypischen und *knockin* Allel möglich.

Restriktion genomischer DNA mit EcoRV und anschließende Southern Blot Analyse

Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes sollten Klone mit wildtypischen Mc4r-Allelen im Southern Blot eine einzelne Bande zeigen; Klone mit einem wildtypischen und einem rekombinanten Allel eine Doppelbande. Anhand der *in silico* Analyse wurde für Klone mit wildtypischem Mc4r ein Signal bei ca. 15 kb erwartet. Nach homologer Rekombination wurde aufgrund einer zusätzlichen EcoRV-Schnittstelle ein kleineres Fragment von etwa 11 kb erwartet.

Die Southern Blot Untersuchung der Mc4r-W16X *knockin* Klone offenbarte jedoch bei ausnahmslos allen ES-Klonen eine Doppelbande. Alle 350 Klone zeigten eine nicht erwartete Bande größer 20 kb. 345 Klone trugen zusätzlich das für das wildtypische Mc4r-Allel prognostizierte Fragment bei 15 kb. Die übrigen 5 Klone zeigten neben dem 20 kb Fragment ein 11 kb Fragment (Abb. 35). Bei diesen Klonen erfolgte eine gerichtete Integration des Vektors in den Mc4r-Locus. Folglich lag die Rekombinationsfrequenz bei 1,4%. Die Genotypisierung der 260 ES-Zellklone für die Herstellung der Mc4r-V103I *knockin* Maus offenbarte, dass 2 Klone eine homologe Rekombination erfahren haben, so dass eine Rekombinationsfrequenz von 0,8% vorlag.

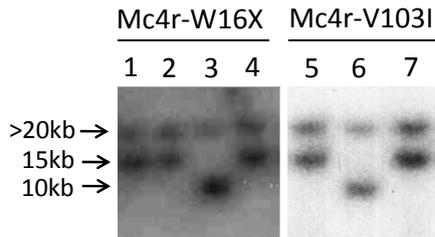


Abb. 35 Southern Blot Genotypisierung von ES-Zellklonen. Dargestellt sind die Genotypen von 7 repräsentativen Klonen. (links für die Herstellung der Mc4r-W16X-, rechts für die Mc4r-V103I *knockin* Maus). Die Klone 3 und 6 unterliefen eine homologe Rekombination, angezeigt durch die Bande bei etwa 11 kb. Die übrigen Klone waren Wildtypen.

Die hochmolekulare Bande größer 20 kb geht auf die Verwendung der F1 V6.5. ES-Zellen zurück. Die Zellen tragen für jedes Chromosomenpaar jeweils eine Kopie von den Mauslinien C57BL/6J und 129SvEvTac, so dass die Vermutung aufkam, es handelt sich um einen stammspezifischen Polymorphismus in einer EcoRV-Schnittstelle nahe dem Mc4r-Lokus. In Abb. 36 sind die im 5'-Bereich des Mc4r-Lokus nächstgelegenen EcoRV-Schnittstellen dargestellt. Die Restriktionskarte wurde *in silico* auf Grundlage von C57BL/6J generiert, da die Sequenz von 129SvEvTac nicht verfügbar ist. Daher ist die Karte mit der fehlenden EcoRV-Schnittstelle für den Stamm 129SvEvTac hypothetisch.

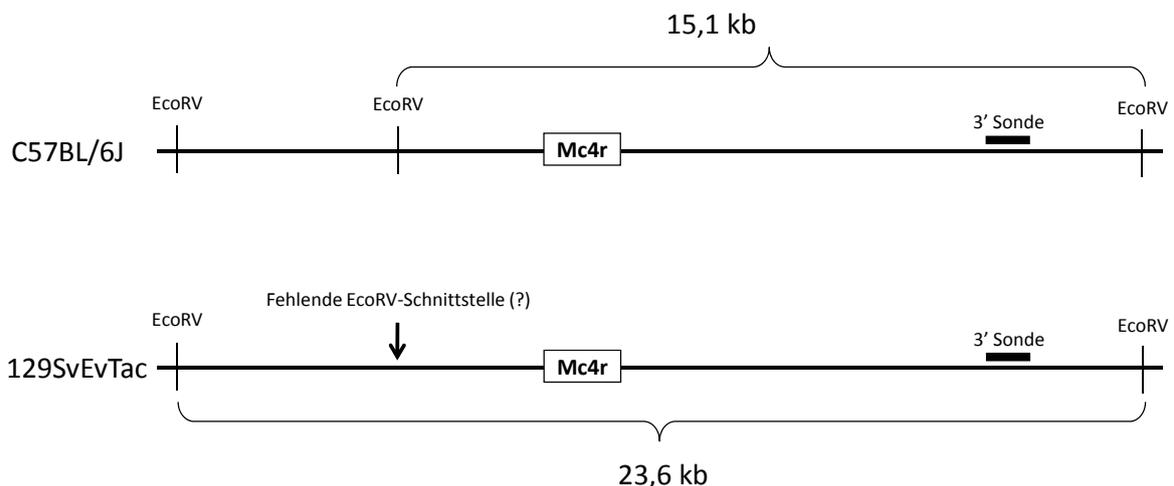


Abb. 36 EcoRV-Restriktionskarte für genomische DNA der Mauslinien C57BL/6J und 129SvEvTac. F1 ES-Zellen tragen für jedes Chromosomenpaar jeweils eine Kopie von C57BL/6J und 129SvEvTac. Die im Southern Blot beobachtete Bande größer 20 kb könnte auf einen Polymorphismus in einer EcoRV-Schnittstelle (\downarrow) zurückzuführen sein, der nur im Mausstamm 129SvEvTac auftritt. Ist diese Schnittstelle mutiert, würde im Southern Blot ein Fragment von 23,6 kb identifiziert werden.

Eine Mutation in einer EcoRV-Schnittstelle würde dazu führen, dass das wildtypische Mc4r-Allel des Mausstamms 129SvEvTac im Southern Blot eine Größe von 23,6 kb hat. Dies deckt sich mit der Beobachtung in der Southern Blot Genotypisierung (Abb. 35). In der besagten EcoRV-Schnittstelle befindet sich laut Datenbank (UCSC Genome Browser) ein Polymorphismus (rs29576391). Das Nukleotid A wird durch G ersetzt, wodurch die EcoRV-Erkennungssequenz GATATC zu GATGTC mutiert wird und nicht mehr vom Enzym erkannt werden kann.

Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurden Primer ausgewählt, welche den rs29576391 Polymorphismus flankieren. Eine PCR wurde durchgeführt mit C57BL/6J-, 129SvEvTac- und F1 V6.5-ES-Zell-DNA als Matrize. Die Amplifikate wurden anschließend mit EcoRV verdaut

(Abb. 37). Bei C57BL/6J konnte nach EcoRV-Verdau eine Doppelbande beobachtet werden. Das Amplifikat von 129SvEvTac hingegen war insensitiv gegenüber dem Restriktionsenzym, was verdeutlicht, dass eine defekte EcoRV-Schnittstelle bei dieser Mauslinie vorlag. Bei den F1 V6.5 ES-Zellen wurden drei Banden registriert. Folglich sind die ES-Zellen heterozygot für die Mutation in der EcoRV-Erkennungssequenz, wodurch das unerwartete Bandenmuster im Southern Blot erklärt ist. Diese Beobachtungen verdeutlichten, dass das C57BL/6J Allel durch die homologe Rekombination modifiziert wurde.

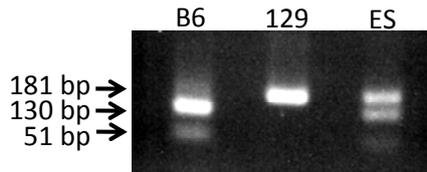


Abb. 37 EcoRV-Schnittstellen-Polymorphismus. Mittels PCR wurde die vermutlich mutierte EcoRV-Schnittstelle amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA von: B6: C57BL/6J, 129: 129SvEvTac, ES: F1 V6.5 ES-Zellen. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit EcoRV verdaut.

Restriktion genomischer DNA mit EcoRI und anschließende Southern Blot Analyse

Die genomische DNA des für die Blastocysteninjektion vorgesehenen Mc4r-W16X Klons wurde für einen Southern Blot unter Verwendung von EcoRI verwendet. Die Hybridisierung erfolgte wieder mit der 3'-Sonde. Aus Kontrollgründen wurde ebenfalls DNA einer C57BL/6J Maus, sowie von einem Klon, der keine homologe Rekombination im oben beschriebenen EcoRV Southern Blot gezeigt hat, verwendet.

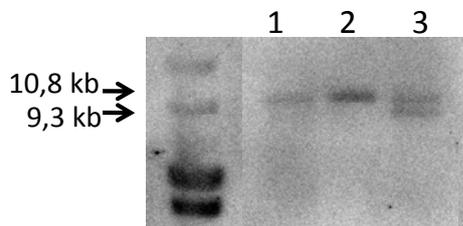


Abb. 38 Southern Blot Genotypisierung. Die genomische DNA wurde mit EcoRI verdaut. Die ungefähren Größen der Fragmente sind seitlich angegeben. 1: DNA von C57BL/6J Maus; 2: DNA von ES-Klon ohne homologe Rekombination; 3: DNA vom rekombinanten Klon für die Blastocysteninjektion.

Die DNA von C57BL/6J und eines ES-Klons ohne homologe Rekombination zeigten jeweils eine Bande bei etwa 11 kb. Der für die Blastocysteninjektion vorgesehene Mc4r-W16X-ES-Klon zeigte eine Doppelbande: das größere Fragment zeigte eine Größe von ca. 11 kb, das kleinere Fragment hatte eine Größe von 9,3 kb (Abb. 38). Die identifizierten Bandenmuster stimmten in allen drei Proben mit den erwarteten Größen überein (vgl. Abb. 34).

Nachweis der Mc4r Punktmutationen mittels PCR

Die Anwesenheit der gewünschten Mutationen W16X und V103I wurden mit einer PCR-basierten Strategie überprüft. Die Punktmutationen wurden mit stillen Mutationen markiert, die jeweils eine neue Restriktionsschnittstelle generierten. Primer, welche die Mutationen flankieren, wurden eingesetzt, um ein PCR-Produkt zu amplifizieren, das anschließend mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaut wurde (Abb. 39).

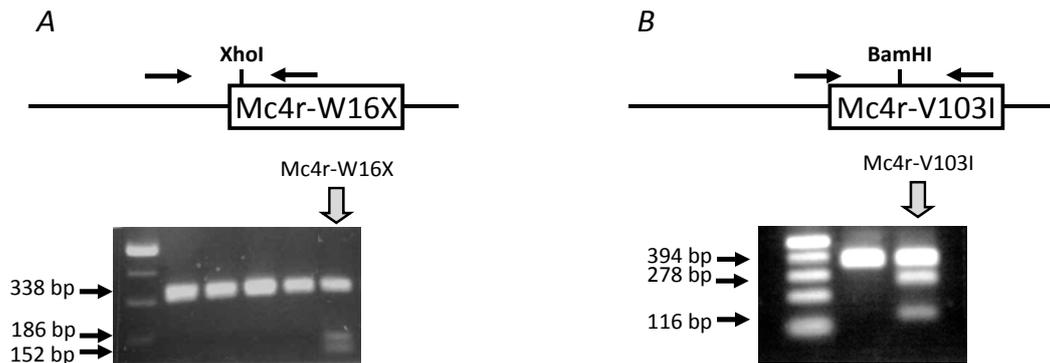


Abb. 39 PCR-basierter Nachweis der Punktmutation in ES-Zellen. **A** Genotypisierung der rekombinanten Klone für die Herstellung der Mc4r-W16X Maus. Die PCR-Produkte wurden mit XhoI verdaut. **B** Genotypisierung der rekombinanten Klone für die Herstellung der Mc4r-V103I Maus. Die PCR-Produkte wurden mit BamHI verdaut.

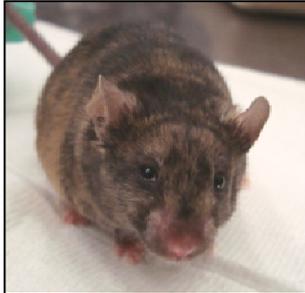
Die PCR zeigte, dass bei den 5 Mc4r-W16X Kandidaten mit homologer Rekombination ein Klon die Stoppmutation W16X in das ES-Zell Genom integriert hat. Für die Herstellung der Mc4r-V103I *knockin* Maus war einer der beiden rekombinanten Klone positiv für die gewünschte Punktmutation.

Beim Southern Blot wurde die homologe Rekombination durch den Nachweis von zusätzlichen Restriktionsschnittstellen erbracht. Die Anwesenheit der EcoRI-/EcoRV-Schnittstellen garantiert nicht die Integration der gewünschten Punktmutation. Der 5'-Homologiearm hatte eine Länge von etwa 3,8 kb. Auf dieser Distanz konnte die homologe Rekombination durch ein *Crossingover*-Ereignis mit der genomischen DNA der ES-Zelle stattfinden. Erfolgte das *Crossingover* stromaufwärts der W16X-bzw. V103I-Mutation wurden alle stromabwärts folgenden Sequenzbereiche in das Genom eingefügt (inklusive der Stoppmutation, der zusätzlichen EcoRI-/EcoRV-Schnittstellen und der Neo-Resistenz). Fand das *Crossingover* am 5'-Homologiearm stromabwärts der Mc4r-Punktmutation statt, wurden nur die EcoRI- und EcoRV-Schnittstellen und das Neo-Resistenzgen in das Genom integriert. Daher musste der Nachweis der BamHI bzw. XhoI markierten Punktmutationen durchgeführt werden.

3.3.4. Blastocysteninjektion und Geburt der Chimären

Die Blastocysteninjektion erfolgte durch Adrienne Tasdemir (*Transgenic Unit*, Helmholtz Zentrum München). Für die Herstellung beider Mc4r *knockin* Mauslinien wurden jeweils 80 Blastocysten verwendet, wobei jede Blastocyste mit 20 bis 30 manipulierten F1 ES-Zellen injiziert wurde. Die Blastocysten wurden in 4 scheinträchtige Weibchen implantiert. Aus dem Embryotransfer resultierten 11 (Mc4r-W16X) bzw. 8 (Mc4r-V103I) F0-Chimären (Abb. 40). Je höher der Chimärismusgrad des Fells, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die transfizierten ES-Zellen an der Entwicklung der Keimbahn partizipieren.

Abb. 40 / Tab. 15 F0-Chimären. Der Chimärismusgrad gibt den prozentualen Anteil des agoutifarbenen Fells an. Die im Keimbahntest verpaarten Chimären sind hervorgehoben. Das Foto zeigt eine etwa 40%ige Chimäre aus der Mc4r-V103I-Herstellung.



Chimärismusgrad / Anteil Agoutifell [%]	Mc4r-W16X		Mc4r-V103I	
	♂	♀	♂	♀
5	3	1		
10		1	1	1
20	1			
40	1	1	4	2
60	1			
80	2			

3.3.5. Keimbahntest

F0-Chimären mit einem agoutifarbenen Fellanteil $\geq 40\%$ wurden mit C57BL/6J-Mäusen verpaart. Resultierten aus dieser Verpaarung agoutifarbene F1-Nachkommen, so bestätigt dies die Keimbahntransmission der manipulierten ES-Zellen. Sobald agoutifarbene F1-Nachkommen geboren wurden, erfolgte die Genotypisierung der F1-Nachkommen. Es wurde auf die Anwesenheit der Punktmutationen, d.h. auf die neu eingefügten Restriktionsschnittstellen im Mc4r-Leserahmen genotypisiert. (Die Ergebnisse der Genotypisierung werden weiter unten dargestellt.)

Während des Keimbahntests wurden für die Mc4r-W16X *knockin* Linie 4 männliche Chimären verpaart. Daraus entstanden 49 F1-Nachkommen, wobei eine agoutifarbene Maus ebenfalls positiv für die gewünschte Stopppmutation war. Für die Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie wurden ebenfalls 4 männliche Chimären zum Verpaaren eingesetzt. Es wurden 76 F1-Nachkommen geboren, von denen 3 ein agoutifarbenes Fell trugen. Davon waren 2 Mäuse zudem positiv für die Mc4r-V103I Punktmutation. Eine Maus mit schwarzem Fell kodierte ebenfalls die gewünschte Mutation im Mc4r-Gen. Die heterozygoten Mc4r-Mutationsträger wurden mit Rosa-Cre Mäusen verpaart.

3.3.6. PCR-basierte Genotypisierungsstrategien der Mäuse

Nachweis der Punktmutation bzw. der neu eingebrachten Restriktionsschnittstelle

Durch eine stille Mutation wurde eine zusätzliche Schnittstelle für ein Restriktionsenzym in den Mc4r-Leserahmen eingebracht. Dies ermöglichte die Unterscheidung des wildtypischen Allels vom mutierten Allel durch Verdau des PCR-Produkts (Abb. 42). Das Prinzip dieser Genotypisierungsstrategie ist oben skizziert worden und kam bereits beim Nachweis der Punktmutationen in ES-Zellen zur Anwendung (Abb. 39).

Nachweis der verbliebenen loxP-Sequenz und der Neo-Deletion

Nach der Cre/loxP-vermittelten Deletion des Neo-Resistenzgens verbleibt eine Sequenz von etwa 100 bp zusätzlich stromabwärts des Mc4r-Leserahmens, welche sich aus einer verbliebenen loxP-Sequenz und Teilen vom Polylinker des Targetingvektors zusammensetzt. Für die Genotypisierung wurden Primer gewählt, die die Insertion flankieren. Der wildtypische Locus hatte somit in der



Abb. 41 Nachweis der Neo-Deletion. Der Nachweis der Neo-Deletion durch das Cre/loxP -System wurde mittels PCR nachgewiesen. Es wurden Primer gewählt, welche die verbliebene loxP-Sequenz (▷) flankieren. Aufgrund der unterschiedlichen Größen der PCR-Amplifikate war es möglich die oben dargestellten Allele voneinander zu unterscheiden. **A** *knockin* Allel mit verbliebender loxP-Sequenz. Vor der Klammer stehen die Produktgrößen für das Mc4r-W16X Allel, in der Klammer die Größen für das Mc4r-V103I Allel. **B** wildtypisches Mc4r Allel.

PCR ein kleineres Fragment als der mutierte Locus. Es ist anzumerken, dass sich die PCR-Produkte für den Locus des Mc4r-W16X und Mc4r-V103I in der Länge minimal unterscheiden, da unterschiedliche Restriktionsenzyme für die Klonierung des jeweiligen 5'-Homologiearms verwendet wurden (vgl. 3.1.3). Da aufgrund der geringen Distanz zwischen der Mc4r-Punktmutation und der verbliebenen loxP-Sequenz eine Kopplung besteht, wurde diese PCR-Strategie auch für die Genotypisierung der Zuchtkolonie verwendet. Der Nachweis der verbliebenen loxP-Sequenz, sowie der eingefügten Schnittstelle waren bei der Genotypisierung der Zuchtkolonie immer in Übereinstimmung zueinander (Abb. 41).

Nachweis des Cre-Gens

Der Nachweis des Cre-Gens erfolgte mit Primern, die im Cre-Gen binden. Die Anwesenheit von Cre wurde durch ein PCR-Produkt von 350 bp angezeigt. Mäuse ohne Cre-Gen zeigten hingegen kein Signal. Die Cre-Genotypisierung erfolgte in den F2-Nachkommen der Verpaarung Mc4r *knockin* mit Rosa-Cre. Für die Verpaarungen wurden heterozygote Rosa-Cre Weibchen verwendet. Bei der Genotypisierung der F2-Nachkommen stellte sich heraus, dass Cre-negative Mäuse ebenfalls eine Deletion der Neo-Resistenz erfahren haben. Während der Oogenese wird bereits in diploiden Zellen (primäre Oocyte) Cre-Protein produziert, was dazu führt, dass Cre-negative, differenzierte Oozyten ausreichend Cre-Rekombinase nach den Zellteilungen besitzen, um eine Deletion der loxP-markierten Neo-Resistenz zu bewirken. Für die Etablierung der Zuchtkolonien wurden Tiere mit *knockin* Allel verwendet, die Cre negativ waren.

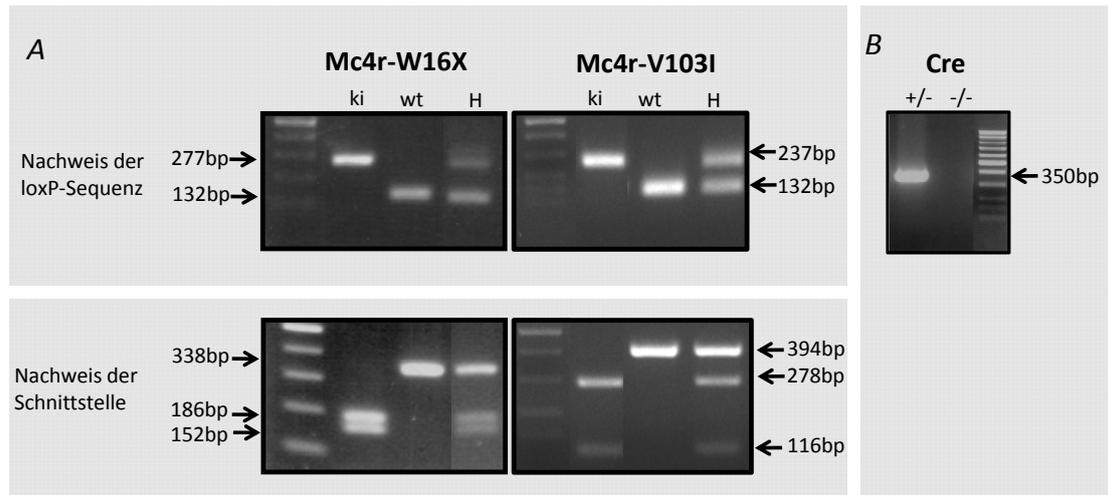


Abb. 42 PCR-basierte Genotypisierung. Gezeigt werden die Amplifikate und die jeweiligen Größenkennzeichnung. **A** Genotypisierung des *Mc4r*-Lokus (oben: Nachweis der loxP-Sequenz unten: Nachweis der neu eingefügten Restriktionsschnittstelle im *Mc4r*-Gen). **B** Cre-Genotypisierung

3.3.7. Sequenzierung der *Mc4r*-Leserahmen

Die Leserahmen der beiden *Mc4r knockin* Linien wurden sequenziert und die jeweilige Mutation konnte nachgewiesen werden (Abb. 43). Es wurden Tiere der F1-Generation für die DNA-Extraktion verwendet. (Die Sequenzen der pcDNA4-Expressionskonstrukte entsprechen den unten angegebenen).

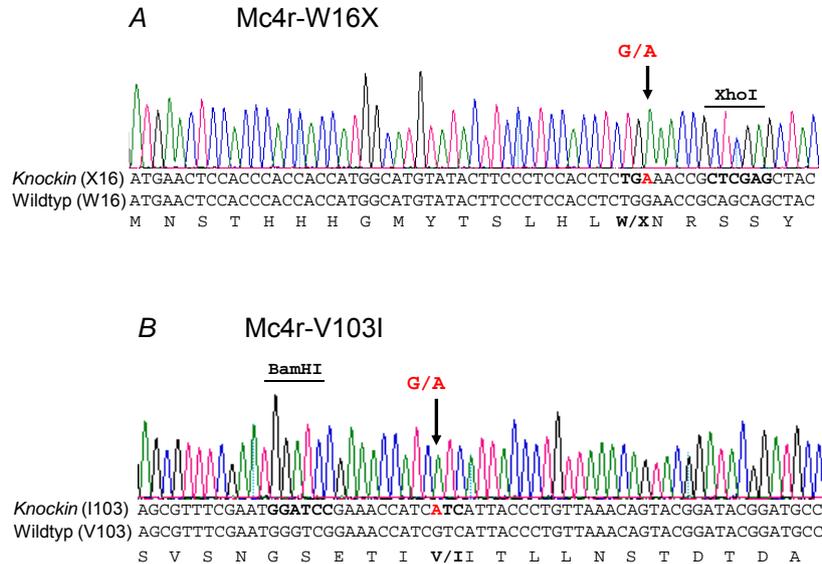


Abb. 43 Sequenzierung der *Mc4r*-Leserahmen. Gezeigt ist die mutierte Sequenz mit zugehörigem Chromatogramm. Die wildtypische Aminosäuresequenz (NP_058673) dient als Referenz. Angegeben ist auch die Aminosäuresequenz. Die Mutationen und eingefügten Schnittstellen sind hervorgehoben **A** *Mc4r*-W16X. **B** *Mc4r*-V103I

3.4. *In vivo* Charakterisierung

3.4.1. Zuchtstrategie

Die Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie wurde 2 -mal auf C57BL/6J zurückgekreuzt, so dass Tiere der F3-Generation für die Phänotypisierung verwendet wurden. Hingegen erfolgte die Rückkreuzung auf C57BL/6J der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie 3-mal. Hier wurden Tiere der F4-Generation phänotypisiert (Abb. 44).

