

Humboldt-Universität zu Berlin

Dissertation

**Molekulare Charakterisierung an der
hypothalamischen Appetitregulation beteiligter
Rezeptoren**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

von

Dipl.-Ing. Patrick Tarnow

geboren am 12.03.1976

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. Werner Kloas
2. Prof. Dr. Gudrun Brockmann
3. PD Dr. Heike Biebermann

eingereicht: 16.05.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2008

Zusammenfassung

Das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme werden unter anderem vom Hypothalamus reguliert. Dort werden Hormonelle Signale der Peripherie und neuronale Signale integriert. Die G-Protein gekoppelten Melanocortinrezeptoren 3 und 4 (MC3R und MC4R) werden von ihren Agonisten, den Melanocortinen aktiviert und durch den inversen Agonisten/Antagonisten Agouti-Related Peptide (AgRP) inaktiviert. Als weiterer Downstream-Mediatoren der MC4R-Aktivierung wurden kürzlich Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und dessen Rezeptor TrkB (Tropomyosin-Related –Kinase) identifiziert. Mutationen im MC4R gelten als häufigste monogenetische Ursache für Adipositas. Da viele dieser Mutationen aber *in vitro* funktionell nicht relevant sind, wurde ein Aminosäurevergleich von orthologen MC4R aus 70 verschiedenen Spezies erstellt. Funktionsverlustmutationen waren häufiger an konservierten Positionen, während Mutationen ohne Effekt überwiegend an schwach konservierten Positionen zu finden waren. Funktionelle Charakterisierung der von in Mausmodellen identifizierten Punktmutationen I194F und Y302C ergaben eine gute *in-vivo/in-vitro* Korrelation. Desweiteren wurden in der Normalbevölkerung in normalgewichtigen Personen identifizierte MC4R-Punktmutationen funktionell charakterisiert. Die Mutationen R7C, A70T, T112K, Q156R, M200V, V166I und R236H hatten keinen Effekt auf die Rezeptorfunktion, die H158R. Mutation zeigte eine hohe Basalaktivität, die aber durch AgRP erniedrigt werden konnte. Die in adipösen Patienten gefundenen Mutationen S136F und S139R wiesen einen kompletten Funktionsverlust auf, erstere verursachte zudem sogar einen dominant-negativen Effekt bei Koexpression mit dem Wildtyprezeptor. Für den MC3R wurde das zum Translationsstart bevorzugte Startcodon identifiziert. Für die Rezeptortyrosinkinase TrkB konnte in Hefe-2-Hybridcreens der neue Interaktionspartner Sept3 identifiziert werden. Dieses Protein bindet phosphorylierungsunabhängig an die intrazelluläre Juxtamembrandomäne.

Schlagwörter

Adipositas

G-Protein gekoppelter Rezeptor

Hypothalamus

Signaltransduktion

Neurotrophin

Melanocortin

evolutionärer Vergleich

Punktmutation

Septin

Protein-Protein-Interaktion

Translationsinitiaition

Abstract

Bodyweight and food intake are regulated by the hypothalamus which integrates peripheral hormonal and neural signals. The G-protein-coupled melanocortin-receptors 3 and 4 (MC3R and MC4R) are activated by melanocortins or inhibited by agouti-related peptide (AgRP) and signal via the cAMP pathway. Brain-derived neurotrophic Factor (BDNF) was recently shown to signal downstream the MC4R via its receptor TrkB (tropomyosin-related kinase). Mutations in the MC4R are the most common cause of monogenetic obesity. However, many of these mutations are not functionally relevant *in vitro*. Here, an amino acid alignment of orthologous MC4R from over 70 species was used to evaluate reported mutations. Loss-of-function mutations were predominantly located at highly conserved positions whereas mutations without effect were located at non-conserved positions. Functional characterization of MC4R point mutations I194F (partial loss of function) and Y302C (complete loss of function) identified in mouse models showed good *in vitro/in vivo* correlation. Furthermore mutations found in normal weight persons were characterized: R7C, A70T, T112K, Q156K, M200V, V166I and R236H had no effect on receptor function *in vitro*, whereas the H158R Mutation showed high constitutive activity, which however could be diminished by AgRP. The mutations S136F and S139F identified in obese patients were characterized as complete loss-of-function mutations, the former additionally caused a dominant-negative effect on wildtype MC4R *in vitro*. For the MC3R the preferred start-codon for initiation of translation was identified. For TrkB Sept3 could be identified as a new interaction partner in a yeast-2-hybrid screen. This Protein belonging to the septin family binds to the intracellular juxtamembrane domain of TrkB independent of phosphorylation of the Shc-binding site.

Keywords

obesity

g-protein coupled receptor

hypothalamus

signaltransduction

neurotrophin

melanocortin

evolutionary approach

pointmutation

septin

protein-protein-interaction

initiation of translation

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Heike Biebermann für die Überlassung des interessanten Themas, für die gute Betreuung und unermüdliche Unterstützung

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Werner Kloas für die offizielle Betreuung dieser Arbeit für die HU-Berlin.

Einen speziellen Dank an Frau Prof. Dr. Annette Grüters für die herzliche Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe.

Diese Arbeit wäre ohne Kooperationen nicht möglich gewesen, daher danke ich:

- Dr. Holger Römpler, Prof. Dr. Torsten Schöneberg, Claudia Stäubert und Dr. Angela Schulz vom Institut für Biochemie der Universität Leipzig für die gute Zusammenarbeit im Orthologenprojekt und für die schönen Monate in Leipzig.
- Dr. Heike Göhler und Prof. Dr. Erich Wanker vom MDC Berlin-Buch für die Durchführung des Y2H-Screens
- Dr. Anke Hinney, Prof. Dr. Johannes Hebebrand von der Universität Essen, Dr. Eva Rettenbacher und Dr. Kurt Widhalm von der Universität Wien sowie Dr. Hanno Bolz von der Universität Köln für die Einsendung von Patienten-DNA-Material.
- Dr. Johannes Grosse und Dr. Martin Augustin von *Ingenium Pharmaceuticals* für die Kooperation im Maus-Projekt und für die Herstellung der Mauslinien.
- Dr. Gunnar Kleinau und Dr. Gerd Krause vom FMP Berlin für das MC4R-Computermodell
- Prof. Dr. Michael Schäfer vom Institut für Pharmakologie für die Benutzung des LSM-Mikroskops.

Natürlich sei auch allen Kollegen des Instituts für experimentelle pädiatrische Endokrinologie der Charité – allen voran Anne Rediger und Petra Ambrugger – für die nette Zusammenarbeit und gute Arbeitsatmosphäre gedankt.

Prof. Dr. Joseph Köhrle danke ich für die Aufnahme im Graduiertenkolleg 1208 und für das vermittelte endokrinologische Grundlagenwissen.

Ein großes Dankeschön an meine Eltern für die langjährige Unterstützung und den Rückhalt, den sie mir geben.

Um alles aufzulisten, wofür ich Ulrike Bardeleben danke, bräuchte ich noch mehrere Seiten. Ohne Dich wäre diese Arbeit vermutlich nie vollendet worden.

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Adipositas als Krankheit.....	1
1.2.	Übersicht über die hypothalamische Gewichtsregulation.....	2
1.2.1.	<i>Leptin</i>	3
1.2.2.	<i>Mausmodelle und Patienten mit Leptin oder Leptinrezeptordefekten</i>	3
1.2.3.	<i>Ghrelin</i>	4
1.2.4.	<i>Insulin</i>	4
1.2.5.	<i>Neuropeptid Y</i>	4
1.2.6.	<i>Weitere Regulationsmechanismen der Neuronen des Nucleus arcuatus</i>	5
1.3.	Das Melanocortinsystem.....	5
1.3.1.	<i>Prozessierung von Pro-Opiomelanocortin zu Melanocortinen</i>	5
1.3.2.	<i>Die Melanocortinrezeptoren</i>	6
1.3.3.	<i>Mutationen im POMC und in der PC1</i>	7
1.3.4.	<i>Die Melanocortinrezeptor-Antagonisten Agouti und Agouti-Related-Peptide (AgRP)</i>	7
1.3.5.	<i>Die Rolle des MC3- und des MC4-Rezeptors</i>	8
1.4.	MC3R und MC4R- Mutationen und Deletionen in Mensch und Maus.....	8
1.4.1.	<i>MC4R knockout-Mäuse</i>	8
1.4.2.	<i>Humane MC4R-Mutationen</i>	9
1.4.3.	<i>MC3R knockout-Mäuse</i>	11
1.4.4.	<i>Humane MC3R-Mutationen und Polymorphismen</i>	12
1.5.	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	13
1.5.1.	<i>Einteilung und Strukturmerkmale von GPCRs</i>	13
1.5.2.	<i>Aktivierung von Klasse A GPCRs</i>	13
1.6.	Signaltransduktionsmechanismen von Melanocortinrezeptoren	14
1.7.	Di- und Oligomerisierung von Melanocortinrezeptoren	15
1.8.	Die Rolle von BDNF und TrkB in der hypothalamischen Gewichtsregulation	16
1.8.1.	<i>Die Neurotrophinrezeptoren</i>	16
1.8.2.	<i>BDNF und TrkB im Hypothalamus</i>	16
1.8.3.	<i>TrkB-Mutationen und BDNF-Haploinsuffizienz im Menschen</i>	17
1.8.4.	<i>Genstruktur und Proteindomänen des humanen TrkB</i>	18
1.8.5.	<i>Signaltransduktionsmechanismen der Trk-Neurotrophinrezeptoren</i>	19
2.	Zielsetzung	20
2.1.	Evolutionärer Ansatz zur Auswertung von funktionell relevanten Mutationen.....	20
2.2.	Funktionelle Charakterisierung von murinen Melanocortinrezeptoren	20
2.3.	Funktionelle Charakterisierung von in der Normalpopulation gefundenen MC4R-Mutationen	20
2.4.	Funktionelle Charakterisierung von mutierten Serinen in der dritten Transmembrandomäne des hMC4R	21
2.5.	Identifikation des bevorzugten Start-ATGs des humanen MC3R.....	21
2.6.	Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern des MC4R und TrkB.....	21

3.	Material und Methoden	22
3.1.	Materialien.....	22
3.2.	Molekularbiologische Routinemethoden	23
3.2.1.	<i>Verwendete Kits zur DNA Aufreinigung, Herstellung von cDNA und TOPO-Klonierung</i>	23
3.2.2.	<i>Herstellung chemisch kompetenter E. coli</i>	23
3.2.3.	<i>Transformation von chemisch kompetenten E. coli.....</i>	23
3.2.4.	<i>Ligation</i>	24
3.2.5.	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	24
3.2.6.	<i>Sequenzierung.....</i>	24
3.3.	Zellkultur	24
3.3.1.	<i>Kultivierung von COS-7-Zellen</i>	24
3.3.2.	<i>Transfektion von COS-7-Zellen</i>	25
3.3.3.	<i>Kultivierung von PC12-Zellen</i>	25
3.3.4.	<i>Nukleofektion mit Amaxa und Differenzierung</i>	25
3.3.5.	<i>Kultivierung von stabil transfizierten CHO-Zellen</i>	25
3.4.	Funktionelle Untersuchungen von GPCRs	25
3.4.1.	<i>Klonierung von Melanocortinrezeptoren zur Expression in COS-7-Zellen.....</i>	26
3.4.2.	<i>Sequenzierung von orthologen MC4R und Klonierung von humanen/orthologen Hybridkonstrukten.....</i>	27
3.4.3.	<i>Zelloberflächen-ELISA.....</i>	27
3.4.4.	<i>cAMP-Messungen</i>	28
3.4.5.	<i>Radioligandenverdrängungsassay</i>	30
3.4.6.	<i>Sandwich-ELISA zum Nachweis von Rezeptordimeren.....</i>	30
3.5.	Charakterisierung von Mäusen mit MC4R-Mutationen.....	31
3.6.	Fluoreszenzbasierte Identifikation des bevorzugten Startcodons des humanen MC3R	32
3.7.	Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.....	32
3.7.1.	<i>Klonierung von TrkB, TrkA und Sept3.....</i>	32
3.7.2.	<i>Klonierung der Fragmente für den Yeast-Two-Hybrid-Screen</i>	32
3.7.3.	<i>Umklonierung von Sept3 in den Vektor pGEX-6P-2.....</i>	32
3.7.4.	<i>Klonierung von TrkB-Fragmenten für die Expression in COS-7-Zellen.....</i>	33
3.7.5.	<i>Overlap-PCR.....</i>	33
3.7.6.	<i>Yeast-2-Hybrid Screen</i>	34
3.7.7.	<i>In-Vitro Bindungs Assay</i>	34
3.7.8.	<i>Konfokale Mikroskopie.....</i>	35
3.8.	Auswertungen und Statistiken	36
4.	Ergebnisse	37
4.1.	Klonierung von orthologen MC4R-Rezeptoren zur Bestimmung des Konservierungsgrades.	37
4.1.1.	<i>Funktionelle Charakterisierung von orthologen/humanen MC4R-Hybridkonstrukten</i>	38
4.1.2.	<i>Vergleich der in der Literatur beschriebenen MC4R-Mutation mit der Konservierung der Position</i>	41

4.1.3.	<i>Reevaluation der humanen MC4R Mutation V95I</i>	42
4.2.	Punktmutationen in murinen Melanocortinrezeptoren	44
4.2.1.	<i>Funktionelle Charakterisierung der murinen Melanocortinrezeptor-Mutationen</i>	44
4.2.2.	<i>Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC3R</i>	44
4.2.3.	<i>Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften der murinen MC3R Mutanten</i>	45
4.2.4.	<i>Evolutionäre Konservierung der in den murinen MC3R mutierten Aminosäuren</i>	46
4.2.5.	<i>Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC4R</i>	47
4.2.6.	<i>Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften der murinen MC4R Mutanten</i>	48
4.2.7.	<i>Evolutionäre Konservierung der in murinen MC4R mutierten Aminosäuren</i>	50
4.2.8.	<i>Ligandenbindung der I194F- und der Y302C- Mutante</i>	53
4.2.9.	<i>Effekt der I194F- und der Y302C-mMC4R-Mutationen auf das Körpergewicht in vivo</i> ...	54
4.2.10.	<i>Untersuchung eines dominant-negativen Effekts der I194F Mutante</i>	56
4.3.	Funktionelle Charakterisierung von in der Normalbevölkerung vorkommenden humanen MC4R-Punktmutationen.....	58
4.3.1.	<i>Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC4R</i>	59
4.3.2.	<i>Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften von humanen MC4R-Mutationen</i>	59
4.3.3.	<i>Analyse der evolutionären Konservierung der humanen MC4R-Mutationen</i>	63
4.3.4.	<i>Untersuchung der Wirkung von AgRP auf die konstitutiv aktive H158R-Mutante</i>	64
4.4.	Funktionelle Charakterisierung von Serinpunktmutationen in der dritten Transmembrandomäne des humanen Melanocortin-4-Rezeptors	67
4.5.	Identifikation des bevorzugten Start-ATGs des humanen MC3R	72
4.6.	Identifikation eines Protein-Protein-Interaktionspartners von TrkB.....	76
4.6.1.	<i>Hefe-2-Hybrid-Screen von TrkB- und MC4R-Fragmenten gegen Gehirnproteine</i>	76
4.6.2.	<i>Verifikation der Interaktion zwischen Sept3 und TrkB mittels GST-Pulldown-Assay</i>	78
4.6.3.	<i>Einschränkung der Interaktionsdomänen von TrkB und Sept3</i>	79
4.6.4.	<i>Subzelluläre Colokalisation von fluoreszenzmarkiertem TrkB und Sept3 in PC12 Zellen</i> ..	81
5.	Diskussion	83
5.1.	Evolutionärer Ansatz zur Auswertung von Mutationen des MC4R	83
5.2.	<i>N-Ethyl-N-Nitrosourea</i> -induzierte Mutationen in murinen Melanocortinrezeptoren	85
5.3.	Funktionelle Charakterisierung von in der Normalpopulation gefundenen MC4R-Mutationen	87
5.4.	Die aktivierende Mutation H158R in der zweiten intrazellulären Schleife des hMC4Rs.....	88
5.5.	Die MC4R Mutationen S136F, S127L, S139R und dominant-negative Effekte	90
5.6.	Identifikation des bevorzugten Translationinitiationscodons des humanen MC3R	93
5.7.	Identifikation von Sept3 als Protein-Protein-Interaktionspartner von TrkB	95
6.	Zusammenfassung	98
7.	Literatur	100
8.	Anhang	117
8.1.	Abkürzungen	131
9.	Lebenslauf und eigene Publikationen	133

1. Einleitung

1.1. Adipositas als Krankheit

Adipositas wird heute als eine chronische Gesundheitsstörung verstanden, die durch eine übermäßige Ansammlung von Fettgewebe im Körper gekennzeichnet ist, und die mit einer hohen Begleit- und Folgemorbidität einher geht (World Health Organization, 2000). Übergewicht und Adipositas resultieren aus einer Störung des Energiehaushaltes. Wird mit der Nahrung mehr Energie aufgenommen als verbraucht wird, lagert sich die unverbrauchte Energie in Form von Körperfett an. Schätzungen haben ergeben, dass weltweit mittlerweile 1,1 Milliarden Menschen übergewichtig und 312 Millionen Menschen adipös sind (James et al., 2004). Das gebräuchlichste Maß zur Bestimmung der Adipositas ist der Body-Mass-Index (BMI), der aus dem Körpergewicht in Kilogramm dividiert durch das Quadrat der Körpergröße in Metern errechnet wird. Erwachsene gelten bei einem BMI zwischen 18,5–24,9 kg/m² als normalgewichtig, bei einem BMI von 25,0–29,9 kg/m² als übergewichtig, bei einem BMI von 30,0–39,9 kg/m² als adipös und ab einem BMI von ≥ 40 kg/m² als extrem adipös (World Health Organization, 2000). In den USA hat sich der Anteil der adipösen Erwachsenen in den letzten 40 Jahren mehr als verdoppelt und lag 2002 bei 27,6% bei Männern bzw. bei 33,2% bei Frauen (Flegal et al., 2002). In Deutschland stieg die Prävalenz der Adipositas bei erwachsenen Männern in den Jahren 1985–2002 von 16,2% auf 22,5% und bei erwachsenen Frauen von 16,2% auf 23,3% (Helmert und Strube, 2004). Zur Bestimmung der Adipositas von Kindern und Jugendlichen werden zur Berücksichtigung des Geschlechts und Alters die als Referenzdaten aufgestellten Perzentilkurven verwendet (Kromeyer-Hauschild et al., 2001). Hier ist ein BMI, der über der 90. Perzentile liegt, als Übergewicht, ein BMI über der 97. Perzentile als Adipositas festgelegt. Dabei bedeutet ein BMI auf der 90. Perzentile, dass 90% der alters- und geschlechtsangepassten Referenzpopulation einen geringeren BMI aufweisen. Aktuelle Daten aus Deutschland besagen, dass 15% der 3–17 Jährigen übergewichtig und 6,3% adipös sind (Kurth und Schaffrath Rosario, 2007). Das entspricht einer Anzahl von fast 1,9 Millionen übergewichtigen Kindern in Deutschland. Adipositas ist nicht nur ein ästhetisches Problem sondern zieht auch eine ganze Reihe von Folgeerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus Typ II, Cholelithiasis, Hypertonie und koronare Herzerkrankungen mit sich (Kopelman, 2000). Besonders Adipositas im Jugendalter führte entsprechend einer norwegischen Studie nach 32 Jahren zu einer 80–100% erhöhten Mortalität (Engeland et al., 2003). Da BMI-Werte weltweit in kurzer Zeit angestiegen sind, hat Adipositas mittlerweile den Status einer Epidemie.

Neben Umweltfaktoren wie z.B. dem sozioökonomischen Status, dem erleichterten Zugriff auf hochkalorische Nahrung und verminderter Bewegung liegen der Adipositas auch genetische Ursachen zugrunde. Studien mit getrennt voneinander aufgewachsenen Zwillingen schätzen die Heritabilität des BMIs auf 50–70% (Allison et al., 1996) oder 77–84% (Stunkard et al., 1986). Adipositas ist ein polygenetischer Phänotyp. Bisher wurden in 61 genomweiten Linkage-Analysen 253 *Quantitative Trait Loci* identifiziert und in 127 Kandidatengenen wurden genetische Varianten gefunden (Yang et al., 2007). Darunter sind vor allem Gene zu finden, die an der Differenzierung von Adipozyten, am Energiemetabolismus oder der Thermogenese beteiligt sind, sowie einige inflammatorische Zytokine. Eine weitere Gruppe von Genen ist Teil des Leptin- Melanocortin-Signalweges, welcher einen Regelkreis zwischen Adipozyten und dem Hypothalamus im Gehirn darstellt.

1.2. Übersicht über die hypothalamische Gewichtsregulation

Der Hypothalamus gilt als Integrator verschiedener peripherer, endokriner Signale, die für die Energiehomöostase eine Rolle spielen. Schon seit der Mitte des letzten Jahrhunderts ist bekannt, dass bilaterale Läsionen von hypothalamischen Kerngebieten die Menge der aufgenommenen Nahrung beeinflussen (Anand und Brobeck, 1951; Hetherington und Ranson, 1940). Besonders der *Nucleus arcuatus*, der sich unterhalb und neben dem dritten Ventrikel befindet und an der *Eminentia mediana* gelegen ist, empfängt Signale von außerhalb der Blut-Hirn-Schranke. Hormone wie Leptin, Insulin und Ghrelin regulieren die Expression von Neuropeptiden in zwei Subpopulationen von Neuronen des *Nucleus arcuatus* (Abb.1). Als anorexigenes Prohormon wird POMC (Pro-Opiomelanocortin) gebildet, aus dem nach proteolytischer Spaltung u.a. die Melanocortine α - und β -MSH entstehen. Diese aktivieren Melanocortin-4-Rezeptoren (MC4R) in Neuronen z.B. des *Nucleus paraventricularis*, was zur Verringerung der Nahrungsaufnahme führt. Mögliche Mediatoren dieses anorexigenen Signals sind das Neurotrophin BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) und dessen Rezeptor TrkB (Xu et al., 2003).