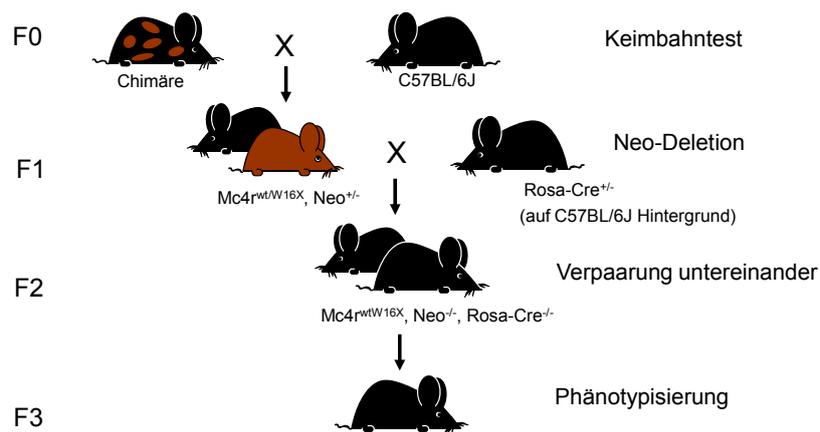


Abb. 44 Zuchtstrategie am Beispiel der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie. Die aus der Blastozysteninjektion stammenden Chimären wurden mit C57BL/6J-Mäusen verpaart. Anschließend erfolgte die Neo-Deletion. Die aus dieser Verpaarung resultierenden F2-Nachkommen wurden untereinander verpaart, um F3-Tiere für die Phänotypisierung zu produzieren. F3-Nachkommen trugen die Mutation heterozygot, homozygot bzw. hatten homozygot das wildtypische Allel. (Bei der Mc4r-V103I *knockin* Linie erfolgte nach der Neo-Deletion eine zusätzliche Verpaarung mit C57BL/6J.)

3.4.2. Genotypenfrequenz der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie

In der für die Phänotypisierung verwendeten Zuchtkolonie wurde die tatsächliche Genotypenfrequenz mit der nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Genotypenfrequenz verglichen. Die hierfür untersuchten Mäuse stammten aus Verpaarungen von heterozygoten Mutationsträgern untereinander. In die Untersuchung des Zuchterfolgs wurden 156 Tiere aus 21 Würfen einbezogen, so dass die durchschnittliche Wurfgröße bei 7-8 Tieren lag. Die tatsächliche Genotypenfrequenz war nahe an der Erwartung nach den Mendelschen Regeln (Tab. 16).

Tab. 16 Genotypenfrequenz in der Mc4r-W16X *knockin* Zuchtkolonie. Angegeben ist die tatsächliche Tierzahl, die tatsächliche und die erwartete Genotypenfrequenz nach Mendel in Prozent. (GT: Genotyp)

Genotyp (GT)	wildtyp (W16/W16)	heterozygot (W16/X16)	<i>knockin</i> (X16/X16)
Tierzahl	33	84	39
GT-Verhältnis [%]	21	54	25
GT-Erwartung nach Mendel [%]	25	50	25

3.4.3. Körpergewichtsverlauf

Das Körpergewicht der Mäuse wurde ab dem Absetzen im Alter von 3 Wochen regelmäßig registriert (Abb. 45). Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser. Im Alter von 6-8 Wochen spalteten sich die Körpergewichte der einzelnen Genotypen auf. Bei beiden Geschlechtern waren die homozygoten Mutationsträger (*knockin*) am schwersten, wohingegen die wildtypischen Mäuse das geringste Körpergewicht hatten. Heterozygote Tiere mit jeweils einem wildtypischen und einem mutierten *Mc4r*-Allel zeigten einen intermediären Gewichtsphänotyp. Der Gewichtsphänotyp war bei beiden Geschlechtern zu verzeichnen.

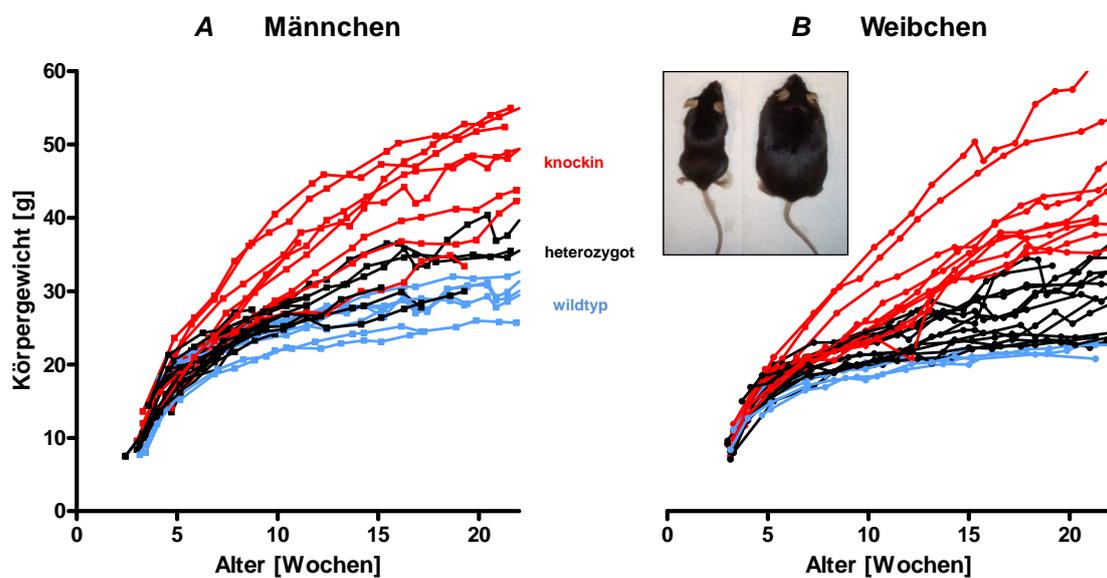


Abb. 45 Körpergewichtsverlauf der *Mc4r*-W16X *knockin* Mauslinie. A Körpergewichtsverlauf der Männchen und B der Weibchen. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Jede Linie repräsentiert ein individuelles Tier. (eingefügtes Foto: links wildtypisches ♀, rechts *knockin* ♀; Alter: 25 Wochen)

Zu beobachten war, dass bei den weiblichen heterozygoten und homozygoten Mutationsträgern eine starke Variabilität im Körpergewicht auftrat. Eine Korrelation der Wurfgröße und der Wurfnummer mit dem Körpergewicht der adulten Tiere konnte nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Bei den wildtypischen Weibchen waren diese starken Gewichtsunterschiede zwischen Individuen nicht zu verzeichnen. Bei den Männchen war die Variabilität im Körpergewicht bei allen drei Genotypen nahezu identisch. Zudem war die Effektstärke der vorzeitigen Stoppmutation auf das Körpergewicht der Weibchen deutlicher ausgeprägt als bei den Männchen: bei weiblichen *knockin* Mäusen war das Gewicht im Vergleich zu den Wildtypen nahezu um 100% erhöht; bei den Männchen war ein fast 70%iger Anstieg im Körpergewicht zu beobachten (Tab. 17).

Tab. 17 Körpergewicht von Mc4r-X16X *knockin* Mäusen im Alter von 25-28 Wochen (n=9-14). VarK gibt den Variationskoeffizienten (relative Standardabweichung) an. Die Effektstärke der Stoppmutation auf das Körpergewicht ist bezogen auf das mittlere Gewicht der Wildtypen eines jeden Geschlechts.

Männchen			
Genotyp	Gewicht \pm Stabw [g]	VarK [%]	Effektstärke \pm Stabw [%]
wildtyp	30,5 \pm 2,5	8,3	0 \pm 8
heterozygot	35,9 \pm 3,3	9,2	18 \pm 11
<i>knockin</i>	50,9 \pm 4,7	9,2	67 \pm 15
Weibchen			
Genotyp	Gewicht \pm Stabw [g]	VarK [%]	Effektstärke \pm Stabw [%]
wildtyp	23,0 \pm 0,5	2,2	0 \pm 2
heterozygot	32,5 \pm 5,9	18,2	42 \pm 26
<i>knockin</i>	45,4 \pm 7,8	17,1	98 \pm 34

3.4.4. Körperlänge der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie

Im Alter von etwa 20 Wochen wurde bei Mäusen beider Geschlechter die Körperlänge registriert. Die Tiere wurden kurzzeitig mit Chloroform betäubt, mit dem Rücken an ein Lineal angelegt und es wurde die Distanz zwischen Schnauze und Anus bestimmt. Homozygote Mutationsträger (*knockin*) sind etwa 10% größer als wildtypische Mäuse. Heterozygote Tiere mit einem intakten und einem mutierten Mc4r-Allel zeigten einen intermediären Phänotyp beim Parameter Körperlänge: sie sind ungefähr 5% größer als die Wildtypen. Der Einfluss der Stoppmutation auf die Körperlänge war bei Männchen und Weibchen in ähnlichem Ausmaß zu beobachten (Abb. 46).

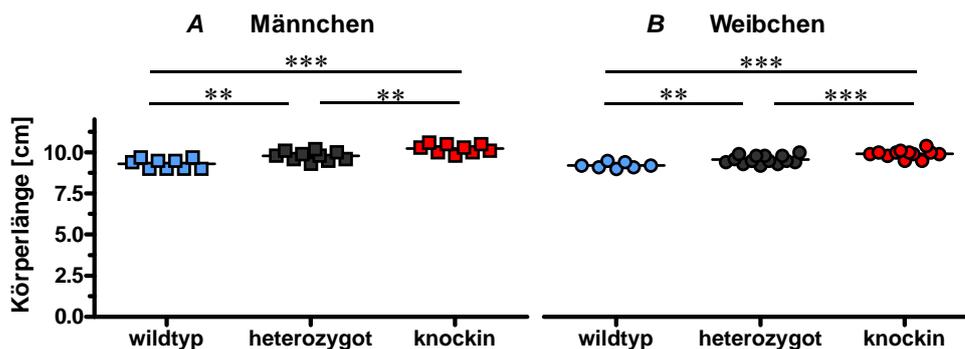


Abb. 46 Körperlänge von Mc4r-W16X *knockin* Mäusen im Alter von etwa 20 Wochen (n=7-14). Die Körperlänge wurde bei narkotisierten Mäusen gemessen. A Körperlänge der Männchen und B der Weibchen (Einfaktorielle Anova / Posthoc-Test **p<0,01; ***p<0,001).

3.4.5. Bestimmung der Körperzusammensetzung

Im Alter von 25-28 Wochen erfolgte neben der Entnahme des Hypothalamus und der Bestimmung des Körpergewichts auch die Messung der Körperzusammensetzung. Die Körperzusammensetzung der dekapitierten Tiere erfolgte im metabolischen Labor der *German*

Mouse Clinic (Helmholtz Zentrum München) in einem Computertomographen. Für die Quantifizierung der fettfreien Masse und des Fettgewebes wurde der Abdominalbereich (Lendenwirbel L1-L6) vermessen.

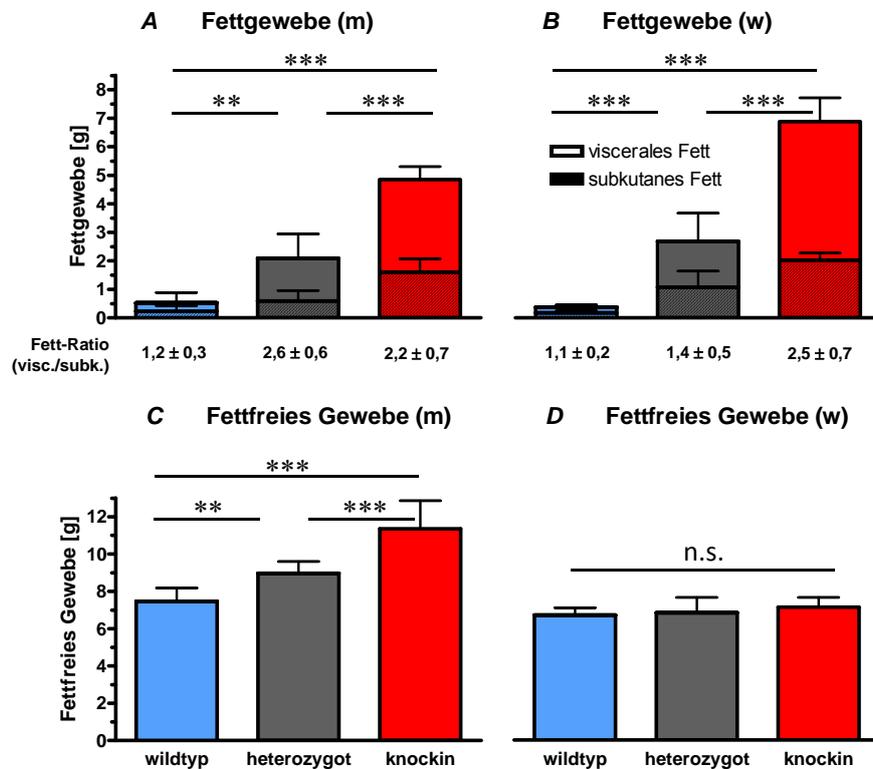


Abb. 47 Abdominale Körperzusammensetzung der *Mc4r-W16X knockin* Mauslinie im Alter von 25-28 Wochen (n=6-11, Mittelwerte ± Stabw). Die Messungen erfolgten mit einem Computertomographen. **A** Fettgewebe der Männchen und **B** der Weibchen. Unter den Graphen ist die Ratio viszerales / subkutanes Fett angegeben. **C** Fettfreies Gewebe der Männchen und **D** der Weibchen (Einfaktorielle Anova / Posthoc Test; **p<0,01; ***p<0,001).

Die Messung der Körperzusammensetzung zeigte, dass homozygote *knockin* Mäuse beiderlei Geschlechts die größte Fettmasse besitzen. Heterozygote Mutationsträger hatten hierbei einen intermediären Phänotyp. Bei den homozygoten *knockin* Männchen war eine etwa 10-fache Erhöhung der Fettmasse zu verzeichnen. Bei den Weibchen war die Fettmasse fast 20-fach erhöht. Bei Betrachtung der charakterisierten Fettdepots (viszeral und subkutan) zeigte sich, dass bei beiden Geschlechtern die Zunahme im Körperfett überwiegend durch das viszerale Fett verursacht wurde. Dies zeigte sich auch durch eine steigende Ratio viszerales Fett / subkutanes Fett (Abb. 47). Beim fettfreien Gewebe offenbarte sich ein Geschlechtsunterschied: bei den männlichen Mutanten war eine Zunahme der fettfreien Masse zu verzeichnen; dies konnte bei den Weibchen nicht beobachtet werden.

3.4.6. Energieaufnahme,-assimilation und Assimilationseffizienz

Im Alter von 20 Wochen erfolgte die Messung von Futtermittelaufnahme und Fäzesproduktion in Einzelhaltung auf Lochgitterplatten. Es wurde auf geraspeltes Futter korrigiert. Die Kotproben

sowie das Futter wurden mittels Bombenkalorimetrie auf den Energiegehalt hin untersucht. Es wurde die aufgenommene Energie (E_{in}), die assimilierte Energie (E_{ass}) und die Assimilationseffizienz berechnet.

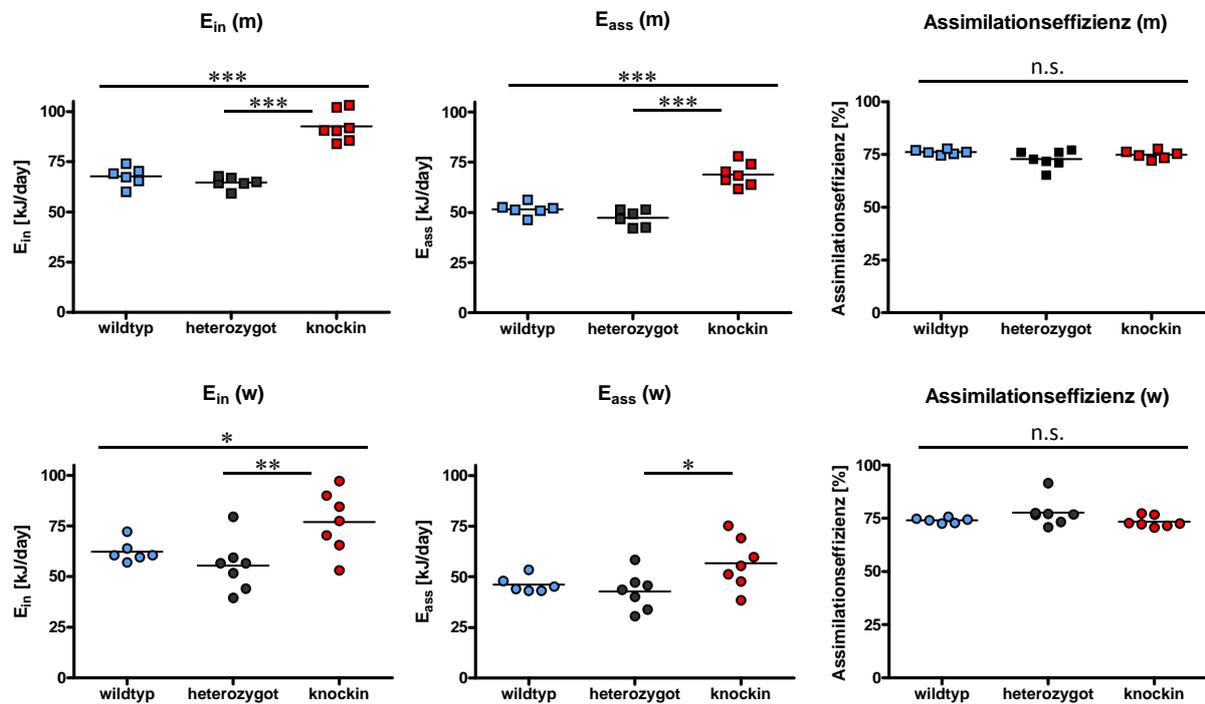


Abb. 48 Aufgenommene Energie (E_{in}), assimilierte Energie (E_{ass}) und Assimilationseffizienz der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie im Alter von 20 Wochen (n=6-7, Mittel- & Einzelwerte). In der oberen Reihe sind die Daten für die Männchen (m) dargestellt, in der unteren Reihe für die Weibchen (w). (Einfaktorielle Anova / Posthoc Test; *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001).**

Homozygote Mutationsträger (*knockin*) hatten eine höhere Energieaufnahme und –assimilation als wildtypische Mäuse und heterozygote Mutationsträger. Diese Unterschiede waren innerhalb der Männchen und Weibchen zu beobachten (Abb. 48). Die Assimilationseffizienz lag bei allen drei Genotypen in einem Bereich von etwa 75%. Heterozygote Mutationsträger zeigten keinen intermediären Phänotyp, wie bei den oben erhobenen Parametern Körpergewicht, Körperlänge und Körperzusammensetzung sondern hatten eine Energieaufnahme und –assimilation ähnlich den Wildtypen.

3.4.7. Bestimmung der Körpertemperatur

Im Experiment wurde die rektale Körpertemperatur der Mc4r-W16X *knockin* Linie bei den Männchen im Alter von 20 Wochen registriert. Es war zu beobachten, dass tendenziell die Körpertemperatur der *knockin* Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen reduziert war. Heterozygote Mutationsträger zeigten einen intermediären Phänotyp die Körpertemperatur betreffend (Abb. 49).

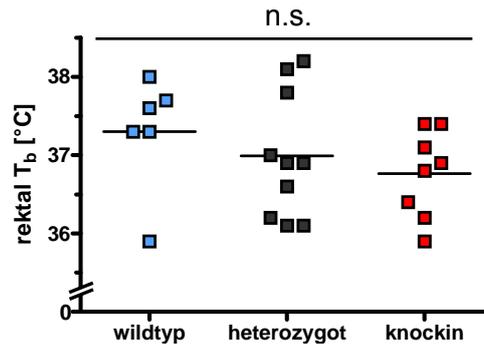


Abb. 49 Rektale Körpertemperatur der *Mc4r-W16X knockin* Männchen im Alter von 20 Wochen ($n=6-10$; Mittel- & Einzelwerte). Die Körpertemperatur wurde morgens gemessen (Einfaktorielle Anova, Posthoc-Test).

3.4.8. Blutglukosekonzentration unter *ad libitum* Bedingungen

In vier verschiedenen Altersstufen wurde die Blutglukosekonzentration von *ad libitum* gefütterten *Mc4r-W16X knockin* Mäusen beiderlei Geschlechts gemessen. Im Absetzalter (3-4 Wochen) gab es keine Unterschiede zwischen den drei Genotypen. Die Blutglukosespiegel von männlichen homozygoten *knockin* Mäuse stiegen signifikant mit zunehmendem Alter an ($p<0,05$). Im Alter von 25-28 Wochen waren die Blutzuckerwerte der homozygoten männlichen Mutanten signifikant höher als die der heterozygoten und wildtypischen Männchen ($p<0,05$). Bei den Weibchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen und im fortlaufenden Alter beobachtet werden. Eine ähnliche Tendenz wie bei den Männchen war aber zu verzeichnen (Zweifaktorielle Anova gegen Alter und Genotyp / Posthoc-Test).

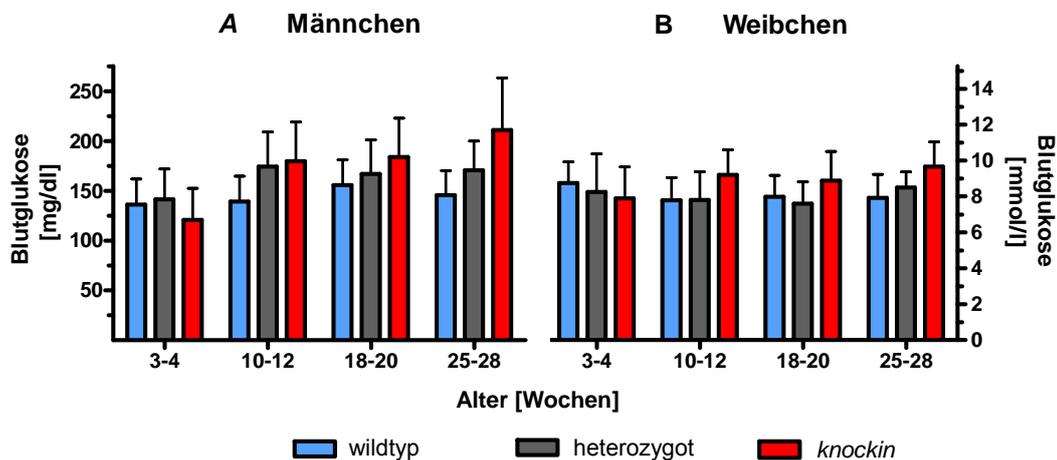


Abb. 50 Blutglukosekonzentration von *ad libitum* gefütterten *Mc4r-W16X knockin* Mäusen ($n=4-31$, Mittelwerte \pm Stabw). Auf der linken Achse wird der Glukosespiegel in mg/dl angegeben; auf der rechten Achse in mmol/l. **A** Blutglukosekonzentration der Männchen und **B** der Weibchen.

3.4.9. Glukosetoleranztest (intraperitoneal)

Der Glukosetoleranztest an 20 Wochen alten Mäusen ergab einen Unterschied in der *area under the curve* (AUC) zwischen den Genotypen. Der Phänotyp war bei den Männchen stärker

ausgeprägt als bei den Weibchen. Die erhöhte AUC der homozygoten Mutanten kam insbesondere dadurch zustande, weil die Mutanten eine längere Zeit benötigten um die Glukosewerte zu reduzieren. Das Niveau der Basalglukosekonzentration (Zeitpunkt „0“) wurde jedoch nicht wieder erreicht. Heterozygote Männchen zeigten einen intermediären Phänotyp.

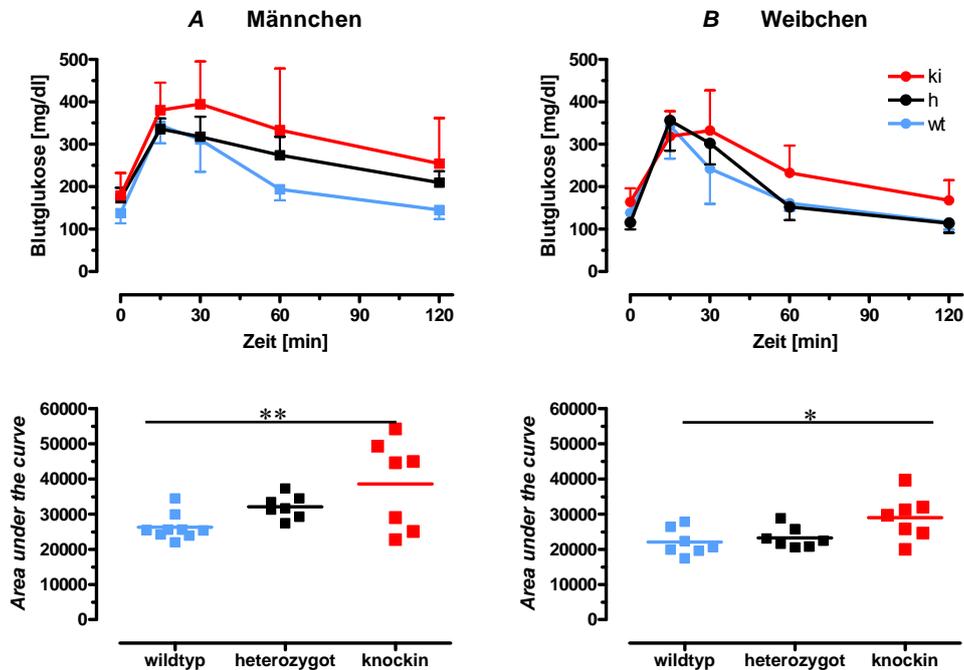


Abb. 51 Intraperitonealer Glukosetoleranztest mit Mc4r-W16X *knockin* Mäusen im Alter von 20 Wochen (n=7-9, Mittelwert \pm Stabw bzw. Einzel- & Mittelwerte). Die Tiere wurden für 6 Stunden gefastet und anschließend mit 2 g /kg Glukose behandelt. Blutglukosekonzentration über die Zeit und *area under the curve* für Männchen (A) und Weibchen (B) (Einfaktorielle Anova / Post-hoc Test *p<0,05; **p<0,01).