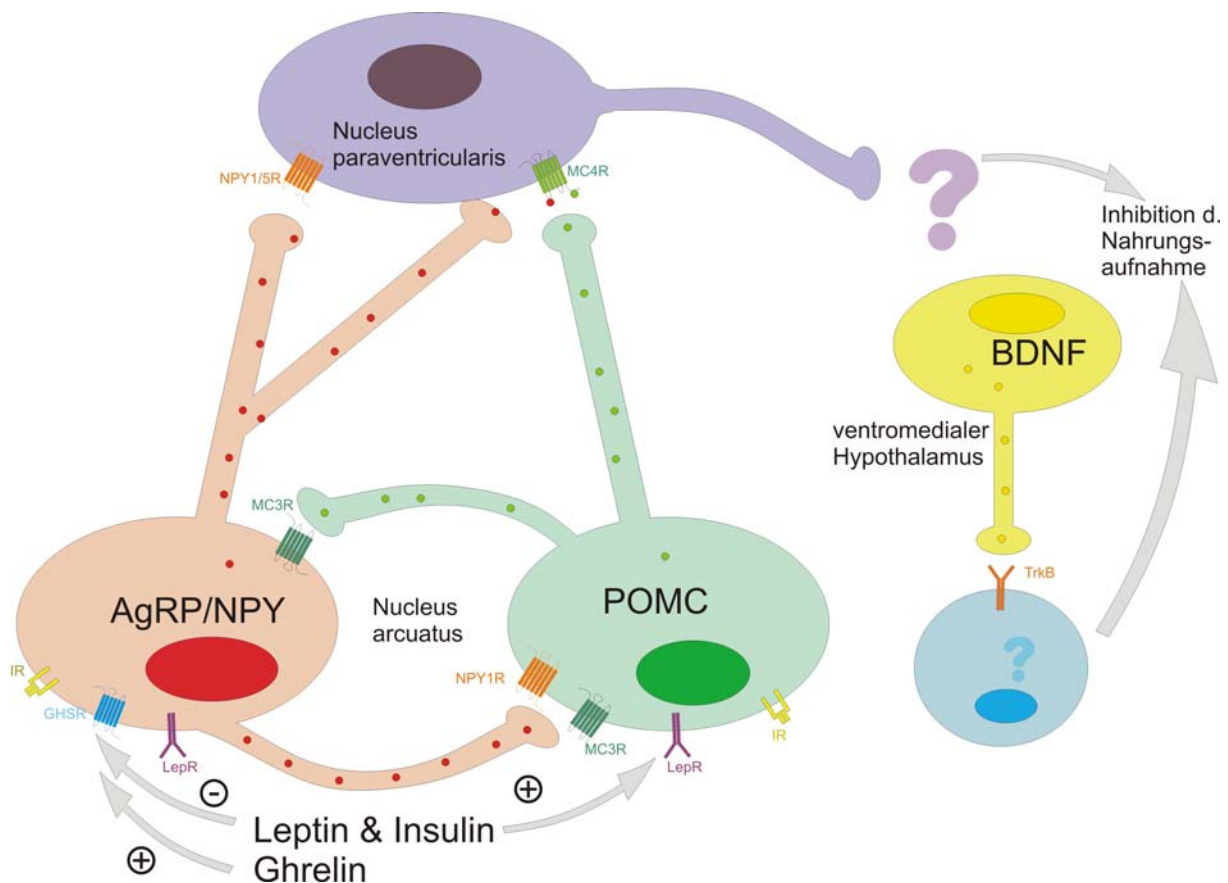


Abbildung 1: Schematische Darstellung von an der hypothalamischen Gewichtsregulation beteiligten Neuronen, Peptiden und Rezeptoren. Die peripheren Hormone Leptin und Insulin stimulieren POMC exprimierende Neuronen (grün) und inhibieren AgRP exprimierende Neuronen (rot), das Hormon Ghrelin stimuliert AgRP-Neuronen im *Nucleus arcuatus*. POMC-Produkte stimulieren, AgRP inhibiert MC4-Rezeptoren in Neuronen z.B. des *Nucleus paraventricularis* (PVN). Gleichzeitig werden in den POMC und AgRP Neuronen exprimierte MC3-Rezeptoren aktiviert bzw. inhibiert. Das in den AgRP-Neuronen coexprimierte NPY stimuliert NPY1-Rezeptoren sowohl im *Nucleus arcuatus* als auch im *Nucleus paraventricularis*. Bei Stimulation des MC4R wird im ventromedialen Hypothalamus (VMH) die Expression von BDNF angeregt (gelb). Ob dieses direkt durch Aktivierung von im VMH exprimierten MC4R geschieht oder über weitere Mediatoren verläuft, ist nicht bekannt. BDNF aktiviert seinen Rezeptor TrkB in Neuronen im PVN und lateralen sowie dorsomedialen Hypothalamus (blau).

Die andere Subpopulation der Neuronen des Nucleus arcuatus bildet die orexigenen Peptide Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-Related-Peptide (AgRP). NPY aktiviert entsprechende Rezeptoren u.a. im *Nucleus paraventricularis*, während AgRP Melanocortinrezeptoren hemmt. Die beiden Neuronenpopulationen des *Nucleus arcuatus* beeinflussen sich außerdem gegenseitig, da sie selbst Rezeptoren für diese Neuropeptide exprimieren. Die einzelnen Elemente dieses Regelmechanismus werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

1.2.1. Leptin

Das von peripherem Fettgewebe gebildete Hormon Leptin aktiviert Neuronen des *Nucleus arcuatus*. Die lange Form des Leptinrezeptors wird im Hypothalamus unter anderem im *Nucleus arcuatus* und im *Nucleus ventromedialis* exprimiert (Elmquist et al., 1998). Der Leptinrezeptor (Ob-Rb oder LepR) gehört zur Klasse der Cytokinrezeptoren und transduziert das Signal über den JAK-STAT-Signalweg. Im *Nucleus arcuatus* befinden sich zwei verschiedene Neuronenpopulationen, von denen eine das Prohormon POMC, die andere den Melanocortinrezeptor-Antagonisten AgRP exprimieren. Wird der Leptinrezeptor aktiviert, kommt es zu einer erhöhten Expression von POMC (Schwartz et al., 1997). Dieses wird durch die Phosphorylierung von *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) durch den Leptinrezeptor in Neuronen des *Nucleus arcuatus* vermittelt. Aktiviertes STAT3 bindet dann direkt an den POMC-Promotor und induziert die POMC Expression (Münzberg et al., 2003). Leptin aktiviert POMC-Neuronen außerdem direkt durch über einen unspezifischen Kationenkanal vermittelte Depolarisation, was zu einer Ausschüttung der POMC-Spaltprodukte an den Synapsen führt (Cowley et al., 2001). POMC-Neuronen des *Nucleus arcuatus* coexprimieren CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transkript) (Elias et al., 1999), während in AgRP-Neuronen Neuropeptid Y (NPY) coexprimiert ist (Hahn et al., 1998). Im Gegensatz zu den POMC-Neuronen werden NPY/AgRP-Neuronen durch Leptin inhibiert. Ein wichtiger Signalweg scheint hierbei durch die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) vermittelt zu werden, da deren Hemmung den inhibitorischen Effekt von Leptin verringert (Morrison et al., 2005).

1.2.2. Mausmodelle und Patienten mit Leptin oder Leptinrezeptordefekten

Das Leptin-Gen ist in adipösen und hyperphagen ob/ob-Mäusen nicht funktionsfähig (Zhang et al., 1994). Wird diesen ob/ob-Mäusen rekombinantes Leptin injiziert, verringert sich die Nahrungsaufnahme und damit auch das Körpergewicht (Halaas et al., 1995). Auch bei adipösen Patienten wurden bereits, wenngleich auch extrem selten, Fälle eines inaktiven Leptin-Gens identifiziert. Die betroffenen Patienten leiden analog zum Mausmodell an extremer Adipositas, die hauptsächlich durch Hyperphagie verursacht ist (Montague et al., 1997). Auch bei diesen Patienten ist es möglich, durch Leptininjektion der Hyperphagie entgegen zu wirken (Farooqi et al., 2002).

Adipöse db/db Mäuse besitzen eine im für den Leptinrezeptor codierenden Ob-R-Gen gelegene Splicemutation, die ein Fehlen der intrazellulären Domäne des Rezeptorproteins verursacht (Lee et al., 1996). Im Menschen wurde bisher nur eine Familie mit homozygoten Mutationen im Leptin-Rezeptor-Gen identifiziert. Zusätzlich zu schwerer Adipositas und Hyperphagie, die schon in den ersten Lebensmonaten einsetzt, weisen die betroffenen Patienten ein verringertes Wachstum, niedrige

GH sowie IGF-I und IGF-BP3 Spiegel und einen verzögerten Pubertätsbeginn auf (Clement et al., 1998).

1.2.3. Ghrelin

Ein weiteres peripheres Hormon, das die Aktivität der NPY/AgRP-Neuronen beeinflusst, ist Ghrelin. Ghrelin ist ein 28 Aminosäuren langes, am Serin an Position 3 octanoyliertes Peptid und wird von endokrinen Zellen des Magenepithels gebildet (Kojima, 1999). Die Ghrelinplasmakonzentration steigt bei Nahrungsmangel bis kurz vor Beginn einer Mahlzeit an und fällt nach der Mahlzeit wieder ab. Der Ghrelinspiegel korreliert negativ mit der Körpermasse, ist bei adipösen Patienten niedrig und steigt nach einer Diät an (Tschöp et al., 2001). Der endogene Rezeptor für Ghrelin war schon lange vor der Entdeckung des Ghrelins selbst als Rezeptor für Wachstumshormon (GH) aus der Hypophyse freisetzende synthetische Substanzen bekannt und wurde daher Growth-Hormone-Secretagogue-Rezeptor (GHSR) genannt (Howard et al., 1996). Dieser $G\alpha_q$ koppelnde G-Protein gekoppelte Rezeptor (GPCR) ist mit NPY in Neuronen des *Nucleus arcuatus* coexprimiert (Willesen et al., 1999). Bei intracerebroventrikulärer Injektion von Ghrelin konnte eine Zunahme der im *Nucleus arcuatus* gebildeten NPY-mRNA und eine dosisabhängiges Ansteigen der Nahrungsaufnahme gezeigt werden (Shintani et al., 2001).

1.2.4. Insulin

Ein drittes Hormon, das die Neuronen des *Nucleus arcuatus* aktiviert, ist das in den Betazellen des Pankreas gebildete Insulin. Neben seinen peripheren Wirkungen auf die Glukoseaufnahme in Muskeln und Leber wird Insulin über die Blut-Hirn-Schranke transportiert und aktiviert dort den stark exprimierten Insulinrezeptor (IR). Das Ausschalten der gehirnspezifischen Expression des IR-Gens in Mäusen führt zu Hyperphagie und Adipositas und hat außerdem Auswirkungen auf die LH-Produktion. Letzteres hat Störungen der Spermatogenese bzw. der Follikelreifung zur Folge (Brüning et al., 2000). Wird Insulin direkt in den Hypothalamus injiziert, supprimiert es die Nahrungsaufnahme und führt dadurch zu einer Reduktion des Körpergewichtes (McGowan et al., 1993). Im *Nucleus arcuatus* hemmt Insulin wie Leptin die Expression von NPY und stimuliert die Expression von POMC (Schwartz et al., 1992 und Bernoit et al., 2002). In beiden Neuronenpopulationen sind Insulinrezeptoren exprimiert. Der anorexigene Effekt von intracerebroventrikulärer Insulingabe kann durch eine gleichzeitige Injektion des Melanocortinrezeptorantagonisten SHU-9119 verhindert werden. Die Signalwege des Leptinrezeptors und des IR, der zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehört, laufen in hypothalamischen Neuronen zusammen. Der aktivierte Insulinrezeptor aktiviert das Insulin-Rezeptor-Substrat(IRS)-Protein, das wiederum die PI3K aktiviert, wodurch es zur Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat und schließlich zur Aktivierung der Proteinkinase B (PKB oder Akt) kommt (Taniguchi et al., 2006).

1.2.5. Neuropeptid Y

Ein wichtiger in Neuronen des *Nucleus arcuatus* von peripheren Hormonen regulierter Neurotransmitter ist das Neuropeptid Y (NPY). NPY ist im Cortex, im Hippocampus, im Hinterhirn und im Hypothalamus – dort vor allem im *Nucleus arcuatus* – exprimiert (Chronwall et al., 1985). In leptindefizienten und adipösen ob/ob-Mäusen ist die NPY-mRNA im Hypothalamus erhöht (Wilding et al., 1993). Intracerebroventrikuläre Injektion von NPY erhöht die Nahrungsaufnahme (Clark et al.,

1985). Dieser orexigene Effekt wird hauptsächlich von zwei der sechs NPY-Rezeptoren, NPY1R und NPY5R vermittelt .

1.2.6. Weitere Regulationsmechanismen der Neuronen des *Nucleus arcuatus*

Kürzlich konnte außerdem gezeigt werden, dass POMC-Neuronen direkt durch Glukose über einen ähnlich dem in der pankreatischen Betazelle ablaufenden Mechanismus, bei dem der durch ATP aktivierte Kaliumkanal Kir6.1 eine Schlüsselrolle spielt, depolarisiert werden können und POMC-Spaltprodukte sezernieren (Parton et al., 2007). Eine bemerkenswerte Eigenschaft der leptinsensitiven Neuronen des *Nucleus arcuatus* wurde 2004 von Pinto und Mitarbeitern beschrieben: POMC- und NPY-Neuronen von *ob/ob* Mäusen wiesen verglichen mit Neuronen von WT-Mäusen ein anderes Verhältnis von erregenden zu inhibitorischen Synapsen auf. Durch Leptingabe konnte der Normalzustand innerhalb weniger Stunden wieder hergestellt werden. Diese Arbeit zeigt eindrucksvoll die Plastizität der hypothalamischen Neuronen.

1.3. Das Melanocortinsystem

1.3.1. Prozessierung von Pro-Opiomelanocortin zu Melanocortinen

Das in den Neuronen des hypothalamischen *Nucleus arcuatus* exprimierte Prohormon POMC wird über eine Reihe von proteolytischen Reaktionen zum adrenocorticotrophen Hormon (ACTH), α -, β - und γ -MSH prozessiert (Abb. 2). Das POMC-Gen codiert ein 32 kDa großes Precursor-Protein, welches neben der für die Sekretion nötigen Signalsequenz folgende drei Hauptregionen enthält : 1) die aminoternale, das γ -MSH beinhaltende Region, 2) die mittlere ACTH-Region, die im Hypothalamus zu α -MSH weiterprozessiert wird und 3) die carboxyterminale β -Lipotrophin (β -LPH)-Region , die zu β -MSH und β -Endorphin (β -END), einem bei der Schmerzempfindung eine Rolle spielenden Hormon, prozessiert wird. Das Signalpeptid leitet das komplette POMC aus dem endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat von dem aus es in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran transportiert wird. In diesen Vesikeln findet die Spaltung durch Prohormonconvertasen (PCs), einer Familie der Serinproteasen, statt. Im Gegensatz zum Hypothalamus wird die Prohormonconvertase 2 (PC2) im Hypophysenvorderlappen nicht exprimiert. Das hat zur Folge, dass dort N-POC, ACTH und β -LPH die Endprodukte des Spaltprozesses sind. Im Hypothalamus hingegen wird vom ACTH von der PC2 das Corticotrophin-Like-Intermediate-Lobe-Peptide (CLIP) abgespalten. Die übrigen N-terminalen 17 Aminosäuren werden von der Carboxypeptidase E (CPE) und von der Peptidyl- α -amidating Monooxygenase (PAM) zu Desacetyl- α -MSH (DA- α -MSH) weiterverarbeitet. CPE spaltet einige basische Aminosäuren vom C-Terminus des ACTH 1-17 ab. Danach wird das Peptid durch PAM amidiert. Anschließend wird das DA- α -MSH durch eine N-Acetyltransferase (n-AT) zum reifen Hormon α -MSH acetyliert (zusammengefasst von Pritchard, 2002). Prohormonconvertasen schneiden an Konsensussequenzen, die dibasische Aminosäuremotive enthalten. Dieses dibasische Motiv ist im POMC von Mäusen und Ratten am β -MSH nicht vorhanden. Daher wird vermutet, dass in Nagern kein β -MSH prozessiert wird. α - β - und γ -MSH besitzen eine identische Aminosäure-Kernsequenz (Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp). Neben den natürlichen Agonisten existieren weitere synthetische, hochpotente Agonisten. Am weitesten verbreitet

sind die Derivate NDP- α -MSH ([Nle⁴, D-Phe⁷]- α -MSH) und MTII (Ac-Nle-cyclo[Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys-NH₂]) (Sawyer et al., 1980; Hadley et al., 1998)

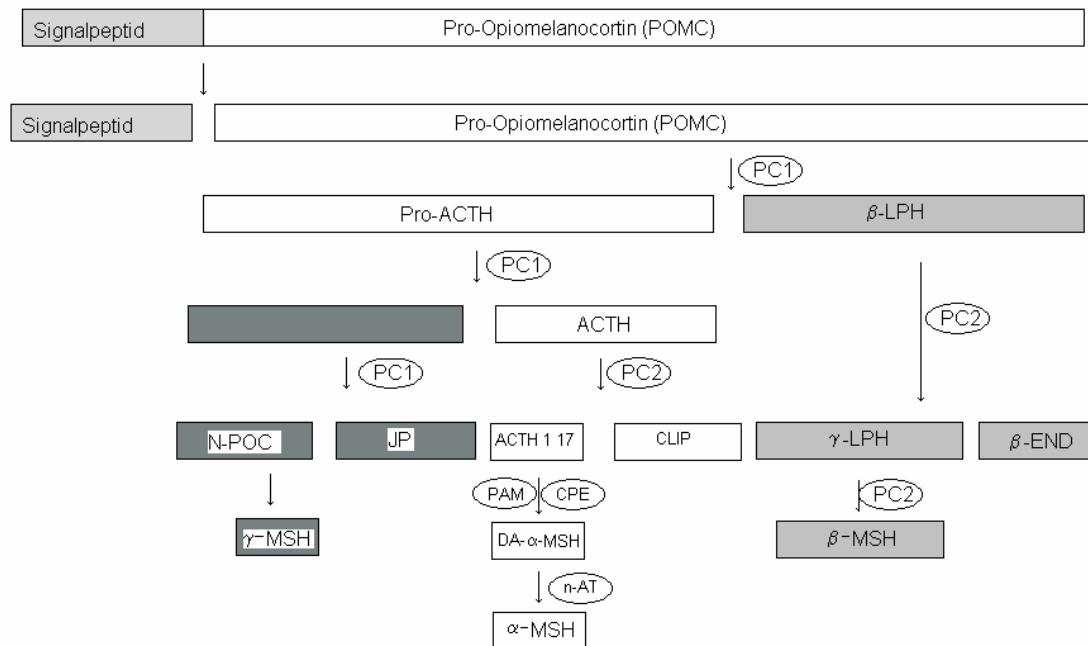


Abbildung 2: Prozessierung des Pro-Opiomelanocortin durch Prohormonconvertasen in seine Endprodukte. Das Prohormon POMC wird durch eine Reihe von proteolytischen Reaktionen zu seinen Endprodukten α -MSH, β -MSH, γ -MSH prozessiert. ACTH: Adrenocorticotrophes Hormon, LPH: Lipotrophin, N-POC: N-Terminales Fragment des POMC, JP: Junction Peptide, CLIP: Corticotrophin-Like-Intermediate-Lobe-Peptide, END: Endorphin, MSH: Melanozyten-Stimulierendes Hormon, PC: Prohormonconvertase, PAM: Peptidyl α -amidating Monooxygenase, CPE: Carboxypeptidase E, n-AT: N-Acetyltransferase

1.3.2. Die Melanocortinrezeptoren

In Vertebraten sind fünf verschiedene Melanocortinrezeptoren bekannt, die sich in Expression, Ligandenaffinität, zentraler und peripherer Funktion unterscheiden. Alle Melanocortinrezeptoren gehören zur Gruppe der siebentransmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und aktivieren über das $G\alpha_s$ -Protein die Adenylylcyclase, was wiederum zur Bildung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) führt. Der MC1R wird in den Melanozyten und in verschiedenen anderen peripheren Geweben exprimiert und stimuliert die Bildung des Farbstoffes Eumelanin. Ist der MC1R defekt, wird verstärkt der rötliche Farbstoff Pheomelanin gebildet. Der MC1R wird durch α -MSH und ACTH, β -MSH, in einem geringeren Maße auch durch γ -MSH aktiviert und besitzt eine vergleichbar hohe Basalaktivität (Suzuki et al., 1996). Der MC2R oder ACTH-Rezeptor wird in der Nebennierenrinde exprimiert und nur durch ACTH aktiviert (Schiöth et al., 1996a). Die Aktivierung des MC2R stimuliert die Glucocortikoidsynthese (Buckley und Ramachandran, 1981). Der MC5R ist in vielen peripheren Geweben sowie im Gehirn exprimiert und bindet alle vier Liganden (Labbé et al., 1994). Knockout des MC5R-Gens führt bei Mäusen zu einer Unterfunktion von exokrinen Drüsen und somit zu einer verringerten Talgproduktion (Chen et al., 1997). In der hypothalamischen Gewichtsregulation spielen vor allem der MC3R und der MC4R eine Rolle. Der MC4R wird im

Hypothalamus vor allem im *Nucleus paraventricularis* (PVN) exprimiert, zu dem sowohl die POMC-Neuronen als auch die AgRP-Neuronen projizieren. An den MC4R binden gleichermaßen α - und β -MSH sowie in geringerem Maße γ -MSH und ACTH (Schiöth et al., 1996b).