3.4.10. Quantifizierung der hypothalamischen Genexpression

Die hypothalamische Genexpression wurde mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) gemessen. Hierfür wurde männlichen Mc4r-W16X *knockin* Mäusen im Alter von 25-28 Wochen der Hypothalamus entnommen.

Aufreinigung der RNA

Die Integrität der RNA konnte aufgrund des Vorhandenseins der 28S rRNA- und 18S rRNA-Banden auf einem nicht-denaturierendem Agarosegel bestätigt werden (Abb. 52). Hiernach erfolgte die Synthese der cDNA. Die extrahierte RNA wurde zudem auf Kontaminationen mit genomischer DNA untersucht. Hierfür wurde RNA-Lösung als Matrize in einer Test-PCR eingesetzt. Hierfür wurde ein Mc4r-spezifisches Primerpaar verwendet, welches bei Verwendung mit genomischer DNA (wie auch cDNA) zur Generierung eines 211 bp langen Produkts führt. Im Gegensatz zur Verwendung von cDNA führte die Verwendung von RNA als Matrize nicht zur Amplifizierung eines PCR-Produkts (Abb. 52).

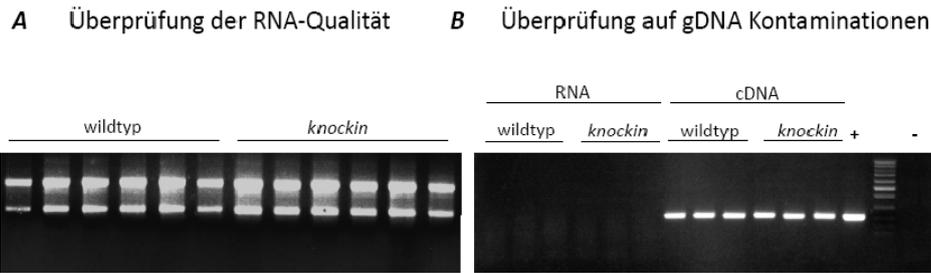


Abb. 52 RNA-Aufreinigung und Überprüfung der Qualität. **A** Überprüfung der RNA-Qualität mittels Gelelektrophorese. Zu sehen sind die RNA-Proben (800 ng/Spur) von 6 wildtypischen Mäusen und 6 *knockin* Mutanten. **B** Überprüfung der RNA-Proben auf Kontaminationen mit genomischer DNA. RNA und korrespondierende cDNA wurden als Matrize in einer Test-PCR eingesetzt. Es werden exemplarisch die Proben von jeweils 3 wildtypischen und 3 *knockin* Mäusen gezeigt. (+: genomische DNA von C57BL/6J, -: Wasserkontrolle)

Folglich lag keine Kontamination der RNA mit genomischer DNA vor. Dies war insbesondere für die anschließende Quantifizierung der Mc4r-Expression von Bedeutung. Das Mc4r-Gen besteht nur aus einem Exon. Daher war es nicht möglich Mc4r-Primer zu entwerfen, welche unterschiedliche Produktgrößen auf genomischer DNA und cDNA generieren. Bei den übrigen Genen konnten Primer verwendet werden, welche intronische Sequenzbereiche flankieren.

Quantifizierung der Kandidatengene

Die qPCR basierte Untersuchung der Genexpression im Hypothalamus offenbarte Veränderungen in der Expression verschiedener Gene, welche eine Beteiligung an der hypothalamischen Regulation des Energiehaushalts haben (vgl. Abschnitt 1.3). Die Normalisierung erfolgte auf β -Actin und Hsp90 (*Heat shock protein 90*). Diese beiden Gene zeigten keinen Unterschied zwischen wildtypischen und *knockin* Mäusen und konnten daher zum Normalisieren herangezogen werden (nicht gezeigt). Zum einen wurden die Transkriptmengen für Neuropeptid Y (Npy) und *Agouti-related protein* (Agrp) quantifiziert. Es zeigten sich verminderte RNA-Abundanzen dieser zwei Gene bei den *knockin* Mutanten im Vergleich zu den Wildtypen. Die anorexigene Komponente Pro-opiomelanocortin (Pomc) war hingegen in den *knockin* Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen positiv reguliert. Die Mc4r-Abundanz war in den Mutanten ebenfalls erhöht. *Brain-derived neurotrophic factor* (Bdnf) und *Single minded 1* (Sim1) liegen im Mc4r-Signalweg (Xu et al., 2003; Kublaoui et al., 2006a). Bei der Hypothalamus-spezifischen Bdnf Isoform 1 zeigte sich tendenziell eine verringerte RNA-Konzentration. Die Sim1-Abundanz war in beiden Genotypen hingegen gleich. Mutationen im *Fat mass and obesity related gene* (Fto) und Sh2b1-Gen wurden in Populationsstudien mit Übergewicht assoziiert (Thorleifsson et al., 2009; Willer et al., 2009). In der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie konnten keine Veränderungen in deren Transkriptmengen identifiziert werden.

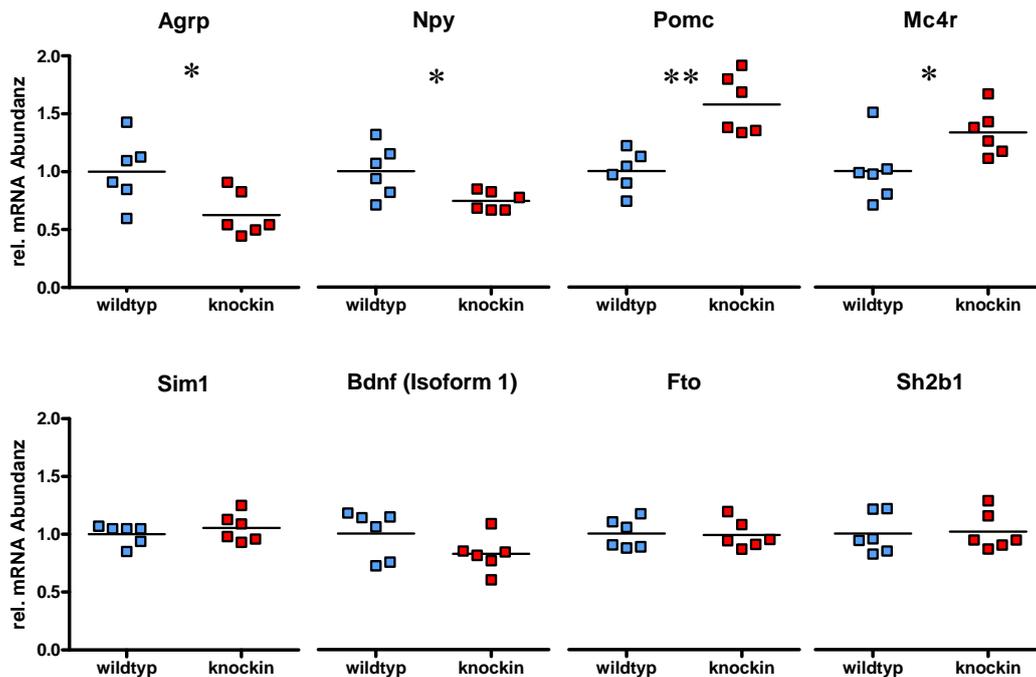


Abb. 53 Hypothalamische Genexpression in männlichen Mc4r-W16X knockin Mäusen (25-28 Wochen) (n=6). Agrp: *agouti related protein*; Npy: Neuropeptid Y; Pomc: Proopiomelanocortin; Mc4r: Melanocortin-4-Rezeptor; Bdnf: *Brain derived neurotrophic factor*; Sim1: *Single minded 1*; Fto: *Fat and obesity associated gene*; Sh2b1: *SH2B adapter protein 1*; (Mann-Whitney-Test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Die Daten wurden durch qRT-PCR gewonnen.

Im Anschluss an die qPCR wurde von jeder Multiwellplatte die Verdünnungsstufe 1:2 aus der Standardreihe auf ein TAE-Agarosegel geladen, um die Größe der qPCR-Produkte zu bestimmen. Alle Amplifikate entsprachen in ihrer Größe der Erwartung (nicht gezeigt).

3.4.11. Behandlung der Mc4r-W16X knockin Mauslinie mit Gentamicin, Amikacin und PTC124

Nach der oben beschriebenen primären Phänotypisierung der Mc4r-W16X knockin Mauslinie erfolgte die subkutane Injektion der Nonsense-Suppressoren Gentamicin, Amikacin und PTC124. Im Laufe der Pilotstudie wurden Körpergewicht und Futtermittelaufnahme aufgezeichnet.

Behandlung mit Gentamicin

In einem ersten Versuchsansatz wurden männliche Mäuse im Alter von 36 ± 10 Wochen für 7 Tage subkutan einmal täglich mit Gentamicin (34 mg/kg) behandelt. Vor der Gentamicinverabreichung erfolgte für 2 Tage die Gewöhnung der Mäuse an die Injektionen. Hiernach erfolgte die Aufteilung in vier Gruppen zu je vier Tieren (Abb. 54):

- Gruppe 1: homozygote knockin Mäuse behandelt mit NaCl
- Gruppe 2: wildtypische Mäuse behandelt mit NaCl
- Gruppe 3: homozygote knockin Mäuse behandelt mit Gentamicin
- Gruppe 4: wildtypische Mäuse behandelt mit Gentamicin

Über die gesamte Versuchsdauer wurde täglich das Körpergewicht registriert. Alle vier Gruppen zeigten Schwankungen im Körpergewicht, die etwa $\pm 1-2\%$ betragen. Die einzige signifikante Reduktion im Körpergewicht ($p < 0,05$) konnte bei den NaCl-injizierten Wildtypen (Gruppe 2) beobachtet werden. Mit Gentamicin behandelte *knockin* Mäuse (Gruppe 3) zeigten eine kurzzeitige aber nicht-signifikante Reduktion im Körpergewicht.

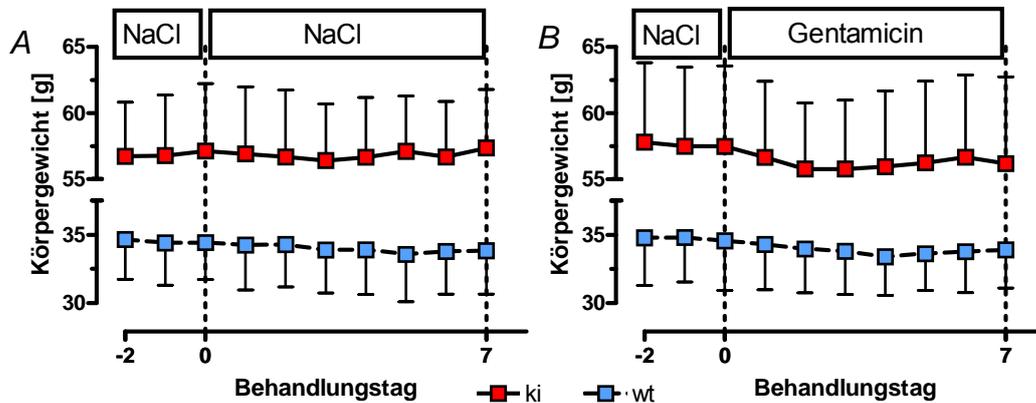


Abb. 54 Subkutane Behandlung von adulten Mc4r-W16X *knockin* Mäusen mit Gentamicin ($n=4$, Mittelwerte \pm Stabw). Dargestellt sind die Körpergewichte während der Kontrollbehandlung (A) mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) und der Gentamicinbehandlung (B).

Behandlung mit Amikacin

Für diesen Versuch wurden weibliche Mäuse im Alter von 42 ± 7 Wochen verwendet. Zunächst wurde den Tieren für 7 Tage PBS verabreicht, um eine Gewöhnung an die Injektionsprozedur zu erzielen. Hiernach erfolgte die Applikation von Amikacin. Von Tag 0 bis Tag 13 erhielten die Tiere 170 mg Amikacin/kg Körpergewicht; von Tag 13 bis 19 eine 3-fach höhere Dosierung von 510 mg/kg Körpergewicht. Nach weiteren 5 Tagen PBS-Injektion wurde die Behandlung beendet (Abb. 55). Im Friedmantest konnte eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) des Körpergewichts um maximal 3,5 % bei den Wildtypen zwischen Tag -7 und Tag 0 (PBS-Injektion) verzeichnet werden. Hiernach war keine weitere Veränderung bei diesem Genotyp zu beobachten. Die homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse hatten über den Versuchsverlauf ein relativ konstantes Körpergewicht mit Schwankungen von ca. $\pm 2\%$. Nur nach dem Absetzen der Behandlung (Tag 24) war ein signifikanter Anstieg im Körpergewicht zu beobachten ($p < 0,05$).

Bei den Wildtypen war während der hohen Amikacindosierung (Tag 13 bis 19) eine signifikante Reduktion der Futtermittelaufnahme zu beobachten ($p < 0,05$). Die Mutanten zeigten eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme über die gesamte Amikacinverabreichung ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Diese Reduktion in der Futtermittelaufnahme startete aber bei den Mutanten schon während der PBS-Behandlung (Tag -7 bis 0).

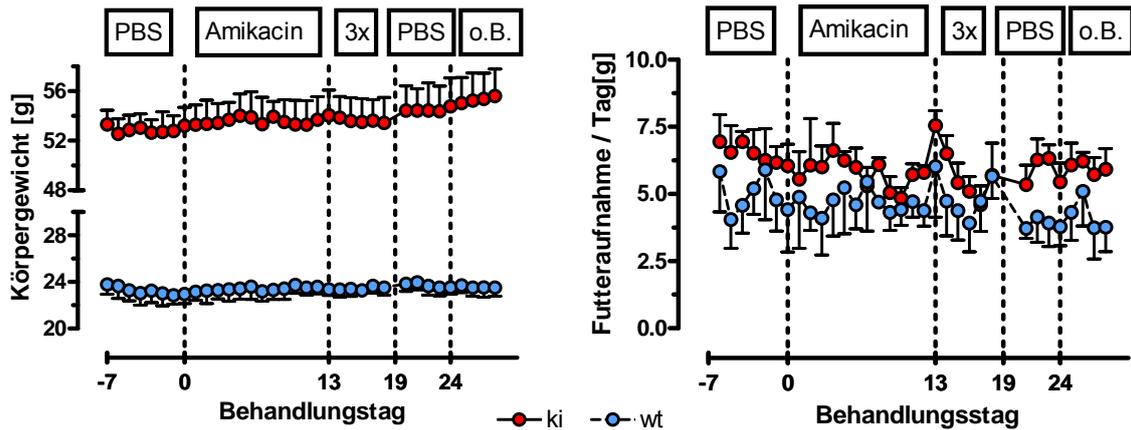


Abb. 55 Subkutane Behandlung von adulten Mc4r-W16X *knockin* Mäusen mit Amikacin ($n=5$, Mittelwerte \pm Stabw). Dargestellt sind das Körpergewicht sowie die tägliche Futtermittelaufnahme. Nach 1 Woche PBS-Injektion erfolgte bei allen Tieren die Umstellung auf Amikacin. An Tag 13 wurde die Dosierung verdreifacht (3x). Hiernach wurde wieder auf PBS umgestellt. An Tag 24 wurden die Injektionen eingestellt. (o.B.).

Behandlung mit PTC124

Weibliche Mäuse im Alter von 35 ± 7 Wochen wurden für 14 Tage zweimal täglich subkutan mit PTC124 (34 mg/kg) behandelt (Abb. 56). Vor der PTC124-Behandlung erfolgte für 7 Tage die Gewöhnung der Tiere an die Injektionsprozedur. (Als Vehikel wurde 5% Glukose, 5% Ethanol in Wasser verwendet.) Die anschließende PTC124-Behandlung dauerte 12 Tage. Bei den Wildtypen war während der PTC124-Behandlung eine signifikante Zunahme um maximal 3 % im Körpergewicht zu beobachten ($p < 0,01$). Die homozygoten Mc4r.W16X *knockin* Mäuse zeigten während der Vehikel- und der PTC124-Behandlung jeweils eine signifikante Reduktion im Körpergewicht um maximal 1,5 % ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$). Nach dem Absetzen der Injektionen war hingegen ein signifikanter Anstieg im Körpergewicht der Mutanten zu beobachten ($p < 0,001$), so dass die während der Vehikel und PTC124 beobachtete Körpergewichtsreduktion auf das Handling während der Injektionen zurückgeführt werden kann.

Insbesondere während der Vehikelbehandlung war bei beiden Genotypen eine Reduktion in der Futtermittelaufnahme zu verzeichnen. Trotz des identischen Kurvenverlaufs der Futtermittelaufnahme war während der PTC124-Behandlung bei den Wildtypen eine signifikante Steigerung der Futtermittelaufnahme über die Zeit zu beobachten ($p < 0,001$); bei den Mutanten dagegen eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$). Nach Beendigung der PTC124-Injektionen zeigten beide Genotypen einen signifikanten Anstieg in der Futterkonsumption (jeweils $p < 0,001$).

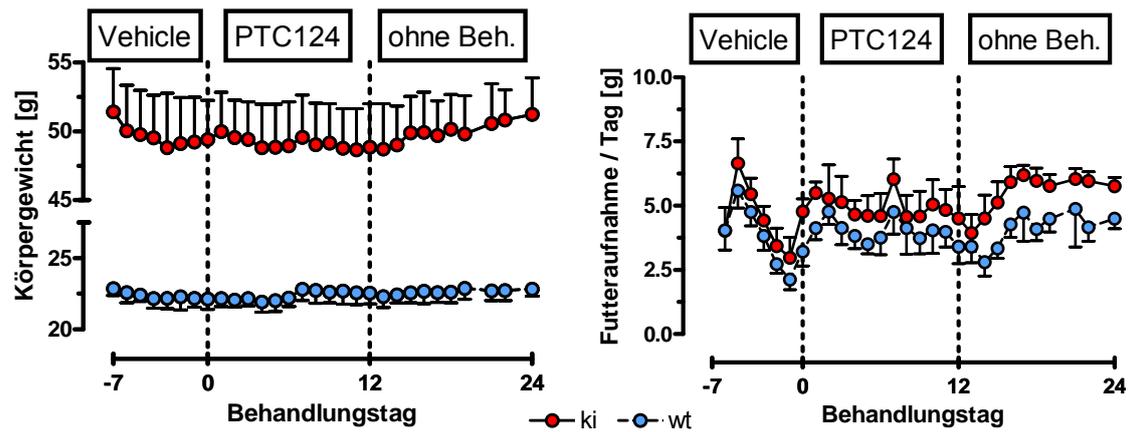


Abb. 56 Subkutane Behandlung von adulten Mc4r-W16X knockin Mäusen mit PTC124 (n=5, Mittelwerte \pm Stabw). Dargestellt sind das Körpergewicht sowie die tägliche Futteraufnahme. Nach 1 Woche Vehikelinjektion erfolgte bei allen Tieren die Umstellung auf PTC124. Die PTC124-Behandlung dauerte 2 Wochen. Hiernach wurden die Injektionen beendet (ohne Beh.).

3.4.12. Genotypenfrequenz der Mc4r-V103I knockin Mauslinie

Zur Überprüfung der Genotypenfrequenz wurden 70 Tiere aus 11 Würfen einbezogen (Tab. 18). Die durchschnittliche Wurfgröße lag bei etwa 6 Tieren. Es lag eine Diskrepanz zwischen der tatsächlichen und der zu erwartenden Genotypenfrequenz vor. Wahrscheinlich wird sich die Verteilung bei der Einbeziehung von mehr Individuen an die zu erwartenden Werte annähern. Dies konnte im Laufe der Zucht bei der Mc4r-W16X knockin Linie beobachtet werden: je mehr Nachkommen in die Untersuchung einbezogen wurden, desto mehr glichen sich das tatsächliche und das nach den Mendelschen Regeln erwartete Genotypenverhältnis.

Tab. 18 Genotypenfrequenz der Mc4r-V103I knockin Zuchtkolonie. Angegeben ist die tatsächliche Tierzahl, die tatsächliche und die erwartete Genotypenfrequenz nach Mendel in Prozent. (GT: Genotyp)

Genotyp (GT)	wildtyp (V103/V103)	heterozygot (V103/I103)	knockin (I103/I103)
Tierzahl	23	36	11
GT-Verhältnis [%]	33	51	16
GT-Erwartung nach Mendel [%]	25	50	25

3.4.13. Körpergewicht der Mc4r-V103I knockin Mauslinie

Das Körpergewicht der Mäuse wurde ab dem Absetzen im Alter von 3 Wochen registriert (Abb. 57). Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter und Wasser. Die Körpergewichtsverläufe der drei Genotypen lagen dicht beieinander. Ein signifikanter Gewichtsunterschied im Alter von 8 und 12 Wochen war nicht zu beobachten. Diese Beobachtung gilt für beide Geschlechter.

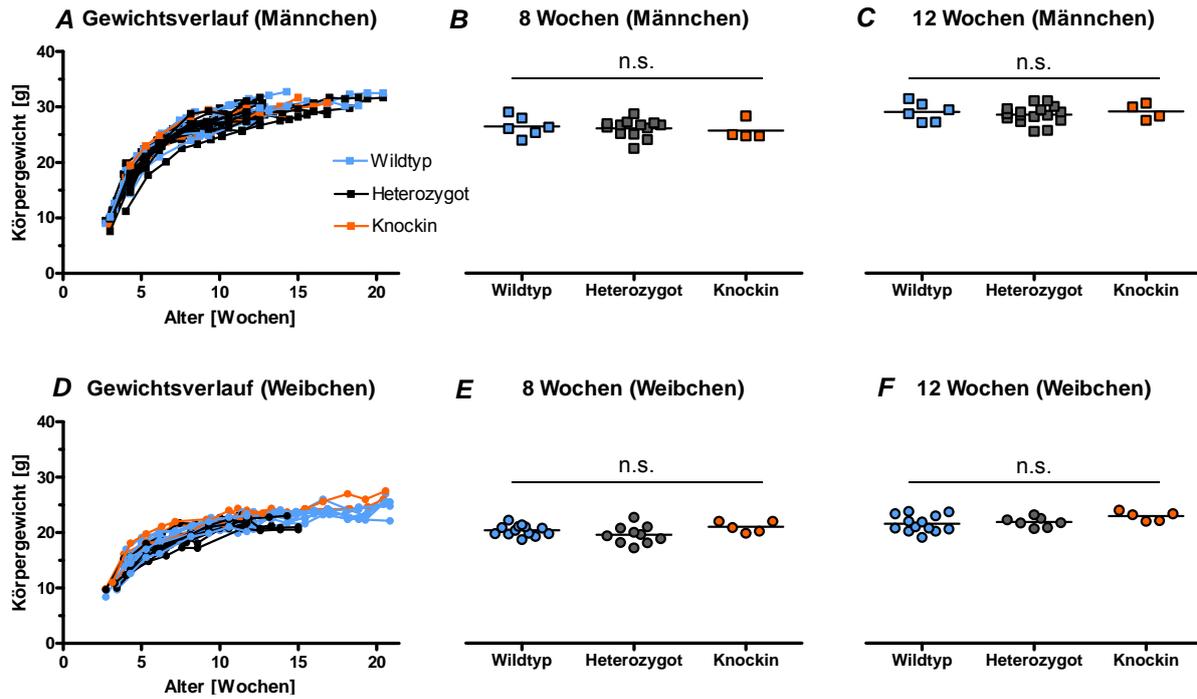


Abb. 57 Körpergewichtsverlauf der Mc4r-V103I knockin Mauslinie. Körpergewichtsverlauf der Männchen (A) und der Weibchen (D). Jede Linie repräsentiert ein individuelles Tier. Körpergewicht der Männchen im Alter von 8 Wochen (B) und im Alter von 12 Wochen (C); Körpergewicht der Weibchen im Alter von 8 Wochen (E) und im Alter von 12 Wochen (F) (Einfaktorielle Anova, Post-Hoc-Test).

3.4.14. Kumulative Futteraufnahme

Im Alter von etwa 8 Wochen erfolgte die kumulative Messung der Futteraufnahme auf Einstreu (Abb. 58). Durch die Ermittlung des Energiegehalts des Futters wurde die durchschnittliche Energieaufnahme errechnet. Es waren keine genotypenspezifischen Unterschiede zu beobachten.