1.3.3. Mutationen im POMC und in der PC1

Patienten, die von einer homozygoten, vollständigen Funktionsverlustmutation im POMC-Gen oder von einer compound heterozygoten Deletion und Punktmutation im α -MSH betroffen sind, weisen daher durch fehlende MC1R Aktivierung rote Haare, durch fehlende MC2R Aktivierung adrenale Insuffizienz und durch fehlende MC4R/MC3R Aktivierung schwere frühmanifeste Adipositas auf (Krude et al., 1998). Einen analogen Phänotyp weisen auch Mäuse auf, deren POMC Gen deletiert wurde (Yaswen et al., 1999). Eine heterozygote, inaktivierende Punktmutation im für β -MSH codierenden Teil des POMC-Gens verursacht hingegen nur Adipositas, was zeigt, dass β -MSH eine Rolle für die Gewichtsregulation spielt (Biebermann et al., 2006; Lee et al., 2006). Auch der Verlust einer funktionsfähigen Prohormonconvertase 1 kann im Menschen unter Begleitung von verschiedenen anderen Symptomen zu Adipositas führen. Hierbei spielt sicherlich die fehlende Prozessierung des POMCs eine Rolle, allerdings werden auch viele andere Prohormone durch die PC1 prozessiert (Jackson et al., 2003).

1.3.4. Die Melanocortinrezeptor-Antagonisten Agouti und Agouti-Related-Peptide (AgRP)

Das peripher exprimierte Peptid Agouti und das zentral exprimierte Homolog AgRP wirken als endogene Antagonisten am MC1R, MC2R, MC4R und MC5R bzw. am MC3R und am MC4R. Für AgRP konnte außerdem ein inverser Agonismus am MC4R und MC3R gezeigt werden, da sie die Basalaktivität dieser Rezeptoren dosisabhängig senken können (Nijehus et al., 2001). Ein Mausmodell für die Wirkung des Agoutiproteins ist schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts bekannt. Danforth berichtete 1927 von einer Mauslinie mit gelbem Fell und Adipositas, deren homozygote Nachkommen nicht lebensfähig waren. Die genetische Ursache für diesen Phänotyp, der als Lethal Yellow (Ay) bezeichnet wurde, konnte erst Jahre später aufgeklärt werden. Ay-Mäuse weisen eine 170 kb-Deletion auf, bei der der Promotor und das erste nicht kodierende Exon des ubiquitär exprimierten Gens *Raly* vor dem 3'-Ende des Agouti Gens lokalisiert sind (Michaud et al., 1994). Dadurch wird das sonst nur in Melanozyten kontrolliert exprimierte Agouti konstitutiv und ubiquitär exprimiert und kann in den Melanozyten den MC1R hemmen, was zu einer gelben Fellfarbe führt. Außerdem ist Agouti nun auch im Gehirn exprimiert und kann antagonistisch am MC4R wirken, was wiederum die Adipositas der Ay-Mäuse erklärt. Das Fehlen des RNA-bindenden Proteins Raley erklärt die Letalität der homozygoten Ay-Mäuse (Michaud et al., 1993). AgRP wirkt antagonistisch an MC3- und MC4Rs, jedoch nicht an den anderen Melanocortinrezeptoren. Daher besitzen transgene Mäuse, die AgRP unter der Kontrolle des β -Actin Promoters überexprimieren, nur den hyperphagischen und adipösen Phänotyp bei normaler Fellfarbe (Ollmann et al., 1997). Intracerebroventrikuläre Injektion eines carboxyterminalen Fragments des AgRP erhöht die Nahrungsaufnahme in Mäusen auch nach Injektion von MC4R Agonisten (Rossi et al., 1998) und wirkt somit orexigen. Im Gegensatz zum erwarteten dünnen oder hypophagen Phänotyp weisen weder AgRP-knockout-Mäuse und NPY-knockout-Mäuse noch aus diesen beiden Stämmen gezüchtete doppelknockout-Mäuse einen bemerkenswerten Phänotyp auf (Qian et al., 2002). Erst im Alter wird

ein Effekt des fehlenden AgRP deutlich: Im Alter von sechs Monaten sind die knockout-Mäuse deutlich leichter als die WT-Tiere, was aber nicht an einer verminderten Nahrungsaufnahme liegt, sondern vielmehr an einem erhöhten Energieverbrauch, der wiederum durch eine Aktivierung der Schilddrüsenachse über eine im Hypothalamus erhöhte TRH-Expression verursacht wird (Wortley et al., 2005). Durch transgene Expression des Diphtherietoxin-Rezeptors in AgRP-Neuronen konnten diese zu verschiedenen Zeitpunkten durch Diphtheritoxinjektion entfernt werden. Es zeigten sich bei neonataler Entfernung der Neuronen nur geringe Effekte auf die Nahrungsaufnahme. Mäuse hingegen, deren AgRP-Neuronen erst im Erwachsenenalter entfernt wurden, wiesen eine stark verminderte Nahrungsaufnahme auf, wodurch die Mäuse letztlich verhungerten (Luquet et al., 2005). Im Menschen wurden bereits zwei Polymorphismen im AgRP mit verringerter Energieaufnahme bzw. mit einem protektiven Effekt vor Adipositas assoziiert. Ein SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in der kodierenden Region verursacht einen Aminosäureaustausch von Alanin nach Threonin (Loos et al., 2005), ein weiterer SNP im Promotor verringert dessen Aktivität (Mayfield et al., 2001).

1.3.5. Die Rolle des MC3- und des MC4-Rezeptors

POMC- und AgRP-Neuronen projizieren weitestgehend zu denselben hypothalamischen Arealen (Bagnol et al., 1999). In der gleichen Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass MC3-Rezeptoren im *Nucleus arcuatus* sowohl in POMC- als auch in AgRP/NPY-Neuronen exprimiert werden. Außerdem gibt es im *Nucleus arcuatus* AgRP-immunoreaktive Synapsen, die an POMC-immunoreaktiven Zellkörpern lokalisiert sind. Man geht daher davon aus, dass hier ein inhibitorischer Regelkreis existiert: AgRP exprimierende Neuronen hemmen durch Inhibierung von MC3-Rezeptoren die anorexigenen POMC Neuronen und verstärken so orexigene Signale. Der MC3R wird daher als inhibitorischer Autorezeptor auf POMC-Neuronen betrachtet. Während der MC3R in spezifischen Gehirnregionen, der Plazenta und im Darm exprimiert wird (Gantz et al., 1993a), ist die Expression des MC4R weitestgehend auf das Gehirn beschränkt. Dort wird der MC4R allerdings weiter verteilt exprimiert, z.B. in der Amygdala, im Cortex, im Hirnstamm, im Thalamus, im Rückenmark sowie im Hypothalamus (Gantz et al., 1993b). Der MC4R wird im Hypothalamus vor allem im *Nucleus paraventricularis* (PVN) exprimiert. Dorthin projizieren sowohl die POMC als auch die AgRP-Neuronen. Der Signalweg downstream des MC4Rs ist weitestgehend unbekannt. Es wurde gezeigt, dass einige MC4R-exprimierende PVN-Neuronen TRH exprimieren (Harris et al., 2001). Ein kürzlich identifizierter möglicher Mediator ist das Neurotrophin BDNF und dessen Rezeptor TrkB (siehe Abschnitt 1.8).

1.4. MC3R und MC4R- Mutationen und Deletionen in Mensch und Maus

1.4.1. MC4R knockout-Mäuse

Im Jahr 1997 wurde von Huszar und Mitarbeitern eine MC4R knockout-Mauslinie erstellt. Diese Mäuse zeigen verglichen mit WT-Mäusen ein erhöhtes Körpergewicht beginnend von der 5. Woche an. Homozygote MC4R^{-/-}-Weibchen sind im Alter von 15 Wochen etwa doppelt so schwer wie die WT-Tiere, während heterozygote MC4R^{+/-}-Weibchen ein um 50% erhöhtes Körpergewicht haben. Dieser intermediäre Phänotyp spricht für einen Gen-Dosis-Effekt des MC4R auf das Körpergewicht. Auch bei den Männchen traten ähnliche Effekte auf, allerdings war die Adipositas der heterozygoten Männchen

nicht ganz so ausgeprägt wie bei den Weibchen. MC4R knockout-Mäuse verhalten sich hyperphag und fressen etwa 50% mehr als WT-Mäuse. Eine weitere Auffälligkeit war ihr erhöhtes Längenwachstum: MC4R^{-/-}-Weibchen waren ca. 11%, Männchen ca. 8% länger als WT-Mäuse. Der MC4R-Knockout führt in Mäusen außerdem zu Hyperinsulinismus und bei Männchen zu Hyperglykämie. Auch die Leptinspiegel sind in männlichen und weiblichen knockout-Mäusen stark erhöht. Der Hyperinsulinismus setzt schon vor der Adipositas im Alter von 4 Wochen ein, eine Insulinresistenz tritt im Alter von 8 Wochen auf (Fan et al., 2000). Weiterführende Arbeiten zeigten, dass die Adipositas der MC4R^{-/-}-Mäuse nicht nur durch die erhöhte Nahrungsaufnahme verursacht wird, sondern dass auch metabolische Effekte eine Rolle spielen: Wird MC4R^{-/-}-Weibchen nur die Menge an Futter zur Verfügung gestellt, die WT-Mäuse in der gleichen Zeit fressen, werden sie zwar leichter als ihre Artgenossen mit freiem Zugang zum Futter, sind aber noch schwerer als die WT-Tiere und besitzen eine höhere Fettmasse (Ste Marie et al., 2000). Noch bevor sich die Adipositas manifestiert, zeigten die jungen MC4R knockout-Mäuse einen geringeren Sauerstoffverbrauch und bei den jungen Männchen konnte außerdem eine verringerte nächtliche Aktivität beobachtet werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Adipositas der MC4R^{-/-}-Mäuse sowohl durch eine erhöhte Energiezufuhr als auch durch einen verringerten Energieverbrauch verursacht wird. Dass die im Hypothalamus exprimierten MC4-Rezeptoren eher eine Rolle für die Nahrungsaufnahme spielen, konnte durch Einbau einer lox-P-Kassette in das *MC4R*-Gen, die dessen Expression verhindert, gezeigt werden (Balthasar et al., 2005). Die so genetisch modifizierten Mäuse wiesen eine Adipositas wie die MC4R^{-/-}-Tiere auf. Wurden diese Tiere mit Tieren gekreuzt, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Sim1*-Promotors exprimierten, wurde die MC4R-Expression selektiv im Hypothalamus und in der Amygdala in der Nachkommenschaft rekonstituiert. Diese Reexpression verhinderte 60% der Adipositas im Vergleich mit den vollständigen knockout-Mäusen und hatte keinen Effekt auf den Energieverbrauch sondern nur auf die Nahrungsaufnahme. Die Mäuse, die den MC4R nur im PVN des Hypothalamus und in der Amygdala exprimierten, fraßen genauso viel wie die WT-Mäuse. Somit konnte bewiesen werden, dass der hypothalamisch exprimierte MC4R nur die Menge der aufgenommenen Nahrung reguliert. Für die Regulation des Energieverbrauches hingegen sind die in anderen Gehirnregionen (z.B. im Hirnstamm) oder in peripheren Geweben exprimierten MC4-Rezeptoren von Bedeutung.

1.4.2. Humane MC4R-Mutationen

Im Menschen wurde zunächst eine heterozygote, einen Frameshift verursachende 4-bp-Deletion im *MC4R*-Gen entdeckt, die zu Adipositas führte (Yeo et al., 1998; Vaisse et al., 1998). Der Patient war 4 Jahre alt und lag mit seinem BMI über der 99., mit seiner Größe über der 91. Perzentile und war hyperphag. In den darauffolgenden Jahren wurden bei Kindern mit frühmanifestierter Adipositas über 60 verschiedene, meist heterozygote Punktmutationen gefunden. Die Rate der Mutationsträger beträgt je nach Veröffentlichung etwa 2,5% bis maximal 6% (Farooqi et al., 2003) und ist somit die häufigste Ursache für monogenetische, nicht-syndromische Adipositas. Es wurden auch seltene Fälle von homozygoten bzw. compound heterozygoten Mutationsträgern identifiziert (Farooqi et al., 2003; Tarnow et al., 2003). In den Familien hatten homozygote Mutationsträger einen höheren BMI als heterozygote Familienmitglieder, was sich mit den Daten aus den MC4R-knockout-Experimenten in Mäusen deckt. Das Auftreten von Adipositas in heterozygoten Mutationsträgern sowie in

heterozygoten MC4R^{+/-}-Mäusen spricht für eine Haploinsuffizienz bzw. einen Gen-Dosiseffekt des MC4R. Bisher wurde erst eine Mutation identifiziert, die einen dominant-negativen Effekt verursachte (Biebermann et al., 2003). Viele der gefundenen Mutationen wurden *in vitro* charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass es sich bei den meisten Mutationen um Funktionsverlustmutationen handelte. So verursacht ein Großteil der Mutationen eine Retention des Rezeptorproteins im endoplasmatischen Retikulum und verhindert eine für die Signalisierung notwendige Expression an der Zelloberfläche (Lubrano-Berthelier et al., 2003). Andere mutierte MC4Rs werden an die Oberfläche transportiert, können aber entweder keinen Liganden binden oder nicht an das G α_s -Protein koppeln (Biebermann et al., 2003). Es wurden allerdings auch inaktivierende Mutationen in normalgewichtigen Trägern identifiziert (Vaisse et al, 2000). Auch in den Familien von MC4R-Mutationsträgern einer französischen Studie findet man Mutationsträger, die nicht übergewichtig sind, sowie adipöse Familienträger, die keine Mutationen tragen (Dubern et al., 2001).

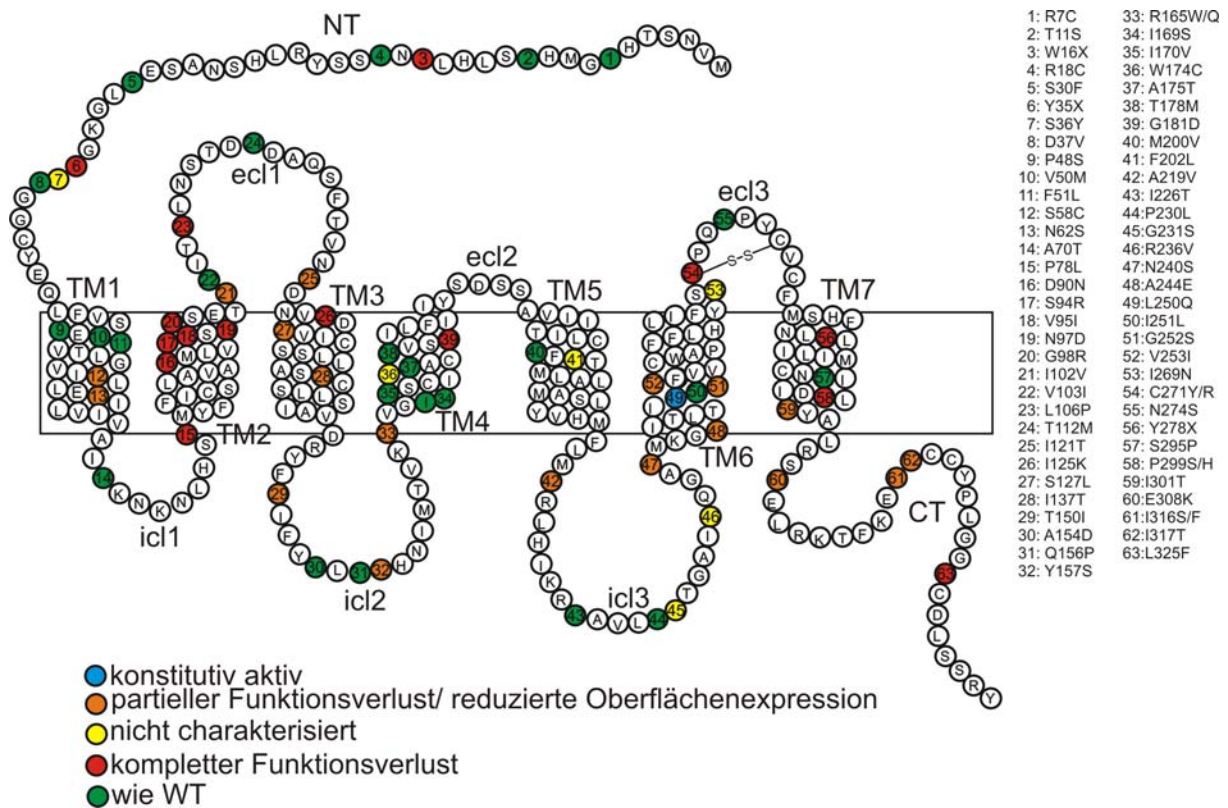


Abbildung 3: Bisher gefundene Mutationen im humanen MC4R. Der MC4R ist als zweidimensionales Modell dargestellt. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Positionen, an denen Mutationen gefunden wurden, sind nummeriert. Der Austausch sowie die Nummer der Position sind in der Liste rechts angegeben. Wurde die Mutation funktionell charakterisiert, ist das Ergebnis durch die Färbung des Kreises angezeigt. Die Quellenangaben zu den Mutationen befinden sich in Tabelle A1 im Anhang. Die Domänen des Rezeptors sind wie folgt gekennzeichnet: TM = Transmembrandomäne; ecl = extrazelluläre Schleife; icl = intrazelluläre Schleife.

Der adipöse Phänotyp von MC4R-Mutationsträgern wird also mit einer unvollständigen Penetranz ausgebildet. Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die Positionen der bisher identifizierten Punktmutationen im zweidimensionalen Modell des humanen MC4R und gibt das Ergebnis der funktionellen Charakterisierung an. Phänotypisch sind die meisten Träger von funktionell relevanten MC4R-Mutationen hyperphag, hyperinsulinämisch und haben eine erhöhte Fettmasse, fettfreie Masse, Knochendichte und Körpergröße. In einigen Studien wurden Heißhungeranfälle (*binge eating*) mit

MC4R-Mutationen assoziiert (Branson et al., 2003). Dieses konnte aber durch andere Studien widerlegt werden (Hebebrand et al., 2004; Lubrano-Bartheliet al., 2006). Im Gegensatz zu MC4R knockout-Mäusen handelt es sich beim Menschen um eine frühmanifeste Adipositas, die schon in den ersten Lebensmonaten auftritt und im Alter abnimmt.

Bisher existieren noch keine Daten darüber, ob und in welcher Häufigkeit funktionell relevante MC4R-Mutationen in der Normalpopulation auftreten. Da es sich bei dem Krankheitsbild der Adipositas um einen multifaktoriell bedingten Phänotyp handelt, ist es schwierig von den *in vitro* Daten einer funktionell charakterisierten Rezeptormutante auf den Grad der Adipositas zu schließen und umgekehrt. Punktmutationen in einem besser vergleichbaren *in vivo* System wie transgenen Mäusen würden aufklären, inwieweit *in vitro* gewonnene funktionelle Rezeptordaten und Phänotypen miteinander korrelieren. Die bisher identifizierten, zu Aminosäureaustauschen führenden Punktmutationen sind über den gesamten Rezeptor verteilt. Ein Vergleich einer hohen Anzahl von orthologen MC4R könnte helfen, für die Rezeptorfunktion essentielle Bereiche oder Aminosäuren zu identifizieren, um so eine Vorhersage für die funktionelle Relevanz von in Patienten gefundenen Mutationen zu treffen.

1.4.3. MC3R knockout-Mäuse

Im Jahr 2000 konnte von zwei unabhängigen Gruppen gezeigt werden, daß MC3R knockout-Mäuse eine um 50-60% erhöhte Fettmasse und eine reduzierte fettfreie Masse bei einem weitestgehend unveränderten Körpergewicht aufweisen (Butler et al., 2000 und Chen et al., 2000). Im Gegensatz zu MC4R knockout-Tieren verhalten sich MC3R knockout-Tiere hypophag. Die erhöhte Fettmasse kommt daher durch eine verbesserte Fütterungseffizienz zustande, die eine Adipozytenhypertrophie zur Folge hat. Die Serumwerte der Tiere deuten auf eine Hyperleptinämie und bei den Männchen zusätzlich auf eine milde Hyperinsulinämie hin. Die Ursache der Fettmassenerhöhung ist bis heute ungeklärt. Körpertemperatur und metabolische Rate waren in den knockout-Tieren unverändert und auch die Serumspiegel des Schilddrüsenhormons T4 und des Corticotropin-Releasing Hormons wiesen keine Unterschiede zu denen der WT-Tiere auf. Allerdings konnten Butler und Mitarbeiter eine Erhöhung des respiratorischen Quotienten (RQ) feststellen, wenn die Tiere von normalem Futter auf Futter mit hohem Fettgehalt gesetzt wurden, was auf ein reduziertes Verhältnis der Fett-/Kohlenhydrat-Oxidation hinweist. Der RQ (das Verhältnis von ausgeatmetem CO₂ zu eingeatmetem O₂) liegt bei kohlenhydratreicher Ernährung bei 1, und sinkt bei fett- oder proteinreicher Ernährung unter 1. Außerdem konnte eine verminderte Laufradaktivität der MC3^{-/-}-Tiere gezeigt werden. Eine Erhöhung des Längenwachstums wie bei den MC4R^{-/-}-Tieren konnte bei den MC3^{-/-}-Tieren nicht beobachtet werden. Beide Gruppen berichten eher von einer Verminderung der Länge. Heterozygote MC3^{+/-}-Tiere wiesen keine statistisch signifikanten Veränderungen im Gewicht, der Fettmasse und bei den Serumwerten im Vergleich zu WT-Tieren auf. Tiere, bei denen sowohl der MC3R als auch der MC4R deletiert wurden, waren signifikant adipöser als MC4R^{-/-}-Tiere, was auf einen nicht redundanten Wirkungsmechanismus der beiden Rezeptoren schließen läßt.

Melanotan-II (MTII), ein unselektiver und hochpotenter Melanocortinrezeptor Agonist, inhibiert bei intracerebroventrikularer oder intraperitonealer Gabe die Nahrungsaufnahme. Bei MC4R^{-/-}-Tieren hat

MTII keinen Effekt (Marsh et al., 1999), was darauf hindeutet, daß die Wirkung auf das Fressverhalten ausschließlich über den MC4R vermittelt wird. Chen und Mitarbeiter bestätigen diese Ergebnisse, indem sie zeigten, dass MTII-Administration bei MC3R^{-/-} wie bei WT-Tieren eine verminderte Nahrungsaufnahme zur Folge hat. Periphere Administration von D-Trp⁸- γ -MSH, einem Melanocortinrezeptor-Agonisten, der eine 100-fach höhere Affinität zum MC3R als zu den anderen Melanocortinrezeptoren hat (Grieco et al., 2000), steigert hingegen die Nahrungsaufnahme in WT- und MC4R^{-/-}, aber nicht in MC3R^{-/-}-Mäusen (Marks et al., 2006).

1.4.4. Humane MC3R-Mutationen und Polymorphismen

Das humane MC3R Gen liegt auf Chromosom 20 in der Region 20q13.2, die in Linkage-Studien mit hohem BMI, hoher Fettmasse und hohem Seruminulin assoziiert wurde (Lembertas et al., 1997). Zwei Polymorphismen in der codierenden Region des Rezeptors, die in den Aminosäureaustauschen T6K im Aminoterminus und V181I in der ersten Transmembrandomäne (TM) resultieren, sind bekannt und kommen sowohl in adipösen Patienten als auch in normalgewichtigen Kontrollen vor. Weder in einem Kollektiv extrem übergewichtiger Frauen (Li et al., 2000) bzw. Frauen und Männern (Schalin-Jantti et al., 2003) noch in einem Kollektiv von Diabetes-Typ-II-Patienten (Hani et al., 2001) oder bei adipösen Maori-Indianern (Wong et al., 2002) konnten diese beiden Polymorphismen mit einem Phänotyp assoziiert werden. Bei Kindern, die für beide Polymorphismen homozygot sind, konnte hingegen eine Assoziation mit frühmanifesten Adipositas sowie Körperfettmasse gezeigt werden (Feng et al., 2005). Hier wurde auch eine eingeschränkte Funktion des doppelt mutierten Rezeptors (T6K/V81I) in Ligandenbindung und Signaltransduktion, sowie eine geringere Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp *in vitro* nachgewiesen. Diese Doppelmutante wurde bevorzugt bei afroamerikanischen Kindern gefunden. Eine heterozygote Mutation im MC3R, die einen Austausch des Isoleucins an Position 183 zu Asparagin in der zweiten extrazellulären Schleife bewirkt, wurde bei einem adipösen Mädchen aus Singapur entdeckt (Lee et al., 2002). Auch der adipöse Vater war Mutationsträger, allerdings waren auch von der Mutation nicht betroffene Familienmitglieder adipös. Spätere Zellkulturexperimente zeigten eine stark reduzierte Ligandenbindung und einen kompletten Funktionsverlust bei ligandenvermittelter cAMP-Produktion, wohingegen die einzelnen Polymorphismen T6K und V81I keinen Einfluß auf die Rezeptorfunktion hatten (Tao und Segaloff, 2004). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte eine intrazelluläre Retention des I183N-Rezeptors, sowie einen dominant-negativen Effekt auf die Funktion des WT-Rezeptors bei Coexpression in HEK293 Zellen (Rached et al., 2004). Gegenteiliges wurde allerdings von Tao und Segaloff beschrieben. Kürzlich konnten zwei neue MC3R-Mutationen bei adipösen Kindern und Jugendlichen gefunden werden, die die Aminosäureaustausche Alanin zu Threonin an Position 70 und Methionin zu Isoleucin an Position 134 bewirken (Lee et al., 2007). Die Mutationen liegen im Aminoterminus bzw. in der zweiten intrazellulären Schleife und bewirken funktionell eine leichte Verringerung der dosisabhängigen cAMP-Antwort nach Stimulation mit α -MSH, wohingegen die Ligandenbindung nicht beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit wurde auch die I183N Mutation reevaluiert. Diesmal zeigte sich keine Veränderung der Ligandenaffinität in Bindungsexperimenten, der vollständige Funktionsverlust in Bezug auf die Signaltransduktion konnte jedoch bestätigt werden. Ein dominant-negativer Effekt wurde auch hier nicht beobachtet. Im Vergleich zu den MC3R anderer Spezies oder zu den anderen humanen Melanocortinrezeptoren besitzen der humane MC3R und die MC3R von Primaten einen um

fast 40 Aminosäuren längeren Aminoterminus, der durch ein zusätzliches, 3' gelegenes Start-ATG entsteht. Dazwischen liegt die oben erwähnte T6K-Variante. Bisher existieren allerdings keine Daten, ob dieses zusätzliche ATG wirklich zur Initiation der Proteintranslation verwendet wird.

1.5. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

1.5.1. Einteilung und Strukturmerkmale von GPCRs

Viele anorexigene und orexigene Peptide und Neurotransmitter üben ihre Effekte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) aus. GPCRs stellen die größte Familie von Zelloberflächenrezeptoren in Vertebraten dar und werden durch eine Vielzahl von verschiedenen Liganden aktiviert. Im humanen Genom beträgt die Zahl von GPCRs etwa 1300, wobei ein Großteil davon chemosensorische GPCRs ausmacht. 367 GPCRs hingegen sind sogenannte endo-GPCRs, deren Ligand endogen gebildet wird (Vassilatis et al., 2003). Bei ca. 100 der endo-GPCRs ist der Ligand noch nicht identifiziert worden, diese Rezeptoren werden als orphane („verwaiste“) Rezeptoren bezeichnet. In über 30 GPCRs wurden aktivierende oder inaktivierende Mutationen gefunden, mit denen sich Erkrankungen im Menschen erklären lassen (Schöneberg et al., 2004). Pharmakologisch sind GPCRs von besonderem Interesse, da von allen auf dem Markt existierenden Medikamenten mehr als 30% GPCRs als Ziel haben (Wise et al., 2002). Alle GPCRs besitzen eine gemeinsame Grundstruktur bestehend aus einem extrazellulären Aminoterminus, sieben transmembranären α -Helices (TM1-7) und einem intrazellulären Carboxyterminus (Baldwin, 1993; siehe Abb. 3). Die TMs sind durch extra- oder intrazelluläre Schleifen (oder Loops, ecl bzw icl 1-3) miteinander verbunden und sind – von der Cytoplasmaseite aus gesehen – kreisförmig im Uhrzeigersinn angeordnet. Aufgrund von Sequenzhomologien lässt sich die Familie der GPCRs in weitere Klassen unterteilen. Die dem Rhodopsin ähnlichen Rezeptoren, zu der auch die Melanocortinrezeptoren gehören, werden zur Klasse A zusammengefasst. Rezeptoren der Klasse B sind durch einen langen extrazellulären N-Terminus mit diversen Disulfidbrücken innerhalb dieser Domäne gekennzeichnet. Die Disulfidbrücke zwischen den ersten beiden extrazellulären Loops findet sich auch bei Klasse B wieder, es fehlt jedoch die Palmylierungsstelle im C-Terminus. Zu Klasse B werden u.a. der Calcitonin- und der Glucagonrezeptor gezählt. Klasse C Rezeptoren besitzen einen noch längeren N-Terminus als Klasse B Rezeptoren (ca. 600 Aminosäuren) und einen langen C-Terminus. Die Disulfidbrücke zwischen dem 1. und dem 2.ecl treten auch in dieser Familie häufig auf. Ein besonderes Merkmal der Klasse C ist der extrem kurze dritte intrazelluläre Loop. Die bekanntesten Vertreter der Familie C Rezeptoren sind Calcium-, GABA- und Glutamatrezeptoren.

1.5.2. Aktivierung von Klasse A GPCRs

Die Zusammensetzung der Klasse A ist sehr heterogen, aber einige Aminosäuresequenzen tauchen in den meisten Mitgliedern dieser Klasse auf. Beispielsweise findet man das sogenannte (D/E)RY-Motiv (eine Asp/Glu-Arg-Tyr-Sequenz am cytoplasmatischen Ende der dritten Transmembrandomäne) in jedem Rezeptor der Klasse A (Probst et al., 1992). Die Interaktion des Asparagins und Arginins der TM3 mit einem Glutaminsäurerest im cytoplasmatischen Ende der TM6 stabilisiert die inaktive Rezeptorkonformation (Ballesteros et al., 2001) und wird bei Aktivierung des Rezeptors unterbrochen. Dieser molekulare Mechanismus wird auch als *ionic lock* bezeichnet. Im Rhodopsin bewirkt die

Aktivierung des Rezeptors eine Drehung der TM6 relativ zur TM3, was eine Öffnung des Transmembrankerns zur Folge hat (Farrens et al., 1996). Diese Beobachtung konnte auch auf andere GPCRs wie z.B. den β 2-adrenergen Rezeptor (β 2AR) übertragen werden (Ballesteros et al., 2001). Da TM6 ein hochkonserviertes Prolin aufweist, welches zu einem Knick in der Mitte der TM führt, bewirkt die Drehung der Helix nach Agonistenbindung eine Verschiebung des cytoplasmatischen Endes der Helix (Shi et al., 2002). Da GPCRs nur schwer zu kristallisieren sind, stand für Strukturanalysen bisher nur die Kristallstruktur des bovinen Rhodopsins zu Verfügung (Okada et al., 2000; Palczewski et al., 2000). Erst kürzlich konnten zwei Arbeitsgruppen eine Kristallstruktur des β 2AR veröffentlichen (Rasmussen et al., 2007; Cherezov et al., 2007). In der Kristallstruktur des im inaktiven Zustand kristallisierten Rhodopsins ist die Interaktion des *ionic locks* erkennbar. Der β 2AR wurde unter Anwesenheit des inversen Agonisten Carbachol kristallisiert und repräsentieren somit auch eher den inaktiven Zustand. Allerdings weisen selbst carbacholinaktivierte β 2ARs noch eine geringe Aktivität auf. Daher ist der Abstand des TM3 Arginins zur TM6 Glutaminsäure in der β 2AR-Struktur größer als in der Rhodopsinstruktur. Die Kristallstrukturen zeigten auch, dass Wassermoleküle zu den Interaktionen der TMs beitragen. So stabilisiert ein Wassermolekül im Rhodopsin die Interaktion zwischen dem Asparagin des hochkonservierten D/NPXXY Motivs in TM7 und anderen TMs im inaktiven Zustand (Okada et al., 2002). Vereinfacht dargestellt existieren GPCRs in einem inaktiven (R) und aktiven (R*) Zustand. In Abwesenheit von Liganden überwiegt der inaktive Zustand, während der aktive Zustand durch Ligandenbindung stabilisiert wird. Inverse Agonisten stabilisieren den inaktiven Zustand (Deupi und Kobilka, 2007). Viele Rezeptoren der Klasse A besitzen außerdem je ein Cystein im 1. und im 2.ecl, die eine Disulfidbrücke zwischen diesen beiden Loops bilden und ein Cystein im intrazellulären C-Terminus, das eine mögliche Palmitoylierungsstelle als Membrananker darstellt und dadurch einen vierten intrazellulären Loop bildet. Auch die Melanocortinrezeptoren weisen das DRY-Motiv auf und gehören somit zur Familie A, ihnen fehlt jedoch die Disulfidbrücke. Sie besitzen allerdings eine einzigartige Disulfidbrücke innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife (Tarnow et al., 2003; Holst et al., 2002).

1.6. Signaltransduktionsmechanismen von Melanocortinrezeptoren

Es ist nicht sicher, ob die Kristallstrukturen des Rhodopsins und des β 2-AR auf die Melanocortinrezeptoren übertragen werden können. Es wurden allerdings einige Studien zur Aktivierung des MC4R vor allem durch NDP- α -MSH durchgeführt. Hogan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Isoleucine an den Positionen 125, 129 und 291 im humanen MC4R an der Bildung einer hydrophoben Tasche beteiligt sind (Hogan et al., 2006). I¹²⁵ und I¹²⁹ liegen in den extrazellulären Bereichen von TM3 bzw TM7, I²⁹¹ liegt über dem D/NPXXY-Motiv und könnte bei Ligandenbindung zur Rotation von TM6 führen. Eine andere Arbeit zeigte, dass NDP- α -MSH mit D¹²⁶ und H²⁶⁴ interagiert (Pogozheva et al., 2005), dass aber für die Bindung von Nicht-Peptid-Liganden andere Aminosäuren wichtig sind. Mutagenese von von D¹²² und D¹²⁶ in TM3, sowie F²⁶¹ und H²⁶⁴ zu Alanin bewirkte eine fünffach schwächere Bindung von NDP- α -MSH an den MC4R (Yang et al., 2000). Im α -MSH sind besonders die Aminosäuren His⁶, Phe⁷, Arg⁸ und Trp⁹ wichtig für die Rezeptorbindung und -aktivierung. Diese vier Aminosäuren sind in allen drei Melanocortinen zu finden. Yang und Mitarbeiter konnten eine Interaktion des NDP- α -MSH-Arginins mit der Asparaginsäure 122 im MC4R zeigen. Als

Hauptsignalweg gilt die Aktivierung von $G\alpha_s$ und infolgedessen Aktivierung der Adenylylcyclase, Bildung des sekundären Botenstoffes cAMP und Aktivierung der Proteinkinase A. Diese phosphoryliert unter anderem den Transkriptionsfaktor CREB. Für die funktionelle Charakterisierung von Melanocortinrezeptormutanten wird meist dieser Signalweg angenommen. Es konnten allerdings auch schon Aktivierungen von anderen Signalwegen, wie die Erhöhung intrazellulären Kalziums (Mountjoy et al., 2001) oder Phosphorylierung der MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) Erk1/2 über die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) nachgewiesen werden (Vongs et al., 2004).

1.7. Di- und Oligomerisierung von Melanocortinrezeptoren

Di- bzw. Oligomerisierung ist eine in den letzten Jahren akzeptierte Eigenschaft der GPCRs (George et al., 2004; Bouvier 2001). Zwar wurde kürzlich für Rhodopsin und für den β_2 -AR gezeigt, dass ein GPCR-Monomer für die Signaltransduktion ausreicht (Whorton et al., 2007 & 2008), allerdings konnte mittels Rasterkraftmikroskopie die Existenz von Rhodopsindimeren in nativen murinen Membranen gezeigt werden (Fotiadis et al., 2003). Mittels immunologischer und biophysikalischer Methoden wie Biolumineszenz- bzw. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (BRET bzw. FRET) konnte die Oligomerisierung von Melanocortinrezeptoren in Zellkulturexperimenten gezeigt werden (Biebermann et al., 2003; Mandrika et al., 2005; Nickolls und Maki, 2006, Sánchez-Laorden et al., 2006). Auch Berechnungen der Bindungskinetiken von NDP- α -MSH an den MC4R kommen zu dem Schluss, dass MC4R als di- oder oligomere Komplexe vorliegen, deren Bindungsstellen sich gegenseitig beeinflussen (Kopanchuck et al., 2006). Funktionelle Studien am Angiotensin-II-Rezeptor zeigten, dass bei Coexpression zweier unterschiedlich bindungsdefizienter Rezeptormutanten eine Ligandenbindung stattfindet (Monnot et al., 1996). Daraus wurde geschlußfolgert, dass eine funktionelle Rezeptoreinheit aus zwei sich überlappenden Rezeptorproteinen entsteht (Domainswapping). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei anderen GPCRs wie z.B. beim Histamin-1-Rezeptor beobachtet (Bakker et al., 2004). Wie es zwischen den Rezeptormolekülen zu einer Dimerisierung kommt, ist unklar. Es könnten sowohl intermolekulare Disulfidbrücken als auch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Transmembrandomänen zur Dimerisierung führen. Beispielsweise konnte durch Mutation von zwei Aminosäuren in TM1 bzw. in TM4 des Chemokinrezeptors 5 eine Dimerisierung verhindert werden. In diesem Fall konnte auch die Signaltransduktion nicht mehr stattfinden (Hernandez-Falcón et al., 2004). Beim Serotoninrezeptor Typ 4 (5HT4-R) hingegen scheint die Dimerisierung von transmembranären Cysteinen abzuhängen (Berthouze et al., 2007). Bei den Melanocortinrezeptoren konnten bisher nur die extrazellulären Cysteine als funktionell wichtige Elemente der Rezeptordimerisierung ausgeschlossen werden (Elsner et al., 2006). Ein wichtiger funktioneller Effekt einer inaktivierenden Mutation in einem Rezeptordimer konnte im Falle der D90N-Mutation des MC4R gezeigt werden. Coexpression des gut an der Zelloberfläche exprimierten mutierten Rezeptors mit dem WT führte zur Bildung eines Heterodimers, welches verschlechterte Signaltransduktionseigenschaften im Vergleich mit dem WT-Homodimer aufweist (Biebermann et al., 2003). Dieses ist das bisher einzige Beispiel für einen dominant-negativen Effekt einer MC4R-Mutation. Weitere Mutationen, die einen dominant-negativen Effekt auf WT-Rezeptoren haben, könnten helfen, die bisher unklaren Aktivierungsmechanismen des MC4R-Dimers zu verstehen.

1.8. Die Rolle von BDNF und TrkB in der hypothalamischen Gewichtsregulation

Im Gegensatz zu den gut untersuchten Signalwegen im *Nucleus arcuatus* ist über die Signalwege hinter dem hypothalamisch exprimierten MC4R wenig bekannt. Als ein möglicher Kandidat für die Weiterleitung des anorexigenen Signals nach Aktivierung des MC4-Rezeptors wird seit kurzem das Neurotrophin BDNF und der dazugehörige Rezeptor TrkB betrachtet (Xu et al., 2003).

1.8.1. Die Neurotrophinrezeptoren

TrkB gehört neben TrkA und TrkC zu den Neurotrophinrezeptoren. Der zuerst entdeckte Neurotrophinrezeptor TrkA wurde zunächst als ein mit Tropomyosin fusioniertes Oncogen aus Darmkrebszellen kloniert und so Tropomyosin-related-kinase (abgekürzt Trk) genannt (Martin-Zanca et al., 1986). Aufgrund von Homologien wurden später TrkB und TrkC als weitere Mitglieder dieser Rezeptortyrosinkinasefamilie identifiziert. In einer Phäochromocytomzelle (PC12), die sich mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) zu Neuronen differenzieren lässt, konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinaseaktivität von TrkA direkt durch Bindung von NGF induziert werden kann (Kaplan et al., 1991). Als endogene Liganden von TrkB wurden BDNF (Brain-Derived-Neurotrophic-Factor) und Neurotrophin 3 identifiziert (Klein et al., 1991).