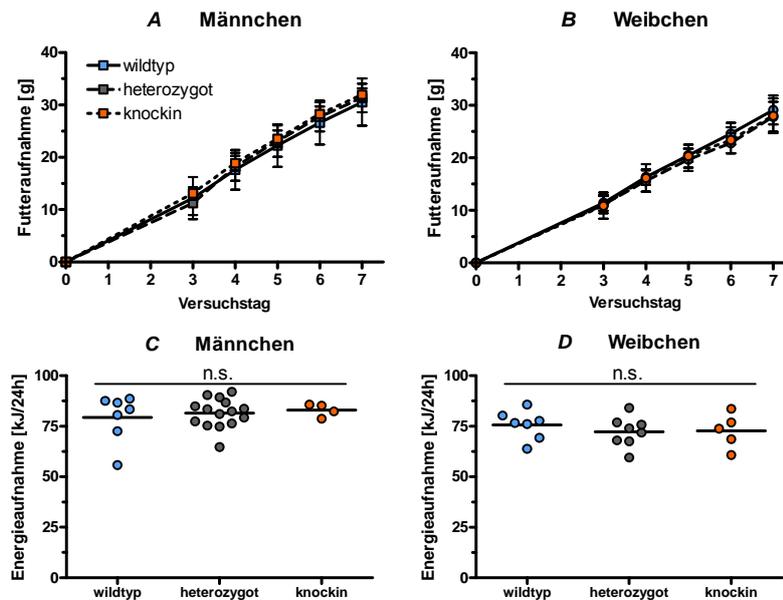


Abb. 58 Kumulative Futteraufnahme und tägliche Energieaufnahme der Mc4r-V103I knockin Mauslinie im Alter von 8 Wochen (n=4-15, Mittelwerte ± Stabw). A Futteraufnahme der Männchen B Futteraufnahme der Weibchen über einen Zeitraum von 7 Tagen. C Durchschnittliche tägliche Energieaufnahme der Männchen und D der Weibchen (Einfaktorielle Anova, Posthoc-Test).

3.4.15. Bestimmung der Körpertemperatur

Es wurde die rektale Körpertemperatur der Mc4r-W16X *knockin* Linie im Alter von 8 Wochen registriert. Bei den homozygoten Mutationsträgern (*knockin*) beider Geschlechter war eine höhere Temperatur als bei den anderen beiden Genotypen zu beobachten. Zudem hatten die Weibchen eine höhere Körpertemperatur im Vergleich zu den Männchen (Abb. 59).

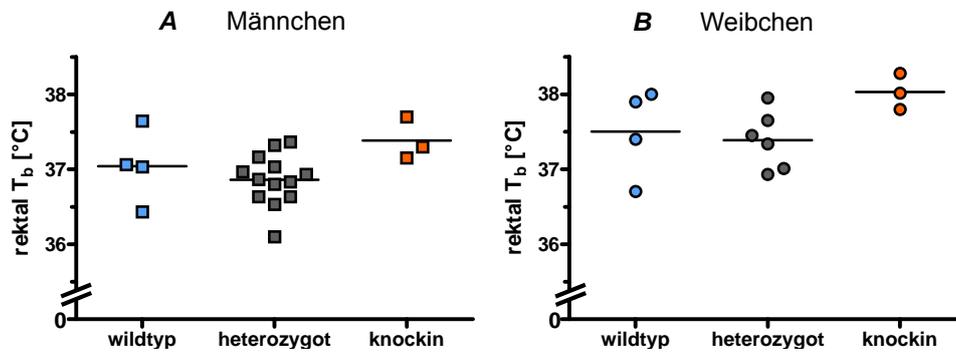


Abb. 59 Rektale Körpertemperatur der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie im Alter von 8 Wochen (n= 3-13; Mittel- & Einzelwerte). Jeder Datenpunkt repräsentiert ein individuelles Tier. Die Körpertemperatur wurde mittags gemessen.

3.4.16. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Zellkultur-basierten System konnte *in vitro* ein Funktionsverlust der stoppmutierten Mc4r-W16X Variante beobachtet werden. Die Oberflächenexpression sowie die Aktivierbarkeit der Mutante durch den Mc4r-Agonisten α -MSH waren nicht nachzuweisen. Durch zwei unterschiedliche Nonsense-Suppressoren wurde versucht die Aktivität der Variante wieder herzustellen. Das Aminoglykosid G-418 reaktivierte sowohl die Oberflächenexpression sowie die Induzierbarkeit der Signaltransduktion durch α -MSH. Dahingegen konnte die Oxadiazolverbindung PTC124 keine Wiederherstellung der Oberflächenexpression bewirken.

Durch das erfolgreiche Einbringen der Stoppmutation W16X in den Mc4r-Lokus der Maus durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (*gene targeting*) konnte die Mutation *in vivo* charakterisiert werden. Homozygote Mc4r-W16X *knockin* Mäuse mit zwei stoppmutierten Mc4r-Allelen beider Geschlechter zeigten einen adipösen Phänotyp, charakterisiert durch eine erhöhte Fettmasse, Hyperphagie und ein gesteigertes Längenwachstum. Eine tendenziell niedrigere rektale Körpertemperatur konnte bei den Mutanten beobachtet werden. Fast ausnahmslos zeigten heterozygote Mutationsträger einen intermediären Phänotyp in den genannten Parametern. Zudem war die hypothalamische Expression von Genen, welche in die Regulation des Energiehaushalts involviert sind, in den homozygoten Mutanten alteriert. In den Mutanten waren die orexigenen Komponenten *Agrp* und *Npy* auf Transkriptebene negativ reguliert. Hingegen war die RNA-Abundanz der anorexigenen Komponenten *Pomc* und des *Mc4r* erhöht.

Die Anwendung verschiedener Nonsense-Suppressoren *in vivo* hatte keinen Effekt auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme der Mäuse. Eine Reduktion der Adipositasymptome war nicht zu verzeichnen.

Die *in vitro* Charakterisierung der Mc4r-V103I-Variante zeigte keine Unterschiede in der α - und β -MSH induzierten Rezeptoraktivität im Vergleich zum wildtypischen Mc4r. In zwei voneinander unabhängigen experimentellen Ansätzen konnte aber eine gesteigerte Agonisten-unabhängige Basalaktivität des Mc4r-V103I beobachtet werden.

Die Herstellung der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen war erfolgreich. Die vorläufige metabolische Charakterisierung zeigte keine Unterschiede im Körpergewicht und in der Energieaufnahme zwischen den Genotypen. Jedoch konnte eine erhöhte rektale Körpertemperatur in den homozygoten Mutationsträgern beider Geschlechter gemessen werden.

4. DISKUSSION

4.1. Hintergrund und Zielsetzung

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Adipositas-Prävalenz weltweit dramatisch erhöht. Die Ursachen hierfür sind multifaktoriell: in der Literatur werden Genvarianten, Umweltbedingungen und Verhaltensweisen als Faktoren für die Entstehung von Fettleibigkeit diskutiert (Kopelman, 2000; Bessesen, 2008; Hebebrand and Hinney, 2009). Durch Adipositas steigt das Risiko an Diabetes mellitus Typ II, Herz-/Kreislaufstörungen und bestimmten Krebsformen zu erkranken (Kopelman, 2000; Kopelman, 2007; Wyatt et al., 2006; Lykouras, 2008).

Das Körpergewicht wird durch ein komplexes neuronales System reguliert. Sensorische und metabolische Informationen müssen mit höheren kognitiven Funktionseinheiten verschaltet werden um die Regulation des Energiestoffwechsels zu gewährleisten. Von fundamentaler Bedeutung für dieses System ist der Leptin-Melanocortin-Signalweg des Zentralnervensystems. Mutationen, welche zu Funktionsverlusten in einzelnen anorexigenen Komponenten dieses Regelkreises führen, bringen die Energiebalance aus dem Gleichgewicht und haben schwere Auswirkungen auf das Körpergewicht(vgl. Tab 1). Eine essentielle anorexigene Komponente in diesem Netzwerk ist der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) (Huszar et al., 1997), ein G-Protein gekoppelter Rezeptor der überwiegend im Hypothalamus exprimiert wird (Mountjoy et al., 1994). Ungefähr 5% der monogenen Adipositasfälle sind auf funktionsrelevante Mutationen im MC4R-Gen zurückzuführen (Vaisse et al., 2000; Farooqi et al., 2000; Farooqi et al., 2003).

Im Rahmen dieser Dissertation sollten zwei im Menschen identifizierte MC4R-Punktmutationen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Die Stoppmutation W16X ist selten und wurde bisher nur in zwei fettleibigen Frauen nachgewiesen (Marti et al., 2003). Wie andere MC4R-Stoppmutationen auch, hat W16X eine drastische Effektstärke auf das Körpergewicht. Die Untersuchung der Mutation erfolgte in einem Zellkultur-basierten System sowie in einem gentechnisch-veränderten Mausmodell. Die durch Stoppmutationen verursachten Funktionsverluste eines Gens können durch die Verwendung von Nonsense-Suppressoren partiell behoben werden (vgl. Tab 3, Abb 4). Solche Substanzen wirken auf die Proteinbiosynthese und verursachen durch eine Reduktion der Translationsgenauigkeit das Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons (DAVIES et al., 1964b; Palmer et al., 1979; Burke and Mogg, 1985). Ziel der Experimente war die Reaktivierung der beeinträchtigten Mc4r-W16X Aktivität durch verschiedene Nonsense-Suppressoren. Die Behandlung der hier generierten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse ist der erste Versuch, diese Therapieoption an einem Tiermodell für Adipositas zu erproben.

Anders als die Vielzahl an MC4R-Mutationen zeigt das V103I-Allel eine negative Assoziation mit Fettleibigkeit (Geller et al., 2004; Heid et al., 2005; Rong et al., 2006; Young et al., 2007; Wang et al., 2010). V103I findet sich heterozygot in etwa 2 % der adipösen aber in 3,5 % der

normalgewichtigen Probanden (Geller et al., 2004). Der Effekt von V103I auf das Körpergewicht ist vergleichsweise gering. Fall/Kontrollstudien liefern keine Kausalität zwischen dem gehäuften gemeinsamen Auftreten einer Genvariante und einem Phänotyp. Es ist denkbar, dass ein untersuchter Polymorphismus einen Marker für eine bisher unbekannte Genvariante darstellt (z.B. Haplotyp), welche die eigentliche funktionelle Konsequenz nach sich zieht. Zu Beginn dieser Promotion lagen keine funktionellen Daten vor, die eine Erklärung für die negative Assoziation des Allels mit Adipositas bieten konnten. Daher erfolgte eine komplementäre Charakterisierung der V103I-Variante: neben den Zellkulturexperimenten wurde die Punktmutation in einer Mausmutante untersucht. Die Herstellung der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie stellt den ersten Ansatz dar, eine im Menschen identifizierte Genvariante mit polygenem Effekt für Adipositas in einem Tiermodell zu überprüfen.

4.2. *In vitro* Charakterisierung von Mc4r-W16X

Für monogene Adipositas ursächliche Stoppmutationen sind bislang im MC4R-, Leptinrezeptor-, Prohormonkonvertase 1 und POMC-Gen identifiziert worden (vgl. Tab 1). In dieser Arbeit wurde die im humanen MC4R-Gen identifizierte Stoppmutation W16X untersucht. Hierfür wurde die Stoppmutation in den murinen Mc4r integriert. Die Zellkulturexperimente zeigten, dass Mc4r-W16X nicht in der Plasmamembran lokalisiert war. Zudem war es nicht möglich die Variante durch den MC4R-Agonisten α -MSH zu aktivieren. Im Gegensatz zum wildtypischen Mc4r, welcher sich aus 332 Aminosäuren zusammensetzt, kommt es durch das vorzeitige Nonsensekodon zur Synthese eines nur 15 Aminosäuren umfassenden Moleküls, das keine funktionsrelevanten Proteindomänen mehr enthält.

Funktionelle *in vitro* Studien mit anderen stoppmutierten MC4R-Varianten decken sich mit den hier gezeigten Ergebnissen (Farooqi et al., 2003; Hinney et al., 2003; Xiang et al., 2006).

Mögliche Behandlungsstrategien von Krankheiten, die auf Stoppmutationen beruhen, erstrecken sich von gentherapeutischen Methoden bis hin zum Einsatz von Nonsense-Suppressoren wie z.B. Aminoglykosiden, welche eine Unterdrückung von Stoppmutationen auf Ebene der Proteinbiosynthese vermitteln sollen. Im Rahmen dieser Promotion sollte evaluiert werden, ob bestimmte Nonsense-Suppressoren eine Reaktivierung des Mc4r-W16X bewirken können.

Die Aminoglykosid-vermittelte Nonsense-Suppression ist abhängig von der Sequenz des vorzeitigen Stoppkodons. Die Überleserate an einem verfrühten UGA ist effizienter als am UAG und UAA Kodon (Manuvakhova et al., 2000; Keeling and Bedwell, 2002). Zudem hat der Nukleotidkontext einen essentiellen Einfluss auf die Terminationseffizienz (Manuvakhova et al., 2000; Keeling and Bedwell, 2002). Das endogene Stoppkodon liegt in einem Umfeld, das eine optimale Beendigung der Proteinbiosynthese gewährleistet. Daher beschränkt sich der Aminoglykosid-vermittelte Effekt auf das Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons. Am besten charakterisiert ist die Auswirkung der ersten Base stromabwärts des Stoppkodons auf die

Terminations- bzw. Suppressionseffizienz. Beim Stoppkodon UGA beispielsweise begünstigt ein nachfolgendes Cytosin das Aminoglykosid-vermittelte Überlesen, gefolgt von Adenin und Guanin. Ein Uracil hingegen verringert die Überleserate des UGA Stoppkodons (Manuvakhova et al., 2000; Keeling and Bedwell, 2002). Die Punktmutation der W16X-Variante verursacht die Bildung eines vorzeitigen UGA Kodons, gefolgt von einem Adeninrest, weshalb für diese Stoppmutation eine vergleichsweise effiziente Überleserate erwartet wurde.

Tatsächlich war es möglich durch das Aminoglykosid G-418 (Geneticin) *in vitro* eine Suppression der Stoppmutation zu induzieren und eine partielle Wiederherstellung der Mc4r-W16X Expression in der Plasmamembran zu bewirken. In Übereinstimmung dazu konnte eine Aktivierung der Signaltransduktion durch den Mc4r-Agonisten α -MSH bewirkt werden. Durch die G-418-vermittelte Nonsense-Suppression wurde eine geringe Menge an Rezeptormolekülen wieder in der vollen Länge synthetisiert, so dass der Mc4r-W16X wieder in die Plasmamembran integriert wurde und die Signaltransduktionkaskade nach α -MSH-Bindung induzieren konnte. In der Dissertation von Dr. Harald Brumm wurden u.a. die Stoppmutationen W16X (UGA), Y35X (UAA) und E61X (UAG) im humanen MC4R untersucht. Passend zu dem oben erläuterten Einfluss der Sequenz eines Stoppkodons auf die Überleserate zeigte die Anwendung von verschiedenen Aminoglykosiden, dass sich die MC4R-W16X-Mutation am effektivsten reaktivieren lässt; gefolgt von E61X und Y35X.

Die Wiederherstellung der murinen und humanen W16X-Variante war ähnlich effizient, da der Nukleotidkontext um die W16X-Mutation in beiden Spezies identisch ist. Neben der Konservierung des Nukleotidkontexts zwischen Mensch und Maus war die UGA-Sequenz des Stoppkodons der W16X-Variante ein weiterer Grund diese MC4R-Stoppmutation und keine andere in eine Mauslinie einzubringen.

Wegen der toxischen Eigenschaften der aminoglykosidischen Antibiotika, besteht ein Bedarf an alternativen Nonsense-Suppressoren. Die aufgrund dieser Notwendigkeit geleistete Forschungsarbeit, führte zur Identifizierung der Oxadiazolverbindung PTC124 (Ataluren) (Welch et al., 2007; Nudelman et al., 2009). Die Wirksamkeit von PTC124 als Nonsense-Suppressor wurde sowohl in Zellkultur, Tierversuchen als auch in Humanstudien beschrieben (Du et al., 2008; Kerem et al., 2008; Hirawat et al., 2007). In den hier gezeigten Zellkulturexperimenten konnte hingegen keine Wiederherstellung der Oberflächenexpression von Mc4r-W16X durch PTC124 beobachtet werden. Unveröffentlichte ELISA-Experimente mit PTC124 im Labor von PD Dr. Heike Biebermann (Charité, Berlin) konnten ebenfalls keinen Überleseffekt nachweisen. Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit von PTC124 als Nonsense-Suppressor angezweifelt, da die Reproduktion des von Welch *et al.* verwendeten Luciferase-basierten Überleseassays scheiterte (Auld et al., 2009). Jedoch muss hervorgehoben werden, dass die Wirksamkeit von PTC124 mit Hilfe einer breiten methodischen Palette in zwei

unterschiedlichen Mausmodell bestätigt wurde (Welch et al., 2007; Du et al., 2008). Eine abschließende Erklärung für das Ausbleiben des PTC124-Effekts auf die Variante Mc4r-W16X bleibt demnach offen. Eine zu geringe PTC124-Konzentration ist unwahrscheinlich, da sich die Behandlung an publizierten Konzentrationen mit HEK293-Zellen orientierte (Welch et al., 2007).

4.3. *In vivo* Charakterisierung von Mc4r-W16X

Die hier gezeigten Zellkulturexperimente haben demonstriert, dass eine Funktionswiederherstellung des Mc4r-W16X durch G-418 prinzipiell möglich ist. Um zu überprüfen, ob sich die Anwendung von Nonsense-Suppressoren *in vivo* als Therapieoption für Adipositas anbietet, wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen ein neues Mausmodell generiert, welches die W16X-Mutation im Mc4r-Gen kodiert. Andere bereits publizierte Mausmodelle mit Mc4r-Defizienz sind ungeeignet diesen Therapieansatz zu verfolgen, da diese Linien keine Stoppmutationen sondern Insertionskassetten oder *missense* Mutationen im Mc4r-Lokus tragen (Huszar et al., 1997; Balthasar et al., 2005; Meehan et al., 2006; Grosse et al., 2006).

Die erfolgreiche homologe Rekombination des Targetingvektors konnte mittels Southern Blot Analyse bestätigt werden. Durch PCR-basierte Genotypisierung und Sequenzierung konnte die Anwesenheit der W16X-Mutation im Mc4r-Gen nachgewiesen werden. Vor der Behandlung der Mc4r-W16X *knockin* Linie mit Nonsense-Suppressoren erfolgte die primäre Phänotypisierung, welche im Folgenden diskutiert werden soll:

Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Die Mc4r-Defizienz der homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie verursachte eine enorme Adipositas. Heterozygote Mutationsträger zeigten einen intermediären Phänotyp hinsichtlich des Körpergewichts. Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch die Erstbeschreibung der Mc4r *knockout* Mauslinie (Huszar et al., 1997).

Das hohe Körpergewicht der Mutanten war primär auf eine erhöhte Fettmasse zurückzuführen. Insbesondere das viszerale Fettgewebe war bei den homozygoten Mutationsträgern deutlich ausgeprägter als bei den wildtypischen Tieren. Nur bei den Männchen war auch eine Zunahme der fettfreien Masse zu beobachten. Mit Ausnahme des hier gezeigten geschlechtsspezifischen Unterschieds in der fettfreien Masse decken sich die Daten mit bereits publizierten Befunden (Weide et al., 2003; Sutton et al., 2006). In den beiden zitierten Publikationen wurde in beiden Geschlechtern eine Zunahme der fettfreien Masse beobachtet, was auf verschiedene Messmethoden bzw. auf ein unterschiedliches Alter der Versuchstiere zurückgeführt werden kann.

Energieaufnahme und Körpertemperatur

Die Verrechnung der Energieaufnahme mit dem Energiegehalt der Fäzes ergab, dass die homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse beiderlei Geschlechts die höchste Energieassimilation aufwiesen. Die höhere Energieassimilation der homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse lässt sich ausschließlich auf die Hyperphagie zurückführen, da alle drei Genotypen eine identische Assimilationseffizienz hatten. Überraschend war, dass die assimilierte Energie der heterozygoten Mutationsträger auf dem Niveau der Wildtypen lag. Homozygote Mc4r *knockout* Mäuse sind ebenfalls hyperphag (Huszar et al., 1997). Daten zur Futtermittelaufnahme für adulte heterozygote *knockout* Mäuse liegen in der Literatur nicht vor. Balthazar *et al.* (2005) haben kürzlich demonstriert, dass unterschiedliche Mc4r-exprimierende Kerngebiete im Zentralnervensystem *entweder* den Energieverbrauch *oder* die Nahrungsaufnahme regulieren. Diese Divergenz im zentralen Melanocortinsystem könnte eine Erklärung für die normale Futtermittelaufnahme der heterozygoten *knockin* Mäuse sein: Kerngebiete, welche die Nahrungsaufnahme regulieren könnten möglicherweise trotz verminderter Mc4r-Expression so funktionieren, dass keine Hyperphagie eintritt; wohingegen Areale, die den Energieverbrauch steuern, bei geringerer Mc4r-Expression den Stoffwechsel reduzieren.

Als Indikator für den Energieverbrauch wurde die rektale Körpertemperatur der Mc4r-W16X *knockin* Mäuse bestimmt, da Veränderungen in der Körpertemperatur mit Änderungen der metabolischen Rate einhergehen (Du Bois, 1921). Hinweise, dass eine Reduktion der Körpertemperatur einen Beitrag zur Entwicklung von Adipositas leistet, kommen u.a. aus Studien mit Leptin-defizienten *ob/ob* Mäusen (DAVIS and MAYER, 1954; Trayhurn and James, 1978). In der vorliegenden Dissertation konnte ein tendenzieller Unterschied in der rektalen Körpertemperatur zwischen den drei Genotypen gemessen werden. Aufgrund der tendenziell reduzierten Körpertemperatur der homozygoten Mutationsträger kann ein verminderter Energieverbrauch der adulten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse vermutet werden. Folglich kann neben der Hyperphagie ein reduzierter Energieverbrauch der homozygoten *knockin* Mäuse den Energiehaushalt aus dem Gleichgewicht bringen und einen Beitrag zum Ausbruch der Fettleibigkeit leisten. Bei der Körpertemperatur zeigten die heterozygoten Mutationsträger wiederum einen intermediären Phänotyp, so dass man spekulieren kann, ob das Übergewicht der heterozygoten *knockin* Tiere nur aufgrund eines reduzierten Stoffwechsels zustande kam.

In publizierten Experimenten konnte durch Sauerstoffverbrauchsmessungen in Kombination mit MTII-Injektionen und *Pair-Feeding*-Experimenten an Mc4r-defizienten und wildtypischen Mäusen gezeigt werden, dass der Rezeptor neben der Regulation der Nahrungsaufnahme auch an der Kontrolle des Energieverbrauchs beteiligt ist (Chen et al., 2000; Ste et al., 2000; Hoggard et al., 2004; Balthazar et al., 2005): Eine Aktivierung des MC4R-Signalwegs steigert den Energieverbrauch. Die tendenziell reduzierte Körpertemperatur der homo- und heterozygoten

Mc4r-W16X *knockin* Mäuse reiht sich in diese Befunde ein. Um den beobachteten Trend hin zu einer reduzierten Körpertemperatur abschließend zu überprüfen, bieten sich Implantationen von Temperatursendern an, um eine kontinuierliche Datenerhebung zu ermöglichen.

Körperlänge

Die Körperlänge der homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mäuse war verglichen mit den Wildtypen signifikant erhöht. Die heterozygoten Mutationsträger zeigten wiederum einen intermediären Phänotyp im Hinblick auf die Körperlänge. Dieser Phänotyp ist charakteristisch für Mausmodelle mit defektem Mc4r-Signalweg wie beispielsweise Mc4r *knockout*-, A^y/a - und AGRP überexprimierende transgene Mäuse (Huszar et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Martin et al., 2006). Mc4r-defiziente Mäuse haben aufgrund der vermehrten Fettspeicherung erhöhte Leptinwerte (Huszar et al., 1997; Ste et al., 2000; Haskell-Luevano et al., 2009). Leptin ist ein mitogener Faktor, der in vielen Zelltypen wie z.B. Knorpelzellen Wachstum stimulieren kann (Dumond et al., 2003; Gat-Yablonski and Phillip, 2008). Neben den peripheren Mechanismen steuert Leptin das Längenwachstum auch über das zentrale Nervensystem. Leptin bewirkt im Hypothalamus eine Verschiebung im GHRH (*Growth hormone releasing hormone*) / Somatostatin Verhältnis und zwar so, dass schlussendlich vermehrt Wachstumshormon freigesetzt wird (Carro et al., 1999). Die Bedeutung von Leptin beim Längenwachstum wird zudem bei Leptin-defizienten ob/ob-Mäuse deutlich, die signifikant kleiner als wildtypische Mäuse sind (INGALLS et al., 1950).

Somatostatin wird u.a. in Nervenzellen des periventriculären Hypothalamus gebildet. Eine Koexpression mit dem Mc4r wurde bisher allerdings noch nicht nachgewiesen, obwohl der Mc4r auch in diesem Kerngebiet exprimiert wird (Mountjoy et al., 1994). Wäre eine Kolokalisation der Fall könnte neben den genannten sekundären Effekten durch Leptin auch ein direkter, d.h. primärer Effekt des Mc4r-Signalwegs auf das Längenwachstum möglich sein.