1.8.2. BDNF und TrkB im Hypothalamus

Im Hypothalamus von Wildtyp-Tieren wird BDNF im ventromedialen Hypothalamus (VMH) und im lateralen hypothalamischen Areal (LHA) am stärksten exprimiert. Die meisten homozygoten BDNF-Knockout-Mäuse (BDNF^{-/-}) versterben in den ersten zwei postnatalen Tagen und die wenigen zwei bis vier Wochen überlebenden Tiere weisen schwere Störungen des Nervensystems auf, unter anderem Ataxie (Jones et al., 1994). Bei etwa der Hälfte von heterozygoten BDNF-Knockout-Tieren (BDNF^{+/-}) konnten neben einem hyperaktiven Verhalten auch Hyperphagie und daraus resultierend Adipositas festgestellt werden (Kernie et al., 2000). Sowohl die adipösen als auch die normalgewichtigen Mäuse wiesen auf Transkriptionsebene eine um die Hälfte verringerte BDNF-RNA-Expression im Hypothalamus auf. Auch bei Mäusen, deren *BDNF*-Gen mittels cre-loxP-Rekombinationssystem erst postnatal deletiert wurde, konnte Adipositas und Hyperaktivität festgestellt werden (Rios et al., 2001). Auch ein kompletter Knockout des TrkB-Gens (*NTRK2*) ist im Mausmodell postnatal letal (Klein et al., 1993). Diese Mäuse weisen Entwicklungsstörungen des zentralen und des peripheren Nervensystems auf. In einem transgenen Mausmodell, in dem die Expression der langen Variante des TrkB Proteins (TrkB-FL) auf 25% der Wildtypmenge reduziert und das trunkierte Protein vollständig deletiert ist (fBZ/fBZ-Mäuse), sind die Tiere lebensfähig (Xu et al., 2000). Abgesehen von einer reduzierten hippocampalen Langzeitpotenzierung wurde bei diesen Tieren Hyperphagie, Hyperdipsie, Adipositas und erhöhtes Längenwachstum beobachtet (Xu et al., 2003). TrkB wird neben hoher Expression im Hippocampus und mäßiger Expression in vielen anderen Gehirnregionen auch im Hypothalamus, hier besonders im PVN und im Arc exprimiert (Merlio et al., 1992). Mit Hilfe von transgenen Mäusen, die das β -Galaktosidasegen unter Kontrolle des BDNF-Promotors exprimieren, konnte histologisch die Expression von BDNF im VMH verifiziert werden. Eine Herabregulation von BDNF unter Nahrungsrestriktion speziell in diesem hypothalamischen Nucleus wurde durch *in-situ* RNA-Hybridisierung gezeigt. Da der Phänotyp der fBZ/fBZ-Mäuse an den der MC4R-Knockout-Mäuse

(Huszar et al., 1997) erinnert, wurde sowohl in $MC4R^{-/-}$ als auch in Agouti (A^Y) Tieren die BDNF-Expression im VMH untersucht. In beiden Tiermodellen konnte eine Herabregulation von BDNF-RNA gezeigt werden. Desweiteren konnte durch intrazerebroventriculäre Applikation des hochpotenten MC4R-Agonisten Melanotan II (MTII) die durch Nahrungsentzug hervorgerufene Herabregulation der ventromedial-hypothalamischen BDNF-RNA-Expression teilweise verhindert werden. Die Autoren schließen daraus, dass BDNF ein nachgeschalteter Regulator der hypothalamischen Gewichts- bzw. Appetitregulation ist. Der VMH ist allerdings nur schlecht durch POMC- oder AgRP-exprimierende Neuronen innerviert, im VMH selbst werden nur wenig MC4-Rezeptoren exprimiert (Kishi et al., 2003). Es konnte vielmehr gezeigt werden, daß exzitatorische Neuronen des medialen VMH zu den POMC-Neuronen bzw. des lateralen VMH zu NPY-Neuronen des *Nucleus arcuatus* projizieren (Sternson et al.; 2005). Ob die BDNF-Expression direkt durch melanocortinabhängige Mechanismen beeinflusst wird, ist bis heute unklar. Stimulation von hypothalamischen Neuronen mit dem MC4R-selektiven Agonisten MK1 führte allerdings zu einer Freisetzung von BDNF (Nicholson et al., 2007). Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass eine durch intraperitoneale Gabe von MK1 induzierte Hypophagie durch vorherige intracerebroventrikuläre Applikation eines BDNF-Antikörpers verhindert werden konnte. Dass das im VMH gebildete BDNF das für die Appetitregulation entscheidende ist, konnte kürzlich gezeigt werden, indem ein Cre-exprimierender Adenovirus in den VMH von BDNF-lox-Mäusen injiziert wurde (Unger et al., 2007). In adulten Mäusen wurde so das *BDNF*-Gen selektiv im VMH und im dorsalen Hypothalamus deletiert, was eine Hyperphagie und eine Zunahme des Körpergewichts mit Hyperleptinämie und Hyperinsulinämie zur Folge hatte. In der gleichen Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass intracerebroventrikuläre Gabe von BDNF eine c-fos Aktivierung in Neuronen des PVN, VMH, DMH und des LH, nicht aber des *Nucleus arcuatus* zur Folge hatte.

1.8.3. TrkB-Mutationen und BDNF-Haploinsuffizienz im Menschen

In adipösen Patienten mit Entwicklungsstörungen wurden kürzlich Mutationen im für TrkB codierenden Gen *NTRK2* beschrieben (Yeo et al., 2004). Der 8-jährige Patient fiel durch frühmanifeste Adipositas, ein eingeschränktes Kurzzeitgedächtnis, stereotypes Verhalten und verminderte Nozizeption auf. Auch war die gesamte Entwicklung, insbesondere das Erlernen von Laufen und Sprechen, verzögert. Die gefundene Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Cystein (Y722C). Molekularbiologisch bewirkt die sich in der Autoaktivierungsdomäne des Rezeptors befindende Y722C-Mutation eine Reduktion in der Aktivierung der downstream signalisierenden MAPK nach BDNF-Stimulation in PC12-Zellen. In einer Kohorte von 288 adipösen Patienten mit Entwicklungsverzögerung konnten fünf weitere Missensemutationen identifiziert werden (A74T, I98V, M354V, P660L, T821L), die allerdings in der späteren funktionellen Charakterisierung keinen Einfluß auf die untersuchten intrazellulären Signalwege hatten (Gray et al., 2007). Es ist allerdings möglich, dass die Mutationen andere, bisher noch nicht bekannte Signalwege beeinflussen. In einer adipösen, hyperphagen, hyperaktiven Patientin konnte eine Inversion einer Region um das BDNF-Gen festgestellt werden, was zur monoallelischen Expression des WT-BDNF-Allels und zu reduzierten BDNF-Serumspiegeln führte (Gray et al., 2006).

1.8.4. Genstruktur und Proteindomänen des humanen TrkB

Das humane für TrkB codierende Gen NTRK2 liegt auf Chromosom 9q22 und besteht aus 24 Exons und 23 Introns. Die Exons 1 bis 4 sind nicht codierend und werden alternativ an Exon 5, welches das Start-ATG beinhaltet und somit das erste codierende Exon ist, gespleißt. Vermutlich befindet sich vor jedem der vier 5' liegenden Exons ein differentiell regulierender Promotor. Insgesamt existieren drei Exons, die Stop-Codons beinhalten und die alternativ gespleißt werden: 16, 19 und 24 (Stoilov et al., 2002). Das längste translatierte Protein (TrkB-FL) beinhaltet neben dem bei allen gebildeten Proteinen gleichen extrazellulären Teil die durch die Exons 20 bis 24 codierte Tyrosinkinasedomäne und die durch Exon 18 codierte Juxtamembrandomäne mit der Shc-Bindungsstelle (Abb. 4).

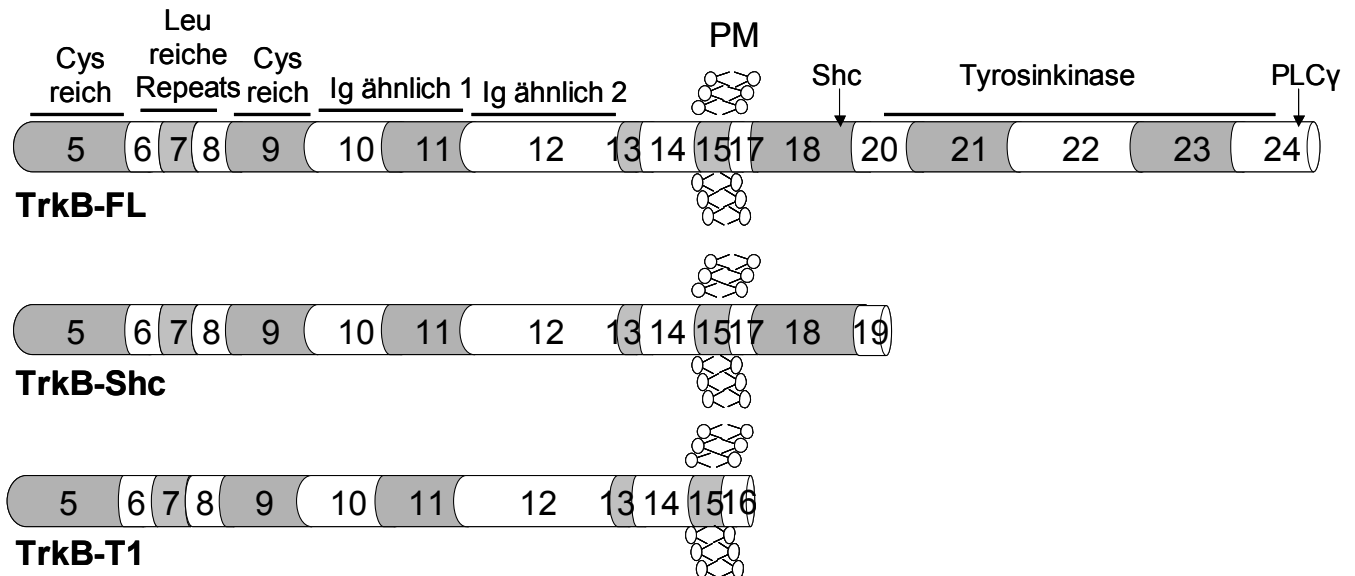


Abbildung 4: Schematische Darstellung der drei humanen TrkB-Isoformen. Die Domänen sind über der ersten Isoform als horizontale Linien dargestellt, die Proteinbindungsstellen für Shc und PLC γ sind durch Pfeile gekennzeichnet. Grau bzw. weiß bezifferte Fragmente stellen die Exons dar. PM=Plasmamembran (nach Stoilov et al., 2002)

Das kürzeste Protein (TrkB-T1) besitzt noch die durch Exon 15 codierte Transmembrandomäne aber keine Tyrosinkinasedomäne und keinen intrazellulären juxtamembranären Teil. Schließlich existiert noch eine dritte Variante, die keine Tyrosinkinasedomäne, aber die durch Exon 18 codierte Juxtamembrandomäne mit der Shc-Bindungsstelle beinhaltet (TrkB-Shc). Außerdem werden die kurzen *in frame* liegenden juxtamembranären Exons 13 und 17 fakultativ gespleißt. Die TrkB-Variante ohne Exon 13 kann nicht mehr durch NT3 sondern nur noch durch BDNF aktiviert werden (Strohmaier et al., 1996), für die Variante ohne Exon 17 ist bisher keine Funktionsänderung beschrieben. TrkB-FL und TrkB-Shc werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert, während TrkB-T1 zusätzlich in Pankreas, Herz und Niere exprimiert ist. Im Gegensatz zum Menschen besitzen Nager zwei verschiedene Versionen des trunkierten Rezeptors, deren Carboxytermini durch zwei alternativ gespleißte Exons codiert werden, dafür wird das TrkB-Shc-Transkript nicht gebildet. Die TrkB-T1 und TrkB-T2 genannten trunkierten Proteine besitzen nach der Transmembrandomäne nur noch 9 bzw. 11 weitere Aminosäuren (Middlemas et al., 1991).

1.8.5. Signaltransduktionsmechanismen der Trk-Neurotrophinrezeptoren

Trk-Rezeptoren sind klassische Rezeptortyrosinkinasen, die nach Bindung des Liganden an der extrazellulären Bindungsdomäne ein Dimer bilden. Dabei spielt die membrannahere Immunglobulin-ähnliche Domäne eine entscheidende Rolle (Pérez, 1995). Aber auch artifizielle Mutationen in der von der Cytoplasmamembran weiter entfernten Ig-ähnlichen Domäne als auch in der Region der Leucinrepeats und den cysteinreichen Domänen führen zu Änderungen der Neurotrophinbindung durch Trk-Rezeptoren. Die intrazellulären Tyrosinkinasedomänen eines Rezeptors können durch die sterische Annäherung den jeweils anderen Rezeptor des Dimers an spezifischen intrazellulären Tyrosinen phosphorylieren. Drei dieser Tyrosine (bei TrkB an den Positionen 718, 722 und 723) befinden sich in der Autoaktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne. Phosphorylierung dieser drei Tyrosine verstärkt die Kinaseaktivität des Rezeptors (Cunningham et al., 1997) und hat die Phosphorylierung außerhalb der Tyrosinkinase gelegener Tyrosine, zum Beispiel in den Shc- und PLC γ -Bindungsmotiven zur Folge (Y538 und Y833 im murinen TrkB). Die Tyrosinphosphorylierung dieser Bindungsstellen erlaubt Proteinen mit PTB- (phosphotyrosine binding) oder SH2- (Src homology region) Domänen an den Rezeptor anzudocken und dort weitere Signalmoleküle zu rekrutieren. An das Phosphotyrosin 833 bindet die Phospholipase C γ und wird von der Tyrosinkinase phosphoryliert (Widmer et al., 1993). Die so aktivierte PLC γ katalysiert die Spaltung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat zu Inositoltrisphosphat (IP3) und DAG. Analog zum Signalweg des G α_q -Proteins bewirkt IP3 die Freisetzung von intrazellulären Calciumionen, was wiederum zur Aktivierung von Ca²⁺-Calmodulin-regulierten Proteinkinasen führt.

An das Phosphotyrosin 538 (im humanen TrkB 516) bindet das Adapterprotein Shc, wird von der Trk-Tyrosinkinase phosphoryliert und rekrutiert dann ein weiteres Adapterprotein Grb2, welches mit dem Ras-Guaninnukleotid-Exchange factor SOS (*Son of Sevenless*) komplexiert vorliegt (Nimnual et al., 1998). SOS aktiviert die Kinasefunktion der GTPase Ras durch den Austausch des gebundenen GDP durch GTP. Ras aktiviert nun die Serin/Threoninkinase Raf, die wiederum die MAP-Kinase-Kinase Mek aktiviert, welche schließlich die MAPK phosphoryliert (Stephens et al., 1994). Die MAP-Kinase aktiviert daraufhin Transkriptionsfaktoren, die die neurotrophinspezifische Genexpression regulieren. Welcher Signalweg der für die Appetitregulation entscheidend ist, ist noch nicht geklärt. Die kürzlich durch c-fos Expression gezeigte Aktivierung von Neuronen des PVN durch BDNF konnte nach 45 Minuten gezeigt werden (Unger et al., 2007), was indiziert, dass hier ein schneller Signalmechanismus zugrunde liegt. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass Aktivierung des im *Nucleus arcuatus* exprimierten TrkB in der von Pinto und Mitarbeitern gezeigten Neuerschaltung von Synapsen an POMC bzw AgRP Neuronen beteiligt ist, da TrkB z.B. im Hippocampus synaptische Plastizität beeinflusst. Außerdem ist es möglich, dass bisher noch nicht bekannte Signalproteine am BDNF-TrkB Signalweg beteiligt und für hypothalamische Neuronen spezifisch sind.

2. Zielsetzung

Adipositas ist eine durch Umweltfaktoren und genetische Veranlagungen bedingte Krankheit, die epidemische Ausmaße erreicht hat. Als häufigste monogenetische Ursache für frühmanifeste Adipositas gelten Mutationen in dem an der hypothalamischen Appetitregulation beteiligten MC4R. Im Hypothalamus werden periphere Signale und Signale aus anderen Gehirnregionen integriert und führen dann zu einer Veränderung der Nahrungsaufnahme. Der daran beteiligte MC4R spielt dabei eine Schlüsselrolle. Über 60 verschiedene Punktmutationen wurden bisher bei adipösen Patienten im humanen MC4R identifiziert, allerdings sind nicht alle davon funktionell relevant. Die Penetranz von MC4R-Mutationen ist unvollständig, was nicht zuletzt daran liegt, dass das Körpergewicht von vielen anderen genetischen und Umweltfaktoren abhängt. Es ist noch unklar, in wieweit *in vitro* gewonnene funktionelle Daten von untersuchten MC4R-Mutationen mit physiologischen Effekten übereinstimmen. Die Rolle des MC3R im Hypothalamus ist weniger eindeutig. Einige Studien assoziieren zwei nicht synonyme Polymorphismen im codierenden Bereich mit Adipositas, Funktionsverlustmutationen wurden aber bisher erst wenige gefunden. Ein möglicher Kandidat für die Weiterleitung des anorexigenen Signals hinter dem MC4R ist das Neurotrophin BDNF und dessen Rezeptor TrkB. Über weitere modifizierende Proteine der Signaltransduktion von MC4R und TrkB ist bisher wenig bekannt. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

2.1. Evolutionärer Ansatz zur Auswertung von funktionell relevanten Mutationen

Der MC4R kommt in allen bisher untersuchten Vertebraten vor. In Datenbanken sind bereits viele Sequenzen dieser Orthologen Proteine verfügbar. Ein evolutionärer Ansatz zur Bestimmung von funktionell wichtigen Aminosäuren wird umso aussagekräftiger, je höher die Zahl der zur Auswertung herangezogenen Sequenzen ist. Daher sollen zusätzlich zu den Datenbanksequenzen weitere orthologe MC4R kloniert und funktionell untersucht werden. Möglich wäre es auch, einen funktionsdefekten MC4R in einer Spezies zu entdecken, die durch eine veränderte Energiebalance Vorteile zieht. Ist ein aussagekräftiges Alignment erstellt, soll untersucht werden, ob die Lage von funktionell relevanten Mutationen mit konservierten Aminosäuren korreliert. Ist das der Fall, kann der Ansatz im Folgenden zur Auswertung von neuen Mutationen benutzt werden.

2.2. Funktionelle Charakterisierung von murinen Melanocortinrezeptoren

Von der Firma *Ingenium* durch N-Ethyl-N-Nitrosurea erstellte und identifizierte Punktmutationen in murinen MC3R und MC4R sollen funktionell charakterisiert werden. Können dabei Unterschiede im Grad des Funktionsverlustes festgestellt werden, soll der Verlauf der Gewichtsentwicklung der dazugehörigen Mauslinien verglichen werden. Dadurch wäre es erstmals möglich, funktionelle *in vitro* Daten mit *in vivo* Phänotypen zu vergleichen.

2.3. Funktionelle Charakterisierung von in der Normalpopulation gefundenen MC4R-Mutationen

Während in Kollektiven adipöser Patienten zahlreiche Screens nach MC4R-Mutationen durchgeführt wurden, fehlt bisher ein Screen der Normalbevölkerung. Die Arbeitsgruppe von Johannes Hebebrand fand beim Screenen des KORA-S4-Kollektives (Kooperative Gesundheitsforschung in der Region Augsburg, Survey 4) 16 MC4R-Mutationen, von denen einige neu, andere zwar bekannt, aber noch

nicht charakterisiert waren. Die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Rezeptorfunktion sollen untersucht werden. Auch hier sollen - wenn möglich - Genotyp-Phänotyp-Vergleiche gezogen werden.

2.4. Funktionelle Charakterisierung von mutierten Serinen in der dritten Transmembrandomäne des hMC4R

Kooperationspartner fanden bei adipösen Patienten zwei neue Mutationen (S136F und S139R) in der TM3 des MC4R. Die S136F Mutation wurde heterozygot, die S139R Mutation wurde compound heterozygot mit der bereits bekannten S127L Mutation gefunden. Durch die Untersuchung natürlich vorkommender Funktionverlustmutationen können Schlüsse auf die Funktionsmechanismen von GPCRs oder auf deren funktionell relevante Domänen gezogen werden. TM3 weist einen besonders hohen Anteil an Serinresten auf.

2.5. Identifikation des bevorzugten Start-ATGs des humanen MC3R

Auch der hypothalamisch exprimierte MC3R ist in die Gewichtsregulation involviert, allerdings ist seine Rolle weniger klar als die des MC4R. Es wurden zwar bisher wenig inaktivierende Mutationen identifiziert, immer wieder werden aber zwei Polymorphismen, T6K und V81I auf Assoziationen mit Adipositas untersucht. Die MC3R der Hominidae (inklusive des humanen) weisen verglichen mit den bisher bekannten Rezeptoren anderer Spezies ein zusätzliches 3' gelegenes Start-ATG auf. Der T6K Polymorphismus liegt zwischen diesen beiden ATGs. Es soll untersucht werden, welches ATG die Proteintranslation initiiert und ob der Polymorphismus dabei eine Rolle spielt.

2.6. Identifikation von Protein-Protein-Interaktionspartnern des MC4R und TrkB

Für den MC2R konnte kürzlich die funktionell relevante Interaktion mit einem neuen Transmembranprotein MRAP2 gezeigt werden (Metherell et al., 2005). MC4R-Mutationsträger weisen eine hohe phänotypische Variabilität auf. Neben unterschiedlichen Lebensstilen der Mutationsträger können vermutlich weitere Gene bzw. Proteine die Ausprägung des Phänotyps modifizieren. Daher sollen mittels eines Yeast-two-Hybrid (Y2H) Screens gegen eine humane Gehirn-cDNA-Library mit dem MC4R interagierende Proteine gefunden werden. Wenig ist über den Signalweg hinter dem MC4R bekannt. Ein möglicher downstream Pathway verläuft über das im VMH gebildete Neurotrophin BDNF und dessen Rezeptor TrkB. Beide Proteine werden aber neuronal ubiquitär exprimiert. Neben den bekannten Signalwegen über PLC γ und Shc/ERK sollen mittels eines Y2H-Screens auch hier mögliche neue Protein-Protein-Interaktionspartner gefunden werden, die eventuell hypothalamusspezifisch sind.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

Bakterien

Escherichia coli:

DH5 α	F ⁻ , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>phoA</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_{k-}</i> , <i>m_{k+}</i>), <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>
BL21-CodonPlus RP (Stratagene, La Jolla, USA)	F ⁻ , <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>dcm</i> ⁺ <i>Tet</i> ^r <i>gal</i> <i>endA</i> <i>Hte</i> [<i>argU</i> <i>proL</i> <i>Cam</i> ^r]
TOP-10 (Invitrogen, Karlsruhe)	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7687 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

Säugerzellen

COS-7	Fibroblasten aus der Niere der grünen Meerkatze, mit einer T-Antigen produzierenden Mutante des SV40-Virus transformiert, ATCC
PC12	Phäochromocytomzellen der Ratte, ATCC
CHO-hMC4R	Epithelzellen aus Hamsteroovarien; stabil transfiziert mit pcDps-hMC4R-NHA

Vektoren

Vektor	Zweck	Herkunft
PCR-2.1-TOPO	Zwischenklonierung	Invitrogen, Karlsruhe
pcDps	Expression (Säuger)	Torsten Schöneberg, Leipzig
pcDps-GFP	Expression (Säuger) / Fluoreszenz	Angela Schulz, Leipzig
pcDNA3	Expression (Säuger)	Invitrogen, Karlsruhe
pECFP-C1	Expression (Säuger) / Fluoreszenz	Clontech, Mountain View, USA
pEYFP-N1	Expression (Säuger) / Fluoreszenz	Clontech, Mountain View, USA
pACT4-1b	Expression (<i>S. cerevisiae</i>) / Y2H	Heike Göhler, MDC, Berlin-Buch
pBTM117c	Expression (<i>S. cerevisiae</i>) / Y2H	Heike Göhler, MDC, Berlin-Buch
pGEX-6P-2	Expression (<i>E. coli</i>)	Amersham, Little Chalfont, UK

Für die Vektorkarten siehe Anhang

Antikörper

Maus-Anti-HA, Biotinkonjugat (clone 12CA5)	Roche, Grenzach
Maus anti FLAG, M2	Sigma, Deisenhofen
Peroxydasekonjugiertes Streptavidin	Dianova, Hamburg

Peptide

NDP- α -MSH	Peter Henklein, Institut f. Biochemie, Charité, Berlin
α -MSH	Peter Henklein, Institut f. Biochemie, Charité, Berlin
β -MSH	Peter Henklein, Institut f. Biochemie, Charité, Berlin
γ -MSH	Sigma, Deisenhofen
ACTH	Sigma, Deisenhofen
AgRP (87-132)	Phoenix, Burlingame, USA
MTII	Bachem, Bubendorf, Schweiz

Radioaktive Substanzen

¹²⁵ I-NDP- α -MSH	Amersham, Little Chalfont, UK
2,8- ³ H-Adenin	Amersham, Little Chalfont, UK

Oligonukleotide

Alle Primer wurden von TIB-Molbiol, Berlin oder Roth, Karlsruhe bezogen. Die Sequenzen finden sich im Anhang.

Enzyme

Restriktionsendonukleasen	NEB, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase	NEB, Ipswich, USA
Taq-Polymerase	Bioline, London, UK
Pfu-Polymerase	Stratagene, La Jolla, USA

3.2. Molekularbiologische Routinemethoden

Methoden, die für alle Teilprojekte verwendet wurden, werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.1. Verwendete Kits zur DNA Aufreinigung, Herstellung von cDNA und TOPO-Klonierung

Die im Folgenden aufgelisteten Kits wurden entsprechend der Angaben des jeweiligen Herstellers angewendet.

Name	Verwendung	Bezug
QIAprep Miniprep	Plasmidisolierung (Minipräp)	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin	Präparative Gelaufreinigung	Qiagen, Hilden
Nucleobond Xtra Midi	Plasmidisolierung (Midipräp)	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript Reverse Transcriptase	Reverse Transkription	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe

3.2.2. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

100 ml SOB-Medium wurden im Schüttelkolben aus einem Glycerolstock angeimpft. Bei 18°C wurden die Kolben so lange geschüttelt, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6-1,2 erreicht hatte. Die Kolben wurden für 10 min auf Eis gestellt und abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 32 ml Transformationspuffer gewaschen. Das Pellet wurde in 8 ml Transformationspuffer aufgenommen, zusätzlich wurden noch 560 µl DMSO (7% Endkonzentration) hinzugegeben. Die fertige Zellsuspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Transformationspuffer pH 6,7	
Pipes-KOH	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM
MnCl ₂	55 mM

SOB-Medium pH 7,0	
Trypton	20 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,6 mM
MgCl ₂	20 mM

3.2.3. Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Zum zu transformierenden Plasmid wurden 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* gegeben, 30 min auf Eis, danach für 90 sec bei 42°C inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien in 250 µl SOC-Medium (SOB mit 20mM Glucose) für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgestrichen und zur Selektion über Nacht inkubiert.

LB-Medium pH 7,4	
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
NaCl	10 g/l

Zur Herstellung von Agarplatten wurde 1,5% Agar-Agar hinzugefügt. Zur Selektion wurden Ampicillin in einer Konzentration von 75 mg/l, Chloramphenicol in einer Konzentration von 25 mg/l, Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt

3.2.4. Ligation

Ungefähr 300 ng Vektor und ca. 1 µg Insert wurden in separaten Ansätzen mit je 10 U des entsprechenden Enzyms für 2 h bei 37°C verdaut. Nach Gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Ligation erfolgte unter Verwendung von Vektor mit einem Überschuß an Insert (molares Verhältnis ca. 1:100), 200 U T7-Ligase und entsprechendem Puffer in einem 15 µl-Ansatz bei 15°C über Nacht.

3.2.5. Ortsgerichtete Mutagenese

Die MC4R-Mutationen V95I, H158A und S139I, die Konstrukte zur Identifikation des MC3R-Startcodons und das TrkB-Konstrukt Y516F wurden mittels ortsgerechter Mutagenese hergestellt. Hierzu wurde ein Primer ausgewählt, der die einzubauende Mutation etwa in der Mitte trug. Nach der Formel

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/\text{Gesamtlänge} - \% \text{Fehlbasen} > 78^\circ\text{C}$$

wurde die Länge des Primers bestimmt. Als Antisenseprimer wurde die revers-komplementäre Sequenz benutzt. In einem 50 µl PCR-Ansatz wurden von 100 ng Plasmid-Template mit je 250 nM Primern und 2,5 U Turbo-*Pfu*-Polymerase die mutationstragenden Plasmide amplifiziert. Die methylierte Template-DNA wurde durch einstündige Inkubation mit 10 U *DpnI* bei 37 °C abgebaut. Die übrige neue Plasmid-DNA wurde in chemisch kompetente DH5α-Bakterien transformiert

3.2.6. Sequenzierung

Zur Plasmid-Sequenzierung wurden ~200 ng Plasmid-DNA, 0,5 µM Primer, 1 µl V3-Big-Dye (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit dazugehörigem Puffer in einem 10 µl Ansatz vereinigt. Die PCR erfolgte bei einer Annealingtemperatur von 55°C und hatte eine Elongationszeit von 5 min bei 60°C. Die Auftrennung und Detektion erfolgte im *ABI-3130xl* Kapillar-Sequenzierer (Applied Biosystems).

3.3. Zellkultur

Zur Expression der klonierten Rezeptoren und Rezeptormutanten wurden diese transient in verschiedene heterologe Zellsysteme transfiziert. Die Kultivierung und Transfektion der Zelllinien wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.3.1. Kultivierung von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden adhären in DMEM (Biochrom, Berlin) mit 10% FKS, Pen/Strep (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptavidin) und L-Glutamin gehalten. Zweimal wöchentlich oder zum aussäen wurden die Zellen abtrypsiniert und im Verhältnis 1:10 subkultiviert.

3.3.2. Transfektion von COS-7-Zellen

Transfektion von COS-7 Zellen mit dem Transfektionsreagenz Metafectene (Biontex, Martinsried) erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Transfektion erfolgte 24 h nach Aussetzen der Zellen. Die verwendeten Mengen von Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Platte/Schale/Flasche	Zellen/well	DNA [$\mu\text{g}/\text{well}$]	Metafectene [$\mu\text{l}/\text{well}$]
48 well	$2,5 * 10^4$	0,0625	0,3125
12 well	$1 * 10^5$	0,25	1,25
6 cm Schale	$3 * 10^5$	3	4
75 cm ² Flasche	$5 * 10^5$	7	20

3.3.3. Kultivierung von PC12-Zellen

PC12-Zellen sind eine Phäochromocytomzelllinie der Rattennebenniere. Mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) lassen sie sich zu einem neuronalen Phänotyp differenzieren (Adler et al., 2005). Undifferenziert wurden die Zellen als Suspensionszellen in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) mit 10% Pferdeserum, 5% FKS, Pen/Strep und L-Glutamin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden sie 1:10 umgesetzt. Zur adhärenenten Kultivierung auf runden Objektträgern wurden diese über Nacht bei 4°C mit Poly-L-Lysin (1:2 mit PBS) und dann für eine Stunde bei 37°C mit Collagen A (1:2 in PBS) beschichtet.

3.3.4. Nucleofektion mit Amaxa und Differenzierung

Nucleofektion der PC12-Zellen wurde mit der Amaxatechnologie (Amaxa AG, Köln) durchgeführt. Pro Ansatz wurden dazu $2 * 10^6$ Zellen gewaschen, mit einer 22G Kanüle trituriert und in 100 μl Nucleofector™ Solution V resuspendiert. Nach dem Zufügen von 3 μg der zu transfizierenden DNA wurde der Ansatz in eine Küvette transferiert und mit dem Nucleofector® (Programm U-29) transfiziert. Die Suspension wurde dann in PC12-Medium mit 300 ng/ml NGF (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen und in eine Zellkulturschale mit einem Poly-L-Lysin/Collagen A beschichteten Objektträgern gegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt, bis die Zellen den neuronalen Phänotyp angenommen hatten (~5 Tage).

3.3.5. Kultivierung von stabil transfizierten CHO-Zellen

CHO-Zellen wurden in HAM's F-12 Medium (Biochrom, Berlin) mit 5% FKS, Pen/Strep und L-Glutamin gehalten. Zur Selektion wurde dem Medium 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin und 0,6 mg/ml Hygromycin zugesetzt. Die Transfektion erfolgte wie bei den COS-Zellen mit Metafectene.

3.4. Funktionelle Untersuchungen von GPCRs

Zur funktionellen Charakterisierung von Mutationen in MC3R und MC4R, wurden diese zunächst in einen Expressionsvektor kloniert (3.4.1.). Mutationen in GPCRs können verschiedene Effekte hervorrufen, die zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führen. Durch fehlerhafte Faltung und Prozessierung kann die Expression an der Zelloberfläche verringert sein (Abb. 5A; 3.4.3.). Andere Mutationen haben keinen Einfluss auf die Zelloberflächenexpression, aber auf die Signaltransduktionseigenschaften des Rezeptors. In diesem Fall wird die Bildung des sekundären Botenstoffs cAMP nach Ligandenstimulation gemessen (Abb. 5B; 3.4.4.). Erreicht der Rezeptor die

Zelloberfläche, ist aber nicht imstande zu signalisieren, kann das entweder daran liegen, dass der Rezeptor durch die Mutation den aktiven Zustand des Rezeptors verhindert oder daran, dass der Rezeptor den Liganden nicht oder schlechter binden kann. Letzteres kann mit einem Radioligandenverdrängungsassay untersucht werden (Abb. 5C; 3.4.5.).

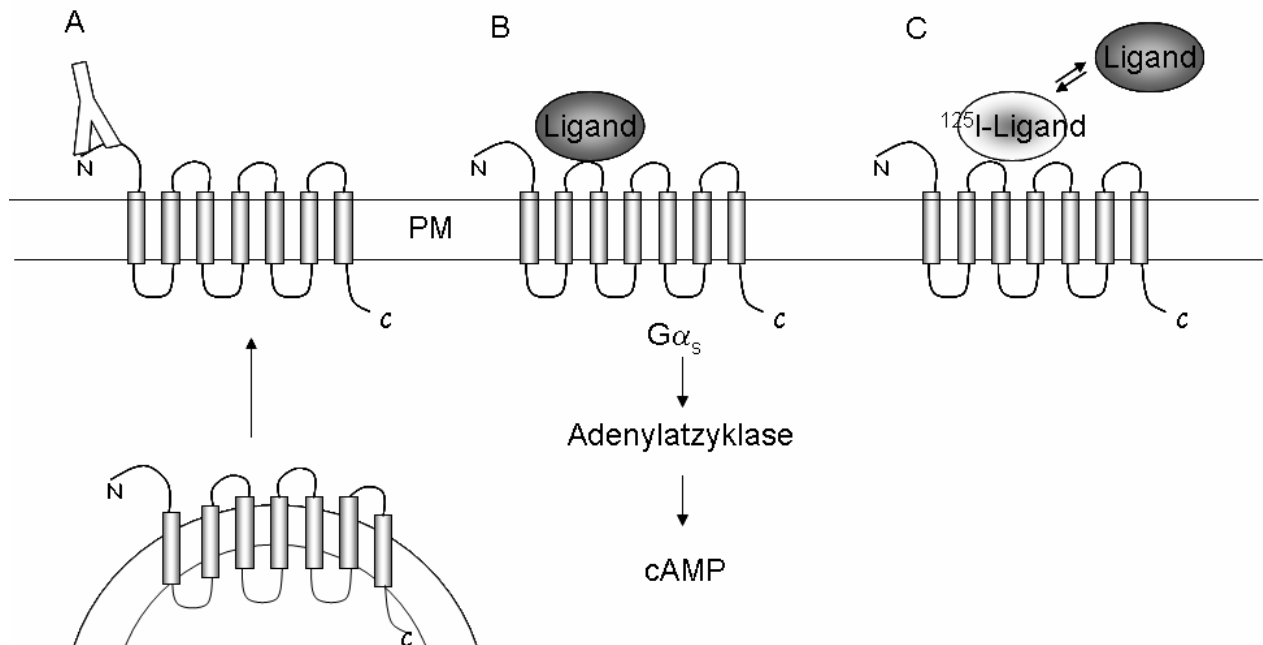


Abbildung 5: Schematische Darstellung der funktionellen Untersuchung von GPCR-Mutanten. In *in vitro* Experimenten wird untersucht, ob der Rezeptor an die Zelloberfläche transportiert wird (A). Dieser Nachweis geschieht immunologisch. Des Weiteren wird untersucht, ob nach Ligandenstimulation der sekundäre Messenger cAMP gebildet wird (B) und ob der Rezeptor einen radioaktiv markierten Liganden bindet, bzw. ob dieser durch unmarkierte Liganden verdrängbar ist (C). PM = Plasmamembran

3.4.1. Klonierung von Melanocortinrezeptoren zur Expression in COS-7-Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung wurden humane bzw. murine Melanocortinrezeptoren mit dem Sense-Primer MC4R-N-HA-F und dem Antisenseprimer MC4R-*Spe*-R (bzw. MC3R-N-HA-F und MC3R-*Spe*-R; Primersequenzen siehe Anhang) aus genomischer DNA ggf. eines Mutationsträgers amplifiziert und zunächst in den Vektor pCR-2.1 über eine Topoisomerasereaktion zwischenkloniert. Die Verwendung genomischer DNA ist möglich, da die Melanocortinrezeptorgene intronlos sind. Der Senseprimer beinhaltet die ersten 20 Basen des Rezeptorgens, sowie im 5'-Bereich die Sequenz des Hämagglutinin (HA)-Tags. Durch Zwischenklonierung wurde eine *Eco*RI-Schnittstelle aus dem pCR-2.1 Vektor 5' vor das Amplifikat angefügt. Nach einer Kontrollsequenzierung wurde das Insert über eine *Eco*RI/*Spe*I-Restriktion ausgeschnitten, aufgereinigt und in den Expressionsvektor ligiert. Der fertige Vektor exprimiert einen aminoterminal HA-markiertes Rezeptorprotein. Zur Herstellung eines am Carboxyterminus mit einem FLAG-Tag markierten Protein wurde eine PCR vom bereits im Vektor ligierten HA-Konstrukt mit dem Senseprimer MC4R-F und dem Antisenseprimer MC4R-FLAG-*Spe*-R durchgeführt, das Amplifikat im pCR-2.1 zwischenkloniert und über *Eco*RI/*Spe*I in den pcDps-Vektor ligiert. Die pcDps-Konstrukte wurden mit den Primern CD-F (hybridisiert 5' von der Klonierungsstelle im pcDps Vektor) und MC4R-F1-F sequenziert.

3.4.2. Sequenzierung von orthologen MC4R und Klonierung von humanen/orthologen Hybridkonstrukten

Aus genomischer DNA von verschiedenen Spezies wurden mit verschiedenen Paarungen degenerierter Primer Fragmente der orthologen MC4R-Gene amplifiziert. Das längste und spezifischste Amplifikat wurde mit dem Senseprimer Oligo34 und dem Antisenseprimer Oligo32 amplifiziert. Die Amplifikate konnten direkt sequenziert werden. Nach Trennung auf einem Agarosegel und präparativer Aufreinigung der entsprechenden Bande wurde eine weitere PCR mit dem Amplifikat als Template und den Primern Oligo30 und Oligo29 durchgeführt, um ein Fragment mit den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bsu36i* und *BspEI* zu erhalten (Abb. 6). Da diese beiden Sequenzen im humanen MC4R nahe der Annealingstelle der Oligos 34 bzw. 32, aber nicht in der Sequenz des pcDps-Vektors vorkommen, war es möglich über diese Schnittstellen das orthologe Fragment in den pcDps-N-HA-hMC4R zu klonieren. Daraus resultierten Rezeptorkonstrukte, die die humanen Amino- und Carboxytermini, aber die orthologen Transmembrandomänen und extra- bzw. intrazellulären Schleifen besaß. Die Sequenzen der benutzten Oligonukleotide sind im Anhang angegeben. Dort befinden sich auch Karten der benutzten Vektoren.

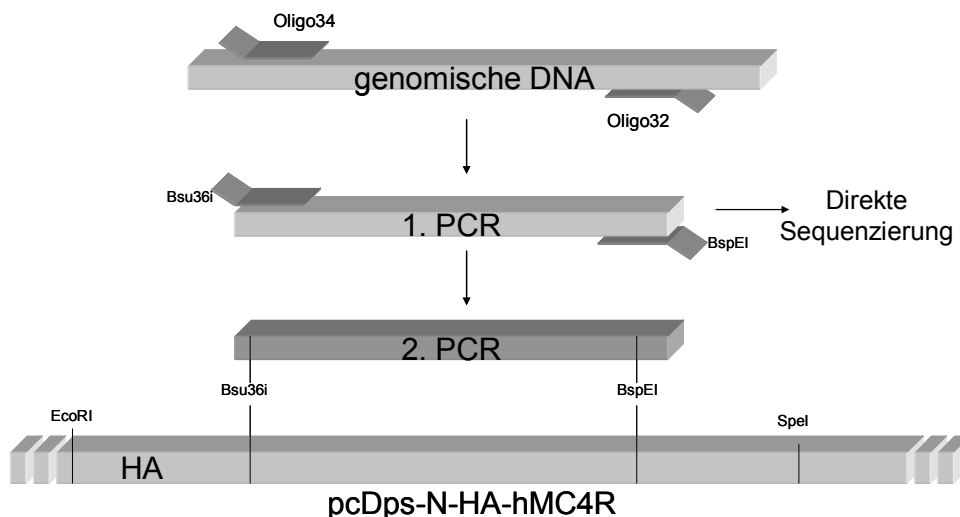


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Klonierung von human/orthologen Hybridkonstrukten. Aus der genomischen DNA verschiedener Spezies wurden mit den Oligos 34/32 MC4R-Fragmente amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde das mit Schnittstellen für *Bsu36i* bzw. *BspEI* beinhaltenden Primern das Fragment für die Klonierung reamplifiziert. Über die im humanen MC4R vorhandenen Schnittstellen wurde das orthologe Fragment in den pcDps-N-HA-hMC4R kloniert.

3.4.3. Zelloberflächen-ELISA

Prinzip: Um die Zelloberflächenexpression von Rezeptoren zu bestimmen, werden Rezeptorkonstrukte am N-Terminus mit einem HA-Tag versehen und in COS-7-Zellen exprimiert. Die Zellen werden dann mit Formaldehyd fixiert, aber nicht permeabilisiert. Da bei membranständigen GPCRs der Aminoterminus extrazellulär lokalisiert ist, werden durch Nachweis des HA-Tags nur Rezeptoren detektiert, die an die Zelloberfläche gelangen konnten. Als erster Antikörper wurde ein Biotinmarkierter anti-HA-Antikörper, als zweiter ein Peroxidase-gekoppelter Streptavidin-Antikörper verwendet (Abb. 5A).

Durchführung: Für den ELISA wurden 48-well-Mikrotiterplatten verwendet. Pro Mutante und Ansatz wurde eine 4- oder 6-fach-Bestimmung durchgeführt. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl/well PBS gewaschen und mit je 100 µl/well 4% Formaldehyd in PBS für 30 min bei RT fixiert. Nach nochmaligem Waschen mit 2X 200µl/well PBS erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen mit 200 µl/well FKS-haltigem COS-7-Vollmedium für eine Stunde bei 37°C. 100 µl Biotin-gekoppelter Anti-HA-Antikörper wurden in einer Konzentration von 1µg/ml in COS-7-Vollmedium zur Detektion des extrazellulären HA-Tags eingesetzt und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 100µl des Streptavidin-POD-Konjugats in einer Verdünnung von 1:5000 (Endkonzentration 0,2µg/ml) in COS-7 Medium zugesetzt und für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 200 µl PBS wurde die Enzymreaktion mit 150 µl/well Substratlösung gestartet und nach etwa 2 Minuten (nach Farbentwicklung) durch Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Extinktionsmessung erfolgte biochromatisch bei 492 und 620 nm als Referenz in einem Mikrotiterplatten-Photometer (Athos Reader 2001; Athos, Krefeld).

Substratlösung pH 5,2	
Citrat	0,1 M
Na ₂ HPO ₄	0,1 M
o-Phenyldiamin	0,4 mg/ml
H ₂ O ₂	0,024%

Stopp-Lösung	
HCl	1 N
Na ₂ SO ₃	0,05 M

3.4.4. cAMP-Messungen

Prinzip: Aktivierung von Melanocortinrezeptoren durch ihre Agonisten führt zur Kopplung des G α_s -G $\beta\gamma$ -Komplexes an den Rezeptor. Das von G α_s gebundene GDP wird zu GTP ausgetauscht, die G α_s -Untereinheit dissoziiert vom heterotrimeren Komplex. Die GTP-bindende, aktive Form kann nun eine membranständige Adenylylcyclase aktivieren. Dabei wird das GTP zu GDP gespalten und die G α_s -Untereinheit bildet wieder einen heterotrimeren Komplex mit der G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die aktivierte Adenylylcyclase katalysiert die Reaktion von ATP zu zyklischem AMP (cAMP). Die Messung der Konzentration des in Gegenwart des Phosphodiesterasehemmers 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) intrazellulär akkumulierten sekundären Botenstoffes cAMP dient als Readout für die Rezeptoraktivierung (Abb. 5B).