Hypothalamische Genexpression

Die vorwiegend im *Nukleus arcuatus* exprimierten Gene *Pomc*, *Agrp* und *Npy* werden u.a. über den Leptinsignalweg reguliert: hohe Leptinspiegel im Blut führen zu einer negativen Regulation der orexigenen Komponenten *Agrp* / *Npy* und zu einer positiven Regulation der anorexigenen Komponente *Pomc* (Schwartz et al., 1997; Mizuno et al., 1998; Korner et al., 2001). Die hier gemessene *Agrp* und *Npy* RNA-Konzentrationen waren in den homozygoten Mc4r-W16X *knockin* Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen signifikant reduziert, wohingegen die von *Pomc* in den Mutanten erhöht war. Dass dieser Effekt eine Folge der Fettleibigkeit ist und auf die damit verbundenen hohen Leptinspiegel im Blut zurückgeführt werden kann, wurde bereits in A^y/a Mäusen und A^y/a ob/ob Doppelmutanten gezeigt (Tsuruta et al., 2002). Die Befunde bezüglich

der *Agrp*, *Npy* und *Pomc* Regulation stimmen mit Ergebnissen aus mehreren Publikationen überein, welche die Genexpression im Hypothalamus von adulten *Mc4r knockout* Mäusen untersucht haben (Weide et al., 2003; Haskell-Luevano et al., 2009). Die veränderten RNA-Abundanzen von *Agrp*, *Npy* und *Pomc* verdeutlichen den *Feedback*-Mechanismus von Leptin im Hypothalamus. Stromabwärts können diese Anpassungen aufgrund der *Mc4r*-Defizienz nicht verarbeitet werden und laufen ins Leere, so dass eine katabole physiologische Antwort ausbleibt.

Zellen schützen sich vor der Translation von stoppmutierten mRNAs durch einen posttranskriptionellen Mechanismus, der als *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) bekannt ist. Diese Qualitätskontrolle verhindert die Bildung von C-terminal trunkierten Proteinen mit potentiell dominant-negativen Effekten, indem sie eine Degradation von stoppmutierten Transkripten einleitet (Hentze and Kulozik, 1999). Der NMD-Mechanismus ist Splicing-abhängig und kommt aufgrund der 1-Exonstruktur des *Mc4r*-Gens nicht zum Tragen (Maquat and Li, 2001). Brocke *et al.* konnten explizit zeigen, dass *Mc4r*-Transkripte mit Stoppmutationen nicht durch den NMD-Mechanismus eliminiert werden (Brocke et al., 2002). Die Quantifizierung der *Mc4r*-Transkriptabundanz demonstrierte eine etwa 25 % gesteigerte *Mc4r* RNA-Expression in den homozygoten *knockin* Mäusen. Die erhöhte *Mc4r*-Transkriptmenge könnte wie auch die Regulation von *Pomc*, *Agrp* und *Npy* eine Folge der Adipositas der *knockin* Mäuse sein. In Ratten wird der *Mc4r* als Antwort auf eine hochkalorische Diät positiv reguliert (Archer et al., 2005). Auch eine Autoregulation des Rezeptors wäre denkbar: Die chronische Behandlung von Ratten mit dem MC4R-Aktivator MTII führt zu einer verminderten *Mc4r*-Transkriptmenge (Zhang et al., 2010). Da in den *Mc4r-W16X knockin* Mäusen kein Rezeptorprotein gebildet werden kann, ist es denkbar, dass die Inaktivität des *Mc4r*-Signalwegs zu einer gesteigerten *Mc4r*-Transkriptabundanz führt. Ein primärer Einfluss der stromabwärts des *Mc4r*-Exons gelegenen loxP-Sequenz auf die Expression kann bislang nicht ausgeschlossen werden. Dieser Punkt könnte durch eine allelspezifische qRT-PCR mit Proben von heterozygoten Mutationsträgern geklärt werden.

BDNF ist ein potentielles Zielgen des MC4R-Signalwegs. *In situ* Hybridisierungen konnten zeigen, dass *A^y/a* und *Mc4r knockout*-Mäuse im ventromedialen Hypothalamus (VMH) reduzierte BDNF-Transkriptmengen haben (Xu et al., 2003). Die homozygoten *Mc4r-W16X knockin* Mäuse hatten eine tendenzielle Reduktion der BDNF RNA-Abundanz im Hypothalamus. Möglicherweise konnte eine signifikante BDNF-Reduktion wie in anderen *Mc4r*-defizienten Linien deshalb nicht gemessen werden, da unterschiedliche Methoden zum Einsatz kamen. Zudem hat BDNF mehrere Isoformen (I-V), welche alle durch eine einzige Sonde in der oben zitierten *in situ* Hybridisierung gemessen wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die vorwiegend im Hypothalamus exprimierte BDNF Isoform 1 mittels qRT-PCR gemessen (Timmusk et al., 1993).

Akute pharmakologische Manipulationen mit dem MC4R-Agonisten MTII resultieren in einer verstärkten Sim1-Transkriptmenge in wildtypischen Mäusen (Kublaoui et al., 2006a). Die Überexpression von SIM1 kann partiell die Adipositas von A^y/a -Mäusen lindern (Kublaoui et al., 2006b), so dass SIM1 vermutlich ein Zielgen des MC4R-Signalwegs ist. Der qRT-PCR-Ansatz zeigte aber keinen Unterschied zwischen den homozygoten *knockin* Mutanten und den wildtypischen Mäusen im Hinblick auf die Sim1 RNA-Abundanz. Insbesondere die von Kublaoui et al. (2006) durchgeführten Experimente mit SIM1-transgenen A^y/a -Mäusen ließen die Vermutung aufkommen, dass Tiere mit beeinträchtigtem Mc4r-Signalweg eine verminderte Sim1-Expression haben, welche durch die Überexpression wiederhergestellt wird. Die hier gewonnenen Daten widersprechen dieser Hypothese: Mc4r-W16X *knockin* Tiere mit beeinträchtigtem Mc4r-Signalweg haben keine veränderten Sim1-Transkriptmengen. Sim1-Expressionsdaten für A^y/a - und Mc4r *knockout* Mäuse liegen in der Literatur bislang nicht vor.

Fto und Sh2b1 wurden in genomweiten Assoziationsstudien als Kandidatengene für Adipositas identifiziert (Willer et al., 2009; Thorleifsson et al., 2009). Die Funktion von Fto ist noch nicht bekannt; es scheint in die Demethylierung von einzelsträngiger DNA involviert zu sein (Gerken et al., 2007). Sh2b1 ist in den Leptinsignalweg eingebunden und verstärkt die Wirkung von Leptin am Rezeptor (Li et al., 2007). Keines der beiden Kandidatengene zeigte veränderte Transkriptmengen in den *knockin* Mutanten. Fettleibigkeit und/oder Mc4r-Defizienz haben in diesem Mausmodell keinen Einfluss auf die Regulation dieser beiden Gene.

Blutglukose

Anders als bei den wildtypischen Mäusen war mit fortschreitendem Alter eine Zunahme der Blutglukosekonzentration bei den homozygoten Mc4r-W16X Mutanten zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen sind für Mc4r *knockout* Mäuse publiziert, wobei auch in der Literatur der Effekt auf den Glukosestoffwechsel bei den Männchen stärker ausgeprägt ist als bei den Weibchen (Huszar et al., 1997). Adulte fettleibige Mc4r-W16X *knockin* Mäuse zeigten in den hier vorgestellten Experimenten eine signifikant reduzierte Glukosetoleranz. Bisherige Publikationen haben für junge Mc4r *knockout* Mäuse eine tendenziell eingeschränkte Glukosetoleranz demonstriert (Fan et al., 2000). Somit sprechen die Daten für einen sekundären Effekt auf den Glukosestoffwechsel, ausgelöst durch die Fettleibigkeit der *knockin* Mäuse.

Ein primärer Beitrag der Mc4r-Defizienz zu diesem Phänotyp ist jedoch nicht auszuschließen, da bekannt ist, dass das zentrale Melanocortinsystem auch direkt auf den Glukosehaushalt wirken kann. Die intracerebroventriculare Verabreichung von MTII steigert in C57BL/6J-Mäusen die Insulinsensitivität. Die mRNA des Glukosetransporters Glut4 wird durch zentrale Effekte von MTII positiv reguliert (Heijboer et al., 2005). Zudem haben junge normalgewichtige Mc4r *knockout* Mäuse eine beeinträchtigte Insulintoleranz (Fan et al., 2000).

Anwendung von Gentamicin, Amikacin und PTC124 in vivo

Die Zellkulturexperimente haben dargelegt, dass die Stoppmutation W16X die Lokalisation der Mc4r-Variante in der Plasmamembran verhindert. Dementsprechend war eine Aktivierung der Signaltransduktion durch das anorexigene Neuropeptid α -MSH nicht zu beobachten. Die Reaktivierung der Mc4r-W16X Variante *in vitro* durch das Aminoglykosid G-418 war erfolgreich. Eine Wiederherstellung des Mc4r-W16X *in vivo* würde die Möglichkeit eröffnen Nonsense-Suppressoren zur Behandlung von Fettleibigkeit einzusetzen, die durch vorzeitige Stoppmutationen verursacht wird. Um diese Therapieoption im Tiermodell zu evaluieren, erfolgte die Herstellung einer Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie. Die metabolische Phänotypisierung offenbarte eine drastische Adipositas der Mc4r-defizienten Mäuse. Der Phänotyp der *knockin* Mauslinie deckt sich mit dem bereits publizierter Mc4r-defizienter Mausmodelle. Die Übereinstimmung der erhobenen *in vitro* und *in vivo* Daten mit der exklusiven Identifikation der W16X-Mutation in adipösen Probanden verdeutlicht, dass die Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie ein geeignetes Tiermodell darstellt um den auf Nonsense-Suppressoren basierenden Therapieansatz zu überprüfen.

In dieser Arbeit konnte wiederholt demonstriert werden, dass sich Defekte im Mc4r-Gen u.a. durch Dosisseffekte ausprägen: in fast allen gemessenen Parametern zeigten heterozygote Mc4r-W16X Mutationsträger einen intermediären Phänotyp, der zwischen dem der Wildtypen und dem der homozygoten Mutationsträger lag. Meehan *et al.* haben in zwei verschiedenen durch chemische Mutagenese hergestellten Mauslinien mit Mc4r-Punktmutationen gezeigt, dass die Ausprägung der Adipositas mit der Beeinträchtigung der Signaltransduktion *in vitro* korreliert: Je dramatischer sich eine Mutation auf die Rezeptoraktivität auswirkt, desto fettleibiger ist das Mausmodell mit der entsprechenden Mutation. Ähnliche Befunde wurden auch am Menschen gemacht: die Beeinträchtigung der Mc4r-Funktion korreliert mit der Energieaufnahme während einer Testmahlzeit (Farooqi and O'Rahilly, 2004). Diese Dosisseffekte gewähren die Annahme, dass eine partielle Wiederherstellung der Mc4r-W16X-Funktionalität durch Nonsense-Suppressoren in den Mc4r-defizienten *knockin* Mäusen eine Reduktion der Adipositas-Symptome bewirken kann.

Die primäre Charakterisierung der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie offenbarte eine Vielzahl an quantitativen Phänotypen, anhand derer die Effektivität einer Adipositastherapie bewertet werden kann. In den Pilotversuchen wurden wegen des einfachen experimentellen Vorgehens während der subkutanen Aminoglykosid-/PTC124-Behandlungen von wildtypischen und homozygoten *knockin* Mäusen das Körpergewicht und die Futtermittelaufnahme aufgezeichnet. Drei Nonsense-Suppressoren wurden für die Injektionen verwendet: die beiden Aminoglykoside Gentamicin und Amikacin, sowie die Oxadiazolverbindung PTC124. Gentamicin und Amikacin wurden in eigens durchgeführten Zellkulturexperimenten nicht getestet. Deren Wirksamkeit ist *in*

vitro und *in vivo* bestätigt (Barton-Davis et al., 1999; Manuvakhova et al., 2000; Du et al., 2006). In der Dissertation von Dr. Harald Brumm konnte für MC4R-W16X explizit gezeigt werden, dass Gentamicin *in vitro* die Rezeptoraktivität wiederherstellen kann. G-418 wurde wegen der drastischen Toxizität nicht im Tierversuch angewendet (La Rocca et al., 1985).

Keine der drei Testsubstanzen hat eine Reduktion des Körpergewichts oder der Futteraufnahme verursacht. Zwar konnten teilweise Reduktionen in der Futteraufnahme und/oder der Körpergewichtsentwicklung der Mutanten während der Behandlung verzeichnet werden, jedoch waren diese Effekte auch bei den wildtypischen Tieren und/oder während den Vehikelinjektionen zu beobachten, so dass es sich um minimale unspezifische Effekte handelte, verursacht durch das experimentelle Vorgehen. Die EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) empfiehlt für neue Anti-Adipositas-Medikamente eine minimale Gewichtsreduktion von 10 %. Die effektivsten Wirkstoffe gegen Adipositas wie z.B. Rimonabant, Orlistat und Sibutramine bewirken eine Körpergewichtsreduktion von ungefähr 5 % (Padwal and Majumdar, 2007). Selbst diese unter der EMEA-Empfehlung liegende Gewichtsveränderung konnte in den Experimenten mit den Nonsense-Suppressoren nicht erreicht werden.

Erklärung für das Ausbleiben eines gewichtreduzierenden Effekts

Mausmodelle mit vorzeitigen Stoppmutationen für Zystische Fibrose, Muskeldystrophie und Diabetes insipidus lassen sich durch verschiedene Nonsense-Suppressoren wie Gentamicin, Amikacin, Negamycin und PTC124 erfolgreich behandeln, so dass eine Linderung der Krankheitssymptome eintritt (vgl. Tab. 3). Die mutationstragenden Gene dieser Mausmodelle werden in peripheren Geweben, wie Darm, Lunge, Muskel oder Niere exprimiert. Die Mc4r-Expression hingegen findet im Gehirn - d.h. jenseits der Blut-Hirn-Schranke - statt.

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf. Durch diese funktionelle Grenze wird das Gehirn vor Milieuschwankungen der Peripherie, Krankheitserregern, Giftstoffen, Transmittern u.a. geschützt. Anders als im Kapillarsystem des übrigen Körpers sind im Gehirn die Endothelzellen nicht fenestriert. Die zerebralen Endothelzellen sind über *tight junctions* eng miteinander verbunden und weisen eine geringe Zahl an Pinocytosevesikeln auf, was einen para- bzw. transzellulären Transport von Substanzen erschwert. Messungen von Aminoglykosidkonzentrationen im Liquor und im Gehirngewebe belegen, dass die Blut-Hirn-Schranke wenig durchlässig für polare Substanzen wie Aminoglykoside ist (Briedis and Robson, 1978; Barling and Selkon, 1978; Bruckner et al., 1980). Pharmakokinetische Daten zur Verteilung von PTC124 im Körper gibt es nicht. Aufgrund des geringen Molekulargewichts und den unpolaren Eigenschaften ist die Wahrscheinlichkeit für die Blut-Hirnschranken-Gängigkeit für solche Substanzen im Vergleich zu Aminoglykosiden höher (Pardridge, 2005). Medikamente mit diesen Eigenschaften haben den Nachteil, dass sie *in vivo*

nicht-selektiv biologische Membranen passieren und sich in allen Geweben anreichern. Kleine lipophile Moleküle werden nach akuten Injektionen schnell aus dem Blut eliminiert und nicht mehr in ausreichenden Mengen zum gewünschten Zielorgan transportiert (Pardridge, 2005). Auch wenn die Behandlung von Mausmodellen für Zystische Fibrose und Muskeldystrophie mit ein- bis mehrmaligen peripheren PTC124-Injektionen pro Tag erfolgreich war (Welch et al., 2007; Du et al., 2008), stellt die perorale PTC124-Verfütterung kombiniert mit subkutanen Injektionen für die Mc4r-W16X *knockin* Linie eine gute Alternative dar, weil durch die Futtersupplementierung im Vergleich zu den akuten Injektionen konstantere PTC124-Blutkonzentrationen erreicht werden können (Welch et al., 2007). Die eigens durchgeführten Zellkulturversuche zeigten, dass PTC124 anders als G-418 keine Reaktivierung der Mc4r-W16X Variante induzieren konnte. Kritische Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit von PTC124 als Nonsense-Suppressor wurden zudem von Auld *et al.* (2009) publiziert. Diese Befunde dürfen bei der Interpretation der *in vivo* Ergebnisse nicht ignoriert werden.

Trotz der Literaturbefunde bezüglich der geringen Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke für Aminoglykoside wurde die periphere Injektion als erster Ansatz aufgrund der einfachen Vorgehensweise durchgeführt. Zudem gibt es keine Daten, die explizit demonstrieren, dass der Hypothalamus nicht von Aminoglykosiden oder PTC124 erreicht werden kann. Der *Nukleus arcuatus* (ARC) im Hypothalamus ist nahe der *Emenentia mediana* gelegen, einem Zirkumventrikularorgan, welches im Gegensatz zu anderen Hirnstrukturen, Blutgefäße mit gefensterten Endothelzellen besitzt. Experimente mit radioaktiven Tracersubstanzen haben dargelegt, dass Bereiche des ARC über die *Emenentia mediana* von Substanzen aus dem Blutkreislauf erreicht werden können (Shaver et al., 1992). Der Mc4r wird zwar auch im ARC exprimiert, höhere Mc4r-mRNA Konzentrationen finden sich aber in anderen hypothalamischen Kerngebieten, die in Distanz zum ARC und zur *Emenentia mediana* stehen, so z.B. im *Nukleus paraventricularis* (PVN), im ventromedialen Hypothalamus (VMH) und im dorsomedialen Hypothalamus (DMN) (Mountjoy et al., 1994). Insbesondere die Mc4r-Expression im PVN ist essentiell für die Regulation der Nahrungsaufnahme (Balthasar et al., 2005).

Es kann daher angenommen werden, dass die Mc4r-positiven Kerngebiete nicht von den applizierten Wirkstoffen erreicht wurden. Um zu untersuchen, inwieweit Kerngebiete des Hypothalamus tatsächlich von Nonsense-Suppressoren erreicht werden, müssten die Substanzen beispielsweise radioaktiv markiert und Autoradiographien an Gewebeschnitten durchgeführt werden. Alternativ wäre die aufwändige Herstellung eines transgenen Mausmodells mit vorzeitiger Stoppmutation in einem leicht zu detektierenden Reporter gen (z.B. *green fluorescent protein* GFP) von Nutzen. Die ubiquitäre Expression eines stoppmutierten Reporters würde aufzeigen, in welchem Gewebe und mit welcher Effektivität verschiedene Nonsense-Suppressoren ihre Wirkung entfalten. Ein Tiermodell mit diesen Eigenschaften ist bisher nicht

publiziert und würde eine Alternative zu den bisher verwendeten Mausmutanten darstellen, die für die *in vivo* Überprüfung von Nonsense-Suppressoren genutzt werden.

Prinzipiell kann die periphere Behandlung auf höhere Dosierungen und andere Wirkstoffe ausgeweitet werden. Kürzlich wurde ein neues Aminoglykosidderivat (NB54) publiziert, welches weniger toxisch als Gentamicin ist und gleichzeitig eine effektivere Suppression von vorzeitigen Stoppkodons vermitteln kann (Nudelman et al., 2009). Auch bietet sich die Koapplikation von Substanzen wie Poly-L-Aspartat an, welche als Wirkverstärker von Aminoglykosiden fungieren und zudem die toxischen Nebenwirkungen senken (Du et al., 2009).

Im Rahmen eines Tierversuchsanspruchs wurde die Genehmigung für die intracerebroventriculäre (icv) Infusion von Testsubstanzen in das Ventrikelsystem über implantierte osmotische Pumpen gewährt. Daher wurde zunächst auf weitere periphere Injektionen von Nonsense-Suppressoren verzichtet. Die icv Infusion ist eine etablierte Technik um die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen (Hagg, 2007). Ein Beispiel, welches die Effektivität dieser Applikation verdeutlicht, ist die periphere bzw. zentralnervöse Injektion des synthetischen Mc4r-Antagonisten SHU9119. SHU9119 steigert nach icv Verabreichung die Futteraufnahme in C57BL/6J Mäusen, aber nicht nach peripherer Injektion (Fan et al., 1997; Rossi et al., 1998; Sutton et al., 2008). Der ausbleibende orexigene Effekt nach peripherer Verabreichung, lässt sich durch eine geringe Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für SHU9119 erklären.

Die Mc4r-Expression im PVN des Hypothalamus ist essentiell für die Regulation der Nahrungsaufnahme. Dieses Kerngebiet liegt an der Seitenwand des 3. Ventrikels, was eine ausreichende Versorgung mit icv infundierten Testsubstanzen wahrscheinlich macht. Ein weiterer Vorteil der kontinuierlichen icv Infusion wäre die Aufrechterhaltung von konstanten Wirkstoffkonzentrationen im Liquor. Nach akuten Injektionen haben Aminoglykoside nur eine kurze biologische Halbwertszeit, da eine rasche Exkretion über die Nieren erfolgt (Sangkuhl et al., 2004; Du et al., 2006).

Die Blut-Hirn-Schranke minimiert die Zahl der biologisch verfügbaren Medikamente um neurologische Störungen wie z.B. Alzheimer, Parkinson und Gehirntumore zu behandeln (Pardridge, 2005). Neben der Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch neurochirurgisch implantierte Zugänge existieren alternative Methoden um Medikamente über die Blut-Hirn-Schranke zu schleusen: intracarotische Infusionen von osmotisch wirksamen Substanzen lassen Gefäßendothelzellen kurzzeitig kollabieren; hohe Dosen von Dimethylsulfoxid, Ethanol oder Natriumdodecylsulfat wirken destabilisierend auf Membranen und erlauben das Eindringen von Medikamenten in das Gehirngewebe (Pardridge, 2005). Nachteilig bei der Anwendung solcher Methoden ist die hohe Wahrscheinlichkeit toxischer Begleiterscheinungen. Auch die direkte chemische Modifikation und die „Verpackung“ von Medikamenten mit Hilfe von Nanopartikeln werden diskutiert um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (Juillerat-Jeanneret, 2008).

Das zukünftige Vorgehen zur Behandlung der Adipositas der Mc4r-W16X *knockin* Linie fokussiert sich zunächst auf die icv Infusion der Testsubstanzen (*proof-of-concept*). Sollte die icv Behandlung erfolgreich ablaufen, kann überlegt werden, durch welche der oben erwähnten Manipulation die Erfolgsaussichten einer peripheren Verabreichung gesteigert werden können.

Neben den Mc4r-W16X *knockin* Mäusen soll künftig ein weiteres adipöses Tiermodell einer (peripheren) Behandlung mit Nonsense-Suppressoren unterzogen werden: Ob/ob-Mäuse können aufgrund der Stoppmutation R105X im Leptingen kein funktionstüchtiges Leptin synthetisieren (Zhang et al., 1994). Eigene Zellkulturexperimente unter Verwendung eines Reportergenkonstruktes haben gezeigt, dass ein G-418-induziertes Überlesen der R105X-Stoppmutation möglich ist. Anders als für das Leptinrezeptor-, POMC- oder MC4R-Gen sind für das humane Leptingen bis heute keine Stoppmutationen entdeckt worden (vgl. Tab. 1). Trotzdem stellen Leptin-defiziente ob/ob-Mäuse aufgrund einer Vielzahl quantitativer Phänotypen ein interessantes Tiermodell dar, um den Effekt von Nonsense-Suppressoren zu untersuchen. Gegenüber der Mc4r-W16X *knockin* Linie besitzen ob/ob-Mäuse den Vorteil, dass Leptin in der Peripherie (Adipozyten) gebildet wird, so dass die oben erläuterte Blut-Hirn-Schranken-Problematik nicht von Relevanz ist. Zudem existieren immunologische Methoden um Leptinspiegel im Blut wiederholt messen zu können. Dadurch kann zu verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung eine Korrelation zwischen der Leptinkonzentration im Blut und metabolischen Parametern wie z.B. Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Futteraufnahme gebildet werden.

Das Überlesen von Stoppmutationen ist eine Therapiemöglichkeit, die darauf ausgerichtet ist eine Krankheit möglichst ursachennah zu bekämpfen. Eine erfolgreiche Behandlungsstrategie zur Manipulation der Termination an vorzeitigen Nonsensekodons, wäre ein universeller Ansatz, der Menschen mit krankheitsrelevanten Stoppmutationen - unabhängig vom Symptom - Genesung bringen könnte. Die toxischen Nebenwirkungen von Aminoglykosiden sowie die Notwendigkeit, die Substanzen intramuskulär oder intravenös zu verabreichen, limitieren die Anwendung am Menschen auf Machbarkeitsstudien (*proof-of-concept*). Die Entdeckung von PTC124 und verdeutlicht, dass sich die Wissenschaft dieser Problematik bewusst ist und gezielt nach alternativen Wirkstoffen sucht (Welch et al., 2007).