1) Messung von tritiummarkiertem cAMP

Die transfizierten Zellen wurden 48 h nach der Transfektion über Nacht mit 500 µl COS-7-Vollmedium mit 2 µCi/ml ³H-Adenin bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und am folgenden Tag mit 1 ml DMEM Medium mit 1 mM IBMX gewaschen. In diesem Medium erfolgte auch die Rezeptorstimulation durch die Liganden. Dazu wurde eine dekadische Verdünnungsreihe des Peptidhormons erstellt. Pro well wurden 500 µl Medium mit IBMX und Ligand eingesetzt. Die Zellen wurden 1h im 37°C Brutschrank bei 5% CO₂ stimuliert. Der darauffolgende Zellaufschluss mit je 1 ml Lysispuffer wurde 1 h lang bei 4°C durchgeführt. Das in den Zellen akkumulierte cAMP wurde über 2 ml Dowex AG®50W-X8-Säulen (Kationenaustauscher, 2 g/Säule, Säulendurchmesser 8 mm, BioRad, München) und 2 ml Aluminiumoxid-Säulen (1,5 g/Säule, Säulendurchmesser 10 mm, Merck, Darmstadt) aufgereinigt. Zunächst wurde der Zellysate-Überstand auf die Dowex-Säulen aufgetragen, anschließend erfolgte ein

Waschschritt mit 2 ml Aqua dest. Nun wurden die Dowex-Säulen über den Aluminiumoxid-Säulen platziert, so dass die kationisch filtrierte Nukleotide durch zweimaliges Waschen mit 5 ml Aqua dest. auf die Aluminiumoxid-Säulen gelangen. Nach Entfernen der Dowex-Säulen wurden die Aluminiumoxid-Säulen ein weiteres Mal mit 5 ml Aqua dest. gewaschen. Danach wurde das cAMP mit 5 ml Imidazol-Puffer (0,1 M; pH 7,5) von den Säulen in 14 ml Szintillationslösung (OptiPhase ‚Supermix‘, Perkin Elmer, Waltham, USA) eluiert. Die Elution erfolgte in Szintillationsgefäße. Die Messung der Proben wurde im Szintillationszähler (Wallac 1409, PerkinElmer Wallac GmbH, Freiburg) für jeweils 3 min durchgeführt. Aus den so gewonnenen Werten konnten mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, LaJolla, USA) Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt werden. Aus diesen Kurven konnte dann die Maximalstimulation (E_{max}) und die halbmaximale Ligandenkonzentration (EC_{50}) abgelesen werden. Diese Werte wurden aus mehreren unabhängigen Experimenten gemittelt und die Mittelwerte miteinander verglichen. Da die EC_{50} ein logarithmischer Wert ist, wurden nur Unterschiede von einer Größenordnung oder mehr als tatsächliche Effekte ausgewertet.

Lysispuffer	
Trichloressigsäure	5%
cAMP	1 mM
ATP	1 mM

2) cAMP Messung mit AlphaScreen-Technologie

Die AlphaScreen Technologie beruht auf der Anregung eines photosensitiven Donor-Beads mit Licht einer Wellenlänge von 680 nm. Dabei entsteht instabiler Singulett-Sauerstoff mit einer Lebensdauer von 4 μ s, der in einem in maximal 200 nm Entfernung befindlichen Acceptorbead eine Chemilumineszenz bewirkt. Durch die Kopplung der Beads mit einem Anti-cAMP-Antikörper bzw. mit Streptavidin werden Donor- und Acceptorbead durch das sich in der Meßlösung befindende biotinylierte cAMP zueinander gebracht. Das im Zelllysate zu messende unbiotinylierte cAMP kompetitiert die Bindung des biotinylierten cAMPs am Anti-cAMP-Antikörper der Acceptorbeads.

Pro Messreihe wurden 250 μ l/well COS-7-Zellen in einer Zelldichte von 10^5 Zellen/ml in eine 48-well-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden je 18 wells mit dem zu untersuchenden Plasmidkonstrukt transfiziert (1,5 μ g Plasmid DNA und 7,5 μ l Metafectene). Nach 24h wurde der Transfektionsansatz durch COS-7-Vollmedium ersetzt. Nach weiteren 24h wurde das Medium aspiriert. Auf die Zellen wurden dann 100 μ l/well Stimulationspuffer mit 1mM IBMX gegeben und für 5 min bei 37°C präinkubiert. Dann wurden zur Stimulation 100 μ l/well eines in Stimulationspuffer mit IBMX gelösten Liganden hinzugegeben und die Zellen für weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Die Ligandenlösungen wurden dann aspiriert und die Zellen mit 100 μ l/well Lysispuffer mit 1mM IBMX für 1 h bei 4°C schüttelnd lysiert. 5 μ l des Lysates wurden in eine 384-well-Mikrotiterplatte (OptiPlate-384, PerkinElmer, Waltham, USA) transferiert. Zur Bestimmung der cAMP Konzentration wurde außerdem eine in Lysis-Puffer mit 1 mM IBMX angesetzte cAMP-Standardkurve im Bereich von 5×10^{-6} – 1×10^{-11} M angesetzt. 5 μ l jeder Konzentration wurden als Triplets zur Erstellung der Kalibrierungskurve in die 384-well Platte transferiert. Zur Messung wurde der Alphascreen cAMP Kit (PerkinElmer, Waltham, USA) verwendet. In jedes well wurde zunächst 1U anti-cAMP Acceptorbeds in 10 μ l SO-Puffer gegeben und für 30 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Dann wurden 1 U/ well Streptavidin-

Donor-Beads und 1 U biotinyliertes cAMP hinzugegeben. Die Platte wurde eine weitere Stunde im Dunkeln und bei RT inkubiert, bevor die Messung im Plattenreader Mithras (Berthold, Bad Wildbad) stattfand. Dazu wurde mit Licht einer Wellenlänge von 680 nm angeregt und die Emission mit einem 568 nm Filter gemessen.

Lysispuffer pH 7,4	
HEPES	5 nM
BSA	0,1 %
Tween 20	0,3 %

Assaypuffer pH 7,4	
HEPES	5 mM
BSA	0,1%
Angelöst in HBSS (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe)	

Stimulationspuffer pH 7,4	
NaCl	138 mM
KCl	6 mM
MgCl	1 mM
HEPES	20 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,1 %

3.4.5. Radioligandenverdrängungsassay

Prinzip: Rezeptorexprimierende Zellen werden mit einer konstanten Konzentration ¹²⁵I-markierten Liganden und verschiedenen Konzentrationen von unmarkiertem Liganden inkubiert. Nach dem Wegwaschen ungebundener Liganden kann durch Messung der γ -Strahlung die Menge des an die Zellen gebundenen markierten Liganden bestimmt werden. So kann eine Verdrängungskurve erstellt und die Bindungsaffinität eines Liganden an einen Rezeptor bestimmt werden (Abb. 5C).

Durchführung: In einer 48-well-Platte transfizierte COS-7-Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit Bindungspuffer gewaschen. Pro well wurden 200 pM ¹²⁵I-NDP- α -MSH und dekadisch verdünnter kalter Ligand (NDP- α -MSH: 100 – 0,01 nM; α -MSH, β -MSH, γ -MSH oder ACTH: 1000 – 0,1 nM) eingesetzt. Die Verdünnungen wurden in Bindungspuffer angesetzt, das Gesamtvolumen betrug 200 μ l/well. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit Bindungspuffer gewaschen und mit 0,1 N NaOH lysiert. Die Überstände wurden für 1 min im γ -Counter (1470 Wizard™, Perkin Elmer Wallc GmbH, Freiburg) gemessen.

Bindungspuffer pH 7,4	
KCl	5,36 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
MgSO ₄	0,40 mM
Na ₂ HPO ₄	0,33 mM
Glucose	5,55 mM
CaCl ₂	1,30 mM
Sucrose	280 mM
BSA	0,2%
Magermilchpulver	2,5%

3.4.6. Sandwich-ELISA zum Nachweis von Rezeptordimeren

Prinzip: Der Sandwich-ELISA dient zum Nachweis von Interaktionen von Membranproteinen (hier: von GPCRs). Dazu werden differentiell epitopmarkierte Rezeptorkonstrukte (hier: HA und FLAG) in COS-7-Zellen cotransfiziert. Membranlysate der Zellen werden dann auf eine mit Anti-FLAG-Antikörper

beschichtete Platte zur Bindung der Rezeptordimere gegeben. Der HA-Tag wird mit einem entsprechenden Antikörper detektiert und photometrisch quantifiziert.

Durchführung: 3×10^5 COS-7-Zellen wurden in 22 cm-Zellkulturschalen ausgesetzt und am nächsten Tag mit 3 µg Plasmid-DNA und 4 µl Metafectene transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 3ml PBS gewaschen und mit einem Zellschaber geerntet und bei 10.600 g für 3 min pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml HPLC-H₂O angelöst und für weitere 4 min bei 18.000 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl Membranlysispuffer resuspendiert und die Membranproteine bei 4°C über Nacht auf einem Rotationsschüttler solubilisiert. Zur Beschichtung der 96-well Mikrotiterplatte wurde diese mit 100 µl 10 µg/ml Anti-FLAG-Antikörper in Beschichtungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte mit 200 µl/well FKS-haltigem Medium gewaschen und mit 200 µl/well FKS-haltigem Medium für 1h bei RT unter Schütteln blockiert. Währenddessen wurde das Membranlysate bei 20.000 g für 15 min abzentrifugiert und der Überstand mit 150 µl PBS-T versetzt. Die Platte wurde dreimal für je eine Minute unter Schütteln mit PBS-T gewaschen, dann mit 100 µl/well Lysat für 2h bei RT geschüttelt. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS-T wurden 100 µl/well biotinylierter Anti-HA Antikörper (1 µg/ml) in PBS-T auf die Platte gegeben und die Platte unter Schütteln bei RT für 2 h inkubiert. Danach wurde viermal mit 200 µl/well PBS-T gewaschen. Von dem Streptavidin-Peroxydase-Konjugat mit einer Konzentration von 0,2 µg/ml in PBS-T wurden 100 µl/well für eine Stunde geschüttelt. Nach weiterem viermaligem Waschen mit PBS-T wurden 150 µl/well Substratlösung zugegeben und die Platte für ca. 2 min geschüttelt, bis ein ausreichender Farbumschlag sichtbar war. Die Reaktion wurde mit 50 µl/well Stopplösung abgestoppt und die Färbung im Mikrotiterplatten-Photometer (Athos Reader 2001, Athos, Krefeld) bei Wellenlängen von 492 nm und 620 nm als Referenzwert gemessen.

Membranlysispuffer pH 7,8	
Tris/HCl	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Na-Desoxycholat	1%
Nonidet-P40	1%
PMSF	0,2 mM

Beschichtungspuffer pH 8,0	
Na-Tetraborat	0,15 M

PBS-T	
PBS	1X
TritonX-100	0,05%

3.5. Charakterisierung von Mäusen mit MC4R-Mutationen

Zur Genotypisierung der Mäuse mit der Y302C Punktmutation im MC4R wurden aus Schwanz-DNA PCR-Produkte mit den Primern mMC4R-F und mMC4R-Y302C-R (Sequenzen siehe Anhang) amplifiziert, mit *Bsp1286I* verdaut und auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. *Bsp1286I* konnte nur bei Vorhandensein der Mutation schneiden. Für die Genotypisierung der I194F-Mäuse wurden der Primer mMC4R-F und der degenerierte Primer mMC4R-I194F-deg-R verwendet. Durch den Basenaustausch des degenerierten Primers entstand eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *BspHI* in der WT-Sequenz.

Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen bei 25°C und 60% Luftfeuchtigkeit bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von je 12 h und mit Standardfutter gehalten.

3.6. Fluoreszenzbasierte Identifikation des bevorzugten Startcodons des humanen MC3R

Prinzip: Zur Identifikation des bevorzugten Start-ATGs des MC3R wurde ein Fragment 90 Basen vor dem ersten Start-ATG beginnendes und 99 Basen hinter dem zweiten Start-ATG endendes Fragment unter Beibehaltung des Leserahmens vor eine GFP-Sequenz mit fehlendem Start-ATG in den Expressionsvektor pcDps kloniert. Die Startcodons wurden zu TTG mutiert, so dass Konstrukte mit beiden Startcodons, ohne Startcodons oder mit nur jeweils dem ersten oder dem zweiten Startcodon entstanden. Mittels einer weiteren Mutagenese-PCR wurde jeweils der T6K-Polymorphismus eingefügt. Nach Expression in COS-7-Zellen und Messung der Fluoreszenzintensität kann so eine Aussage über die Translationseffizienz getroffen werden.

Durchführung: 1 µg Plasmid wurde mit 4 µl Metafectene in je 4 wells einer mit COS-7 Zellen bewachsenen 48-well-Zellkulturplatte transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 µl/well Lysispuffer (s. 3.4.4.) bei 4°C unter Schütteln lysiert. Je 90 µl Lysat wurden in ein well einer 98-well-Mikrotiterplatte transferiert, im Fluoreszenzmeßgerät (CytoFluor™, Millipore, Bedford, USA) mit Licht der Wellenlänge von 480 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen.

3.7. Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen

Zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen wurde mit verschiedenen Fragmenten ein Yeast-Two-Hybrid-Screen (Y2H) durchgeführt. Positive Interaktionen wurden mittels eines in vitro GST-Pulldown-Assays verifiziert.

3.7.1. Klonierung von TrkB, TrkA und Sept3

Zur Klonierung von humanem TrkB, TrkA und Sept3 wurde zunächst kommerziell erworbene humane Gehirn-RNA unter Verwendung des Omniscript™-RT-Kits (Quiagen, Hilden) und eines Oligo-dT-Primers (Invitrogen, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Aus der so generierten cDNA wurden dann mit entsprechenden Primern die Zielgene mit Taq-Polymerase amplifiziert. Zur Optimierung der Annealingtemperatur wurde ein Gradientthermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf) benutzt. Der zwölfstufige Gradient reichte von 50-70°C. Die Elongationszeit wurde ausreichend lang gewählt (ca. 1 min pro 1 kB) und es wurden 40 Zyklen durchlaufen. Die Amplifikate wurden nach Gelelution in den pCR-2.1 Vektor zwischenkloniert.

3.7.2. Klonierung der Fragmente für den Yeast-Two-Hybrid-Screen

Zur Umklonierung wurden die jeweiligen Fragmente mit *SalI*- bzw. *NotI*-Schnittstellen beinhaltenden Primern von den Vektoren mit der gesamten cDNA amplifiziert, aufgereinigt, verdaut und in den Hefevektor pBTM117c ligiert (Vektorkarte im Anhang). Beim Design der Primer wurde der Leserahmen berücksichtigt, so daß ein Hybridprotein mit der vom Vektor kodierten LexA-DNA-Bindungsdomäne entstand.

3.7.3. Umklonierung von Sept3 in den Vektor pGEX-6P-2

Für die Pulldown-Assays wurde das im Y2H-Screen gefundene Sept3-Fragment aus dem Library-Vektor pACT4-1b über *SalI/NotI*-Schnittstellen in das Bakterienexpressionsplasmid pGEX-6p-2

umgehängt. Dieses war möglich, da sich die aminoternale *SalI*-Schnittstelle in den Vektoren im gleichen Leserahmen bezüglich zu den N-terminalen für die Gal4-Aktivierungsdomäne bzw. die Glutathion-S-Transferase kodierenden Sequenzen befand.

3.7.4. Klonierung von TrkB-Fragmenten für die Expression in COS-7-Zellen

Zur Expression von TrkB-Fragmenten in COS-7 Zellen für die Pulldown-Assays, wurden Fragmente von einem die TrkB cDNA beinhaltendem Plasmid in einer 10-Zyklen PCR amplifiziert. Zur späteren Detektion im Westernblot codierten die Senseprimer außerdem für einen HA-Tag. Der Rückwärtsprimer trug die für die spätere Klonierung nötige *XhoI*-Schnittstelle. Das Produkt wurde in den pCR2.1 Vektor zwischenkloniert. Zur Ligation in den pcDNA3 Vektor wurden die aus dem pCR2.1 gewonnene *EcoRI*- und die im Primer kodierte *XhoI*-Schnittstellen verwendet.

3.7.5. Overlap-PCR

Zur Klonierung eines TrkB/A/B-Hybridkonstruktes wurde eine mehrstufige Overlap-PCR-Technik eingesetzt. Zunächst wurden in zwei separaten PCRs zwei einzelne TrkB kodierende Fragmente von einem TrkB beinhaltenden Plasmid-Template amplifiziert (PCR1 und PCR2 in Abb. 7A). In einer dritten PCR wurde die ins Endkonstrukt einzubauende Region von einem TrkA beinhaltendem Plasmid Template mit Primern, deren 3'-Teile mit TrkB homolog waren, ein weiteres Fragment amplifiziert. Dieses Fragment (PCR 3 in Abb. 7A) bestand aus einer TrkA-Sequenz und wies an beiden Enden je ~ 20 bp kurze, zu TrkB homologe Sequenzen auf. In einer ersten Overlap-PCR wurden die PCR-Produkte 1 und 3, die Senseprimer des Fragmentes 1 und der Antisenseprimer des Fragmentes 2 verwendet, um das aminoternale Hybrid (PCR4 in Abb. 7B) zu amplifizieren. Das PCR-Produkt beinhaltete 5' den HA-Tag und TrkB, dann die in PCR 3 amplifizierte TrkA Sequenz und 3' die kurze TrkB-Sequenz.

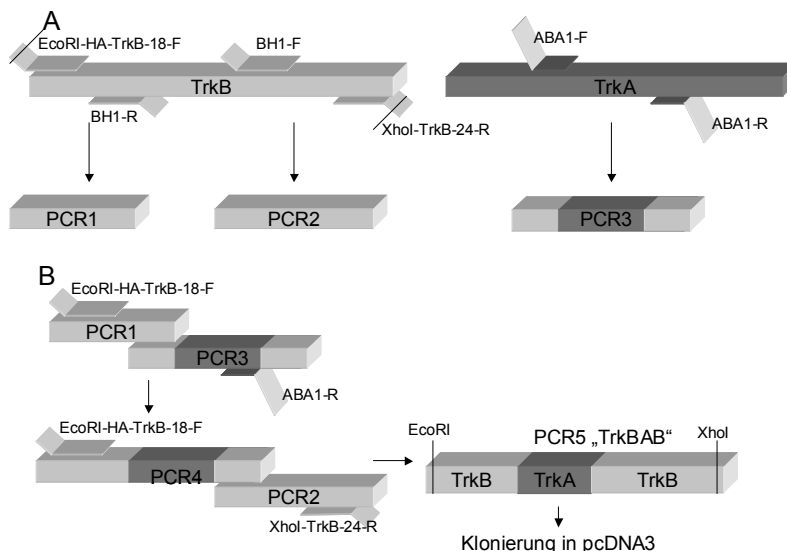


Abbildung 7: Schematische Darstellung der mehrstufigen Overlap-PCR. (A) Amplifikation der Teilfragmente von Plasmid-DNA. (B) Eingesetzte Fragmente und Primer zur Amplifikation des Hybridkonstruktes TrkBAB. Für TrkB kodierende DNA-Fragmente sind hellgrau, für TrkA kodierende Fragmente sind dunkelgrau dargestellt.

Dieses PCR-Produkt wurde wiederum in der zweiten Overlap-PCR mit dem Produkt aus der PCR2 und dem Senseprimer des ersten Fragmentes und dem Antisenseprimer des dritten Fragmentes

eingesetzt. Das Produkt dieser PCR (TrkBAB) wurde anschließend über *EcoRI/XhoI* in den Expressionvektor pcDNA-3 (Clontech) kloniert.

3.7.6. Yeast-2-Hybrid Screen

Der automatisierte Y2H-Screen wurde von Heike Göhler in der Arbeitsgruppe von Prof. Wanker (MDC Berlin-Buch) in einer Kooperation im Rahmen des SFB 577 durchgeführt. Es wurde gegen eine humane Gehirn-cDNA Library gescreent (Göhler et al., 2004).

3.7.7. In-Vitro Bindungs Assay

Prinzip: Zum Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion wird eines der zu untersuchenden Proteine mit einem GST-Tag versehen in *Escherichia coli*, das andere Protein mit einem HA-Tag in Säugerzellen exprimiert. Nach Bindung des GST-Proteins an Gluthathion-Agarose-Beads werden beide Lysate vereinigt, coimmunoprecipitiert und das HA-markierte Protein immunologisch über einen Western-Blot detektiert. Die Protein-Protein-Interaktion findet dabei *in vitro* statt.