Zu dem in dieser Promotion verfolgten Ansatz kommt noch die Problematik der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit eines Medikaments hinzu. Effektive Nonsense-Suppressoren kombiniert mit Methoden, die eine Überwindung der Blut-Hirnschranke ermöglichen, könnten zukünftige Therapieversuche von Adipositas-relevanten Stoppmutationen möglich machen. In den Zellkulturstudien war es möglich die Auswirkungen der W16X-Stoppmutation im Mc4r-Gen, sowie die R105X-Mutation im Leptingen zu supprimieren. Daher bietet es sich an mit Mc4r-W16X *knockin* Mäusen sowie mit Leptin-defizient ob/ob-Mäusen auf Nonsense-Suppressoren basierende Behandlungsstrategien im Tiermodell zu erproben.

4.4. *In vitro* Charakterisierung von Mc4r-V103I

Die Identität zwischen dem humanen und murinen Rezeptor beträgt auf Proteinebene 94 %. Durch ein Aminosäure-Alignment von MC4R-Orthologen aus neun Spezies verschiedener Tierklassen gezeigt werden, dass der Aminosäurerest Valin 103 in neun Arten identisch ist (Abb. 60). Veröffentlichte *in vitro* Charakterisierungen des V103I-Polymorphismus erfolgten im humanen MC4R (Gu et al., 1999; Ho and MacKenzie, 1999; Xiang et al., 2006). Wegen der Konservierung des Aminosäurerests und dem Ziel, die V103I-Variante in das Genom der Maus einzufügen, wurde die *in vitro* Phänotypisierung mit dem murinen Mc4r vollzogen.

Mensch	MVNST-HRGMHTSLHLNRS	SYRLHSNASESLGKGYSDGG	CYEQLFVSPFVFTLGVISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Ratte	MNSTH-HHGMYSLHLNRS	SHGLHGNASESLGKHSDGG	CYEQLFVSPFVFTLGVISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Maus	MNSTH-HHGMYSLHLNRS	SYGLHGNASESLGKHDPDG	CYEQLFVSPFVFTLGVISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Hund	MNSTL-QHGMHTSLHFNRS	TYGQHGNAESLGGKYPDGG	CYEQLFVSPFVFTLGVISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Schimpanse	MVNST-HRGMHTSLHLNRS	SYRLHSNASESLGKGYSDGG	CYEQLFVSPFVFTLGVISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Opposum	MNSTHYHGMHTSLHFNRS	-YVLHSSANDTIGKGYLDGG	CYEQLFVSPFVFTLGIISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Huhn	MNFTQ-HRGTLPQLHFNRS	N-GLHRGASEPSAKGHSSGG	CYEQLFVSPFVFTLGIISL	LENILVIVAIAKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGS
Krallenfr.	MNFTQ-HHEPHH-LHYRNRS	R-TVGAGANDTKKKGHSSGG	CYEQLFVSPFVFTLGIISL	MENILVIAAISRNKLNHSPM	YFFICSLAVADMVSVSNGF
Zebrafisch	MNTSH-HHGLHHS--FRNRS	QGALPVGKPSHGDRGSASG-	CYEQLLISTEITFLTLGLVSL	LENILVIAAIVKKNKLNHSPM	YFFICSLAVADLLVSVSNAS
					100
Mensch	ETIVHTLLN-STDTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIISCIWAAC	VSGILFIIYSDSSAVIICLI
Ratte	ETIVHTLLN-STDTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIISCIWAAC	VSGVLFIIYSDSSAVIICLI
Maus	ETIVHTLLN-STDTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIISCIWAAC	VSGVLFIIYSDSSAVIICLI
Hund	ETIVHTLLN-STDTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIISCIWAAC	VSGILFIIYSDSTAVIICLI
Schimpanse	ETIVHTLLN-GTDTAQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIISCIWAAC	VSGILFIIYSDSSAVIICLI
Opposum	ETIVHTLLN-STDTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIITCIWAAC	VSGILFIIYSDSSAVIICLI
Huhn	ETIVHTLLN-NTDQSF	VNIDNVIDSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIMTVKRVGIIITCIWAAC	VSGILFIIYSDSSAVIICLI
Krallenfr.	ETIVHTLFPN-TTDKNTQHI	VNVDNILDVSVICSSLLASIC	SLLSIAVDRYFTIFVALQYH	NIITVRRAVVITCIWTACS	ISGVLFIIYSDSAVVIICLI
Zebrafisch	ETIVMALITGGNLTNRESII	KNMDNVFDSMICSSLLASIC	SLLSIAVDRYITIFVALRYH	NIMTVKRVGIIITCIWTFCT	VSGVLFIVYSESTVTLICLI
					200
Mensch	TMFFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGAIROG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNLYLILIMCNSIID
Ratte	TMFFTMLVLMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGTIRQG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNLYLILIMCNAVID
Maus	SMFFTMLVLMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGTIRQG	TNMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNLYLILIMCNAVID
Hund	TMFFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGTIRQG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNLYLILIMCNSIID
Schimpanse	TMFFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGAIROG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNLYLILIMCNSIID
Opposum	TMFFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTGTIRQG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNFYLLILIMCNSIID
Huhn	SMFFTMLILMASLYVHMFM	ARMHIKRIAVLPGTGTIRQG	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNFYLLILIMCNSIID
Krallenfr.	SIIFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHIKRIAVLPGTNSVRGV	TNMKGAITLTILIGVFVVCW	SPFFLHLIFYISCPQNPYCV	CFMSHFNFYLLILIMCNSVID
Zebrafisch	SMFFTMLALMASLYVHMFLM	ARLHMKRIALPGENGIWQA	ANMKGAITLTILIGVFVVCW	APFFLHLILIMISCPQNPYCV	CFMSHFNMYLILIMCNSVID
					300
Mensch	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	CYPLGGCLDLSSRY-			
Ratte	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	FYPLGGICELPGRY-			
Maus	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	FYPLGGICELSSRY-			
Hund	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	CYPLGGCLDLSSRY-			
Schimpanse	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	CYPLGGCLDLSSRY-			
Opposum	PLIYALRSQELRKTFKEIIC	CYTLLGGPCDLAGRY-			
Huhn	PLIYAFRSQELRKTFKEIIC	CCNLRGLCDLPGKY-			
Krallenfr.	PLIYALRSQELRKTFKEMMC	CYCMS---MGKTFL			
Zebrafisch	PLIYAFRSQEMRKTFKEIIC	CWYG----LASLCV			

Abb. 60 Aminosäure-Alignment von MC4R-Orthologen. In „grün“ sind Aminosäurereste dargestellt, die in allen 9 Spezies identisch sind. Schwarz unterlegt sind die in dieser Arbeit charakterisierten Punktmutationen W16X und V103I.

*Erstellung von Dosis-Wirkungskurven mit den Agonisten α - und β -MSH *in vitro**

Aufgrund der negativen Assoziation des V103I-Allels mit Adipositas, wurde eine Funktionssteigerung für diese Variante vermutet. Es war kein Unterschied in der α - und β -MSH induzierten Rezeptoraktivität zwischen dem wildtypischen Mc4r und dem Mc4r-V103I zu beobachten: weder in den EC_{50} -Werten, noch in der maximalen Aktivierbarkeit waren genotypenspezifische Unterschiede zu verzeichnen. Diese Befunde stimmen mit Publikationen überein, in denen unter Verwendung verschiedener Agonisten keine Unterschiede zwischen der V103I-Variante und dem wildtypischen MC4R in Dosis-Wirkungsexperimenten festgestellt

wurden (Gu et al., 1999; Ho and MacKenzie, 1999; Xiang et al., 2006). Anders als in der vorliegenden Dissertation erfolgten die Versuche in den zitierten Arbeiten mit dem humanen MC4R. Aufgrund der Übereinstimmung der publizierten Ergebnisse mit den hier gewonnenen Daten wird deutlich, dass die *in vitro* Charakterisierung des V103I-Polymorphismus im Mc4r der Maus und im MC4R des Menschen vergleichbare Erkenntnisse bringt.

Charakterisierung der Basalaktivität von Mc4r-V103I in vitro

Mehrere Studien haben demonstriert, dass der MC4R eine Agonisten-unabhängige Aktivität aufweist und dass diese sogenannte Basalaktivität durch den inversen MC4R-Agonisten AGRP reduziert werden kann (Haskell-Luevano and Monck, 2001; Nijenhuis et al., 2001). In den hier gezeigten Experimenten konnten diese Befunde bestätigt werden. Dabei war die Agonisten-unabhängige Aktivität des Mc4r-V103I doppelt so hoch, wie die des wildtypischen Rezeptors. In zwei voneinander unabhängigen experimentellen Ansätzen konnte in dieser Arbeit erstmalig eine gesteigerte Basalaktivität des V103I-Polymorphismus identifiziert werden. Ein Unterschied in der Oberflächenexpression ist nicht die Ursache für diese Beobachtung, da in beiden Ansätzen die relative Rezeptormenge in der Zellmembran beider Varianten gleich war.

Die Bedeutung der Agonisten-unabhängigen Rezeptoraktivität für die Regulation des Energiehaushalts wird durch funktionelle Studien von N-Terminal lokalisierten MC4R-Mutationen verdeutlicht, die bislang nur in fettleibigen Probanden identifiziert worden sind: die Beeinträchtigung der basalen MC4R-Aktivität gegenüber dem wildtypischen MC4R wird als Beitrag für die Entstehung der Adipositas genannt (Srinivasan et al., 2004). Andere Beeinträchtigungen in der Agonisten vermittelten Rezeptoraktivierung und der Oberflächenexpression sind für diese N-terminalen Varianten nicht bekannt (Srinivasan et al., 2004). Aufgrund der positiven Assoziation dieser nur in ihrer Basalaktivität beeinträchtigten MC4R-Varianten mit Adipositas, liegt die Vermutung nahe, dass die Agonisten-unabhängige Basalaktivität essentiell für die Aufrechterhaltung der Energiebalance ist.

Wenn laut Shrinivasan et al. (2004) eine reduzierte Basalaktivität zur Entstehung von Fettleibigkeit beitragen kann, ist es durchaus denkbar, dass eine verstärkte anorexigene Wirkung durch eine gesteigerte Basalaktivität den protektiven Effekt des V103I-Polymorphismus vermittelt. Somit kann die hier beobachtete gesteigerte Agonisten-abhängige Rezeptoraktivität als funktionelle Erklärung für die negative Assoziation des V103I-Alles mit Adipositas dienen.

Die V103I-Mutation ist in der zweiten Transmembranhelix des MC4R lokalisiert. Die mögliche Bedeutung dieser Domäne in der Regulation der Basalaktivität wird durch die E92K-Punktmutation im Mc1r verdeutlicht (Robbins et al., 1993). Die Aminosäuresubstitution an diesem Glutamatrest in der zweiten Transmembranhelix führt im Mc1r zu einer dramatisch erhöhten basalen Rezeptoraktivität. Im murinen und humanen MC4R liegt der Glutamatrest an

Position 100 nahe dem V103I-Polymorphismus. Zudem ist dieser Glutamatrest in allen Melanocortin-Rezeptor Paralogen von Mensch und Maus konserviert (nicht gezeigte Alignments). Sollte dieser Glutamatrest auch im Mc4r für die Basalaktivität von Relevanz sein, könnte die geringe Entfernung der V103I-Mutation zu diesen Positionen auf Ebene der Aminosäuresequenz eine Erklärung für die gesteigerte Basalaktivität liefern. Trotz der Konservierung sind artspezifische Konsequenzen der V103I-Mutation im humanen und murinen MC4R auch für die Basalaktivität nicht auszuschließen. Studien bezüglich der Basalaktivität des humanen MC4R-V103I sind nicht publiziert.

Die Interpretation, dass eine erhöhte Basalaktivität protektiv gegenüber Übergewicht wirkt, wird durch die Identifizierung von MC4R-Varianten mit gesteigerter Basalaktivität in fettleibigen Menschen verzerrt. Die in adipösen Personen entdeckten Mutationen S127L und L250Q haben neben der erhöhten Basalaktivität auch signifikante Defekte in der α - und β -MSH-vermittelten Rezeptoraktivität (Hinney et al., 2003; Xiang et al., 2006; Proneth et al., 2006). Daher leistet bei diesen beiden Varianten wahrscheinlich die Störung der Agonisten-abhängigen MC4R-Aktivität den Beitrag zur Ausprägung der Fettleibigkeit und nicht die gesteigerte Basalaktivität.

Die in fettleibigen Probanden identifizierten Mutationen H158R und P230L zeigen ebenfalls eine erhöhte Basalaktivität. Hingegen scheint die Aktivierung dieser Varianten durch verschiedene MC4R-Agonisten nicht beeinträchtigt zu sein (Xiang et al., 2006; Hinney et al., 2006; Kim et al., 2008). Eine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich der Relevanz der Basalaktivität *in vivo* kann aufgrund der Literaturbefunde nicht gezogen werden, da MC4R-Mutanten mit einer gesteigerten wie auch einer reduzierten basalen Rezeptoraktivität in adipösen Menschen gefunden worden sind. Um herauszufinden, welche Wirkung eine gesteigerte Mc4r-Basalaktivität auf die Energiebalance hat, bieten sich Experimente mit der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie an.

4.5. *In vivo* Charakterisierung von Mc4r-V103I

Da der MC4R natürlicherweise im zentralen Nervensystem exprimiert wird und Cos7- und HEK293-Zellen ursprünglich von Nierenzellen abstammen, erfolgte die *in vitro* Phänotypisierung somit in einem heterologen System. Die verwendeten Zelllinien zeichnen sich durch eine einfache Handhabung und leichte Transfizierbarkeit aus. Alle publizierten Funktionsassays mit humanen MC4R-Varianten erfolgten im heterologen System: eine Vielzahl an Phänotypen konnte in diesen Zelllinien identifiziert werden. Ein Nachteil der heterologen Expression besteht darin, dass mögliche Interaktionspartner des Zielgens in der verwendeten Zelllinie nicht exprimiert werden. Denkbar wäre daher, dass insbesondere der Phänotyp einer Mc4r-Variante mit eher „subtilen“ Funktionsstörungen übersehen wird, weil für dessen Ausprägung (unbekannte) Neuronen-spezifische Komponenten notwendig sind. Zudem können entwicklungsbiologische Aspekte in Zellkultur nicht untersucht werden. Die Herstellung einer

Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie sollte diesen Umständen Abhilfe verschaffen. Durch die *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der Varianten wurde ein komplementärer Ansatz verfolgt, welcher die Identifizierung funktioneller Konsequenzen auf zellulärer und organismischer Ebene erlaubt. Durch diesen zweigleisigen Ansatz sollten die Vorteile von beiden Ansätzen vereinigt werden.

Die homologe Rekombination des Targetingvektors in embryonalen Stammzellen konnte mittels Southern Blot Analyse bestätigt werden. Durch PCR und Sequenzierung konnte die Anwesenheit der V103I-Mutation im Mc4r-Gen nachgewiesen werden. Nach erfolgreicher Keimbahntransmission des manipulierten ES-Klons war es möglich eine Zuchtkolonie zu etablieren, die für die primäre Phänotypisierung verwendet wurde. Die Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie ist das erste Tiermodell, das einen im Menschen identifizierten Polymorphismus mit bestätigtem polygenem Effekt für Adipositas trägt.

Bis dato sind die Phänotypisierungsdaten vorläufig, da nur mit einer kleinen Stichprobengröße die Experimente durchgeführt wurden. Im Körpergewichtsverlauf und in der kumulativen Nahrungsaufnahme waren keine Unterschiede zwischen den Genotypen ersichtlich. In beiden Geschlechtern war eine höhere Körpertemperatur in den homozygoten V103I-Allelträgern zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die Tiere mehr Energie für die Thermogenese aufwendeten. Zudem hatten Weibchen eine höhere Körpertemperatur als Männchen. Unveröffentlichte Daten (mit anderen Mauslinien) aus der Deutschen Mauslinik zeigen ebenfalls einen Geschlechtsunterschied in der Körpertemperatur, wodurch die Vertrauenswürdigkeit der eigenen Messungen bestärkt wird. Zudem zeigten Mc4r-Defiziente W16X *knockin* Mäuse eine tendenziell reduzierte Körpertemperatur, so dass eine potentielle Mc4r-Funktionsteigerung in V103I *knockin* Mäusen den gegenteiligen Effekt bewirken könnte.

Um den Effekt des V103I-Allels auf die Körpertemperatur zu validieren, bieten sich zukünftig Messungen mit implantierten Sendern an, um das Temperaturprofil über mehrere Tage bestimmen zu können. Körpertemperaturdaten von humanen V103I-Allelträgern stehen nicht zur Verfügung; jedoch wurde ein höherer Sauerstoffverbrauch für heterozygote V103I-Allelträger gemessen und als Erklärung für die negative Assoziation der Variante mit Adipositas vorgebracht (Rutanan et al., 2004). Folglich deuten die Temperaturmessungen der Mc4r-V103I *knockin* Linie und die Sauerstoffverbrauchsmessungen in dieselbe Richtung.

Unterschiede im Körpergewicht und der Energieaufnahme waren zwischen den verschiedenen Genotypen nicht zu beobachten, so dass ein identischer täglicher Energieverbrauch in den Wildtypen und den Mutanten anzunehmen ist. Obwohl die *knockin* Mutanten eine höhere Körpertemperatur hatten und mehr Energie für Thermogenese aufwendeten, wäre denkbar, dass die *knockin* Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen ihre lokomotorische Aktivität reduzieren oder an andere Stelle Einsparungen am Energieverbrauch vollziehen. Wildtypen und Mutanten hätten trotz einer „Umschichtung“ im Energiebudget einen identischen Energieverbrauch. Durch

Messungen des Sauerstoffverbrauchs und der Aktivität können künftig detailliertere Daten für den Energieverbrauch erhoben werden.

Trotz der geringen Tierzahl zeichnet sich bereits ab, dass – anders als bei der Mc4r-W16X *knockin* Linie - die V103I-Mutation keine so dramatischen Konsequenzen auf den Energiehaushalt hat. Aufgrund der geringen Effektstärke der humanen V103I-Variante bedurfte die Entdeckung der negativen Assoziation des Allels mit Adipositas einer Metaanalyse mit mehreren tausend Menschen (Geller et al., 2004). Die vorläufige Untersuchung der Mc4r-V103I *knockin* Linie hat keinen Gewichtsphänotypen zum Vorschein gebracht, so dass in Analogie zum Menschen möglicherweise eine viel größere Stichprobenzahl der Mauslinie charakterisiert werden muss, um Unterschiede zwischen den Genotypen zu identifizieren. Neben dem Vorteil die Mutation in homozygoter Form in den Mäusen zu charakterisieren, kann durch weiteres Rückkreuzen auf die Inzuchtlinie C57BL/6J ein - im Gegensatz zum Menschen - viel homogenerer genetischer Hintergrund erzeugt werden, vor dem die V103I-Mutation analysiert werden kann.

Möglicherweise offenbaren sich Effekte auf das Körpergewicht erst dann, wenn die Mc4r-V103I *knockin* Linie *challenge*-Experimenten unterzogen wird: die Verfütterung einer Hochfettdiät könnte z.B. aufdecken, ob homozygote Mc4r-V103I *knockin* Mäuse gegenüber den Wildtypen resistent gegenüber einer Diät-induzierten Adipositas sind. Längerfristig wäre es interessant, die Mutation in andere Mausstämmen einzukreuzen. Anbieten würden sich Linien mit genetisch bedingter Fettleibigkeit, wie beispielsweise Leptin-defiziente ob/ob Mäuse. Ob/ob-Mäuse haben eine reduzierte Körpertemperatur (DAVIS and MAYER, 1954; Trayhurn and James, 1978). Durch das Einkreuzen der V103I-Mutation könnte der Temperaturphänotyp der ob/ob-Linie wiederhergestellt werden, wodurch möglicherweise die drastische Fettleibigkeit partiell reduziert wird.

Neben weiteren Phänotypisierungsansätzen muss geklärt werden, ob die Mutagenese des Mc4r-Gens Auswirkungen auf die Genexpression hat. Durch eine Allel-spezifische qRT-PCR mit cDNA hergestellt aus heterozygoten Mutationsträgern kann überprüft werden, ob das *knockin* Allel eine veränderte Expression aufweist. Es kann bislang nicht ausgeschlossen werden, dass die im 3'-Bereich verbliebene loxP-Sequenz die Mc4r-Expression beeinflusst.

Aus den durchgeführten Tierexperimenten kann noch nicht gefolgert werden, ob die in Zellkultur entdeckte erhöhte Basalaktivität des Mc4r-V103I auch im *knockin* Mausmodell repräsentiert ist. Die Basalaktivität kann nur dann untersucht werden, wenn keine Agonisten bzw. keine inversen Agonisten die Rezeptoraktivität beeinflussen. Im Zellkulturversuch ist es einfach diese Bedingungen zu erzielen. Im Tiermodell wäre dies in *Pomc/Agrp*-defizienten Mäusen gegeben. Prinzipiell wäre die Zucht einer dreifachen Mausmutante möglich. Sollten vor diesem *knockout* Hintergrund Mäuse mit V103I-Genotyp im Vergleich zu wildtypischen Tieren beispielsweise ein geringeres Körpergewicht haben, wäre das ein Indikator für die metabolische Relevanz der im Zellkulturversuch beobachteten erhöhten Basalaktivität von Mc4r-V103I.

Alternativ zur aufwendigen Zucht einer dreifachen Mausmutantenlinie würde sich die pharmakologische Intervention mit SHU9119 in den Mc4r-V103I *knockin* Mäusen anbieten. SHU9119 ist ein klassischer kompetitiver Antagonist, der nicht als inverser Agonist wirkt und daher nach Bindung an den Rezeptor keinen Effekt auf die Basalaktivität ausübt (Chai et al., 2003). Die intracerebroventriculare (icv) Infusion von hohen Dosen SHU9119 würde die Bindung der endogenen Mc4r-Liganden *Agrp* und α -MSH blockieren. Die icv Infusion von SHU9119 führt zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (Fan et al., 1997). Obwohl SHU9119 den Mc4r blockiert, hätte dies keine Auswirkungen auf die Basalaktivität (Chai et al., 2003), so dass ein Unterschied in der Nahrungsaufnahme zwischen wildtypischen und Mc4r-V103I *knockin* Mäusen auf eine veränderte Basalaktivität zurückgeführt werden könnte. Sollte sich eine gesteigerte Basalaktivität als anorexigene Funktionssteigerung äußern, würde dies in den Mutanten die orexigene Wirkung von SHU9119 abmildern. Die genannten Experimente für die Charakterisierung der Basalaktivität sind zwar aufwendig, könnten aber helfen zu verstehen, welche Konsequenzen eine veränderte Agonisten-unabhängige Rezeptoraktivität *in vivo* hat (vgl. Abschnitt 4.3).

Die Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie erlaubt zum ersten Mal die *in vivo* Charakterisierung eines im Menschen identifizierten Allels mit geringer Effektstärke auf das Körpergewicht. Obwohl Mäuse als Modellsysteme für Stoffwechselstörungen wie Adipositas im Allgemeinen etabliert sind, sollte jedes neue Mausmodell dahingehend bewertet werden inwieweit Phänotypen zwischen Mensch und Maus übertragbar sind. Die Funktionsweise des Leptin-Melanocortinsystems ist in verschiedenen Spezies konserviert: die unter Absatz 1.3 beschriebenen Mechanismen der zentralnervösen Kontrolle des Energiehaushalts sind für Mensch und Maus gültig. Viele Erkenntnisse aus Mausmodellen lassen sich auf den Menschen übertragen. Ein Beispiel sind die deckungsgleichen Phänotypen von MC4R-defizienten Menschen und Mäusen (Huszar et al., 1997; Farooqi et al., 2003). Zudem beträgt die Protein-Identität des murinen und humanen Rezeptors 94 %. Die V103I-Aminosäuresubstitution findet an einer Position statt, welche in mehreren Spezies aus verschiedenen Tierklassen konserviert ist (Abb. 60). Diese Befunde bestärken die Annahme, dass die Untersuchung des V103I-Polymorphismus im Mc4r der Maus für den Menschen relevante Ergebnisse ergibt.

Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich eine Punktmutation artspezifisch auswirkt. Erst kürzlich publizierte Studien deuten an, dass im Menschen nicht α -MSH sondern β -MSH der primäre MC4R-Agonist ist (Biebermann et al., 2006). Anders als Menschen sind Nagetiere aufgrund einer fehlenden Schnittstelle im *Pomc* Vorläufermolekül nicht in der Lage β -MSH zu prozessieren (Bennett, 1986). Sollte im Menschen der protektive Effekt des V103I-Allels gegenüber Adipositas exklusiv durch β -MSH vermittelt werden, wäre das im Mausmodell nicht zu reproduzieren. Jedoch sind keine signifikanten Unterschiede in der β -MSH-

induzierbaren Aktivität zwischen dem wildtypischen MC4R und dem MC4R-V103I bekannt (Xiang et al., 2006), so dass dieser Punkt spekulativ bleibt.

Eine funktionelle Erklärung für die negative Assoziation des V103I-Allels mit Adipositas stammt von Xiang et al.: Konkurrenzexperimente mit AGRP und MTII haben *in vitro* gezeigt, dass AGRP als klassischer Antagonist weniger effektiv den MC4R-V103I im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor inhibieren kann (Xiang et al., 2006). Die reduzierte Hemmung des MC4R-V103I durch dieses orexigene Neuropeptid kann den protektiven Effekt des humanen Allels erklären. Dieser protektive Mechanismus ist nicht auf den Menschen beschränkt, sondern ist auch im Mc4r-V103I *knockin* Mausmodell möglich. Durch pharmakologische Manipulationen könnten die Eigenschaften von AGRP als kompetitiver Antagonist im *knockin* Mausmodell zusätzlich überprüft werden.

Die erhöhte Körpertemperatur der homozygoten V103I *knockin* Mäuse und der erhöhte Energieverbrauch von Menschen mit V103I-Allel deuten auf eine identische funktionelle Konsequenz der Punktmutation in beiden Spezies hin. Außerdem stimmen die *in vitro* Ergebnisse der Dosis-Wirkungsexperimente mit publizierten Befunden überein. Diese phänotypischen Ergebnisse unterstützen neben der Konservierung des Leptin-Melanocortinsystems und des Rezeptors selber, die Annahme, dass die hier vorgestellte Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie Erkenntnisse liefert, die auf den Menschen übertragen werden können.

4.6. Fazit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei im Menschen identifizierte MC4R-Punktmutationen *in vitro* und *in vivo* phänotypisiert. Die ausschließlich in adipösen Menschen entdeckte Nonsensemutation W16X verursachte einen totalen Funktionsverlust des Mc4r in einem Zellkultur-basierten System. Für die Charakterisierung der Mutation *in vivo* wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen eine Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie hergestellt. Die Mc4r-Defizienz der *knockin* Linie war Ursache für die Ausbildung einer drastischen Adipositas. Im Zellkulturversuch konnte durch das aminoglykosidische Antibiotikum G-418 eine partielle Wiederherstellung der Mc4r-Funktion erreicht werden. Aminoglykoside sind Nonsense-Suppressoren, die ein Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons während der Translation vermitteln können. Im Tiermodell war eine Reduktion der Adipositas durch die periphere Applikation von verschiedenen Nonsense-Suppressoren nicht erfolgreich. Vermutlich konnte aufgrund der geringen Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit keine ausreichend hohen Konzentrationen der Wirkstoffe im Hypothalamus erzielt werden, welche für eine Suppression der Mc4r-Stoppmutation notwendig wären. Nonsense-Suppressoren haben in verschiedenen *in vivo* Studien ein Überlesen von Stoppmutationen verursacht und konnten Krankheitsphänotypen lindern. In der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmalig die Anwendung von Nonsense-

Suppressoren an einem Mausmodell für Fettleibigkeit angewendet. Bisher publizierte Mc4r-defiziente Mauslinien erlauben diese Therapieform nicht, da nur die neu generierte *knockin* Linie exklusiv eine Stoppmutation im Mc4r-Gen trägt. Obwohl die Therapieansätze bis dato keine Reduktion der Adipositas herbeiführten, kann die Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie künftig einen Beitrag dazu leisten, Nonsense-Suppressoren als Behandlungsform von adipösen Phänotypen aufgrund von Stoppmutationen zu etablieren. Neben der MC4R-Mutation W16X wurden auch erste *in vitro* Experimente mit der Leptinvariante R105X durchgeführt. Diese Stoppmutation ist der Grund für die Leptindefizienz der *ob/ob*-Mauslinie. Auch hier war in Zellkultur eine Wiederherstellung von Leptin-R105X durch G-418 zu beobachten, so dass aufgrund der prinzipiellen Reaktivierbarkeit der Variante auch *ob/ob*-Mäuse für künftige Tierexperimente verwendet werden können.

Der V103I-Polymorphismus stellt die häufigste Variante im kodierenden Bereich des humanen MC4R-Gens dar. Im Gegensatz zu den meisten anderen MC4R-Mutationen, ist V103I negativ mit Adipositas assoziiert. Die *in vitro* Charakterisierung der V103I-Variante zeigte gegenüber dem wildtypischen Mc4r eine erhöhte Agonisten-unabhängige Basalaktivität. Dieser Phänotyp würde eine funktionelle Erklärung für den protektiven Effekt des Allels gegenüber Adipositas bieten. Die vorläufige Untersuchung einer Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie offenbarte keine Unterschiede im Körpergewicht und der täglichen Energieaufnahme zwischen den Wildtypen und den Mutanten. Es konnte aber gezeigt werden, dass homozygote Mutationsträger beider Geschlechter eine höhere Körpertemperatur aufwiesen, wodurch ein erhöhter Energieverbrauch für die Thermogenese vermutet werden kann.

In Humanstudien bedurfte die Entdeckung der negativen Assoziation des Allels mit Adipositas einer Metaanalyse mit mehreren tausend Probanden. Aufgrund der geringen Effektstärke des Allels ist es möglich, dass auch im Mausmodell eine viel größere Stichprobenzahl charakterisiert werden muss um Unterschiede zwischen den Genotypen zu identifizieren.

Die Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie stellt das erste Tiermodell dar, welches ein im Menschen entdecktes Allel mit polygenem Effekt für Adipositas trägt. Weitere Experimente mit der Mauslinie könnten dazu beitragen, die metabolischen Konsequenzen der V103I-Variante zu definieren. Insbesondere die Überprüfung der Basalaktivität des Rezeptors im Mausmodell könnte helfen zu verstehen wie dieser Agonisten-unabhängige Mechanismus den Energiehaushalt beeinflusst.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Anzahl adipöser (fettleibiger) Menschen weltweit enorm erhöht. Die Ursachen hierfür sind heterogen und multifaktoriell: Genvarianten, Umweltbedingungen und Verhaltensweisen werden als Faktoren für die Entstehung von Adipositas diskutiert. Durch Adipositas steigt das Risiko an Diabetes mellitus Typ II, Herz-/Kreislaufstörungen und bestimmten Krebsformen zu erkranken.

Das Körpergewicht wird durch ein komplexes neuronales Netzwerk reguliert. Von essentieller Bedeutung für dieses System ist der Leptin-Melanocortin-Signalweg des Zentralnervensystems. Mutationen, welche zu Funktionsverlusten in einzelnen anorexigenen Komponenten dieses Regelkreises führen, bringen die Energiebalance aus dem Gleichgewicht und haben drastische Konsequenzen auf das Körpergewicht. Eine Komponente ist dabei der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R). Dieser G-Protein gekoppelte Rezeptor wird überwiegend im Hypothalamus exprimiert und vermittelt nach Aktivierung u.a. eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und eine Steigerung des Energieverbrauchs. Etwa 5% der monogenen Adipositasfälle werden auf funktionsrelevante Mutationen im MC4R-Gen zurückgeführt.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten zwei im MC4R-Gen des Menschen identifizierte Punktmutationen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Die Stoppmutation W16X wurde bisher nur in fettleibigen Individuen nachgewiesen. Wie andere MC4R-Stoppmutationen auch, hat W16X eine drastische Effektstärke auf das Körpergewicht und wird als monogene Ursache für Fettleibigkeit betrachtet. Anders als die Vielzahl an MC4R-Mutationen zeigt das V103I-Allel hingegen eine negative Assoziation mit Adipositas, d.h. die Mutation findet sich vorwiegend in normalgewichtigen Personen wieder. Der Effekt von V103I auf das Körpergewicht ist - wie für Genvarianten mit polygenen Effekten charakteristisch - vergleichsweise gering.

Die Charakterisierung der beiden Varianten erfolgte im Mc4r der Maus. Die Zellkultur-basierte Phänotypisierung zeigte zunächst eine totale Funktionsbeeinträchtigung der Mc4r-W16X Variante. Es konnte keine Lokalisation in der Plasmamembran detektiert werden. Dementsprechend war es nicht möglich die Signaltransduktion mit dem Mc4r-Agonisten α -MSH (Melanocyten-stimulierendes Hormon) anzuschalten. Erst die Behandlung der Zellkulturen mit dem Aminoglykosid G-418 bewirkte eine partielle Reaktivierung der Mc4r-W16X Funktionalität: die Oberflächen-Expression wie auch die α -MSH-abhängige Aktivierbarkeit konnten durch G-418 wiederhergestellt werden. Aminoglykoside wirken als Nonsense-Suppressoren, indem sie die Genauigkeit während der Proteinbiosynthese reduzieren und dadurch das Überlesen von vorzeitigen Stoppkodons induzieren. Somit kam es in Anwesenheit von G-418 trotz der W16X-

Mutation zur Synthese des Rezeptors in voller Länge, welcher wieder teilweise funktionstüchtig war.

Die *in vitro* Charakterisierung ergab keinen Unterschied in der α - und β -MSH vermittelten Aktivität sowie in der Oberflächen-Expression zwischen dem wildtypischen Mc4r und dem Mc4r-V103I. Es konnte aber ein Unterschied in der Agonisten-unabhängigen Basalaktivität identifiziert werden. Die gesteigerte Basalaktivität des Mc4r-V103I bietet eine funktionelle Erklärung für den protektiven Effekt des Allels gegenüber Adipositas an.

Durch die Herstellung von zwei *knockin* Mauslinien durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen (*gene targeting*) war es möglich die beiden Mutationen im Tiermodell zu untersuchen. Die erfolgreiche Integration der Punktmutationen in die genomische DNA konnte durch Southern Blot und Sequenzierung bestätigt werden. Mc4r-W16X *knockin* Mäuse zeigten einen stark ausgeprägten adipösen Phänotyp, charakterisiert durch eine erhöhte Fettmasse, Hyperphagie und ein gesteigertes Längenwachstum. Eine tendenziell niedrigere Körpertemperatur konnte bei den *knockin* Mäusen beobachtet werden. Zudem war die hypothalamische Expression von Genen, welche in die Regulation des Energiehaushalts involviert sind, in den Mutanten alteriert. Anders als im Zellkulturansatz bewirkte die subkutane Anwendung von verschiedenen Nonsense-Suppressoren *in vivo* keine Wiederherstellung der Mc4r-W16X Funktion. Eine Reduktion der Adipositas war vermutlich aufgrund der geringen Verfügbarkeit der Substanzen in Mc4r-exprimierenden Arealen des Zentralnervensystems nicht möglich. Wahrscheinlich war hierfür die geringe Bluthirnschrankengängigkeit der getesteten Wirkstoffe ursächlich. Weiterführende Experimente mit der Mc4r-W16X *knockin* Mauslinie können helfen eine auf Nonsense-Suppressoren basierende Therapie für bestimmte (auf Stoppmutationen beruhende) Adipositasfälle zu optimieren bzw. zu etablieren. Bislang publizierte Mc4r-defiziente Linien erlauben diese Therapieoption nicht.

Die Phänotypisierung der Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie zeigte keine Unterschiede im Körpergewicht und der täglichen Energieaufnahme zwischen den Wildtypen und den *knockin* Mutanten. Es konnte aber demonstriert werden, dass homozygote Mutationsträger beider Geschlechter eine höhere Körpertemperatur aufwiesen, wodurch ein erhöhter Energieverbrauch für die Thermogenese vermutet werden kann. Die Mc4r-V103I *knockin* Mauslinie stellt das erste Mausmodell dar, welches einen im Menschen identifizierten Polymorphismus mit polygenem Effekt auf das Körpergewicht trägt. Weiterführende Experimente können dazu beitragen zu verstehen, in welcher Weise das V103I-Allel auf den Metabolismus der Mauslinie wirkt.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Adan,R.A., Tiesjema,B., Hillebrand,J.J., la Fleur,S.E., Kas,M.J., and de,K.M. (2006). The MC4 receptor and control of appetite. *Br. J Pharmacol.* 149, 815-827.

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

Archer,Z.A., Rayner,D.V., Duncan,J.S., Bell,L.M., and Mercer,J.G. (2005). Introduction of a high-energy diet acutely up-regulates hypothalamic cocaine and amphetamine-regulated transcript, Mc4R and brown adipose tissue uncoupling protein-1 gene expression in male Sprague-Dawley rats. *J Neuroendocrinol.* 17, 10-17.

Auld,D.S., Thorne,N., Maguire,W.F., and Inglese,J. (2009). Mechanism of PTC124 activity in cell-based luciferase assays of nonsense codon suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 3585-3590.

Balthasar,N., Dalgaard,L.T., Lee,C.E., Yu,J., Funahashi,H., Williams,T., Ferreira,M., Tang,V., McGovern,R.A., Kenny,C.D., Christiansen,L.M., Edelstein,E., Choi,B., Boss,O., Aschkenasi,C., Zhang,C.Y., Mountjoy,K., Kishi,T., Elmquist,J.K., and Lowell,B.B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493-505.

Barling,R.W. and Selkon,J.B. (1978). The penetration of antibiotics into cerebrospinal fluid and brain tissue. *J Antimicrob. Chemother.* 4, 203-227.

Barsh,G.S., Ollmann,M.M., Wilson,B.D., Miller,K.A., and Gunn,T.M. (1999). Molecular pharmacology of Agouti protein in vitro and in vivo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 885, 143-152.

Barton-Davis,E.R., Cordier,L., Shoturma,D.I., Leland,S.E., and Sweeney,H.L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin. Invest* 104, 375-381.

Batterham,R.L., Cowley,M.A., Small,C.J., Herzog,H., Cohen,M.A., Dakin,C.L., Wren,A.M., Brynes,A.E., Low,M.J., Ghatei,M.A., Cone,R.D., and Bloom,S.R. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650-654.

Bennett,H.P. (1986). Biosynthetic fate of the amino-terminal fragment of pro-opiomelanocortin within the intermediate lobe of the mouse pituitary. *Peptides* 7, 615-622.

Bessesen,D.H. (2008). Update on obesity. *J Clin. Endocrinol. Metab* 93, 2027-2034.

Biebermann,H., Castaneda,T.R., van,L.F., von,D.A., Escher,F., Brabant,G., Hebebrand,J., Hinney,A., Tschop,M.H., Gruters,A., and Krude,H. (2006). A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab* 3, 141-146.

Bonetti,B., Fu,L., Moon,J., and Bedwell,D.M. (1995). The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol. Biol.* 251, 334-345.

- Briedis,D.J. and Robson,H.G. (1978). Cerebrospinal fluid penetration of amikacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *13*, 1042-1043.
- Brocke,K.S., Neu-Yilik,G., Gehring,N.H., Hentze,M.W., and Kulozik,A.E. (2002). The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 331-335.
- Bruckner,O., Alexander,M., and Martens,F. (1980). [Gentamicin concentrations in cerebrospinal fluid of patients with inflamed and uninflamed meninges (author's transl)]. *Infection* *8*, 86-89.
- Brumm, H. (2008). Aminoglykosid-induzierte Wiederherstellung der Signaltransduktion von Melanocortin-4-Rezeptoren mit prä-matur terminierendem Stoppcodon. (Dissertation, FU Berlin).
- Bruning,J.C., Gautam,D., Burks,D.J., Gillette,J., Schubert,M., Orban,P.C., Klein,R., Krone,W., Muller-Wieland,D., and Kahn,C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* *289*, 2122-2125.
- Bultman,S.J., Michaud,E.J., and Woychik,R.P. (1992). Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* *71*, 1195-1204.
- Buono,P., Pasanisi,F., Nardelli,C., Ieno,L., Capone,S., Liguori,R., Finelli,C., Oriani,G., Contaldo,F., and Sacchetti,L. (2005). Six novel mutations in the proopiomelanocortin and melanocortin receptor 4 genes in severely obese adults living in southern Italy. *Clin. Chem.* *51*, 1358-1364.
- Burke,J.F. and Mogg,A.E. (1985). Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res.* *13*, 6265-6272.
- Carro,E., Senaris,R.M., Seoane,L.M., Frohman,L.A., Arimura,A., Casanueva,F.F., and Dieguez,C. (1999). Role of growth hormone (GH)-releasing hormone and somatostatin on leptin-induced GH secretion. *Neuroendocrinology* *69*, 3-10.
- Castle,W.E. and Little,C.C. (1910). ON A MODIFIED MENDELIAN RATIO AMONG YELLOW MICE. *Science* *32*, 868-870.
- Chai,B.X., Neubig,R.R., Millhauser,G.L., Thompson,D.A., Jackson,P.J., Barsh,G.S., Dickinson,C.J., Li,J.Y., Lai,Y.M., and Gantz,I. (2003). Inverse agonist activity of agouti and agouti-related protein. *Peptides* *24*, 603-609.
- Chen,A.S., Metzger,J.M., Trumbauer,M.E., Guan,X.M., Yu,H., Frazier,E.G., Marsh,D.J., Forrest,M.J., Gopal-Truter,S., Fisher,J., Camacho,R.E., Strack,A.M., Mellin,T.N., MacIntyre,D.E., Chen,H.Y., and Van der Ploeg,L.H. (2000). Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res.* *9*, 145-154.
- Cheung,C.C., Clifton,D.K., and Steiner,R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* *138*, 4489-4492.
- Clement,K., Vaisse,C., Lahlou,N., Cabrol,S., Pelloux,V., Cassuto,D., Gormelen,M., Dina,C., Chambaz,J., Lacorte,J.M., Basdevant,A., Bougneres,P., Lebouc,Y., Froguel,P., and Guy-Grand,B. (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* *392*, 398-401.

- Cowley,M.A., Pronchuk,N., Fan,W., Dinulescu,D.M., Colmers,W.F., and Cone,R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155-163.
- Cowley,M.A., Smart,J.L., Rubinstein,M., Cerdan,M.G., Diano,S., Horvath,T.L., Cone,R.D., and Low,M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480-484.
- Cummings,D.E., Weigle,D.S., Frayo,R.S., Breen,P.A., Ma,M.K., Dellinger,E.P., and Purnell,J.Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 346, 1623-1630.
- DAVIES,J., GILBERT,W., and GORINI,L. (1964a). STREPTOMYCIN, SUPPRESSION, AND THE CODE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 883-890.
- DAVIES,J., GILBERT,W., and GORINI,L. (1964b). STREPTOMYCIN, SUPPRESSION, AND THE CODE. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 51, 883-890.
- DAVIS,T.R. and MAYER,J. (1954). Imperfect homeothermia in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome of mice. *Am. J Physiol* 177, 222-226.
- Dempfle,A., Hinney,A., Heinzl-Gutenbrunner,M., Raab,M., Geller,F., Gudermann,T., Schafer,H., and Hebebrand,J. (2004). Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med. Genet.* 41, 795-800.
- Du,M., Keeling,K.M., Fan,L., Liu,X., and Bedwell,D.M. (2009). Poly-L-aspartic acid enhances and prolongs gentamicin-mediated suppression of the CFTR-G542X mutation in a cystic fibrosis mouse model. *J Biol. Chem.* 284, 6885-6892.
- Du,M., Keeling,K.M., Fan,L., Liu,X., Kovacs,T., Sorscher,E., and Bedwell,D.M. (2006). Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J Mol. Med.* 84, 573-582.
- Du,M., Liu,X., Welch,E.M., Hirawat,S., Peltz,S.W., and Bedwell,D.M. (2008). PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 2064-2069.
- Dumond,H., Presle,N., Terlain,B., Mainard,D., Loeuille,D., Netter,P., and Pottie,P. (2003). Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 3118-3129.
- Dumont,L.M., Wu,C.S., Aschkenasi,C.J., Elmquist,J.K., Lowell,B.B., and Mountjoy,K.G. (2001). Mouse melanocortin-4 receptor gene 5'-flanking region imparts cell specific expression in vitro. *Mol. Cell Endocrinol.* 184, 173-185.
- Echwald,S.M., Sorensen,T.I., Andersen,T., Tybjaerg-Hansen,A., Clausen,J.O., and Pedersen,O. (1999). Mutational analysis of the proopiomelanocortin gene in Caucasians with early onset obesity. *Int. J Obes. Relat Metab Disord.* 23, 293-298.
- Eipper,B.A. and Mains,R.E. (1980). Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr. Rev.* 1, 1-27.
- Elmquist,J.K., Ahima,R.S., Maratos-Flier,E., Flier,J.S., and Saper,C.B. (1997). Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. *Endocrinology* 138, 839-842.
-

- Emond, M., Schwartz, G.J., Ladenheim, E.E., and Moran, T.H. (1999). Central leptin modulates behavioral and neural responsiveness to CCK. *Am. J Physiol* 276, R1545-R1549.
- Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.
- Fan, W., Dinulescu, D.M., Butler, A.A., Zhou, J., Marks, D.L., and Cone, R.D. (2000). The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141, 3072-3079.
- Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T., and O'Rahilly, S. (2003). Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J Med.* 348, 1085-1095.
- Farooqi, I.S. and O'Rahilly, S. (2004). Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 409-424.
- Farooqi, I.S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J.M., Lank, E., Bottomley, B., Lopez-Fernandez, J., Ferraz-Amaro, I., Dattani, M.T., Ercan, O., Myhre, A.G., Retterstol, L., Stanhope, R., Edge, J.A., McKenzie, S., Lessan, N., Ghodsi, M., De, R., V, Perna, F., Fontana, S., Barroso, I., Undlien, D.E., and O'Rahilly, S. (2007). Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N. Engl. J Med.* 356, 237-247.
- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheetham, T., and O'Rahilly, S. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin. Invest* 106, 271-279.
- Gantz, I. and Fong, T.M. (2003). The melanocortin system. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 284, E468-E474.
- Gat-Yablonski, G. and Phillip, M. (2008). Leptin and regulation of linear growth. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab Care* 11, 303-308.
- Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., Siffert, W., Platzer, M., Hess, C., Gudermann, T., Biebermann, H., Wichmann, H.E., Schafer, H., Hinney, A., and Hebebrand, J. (2004). Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 572-581.
- Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., Galvanovskis, J., Rorsman, P., Robins, P., Prieur, X., Coll, A.P., Ma, M., Jovanovic, Z., Farooqi, I.S., Sedgwick, B., Barroso, I., Lindahl, T., Ponting, C.P., Ashcroft, F.M., O'Rahilly, S., and Schofield, C.J. (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469-1472.
- Gibbs, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 84, 488-495.
- Gibson, W.T., Farooqi, I.S., Moreau, M., DePaoli, A.M., Lawrence, E., O'Rahilly, S., and Trussell, R.A. (2004). Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Delta133G mutation: report of another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *J Clin. Endocrinol. Metab* 89, 4821-4826.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breining, J., and Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143, 239-246.

- Grosse,J., Tarnow,P., Rompler,H., Schneider,B., Sedlmeier,R., Huffstadt,U., Korthaus,D., Nehls,M., Wattler,S., Schoneberg,T., Biebermann,H., and Augustin,M. (2006). N-ethyl-N-nitrosourea-based generation of mouse models for mutant G protein-coupled receptors. *Physiol Genomics* 26, 209-217.
- Gu,W., Tu,Z., Kleyn,P.W., Kissebah,A., Duprat,L., Lee,J., Chin,W., Maruti,S., Deng,N., Fisher,S.L., Franco,L.S., Burn,P., Yagaloff,K.A., Nathan,J., Heymsfield,S., Albu,J., Pi-Sunyer,F.X., and Allison,D.B. (1999). Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48, 635-639.
- Hagg,T. (2007). Intracerebral infusion of neurotrophic factors. *Methods Mol. Biol.* 399, 167-180.
- Hakansson,M.L., Hulting,A.L., and Meister,B. (1996). Expression of leptin receptor mRNA in the hypothalamic arcuate nucleus--relationship with NPY neurones. *Neuroreport* 7, 3087-3092.
- Haskell-Luevano,C. and Monck,E.K. (2001). Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul. Pept.* 99, 1-7.
- Haskell-Luevano,C., Schaub,J.W., Andreasen,A., Haskell,K.R., Moore,M.C., Koerper,L.M., Rouzaud,F., Baker,H.V., Millard,W.J., Walter,G., Litherland,S.A., and Xiang,Z. (2009). Voluntary exercise prevents the obese and diabetic metabolic syndrome of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. *FASEB J* 23, 642-655.
- Hebebrand,J. and Hinney,A. (2009). Environmental and genetic risk factors in obesity. *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.* 18, 83-94.
- Heid,I.M., Vollmert,C., Hinney,A., Doring,A., Geller,F., Lowel,H., Wichmann,H.E., Illig,T., Hebebrand,J., and Kronenberg,F. (2005). Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J. Med. Genet.* 42, e21.
- Heijboer,A.C., van den Hoek,A.M., Pijl,H., Voshol,P.J., Havekes,L.M., Romijn,J.A., and Corssmit,E.P. (2005). Intracerebroventricular administration of melanotan II increases insulin sensitivity of glucose disposal in mice. *Diabetologia* 48, 1621-1626.
- Hentze,M.W. and Kulozik,A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.
- Hermann,T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches. *Cell Mol. Life Sci.* 64, 1841-1852.
- Hinney,A., Bettecken,T., Tarnow,P., Brumm,H., Reichwald,K., Lichtner,P., Scherag,A., Nguyen,T.T., Schlumberger,P., Rief,W., Vollmert,C., Illig,T., Wichmann,H.E., Schafer,H., Platzer,M., Biebermann,H., Meitinger,T., and Hebebrand,J. (2006). Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin. Endocrinol. Metab* 91, 1761-1769.
- Hinney,A., Hohmann,S., Geller,F., Vogel,C., Hess,C., Wermter,A.K., Brokamp,B., Goldschmidt,H., Siegfried,W., Remschmidt,H., Schafer,H., Gudermann,T., and 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.
- Hinney,A., Schmidt,A., Nottebom,K., Heibult,O., Becker,I., Ziegler,A., Gerber,G., Sina,M., Gorg,T., Mayer,H., Siegfried,W., Fichter,M., Remschmidt,H., and 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.

Hirawat,S., Welch,E.M., Elfring,G.L., Northcutt,V.J., Paushkin,S., Hwang,S., Leonard,E.M., Almstead,N.G., Ju,W., Peltz,S.W., and Miller,L.L. (2007). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* *47*, 430-444.

Ho,G. and MacKenzie,R.G. (1999). Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol. Chem.* *274*, 35816-35822.

Hoggard,N., Rayner,D.V., Johnston,S.L., and Speakman,J.R. (2004). Peripherally administered [Nle⁴,D-Phe⁷]-alpha-melanocyte stimulating hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti-related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and ob/ob mice. *J Mol. Endocrinol.* *33*, 693-703.

Holder,J.L., Jr., Butte,N.F., and Zinn,A.R. (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 101-108.

Huszar,D., Lynch,C.A., Fairchild-Huntress,V., Dunmore,J.H., Fang,Q., Berkemeier,L.R., Gu,W., Kesterson,R.A., Boston,B.A., Cone,R.D., Smith,F.J., Campfield,L.A., Burn,P., and Lee,F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131-141.

Hutchin,T. and Cortopassi,G. (1994). Proposed molecular and cellular mechanism for aminoglycoside ototoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *38*, 2517-2520.

INGALLS,A.M., DICKIE,M.M., and SNELL,G.D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* *41*, 317-318.

Jackson,R.S., Creemers,J.W., Farooqi,I.S., Raffin-Sanson,M.L., Varro,A., Dockray,G.J., Holst,J.J., Brubaker,P.L., Corvol,P., Polonsky,K.S., Ostrega,D., Becker,K.L., Bertagna,X., Hutton,J.C., White,A., Dattani,M.T., Hussain,K., Middleton,S.J., Nicole,T.M., Milla,P.J., Lindley,K.J., and O'Rahilly,S. (2003). Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin. Invest* *112*, 1550-1560.

Jackson,R.S., Creemers,J.W., Ohagi,S., Raffin-Sanson,M.L., Sanders,L., Montague,C.T., Hutton,J.C., and O'Rahilly,S. (1997). Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat. Genet.* *16*, 303-306.

Juillerat-Jeanneret,L. (2008). The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov. Today* *13*, 1099-1106.

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

Kennedy,G.C. (1953). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *140*, 578-596.

Kerem,E., Hirawat,S., Armoni,S., Yaakov,Y., Shoseyov,D., Cohen,M., Nissim-Rafinia,M., Blau,H., Rivlin,J., Aviram,M., Elfring,G.L., Northcutt,V.J., Miller,L.L., Kerem,B., and

- Wilschanski,M. (2008). Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372, 719-727.
- Kim,D.H., Shin,S.W., and Baik,J.H. (2008). Role of third intracellular loop of the melanocortin 4 receptor in the regulation of constitutive activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 439-445.
- Kojima,M. and Kangawa,K. (2002). Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 665-668.
- Kopelman,P. (2007). Health risks associated with overweight and obesity. *Obes. Rev.* 8 *Suppl* 1, 13-17.
- Kopelman,P.G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature* 404, 635-643.
- Korbonits,M., Trainer,P.J., Little,J.A., Edwards,R., Kopelman,P.G., Besser,G.M., Svec,F., and Grossman,A.B. (1997). Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 46, 751-757.
- Korner,J., Savontaus,E., Chua,S.C., Jr., Leibel,R.L., and Wardlaw,S.L. (2001). Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 13, 959-966.
- Krawczak,M., Ball,E.V., Fenton,I., Stenson,P.D., Abeyasinghe,S., Thomas,N., and Cooper,D.N. (2000). Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum. Mutat.* 15, 45-51.
- Krude,H., Biebermann,H., Luck,W., Horn,R., Brabant,G., and Gruters,A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 19, 155-157.
- Krude,H., Biebermann,H., Schnabel,D., Tansek,M.Z., Theunissen,P., Mullis,P.E., and Gruters,A. (2003). Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin. Endocrinol. Metab* 88, 4633-4640.
- Kublaoui,B.M., Holder,J.L., Jr., Gemelli,T., and Zinn,A.R. (2006a). *Sim1* haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol. Endocrinol.* 20, 2483-2492.
- Kublaoui,B.M., Holder,J.L., Jr., Tolson,K.P., Gemelli,T., and Zinn,A.R. (2006b). *SIM1* overexpression partially rescues *agouti* yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake. *Endocrinology* 147, 4542-4549.
- La Rocca,P.T., Baker,F., Frantz,J.D., Szot,R.J., Black,H.E., and Schwartz,E. (1985). Skin and mucous membrane ulceration in beagle dogs following oral dosing with an experimental aminoglycoside antibiotic. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5, 986-990.
- Larsen,L.H., Echwald,S.M., Sorensen,T.I., Andersen,T., Wulff,B.S., and Pedersen,O. (2005). Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin. Endocrinol. Metab* 90, 219-224.
- Li,Z., Zhou,Y., Carter-Su,C., Myers,M.G., Jr., and Rui,L. (2007). SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 21, 2270-2281.

- Lin,H.C. and Chey,W.Y. (2003). Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul. Pept.* 114, 131-135.
- Loos,R.J., Lindgren,C.M., Li,S., Wheeler,E., Zhao,J.H., Prokopenko,I., Inouye,M., Freathy,R.M., Attwood,A.P., Beckmann,J.S., Berndt,S.I., Jacobs,K.B., Chanock,S.J., Hayes,R.B., Bergmann,S., Bennett,A.J., Bingham,S.A., Bochud,M., Brown,M., Cauchi,S., Connell,J.M., Cooper,C., Smith,G.D., Day,I., Dina,C., De,S., Dermitzakis,E.T., Doney,A.S., Elliott,K.S., Elliott,P., Evans,D.M., Sadaf,F., I, Froguel,P., Ghorji,J., Groves,C.J., Gwilliam,R., Hadley,D., Hall,A.S., Hattersley,A.T., Hebebrand,J., Heid,I.M., Lamina,C., Gieger,C., Illig,T., Meitinger,T., Wichmann,H.E., Herrera,B., Hinney,A., Hunt,S.E., Jarvelin,M.R., Johnson,T., Jolley,J.D., Karpe,F., Keniry,A., Khaw,K.T., Luben,R.N., Mangino,M., Marchini,J., McArdle,W.L., McGinnis,R., Meyre,D., Munroe,P.B., Morris,A.D., Ness,A.R., Neville,M.J., Nica,A.C., Ong,K.K., O'Rahilly,S., Owen,K.R., Palmer,C.N., Papadakis,K., Potter,S., Pouta,A., Qi,L., Randall,J.C., Rayner,N.W., Ring,S.M., Sandhu,M.S., Scherag,A., Sims,M.A., Song,K., Soranzo,N., Speliotes,E.K., Syddall,H.E., Teichmann,S.A., Timpson,N.J., Tobias,J.H., Uda,M., Vogel,C.I., Wallace,C., Waterworth,D.M., Weedon,M.N., Willer,C.J., Wraight, Yuan,X., Zeggini,E., Hirschhorn,J.N., Strachan,D.P., Ouwehand,W.H., Caulfield,M.J., Samani,N.J., Frayling,T.M., Vollenweider,P., Waeber,G., Mooser,V., Deloukas,P., McCarthy,M.I., Wareham,N.J., Barroso,I., Jacobs,K.B., Chanock,S.J., Hayes,R.B., Lamina,C., Gieger,C., Illig,T., Meitinger,T., Wichmann,H.E., Kraft,P., Hankinson,S.E., Hunter,D.J., Hu,F.B., Lyon,H.N., Voight,B.F., Ridderstrale,M., Groop,L., Scheet,P., Sanna,S., Abecasis,G.R., Albai,G., Nagaraja,R., Schlessinger,D., Jackson,A.U., Tuomilehto,J., Collins,F.S., Boehnke,M., and Mohlke,K.L. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* 40, 768-775.
- Lubrano-Berthelie,C., Dubern,B., Lacorte,J.M., Picard,F., Shapiro,A., Zhang,S., Bertrais,S., Hercberg,S., Basdevant,A., Clement,K., and Vaisse,C. (2006). Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin. Endocrinol. Metab* 91, 1811-1818.
- Lykouras,L. (2008). Psychological profile of obese patients. *Dig. Dis.* 26, 36-39.
- Maffei,M., Halaas,J., Ravussin,E., Pratley,R.E., Lee,G.H., Zhang,Y., Fei,H., Kim,S., Lallone,R., Ranganathan,S., and . (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* 1, 1155-1161.
- Manuvakhova,M., Keeling,K., and Bedwell,D.M. (2000). Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA.* 6, 1044-1055.
- Maquat,L.E. and Li,X. (2001). Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA.* 7, 445-456.
- Marsh,D.J., Hollopeter,G., Huszar,D., Laufer,R., Yagaloff,K.A., Fisher,S.L., Burn,P., and Palmiter,R.D. (1999). Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet.* 21, 119-122.
- Marti,A., Corbalan,M.S., Forga,L., Martinez,J.A., Hinney,A., and Hebebrand,J. (2003). A novel nonsense mutation in the melanocortin-4 receptor associated with obesity in a Spanish population. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27, 385-388.

- Martin,N.M., Houston,P.A., Patterson,M., Sajedi,A., Carmignac,D.F., Ghatei,M.A., Bloom,S.R., and Small,C.J. (2006). Abnormalities of the somatotrophic axis in the obese agouti mouse. *Int. J. Obes. (Lond)* 30, 430-438.
- Meehan,T.P., Tabeta,K., Du,X., Woodward,L.S., Firozi,K., Beutler,B., and Justice,M.J. (2006). Point mutations in the melanocortin-4 receptor cause variable obesity in mice. *Mamm. Genome* 17, 1162-1171.
- Mercer,J.G., Hoggard,N., Williams,L.M., Lawrence,C.B., Hannah,L.T., Morgan,P.J., and Trayhurn,P. (1996). Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 8, 733-735.
- Mingeot-Leclercq,M.P. and Tulkens,P.M. (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1003-1012.
- Mizuno,T.M., Kleopoulos,S.P., Bergen,H.T., Roberts,J.L., Priest,C.A., and Mobbs,C.V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47, 294-297.
- Montague,C.T., Farooqi,I.S., Whitehead,J.P., Soos,M.A., Rau,H., Wareham,N.J., Sewter,C.P., Digby,J.E., Mohammed,S.N., Hurst,J.A., Cheetham,C.H., Earley,A.R., Barnett,A.H., Prins,J.B., and O'Rahilly,S. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903-908.
- Mort,M., Ivanov,D., Cooper,D.N., and Chuzhanova,N.A. (2008). A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* 29, 1037-1047.
- Morton,G.J., Blevins,J.E., Williams,D.L., Niswender,K.D., Gelling,R.W., Rhodes,C.J., Baskin,D.G., and Schwartz,M.W. (2005). Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J Clin. Invest* 115, 703-710.
- Morton,G.J., Cummings,D.E., Baskin,D.G., Barsh,G.S., and Schwartz,M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289-295.
- Mountjoy,K.G., Mortrud,M.T., Low,M.J., Simerly,R.B., and Cone,R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298-1308.
- Nijenhuis,W.A., Oosterom,J., and Adan,R.A. (2001). AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol. Endocrinol.* 15, 164-171.
- Nudelman,I., Rebibo-Sabbah,A., Cherniavsky,M., Belakhov,V., Hainrichson,M., Chen,F., Schacht,J., Pilch,D.S., Ben-Yosef,T., and Baasov,T. (2009). Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *J Med. Chem.* 52, 2836-2845.
- Obici,S., Feng,Z., Morgan,K., Stein,D., Karkanas,G., and Rossetti,L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271-275.
- Ollmann,M.M., Wilson,B.D., Yang,Y.K., Kerns,J.A., Chen,Y., Gantz,I., and Barsh,G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.
- Padwal,R.S. and Majumdar,S.R. (2007). Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *Lancet* 369, 71-77.
-

- Palmer,E., Wilhelm,J.M., and Sherman,F. (1979). Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277, 148-150.
- Pardridge,W.M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2, 3-14.
- Prior,T.W., Bartolo,C., Pearl,D.K., Papp,A.C., Snyder,P.J., Sedra,M.S., Burghes,A.H., and Mendell,J.R. (1995). Spectrum of small mutations in the dystrophin coding region. *Am. J Hum. Genet.* 57, 22-33.
- Proneth,B., Xiang,Z., Pogozeva,I.D., Litherland,S.A., Gorbatyuk,O.S., Shaw,A.M., Millard,W.J., Mosberg,H.I., and Haskell-Luevano,C. (2006). Molecular mechanism of the constitutive activation of the L250Q human melanocortin-4 receptor polymorphism. *Chem. Biol. Drug Des* 67, 215-229.
- Robbins,L.S., Nadeau,J.H., Johnson,K.R., Kelly,M.A., Roselli-Rehfuß,L., Baack,E., Mountjoy,K.G., and Cone,R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
- Rong,R., Tao,Y.X., Cheung,B.M., Xu,A., Cheung,G.C., and Lam,K.S. (2006). Identification and functional characterization of three novel human melanocortin-4 receptor gene variants in an obese Chinese population. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 65, 198-205.
- Rossi,M., Kim,M.S., Morgan,D.G., Small,C.J., Edwards,C.M., Sunter,D., Abusnana,S., Goldstone,A.P., Russell,S.H., Stanley,S.A., Smith,D.M., Yagaloff,K., Ghatei,M.A., and Bloom,S.R. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 139, 4428-4431.
- Rutanen,J., Pihlajamaki,J., Karhapaa,P., Vauhkonen,I., Kuusisto,J., Moilanen,M.L., and Laakso,M. (2004). The Val103Ile polymorphism of melanocortin-4 receptor regulates energy expenditure and weight gain. *Obes. Res.* 12, 1060-1066.
- Sangkuhl,K., Schulz,A., Rompler,H., Yun,J., Wess,J., and Schoneberg,T. (2004). Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum. Mol. Genet.* 13, 893-903.
- Schioth,H.B., Muceniece,R., and Wikberg,J.E. (1996). Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 161-165.
- Schwartz,M.W., Seeley,R.J., Woods,S.C., Weigle,D.S., Campfield,L.A., Burn,P., and Baskin,D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 2119-2123.
- Scott,H.S., Litjens,T., Nelson,P.V., Brooks,D.A., Hopwood,J.J., and Morris,C.P. (1992). alpha-L-iduronidase mutations (Q70X and P533R) associate with a severe Hurler phenotype. *Hum. Mutat.* 1, 333-339.
- Shaver,S.W., Pang,J.J., Wainman,D.S., Wall,K.M., and Gross,P.M. (1992). Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum. *Cell Tissue Res.* 267, 437-448.
- Small,C.J., Liu,Y.L., Stanley,S.A., Connoley,I.P., Kennedy,A., Stock,M.J., and Bloom,S.R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int. J Obes. Relat Metab Disord.* 27, 530-533.

- Smith,A.I. and Funder,J.W. (1988). Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr. Rev.* 9, 159-179.
- Srinivasan,S., Lubrano-Berthelier,C., Govaerts,C., Picard,F., Santiago,P., Conklin,B.R., and 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.
- Ste,M.L., Miura,G.I., Marsh,D.J., Yagaloff,K., and Palmiter,R.D. (2000). A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 12339-12344.
- Strobel,A., Issad,T., Camoin,L., Ozata,M., and Strosberg,A.D. (1998). A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.* 18, 213-215.
- Stutzmann,F., Vatin,V., Cauchi,S., Morandi,A., Jouret,B., Landt,O., Tounian,P., Levy-Marchal,C., Buzzetti,R., Pinelli,L., Balkau,B., Horber,F., Bougneres,P., Froguel,P., and Meyre,D. (2007). Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1837-1844.
- Sutton,G.M., Duos,B., Patterson,L.M., and Berthoud,H.R. (2005). Melanocortinergic modulation of cholecystinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146, 3739-3747.
- Sutton,G.M., Josephine,B.M., Gu,X., Hruby,V.J., and Butler,A.A. (2008). A derivative of the melanocortin receptor antagonist SHU9119 (PG932) increases food intake when administered peripherally. *Peptides* 29, 104-111.
- Sutton,G.M., Trevaskis,J.L., Hulver,M.W., McMillan,R.P., Markward,N.J., Babin,M.J., Meyer,E.A., and Butler,A.A. (2006). Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. *Endocrinology* 147, 2183-2196.
- Thorleifsson,G., Walters,G.B., Gudbjartsson,D.F., Steinthorsdottir,V., Sulem,P., Helgadottir,A., Styrkarsdottir,U., Gretarsdottir,S., Thorlacius,S., Jonsdottir,I., Jonsdottir,T., Olafsdottir,E.J., Olafsdottir,G.H., Jonsson,T., Jonsson,F., Borch-Johnsen,K., Hansen,T., Andersen,G., Jorgensen,T., Lauritzen,T., Aben,K.K., Verbeek,A.L., Roeleveld,N., Kampman,E., Yanek,L.R., Becker,L.C., Tryggvadottir,L., Rafnar,T., Becker,D.M., Gulcher,J., Kiemenev,L.A., Pedersen,O., Kong,A., Thorsteinsdottir,U., and Stefansson,K. (2009). Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat. Genet.* 41, 18-24.
- Timmusk,T., Palm,K., Metsis,M., Reintam,T., Paalme,V., Saarma,M., and Persson,H. (1993). Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. *Neuron* 10, 475-489.
- Trayhurn,P. and James,W.P. (1978). Thermoregulation and non-shivering thermogenesis in the genetically obese (ob/ob) mouse. *Pflugers Arch.* 373, 189-193.
- Tsui,L.C. (1992). The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet.* 8, 392-398.
- Tsuruta,Y., Yoshimatsu,H., Hidaka,S., Kondou,S., Okamoto,K., and Sakata,T. (2002). Hyperleptinemia in A(y)/a mice upregulates arcuate cocaine- and amphetamine-regulated transcript expression. *Am. J Physiol Endocrinol. Metab* 282, E967-E973.
-

- Vaisse,C., Clement,K., Durand,E., Hercberg,S., Guy-Grand,B., and Froguel,P. (2000). Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin. Invest* 106, 253-262.
- Vicens,Q. and Westhof,E. (2001). Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*. 9, 647-658.
- Wang,D., Ma,J., Zhang,S., Hinney,A., Hebebrand,J., Wang,Y., and Wang,H.J. (2010). Association of the MC4R V103I polymorphism with obesity: a Chinese Case-control study and meta-analysis in 55,195 individuals. *Obesity (Silver. Spring)* 18, 573-579.
- Weide,K., Christ,N., Moar,K.M., Arens,J., Hinney,A., Mercer,J.G., Eiden,S., and Schmidt,I. (2003). Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Physiol Genomics* 13, 47-56.
- Welch,E.M., Barton,E.R., Zhuo,J., Tomizawa,Y., Friesen,W.J., Trifillis,P., Paushkin,S., Patel,M., Trotta,C.R., Hwang,S., Wilde,R.G., Karp,G., Takasugi,J., Chen,G., Jones,S., Ren,H., Moon,Y.C., Corson,D., Turpoff,A.A., Campbell,J.A., Conn,M.M., Khan,A., Almstead,N.G., Hedrick,J., Mollin,A., Risher,N., Weetall,M., Yeh,S., Branstrom,A.A., Colacino,J.M., Babiak,J., Ju,W.D., Hirawat,S., Northcutt,V.J., Miller,L.L., Spatrack,P., He,F., Kawana,M., Feng,H., Jacobson,A., Peltz,S.W., and Sweeney,H.L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87-91.
- Wildin,R.S., Antush,M.J., Bennett,R.L., Schoof,J.M., and Scott,C.R. (1994). Heterogeneous AVPR2 gene mutations in congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Am. J Hum. Genet.* 55, 266-277.
- Willer,C.J., Speliotes,E.K., Loos,R.J., Li,S., Lindgren,C.M., Heid,I.M., Berndt,S.I., Elliott,A.L., Jackson,A.U., Lamina,C., Lettre,G., Lim,N., Lyon,H.N., McCarroll,S.A., Papadakis,K., Qi,L., Randall,J.C., Roccascaccia,R.M., Sanna,S., Scheet,P., Weedon,M.N., Wheeler,E., Zhao,J.H., Jacobs,L.C., Prokopenko,I., Soranzo,N., Tanaka,T., Timpson,N.J., Almgren,P., Bennett,A., Bergman,R.N., Bingham,S.A., Bonnycastle,L.L., Brown,M., Burtt,N.P., Chines,P., Coin,L., Collins,F.S., Connell,J.M., Cooper,C., Smith,G.D., Dennison,E.M., Deodhar,P., Elliott,P., Erdos,M.R., Estrada,K., Evans,D.M., Gianniny,L., Gieger,C., Gillson,C.J., Guiducci,C., Hackett,R., Hadley,D., Hall,A.S., Havulinna,A.S., Hebebrand,J., Hofman,A., Isomaa,B., Jacobs,K.B., Johnson,T., Jousilahti,P., Jovanovic,Z., Khaw,K.T., Kraft,P., Kuokkanen,M., Kuusisto,J., Laitinen,J., Lakatta,E.G., Luan,J., Luben,R.N., Mangino,M., McArdle,W.L., Meitinger,T., Mulas,A., Munroe,P.B., Narisu,N., Ness,A.R., Northstone,K., O'Rahilly,S., Purmann,C., Rees,M.G., Ridderstrale,M., Ring,S.M., Rivadeneira,F., Ruukonen,A., Sandhu,M.S., Saramies,J., Scott,L.J., Scuteri,A., Silander,K., Sims,M.A., Song,K., Stephens,J., Stevens,S., Stringham,H.M., Tung,Y.C., Valle,T.T., Van Duijn,C.M., Vimalaswaran,K.S., Vollenweider,P., Waeber,G., Wallace,C., Watanabe,R.M., Waterworth,D.M., Watkins,N., Wittman,J.C., Zeggini,E., Zhai,G., Zillikens,M.C., Altshuler,D., Caulfield,M.J., Chanock,S.J., Farooqi,I.S., Ferrucci,L., Guralnik,J.M., Hattersley,A.T., Hu,F.B., Jarvelin,M.R., Laakso,M., Mooser,V., Ong,K.K., Ouwehand,W.H., Salomaa,V., Samani,N.J., Spector,T.D., Tuomi,T., Tuomilehto,J., Uda,M., Uitterlinden,A.G., Wareham,N.J., Deloukas,P., Frayling,T.M., Groop,L.C., Hayes,R.B., Hunter,D.J., Mohlke,K.L., Peltonen,L., Schlessinger,D., Strachan,D.P., Wichmann,H.E., McCarthy,M.I., Boehnke,M., Barroso,I., Abecasis,G.R., and Hirschhorn,J.N. (2009). Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* 41, 25-34.
- Wilson,B.D., Bagnol,D., Kaelin,C.B., Ollmann,M.M., Gantz,I., Watson,S.J., and Barsh,G.S. (1999). Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling. *Endocrinology* 140, 2387-2397.

- Wyatt,S.B., Winters,K.P., and Dubbert,P.M. (2006). Overweight and obesity: prevalence, consequences, and causes of a growing public health problem. *Am. J Med. Sci.* *331*, 166-174.
- Xiang,Z., Litherland,S.A., Sorensen,N.B., Proneth,B., Wood,M.S., Shaw,A.M., Millard,W.J., and Haskell-Luevano,C. (2006). Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry* *45*, 7277-7288.
- Xu,B., Goulding,E.H., Zang,K., Cepoi,D., Cone,R.D., Jones,K.R., Tecott,L.H., and Reichardt,L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* *6*, 736-742.
- Yeo,G.S., Lank,E.J., Farooqi,I.S., Keogh,J., Challis,B.G., and O'Rahilly,S. (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*, 561-574.
- Young,E.H., Wareham,N.J., Farooqi,S., Hinney,A., Hebebrand,J., Scherag,A., O'Rahilly,S., Barroso,I., and Sandhu,M.S. (2007). The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int. J. Obes. (Lond)* *31*, 1437-1441.
- Zhang,Y., Collazo,R., Gao,Y., Li,G., and Scarpace,P.J. (2010). Intermittent MTII application evokes repeated anorexia and robust fat and weight loss. *Peptides* *31*, 639-643.
- Zhang,Y., Proenca,R., Maffei,M., Barone,M., Leopold,L., and Friedman,J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425-432.

7. DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Prof. Dr. Martin Klingenspor für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung während der Promotion danken.

Ein dickes Dankeschön geht auch an Dr. Ralf Kühn für die Hilfe bei der Herstellung der zwei Mauslinien am Helmholtz Zentrum München.

Ebenfalls möchte ich mich bei PD Dr. Heike Biedermann, Dr. Harald Brumm und Dr. Andreas Breit für die Zusammenarbeit bei der *in vitro* Charakterisierung der beiden Mc4r-Varianten bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht natürlich an alle Kollegen in Freising und Marburg: insbesondere Nadine Rink für die tolle Büronachbarschaft und die Hilfe beim Formatieren der Arbeit; Dr. Tobias Fromme für die immerwährende Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen der Dissertation; Sabine Mocek und Sigrid Stöhr für die hervorragende Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor und natürlich Dr. Michael Helwig für die Freundschaft in den letzten Jahren.

Das letzte Dankeschön geht natürlich an meine Eltern und meine Schwester ohne die das alles niemals hätte stattfinden können.