Durchführung: 20 ml *E.coli*-Expressionsmedium wurden mit entsprechenden Glycerolstocks als Vorkultur angeimpft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttler wurden mit der Vorkultur 400 ml Expressionsmedium inokuliert. Diese wuchs unter Schütteln bei 18°C bis zu einer OD₅₀₀ von 0,5, wurde dann mit 50 mg Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und weiter bei 18°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert, mit kaltem PBS gewaschen und in 20 ml Lysispuffer aufgenommen. Die Bakterien wurden zunächst für 45 min chemisch lysiert und dann zweimal für je 1min auf Eis und mit 2 min Pause sonifiziert (Bandelin Sonoplus). Dem Lysat wurde TritonX zugegeben, bis eine Konzentration von 0,5% erreicht war. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat für 30 min bei 16000 rpm und 4°C zentrifugiert. Über Nacht waren GST-Sepharose Beads in Aqua bidest. bei 4°C gequollen. Diese wurden mit PBS und in GST-Bindungspuffer gewaschen (Zentrifugation bei ca. 90g). Die Beads wurden dann in einem vierfachen Volumen GST-Bindungspuffer aufgenommen. 10 ml *E. coli* Lysat wurden für 1 Stunde bei 4°C und bei langsamer Rotation mit 200 µl der GST-Bead-Suspension inkubiert. Dann wurden die Beads mit GST-Bindungspuffer gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Parallel zur Proteinexpression in Bakterienzellen wurde eine mit COS-7-Zellen bewachsene 175 cm² Zellkulturflasche mit 14 µg des pcDNA3-HA-Konstrukts und 40 µl Metafectene transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abgeschabt und bei 2000 rpm für 3 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml HEPES-Lysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BCATM-Protein-Assay-Kits (Pierce, Rockford, USA) vorgenommen. Zur Proteinbindung wurde ein entsprechendes Volumen des COS-7 Lysates zu den Beads hinzugefügt und auf ca. 500µl mit GST-Bindungspuffer aufgefüllt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 4°C und bei langsamer Rotation für 4 – 5 Stunden. Die Beads wurden dann sechsmal mit 750 µl GST-Bindungspuffer gewaschen und dann in 40 µl 2X Loading-Puffer aufgenommen und 5 min bei 99°C denaturiert. Von dem Überstand wurden 20 µl auf ein 10 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und aufgetrennt. Für den Westernblot wurden das Gel und eine mit H₂O aktivierte Nitrozellulosemembran in Transferpuffer äquilibriert. Mittels des Trans-Blot[®]Semi-Dry Gerätes (Biorad, Hercules, USA) bei 15 V für 30 min auf die Membran transferiert. Die Membran wurde dann für 5 min

mit TBS gewaschen und mit Blockingpuffer geblockt. Der Anti-HA-Biotin-Antikörper wurde 1:400 in Blockingpuffer verdünnt und die Membran für 2 Stunden mit der Antikörperlösung inkubiert, 3 X 5 min mit TBST gewaschen und eine weitere Stunde mit 1:5000 in Blockingpuffer verdünntem peroxidasekonjugiertem Streptavidin hybridisiert. Nach 4 fünfminütigen TBST-Waschschritten wurden 500 µl Lumi-Glow (Pierce, Rockford, USA) als Substrat auf den Blot gegeben. Im Dunkeln wurde ein Röntgenfilm für 5-10 Minuten auf den Blot zur Belichtung gelegt und dann entwickelt.

Bakterienlysepuffer	
HEPES pH7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 %
MgCl ₂	5 mM
NaF	20 mM
DTT	1 mM
EDTA	2 mM
Pefabloc SC	0,1 mg/ml
Leupeptin	2,5 µg/ml
Lysozym	0,5 mg/ml

Säugerzellysepuffer	
HEPES pH7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10 %
Nonidet-P40	1 %
NaF	20 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	2 mM
Pefabloc SC	0,1 mg/ml
Leupeptin	2,5 µg/ml
Benzonase	2,5 U/ml

GST-Bindungspuffer	
HEPES pH7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	10%
TritonX-100	0,5%
Nonidet-P40	1%
NaF	20 mM
DTT	1 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	2 mM
Pefabloc SC	0,1 mg/ml
Leupeptin	2,5 µg/ml

Expressionsmedium pH 7,0	
Tryptone	16 g/l
Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	5 g/l
MOPS-KOH (pH 7,9)	50 mM
Glucose	0,2%
Thiamin	20 mg
Prolin	0,01 mM

3.7.8. Konfokale Mikroskopie

Zur Visualisierung der subzellulären Colokalisation von fluoreszenzmarkierten Proteinen in differenzierten PC12-Zellen wurden diese nach Nukleofektion auf Glasplättchen kultiviert. Der Objektträger wurde dann in die Messkammer des LSM 510 META (Zeiss, Jena) Mikroskops eingespannt und mit HBS-Puffer überschichtet. Die Anregung der Proteine erfolgte bei Wellenlängen von 458 nm bzw. 488 nm. Als Emissionfilter wurde ein LP505 Filter verwendet.

HBS pH 7,5	
HEPES	10 mM
NaCl	128 mM
KCl	6 mM
MgCl ₂	1 mM
CaCl ₂	1 mM
Glucose	5,5 mM
BSA	0,2 %

3.8. Auswertungen und Statistiken

Bindungs- und Dosis-Wirkungs-Kurven sowie Balkendiagramme wurden mit dem Programm GraphPadPrism 4 (GraphPad Software, LaJolla, USA) erstellt. Mit diesem Programm wurden auch die EC_{50} -, IC_{50} - und E_{max} -Werte bestimmt und die One-Way-ANOVA Teste durchgeführt. Für die statistische Auswertung der Wachstumskurven wurde SPSS (SPSS GmbH Software, München) verwendet.

Positionen, an denen sich die Rezeptoren um höchstens eine Aminosäure unterscheiden sind grau, Positionen die sich um zwei oder mehr Aminosäuren unterscheiden sind weiß gekennzeichnet. Aus Abb. 8 ist ersichtlich, dass die Transmembrandomäne 4 am geringsten konserviert ist. TM 3 weist die geringsten Aminosäurevariationen auf. Die erste und zweite intrazelluläre Schleife sowie die dritte extrazelluläre Schleife weisen einen hohen Anteil an 100% konservierten Aminosäuren auf.

4.1.1. Funktionelle Charakterisierung von orthologen/humanen MC4R-Hybridkonstrukten

In einem auf die erste PCR folgenden Reamplifikationsschritt konnten am 5'-Ende die Schnittstelle für *Bsu36I* und am 3'-Ende die für *BspEI* angefügt werden (Oligo30 und 28 bzw. 29). Diese beiden Schnittstellen sind bereits im humanen MC4R enthalten, daher konnte über sie die Einklonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDps-MC4R-N-HA erfolgen, wodurch Hybridkonstrukte erzeugt wurden, die aus dem humanen Amino- und Carboxytermini und den orthologen Transmembrandomänen und sowohl intra- als auch extrazellulären Schleifen bestanden. Diese Hybridkonstrukte wurden nun auf ihre Signaltransduktionseigenschaften sowie Zelloberflächenexpression und Ligandenbindung untersucht. Dafür wurden zunächst folgende acht Konstrukte ausgewählt: Minkwal, Baikalrobbe, Faultier, Fledermaus, Klippschliefer, fette Sandratte, Eisbär und Heilbutt. Alle Konstrukte wurden ähnlich gut auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 9A, Tab. 1A). Es fanden sich zwar Unterschiede in den EC_{50} Werten von α -, β -, und NDP- α -MSH im cAMP-Akkumulationsassay, diese waren aber stets geringer als eine Größenordnung und wurden daher als physiologisch nicht relevant eingeordnet (Tab. 1B). Exemplarisch sind Dosis-Wirkungs-Kurven für NDP- α -MSH gezeigt (Abb. 9B). Das Gleiche gilt für die Bindung von verschiedenen Agonisten (α -, β -, γ -MSH und ACTH). Exemplarisch ist die Bindungskurve für NDP- α -MSH in Abbildung 9C dargestellt. Die Unterschiede in den IC_{50} Werten waren hier geringer als das 10-fache, ausgenommen der IC_{50} der Bindung von ACTH an den MC4R der fetten Sandratte verglichen mit dem hMC4R (15-faches Verhältnis; Tab. 1A). Auch die relativ zueinander ins Verhältnis gesetzten IC_{50} -Werte zeigten nur geringe Abweichungen voneinander. Zusammenfassend konnte kein dramatischer Funktionsverlust eines der exemplarisch untersuchten MC4R-Orthologe festgestellt werden. Ein Aminosäurealignment für den klonierten Bereich der untersuchten Spezies ist in Abb. 10 angegeben.

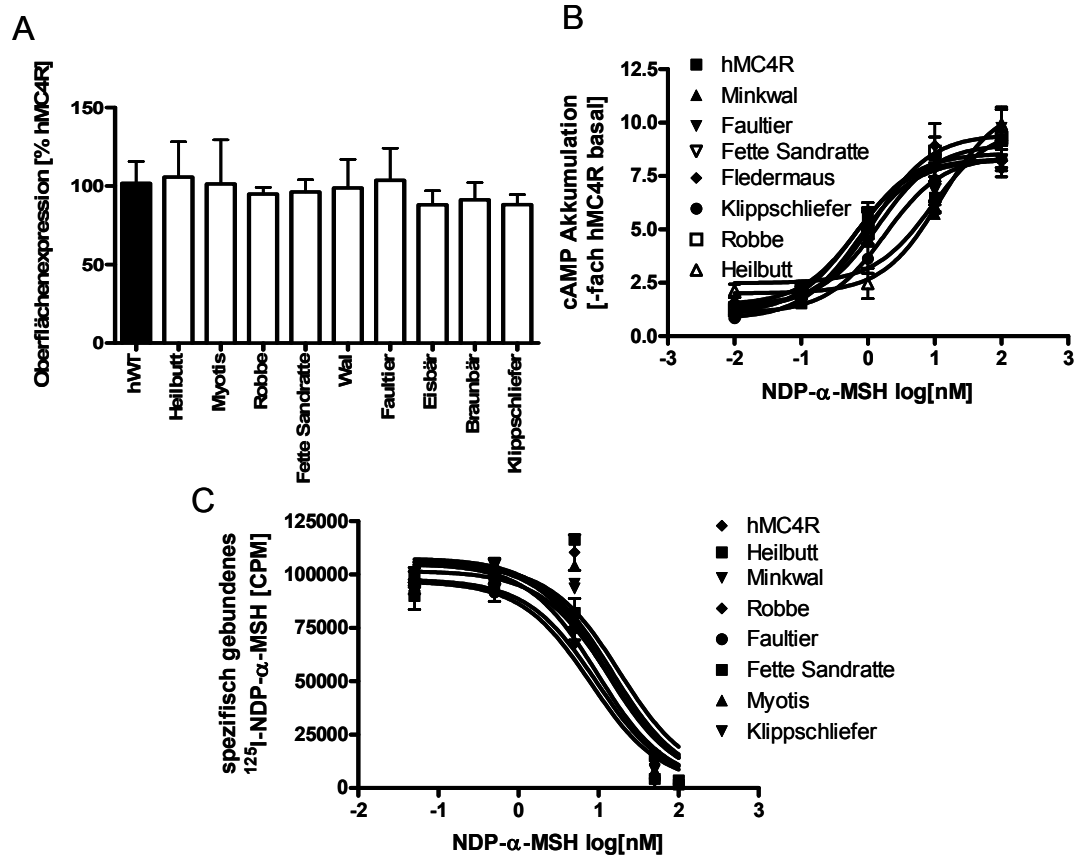


Abbildung 9: Oberflächenexpression, Signaltransduktions- und Bindungseigenschaften einiger Orthologer MC4R-Hybridkonstrukte im Vergleich mit dem humanen MC4R-WT. (A) Aminoterminale HA-getaggte Rezeptorkonstrukte wurden 48h nach Transfektion in COS-7 Zellen formaldehydfixiert und mit einem anti-HA-Biotin Antikörperkonjugat und Streptavidin-POD detektiert. Peroxidaseaktivität wurde photometrisch gemessen, die optische Dichte (OD) einer GFP-transfizierten Kontrolle wurde abgezogen. Die Werte wurden dann auf die OD des WT-MC4R bezogen. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichung. (B) 48 Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptor exprimierenden COS-7 Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von NDP- α -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen Counts per Minute (cpm) wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je 3 mal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 195 bis 2758 cpm. (C) 48 Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptor exprimierenden COS-7 Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von nicht markiertem NDP- α -MSH und einer konstanten Konzentration von ^{125}I -NDP- α -MSH über Nacht bei 4°C kompetitiert. Die Bindung von ^{125}I -NDP- α -MSH ist auf der Ordinate als cpm angegeben. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

Tabelle 1: Ergebnisse der Bindungsstudien, Oberflächenexpression und cAMP-Akkumulationsassays. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben und wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die cAMP-Assays und Bindungsassays wurden in Duplikaten, die Oberflächenexpression in Quadruplikaten durchgeführt. Das Verhältnis der IC₅₀- bzw. der EC₅₀-Werte für die einzelnen Liganden ist angegeben.

Ortholog	Verdrängung von [¹²⁵ I]-NDP- α -MSH					Verhältnis α - : β - : γ -MSH : ACTH	Oberflächen- expression (% hMC4R)
	α -MSH	β -MSH	γ -MSH IC ₅₀ [nM]	ACTH	NDP- α -MSH		
hMC4R	154,3 \pm 10,6	276,2 \pm 64,3	915,3 \pm 235,6	293,3 \pm 5,3	13,6 \pm 1,0	1 : 1,8 : 5,9 : 2,5	102 \pm 15
Minkwal	130,8 \pm 17,4	350,9 \pm 72,2	1261,6 \pm 410,4	155,2 \pm 95,3	11,8 \pm 1,3	1 : 2,7 : 9,6 : 2,8	99 \pm 18
Baikalrobbe	85,1 \pm 1,0	216,7 \pm 34,8	589,4 \pm 209,8	95,5 \pm 42,4	5,3 \pm 1,5	1 : 2,5 : 6,9 : 2,9	95 \pm 4
Faultier	99,8 \pm 9,0	243,3 \pm 64,2	804,2 \pm 287,9	106,2 \pm 44,2	7,7 \pm 2,0	1 : 2,4 : 8,1 : 1,4	104 \pm 20
Fledermaus	82,4 \pm 7,1	233,8 \pm 52,0	231,5 \pm 76,4	82,3 \pm 13,6	11,3 \pm 2,9	1 : 2,8 : 2,8 : 1,8	101 \pm 28
Klippschliefer	97,2 \pm 23,9	209,4 \pm 60,9	746,5 \pm 412,4	129,8 \pm 10,3	11,7 \pm 0,9	1 : 2,2 : 7,7 : 0,3	101 \pm 8
Fette Sandratte	82,4 \pm 4,9	153,0 \pm 30,8	379,2 \pm 121,3	20,7 \pm 4,6	7,5 \pm 2,4	1 : 1,9 : 4,6 : 1,2	88 \pm 11
Eisbär	177,8 \pm 16,4	277,0 \pm 77,0	1332,0 \pm 459,2	263,7 \pm 98,8	9,1 \pm 3,0	1 : 1,6 : 7,5 : 0,8	88 \pm 9
Heilbutt	141,5 \pm 11,0	291,8 \pm 38,4	1351,8 \pm 199,8	284,0 \pm 108,4	16,7 \pm 1,5	1 : 2,0 : 9,3 : 2,1	106 \pm 22

Ortholog	cAMP-Akkumulationsassay									Verhältnis α -MSH : β -MSH : NDP- α -MSH
	α -MSH			β -MSH			NDP- α -MSH			
	Basal [-fach WT]	E _{max} /E _{max} WT [%]	EC ₅₀ [nM]	Basal [-fach WT]	E _{max} /E _{max} WT [%]	EC ₅₀ [nM]	Basal [-fach WT]	E _{max} /E _{max} WT [%]	EC ₅₀ [nM]	
hMC4R	1	100	5,7 \pm 1,4	1	100	12,9 \pm 5,3	1	100,0	0,72 \pm 0,09	1 : 2,3 : 0,13
Minkwal	1,5 \pm 0,3	84,7 \pm 15,3	5,7 \pm 3,2	2,1 \pm 0,5	141,5 \pm 15,4	19,4 \pm 6,0	1,7 \pm 0,4	100,0 \pm 24,2	0,75 \pm 0,23	1 : 3,4 : 0,13
Baikalrobbe	0,3 \pm 0,2	59,7 \pm 4,2	1,0 \pm 0,5	1,3 \pm 0,5	121,5 \pm 41,5	19,5 \pm 1,6	1,1 \pm 0,1	109,1 \pm 21,2	0,73 \pm 0,14	1 : 19,5 : 0,73
Faultier	1,3 \pm 0,2	109,7 \pm 25,0	4,6 \pm 0,7	1,5 \pm 0,1	149,2 \pm 1,5	8,3 \pm 3,0	1,2 \pm 0,2	107,6 \pm 16,7	0,91 \pm 0,21	1 : 1,8 : 0,20
Fledermaus	1,6 \pm 0,1	87,5 \pm 1,4	1,9 \pm 0,6	2,7 \pm 0,5	178,5 \pm 70,8	14,4 \pm 2,7	1,8 \pm 0,1	104,5 \pm 21,1	0,92 \pm 0,20	1 : 7,6 : 0,48
Klippschliefer	0,8 \pm 0,3	90,3 \pm 8,3	4,8 \pm 2,1	1,7 \pm 0,7	158,5 \pm 49,2	19,7 \pm 6,4	0,8 \pm 0,2	112,1 \pm 22,7	0,94 \pm 0,29	1 : 4,1 : 0,20
Fette Sandratte	1,0 \pm 0,1	75,0 \pm 6,9	2,4 \pm 0,7	1,8 \pm 0,5	163,1 \pm 64,6	14,5 \pm 0,8	1,5 \pm 0,4	98,5 \pm 18,2	0,65 \pm 0,12	1 : 6,0 : 0,27
Braunbär	1,4 \pm 0,2	101,4 \pm 22,2	2,3 \pm 0,8	1,0 \pm 0,1	86,2 \pm 27,2	13,1 \pm 7,2	0,5 \pm 0,1	72,6 \pm 16,6	0,19 \pm 0,06	1 : 5,7 : 0,08
Eisbär	1,0 \pm 0,2	87,5 \pm 15,3	3,2 \pm 1,5	0,8 \pm 0,1	92,3 \pm 18,5	16,6 \pm 3,4	1,0 \pm 0,4	93,9 \pm 39,4	0,45 \pm 0,26	1 : 5,2 : 0,14
Heilbutt	1,1 \pm 0,3	63,9 \pm 2,8	3,8 \pm 2,2	1,4 \pm 0,2	115,4 \pm 41,5	9,4 \pm 2,9	1,5 \pm 0,3	103,0 \pm 34,8	1,60 \pm 0,66	1 : 2,5 : 0,40
hMC4R V95I	0,9 \pm 0,1	102 \pm 28	2,3 \pm 0,6	0,8 \pm 0,1	97,1 \pm 9,4	17,6 \pm 8,8	0,7 \pm 0,2	80 \pm 6,6	0,5 \pm 0,03	1 : 7,6 : 0,22

Tabelle 2: Vergleich der Auswirkung von humanen MC4R Mutationen auf die Rezeptorfunktion mit dem Konservierungsgrad der betroffenen Aminosäure. In der Literatur sind >60 verschiedene Missensemutationen beschrieben, von denen ca. 90% funktionell charakterisiert wurden. Diese wurden mit der Konservierung der jeweiligen Aminosäure in 70 orthologen MC4R (siehe Abb. 3, Abb. 8 und Tab. A1) korreliert. Einige Mutationen wurden mit gegensätzlichen Ergebnissen charakterisiert. Diese wurden dann individuell ausgewertet.

Konservierung	Funktion wie WT	Partieller oder vollständiger Funktionsverlust
>2 Aminosäuren	18	3
2 Aminosäuren	8	9
1 Aminosäure	5	24

4.1.3. Reevaluation der humanen MC4R Mutation V95I

Einige im Menschen als Mutation gefundene Aminosäureaustausche findet man in orthologen Rezeptoren wieder. So findet man den Austausch von Valin zu Isoleucin an Position 95 im MC4R des Eisbären (Hinney et al., 2003). Die dort durchgeführte funktionelle Charakterisierung ergab einen vollständigen Funktionsverlust der V95I-Mutation. Ein funktionsunfähiger MC4R könnte dem Eisbären als maritimen Säugetier Vorteile in seinem arktischen Lebensraum durch eine effizientere Fettakkumulation als Schutz vor Kälte oder durch einen verbesserten Auftrieb im Wasser bringen. Der Eisbären-MC4R weist allerdings in funktionellen Untersuchungen keinen großen Unterschied zu den Signaltransduktionseigenschaften des humanen MC4R auf (Tab. 1, Abb. 12). Um zu überprüfen, ob auch andere Spezies der *Ursidae* diesen Austausch aufweisen, wurden die MC4R-Sequenzen von sechs weiteren Bärenarten, und wenn möglich auch von verschiedenen Individuen, bestimmt. In Abb. 11 ist das Aminosäurealignment in der Umgebung der Mutation dargestellt. Bis auf den Eisbären wurde in allen Spezies die Valin-Variante gefunden.

	TMD2	95	ECL1
Mensch	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Braunbär (6)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Brilliebär (6)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Eisbär (6)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD	I	
Schwarzbär (4)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Kragenbär (6)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Nasenbär (5)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		
Großer Panda (1)	KNKNLHSPMYFFICSLAVADMLVSVSNGSETIVITLLNSTDTD		

Abbildung 11: Aminosäurealignment von Bären-MC4R verglichen mit dem humanen MC4R. Es ist ein Ausschnitt um die Region der zweiten Transmembrandomäne (TMD2) und der ersten extrazellulären Schleife (ECL1) gezeigt. Der Trivialname der jeweiligen Spezies ist links angegeben, die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der sequenzierten Individuen an. Der V95I Austausch des Eisbären ist schwarz hinterlegt.

Um die publizierten Ergebnisse zu verifizieren, wurde die humane V95I-Mutation durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt und funktionell charakterisiert. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten konnte hier keine Veränderung der Funktion festgestellt werden. Die EC₅₀-Werte lagen in den

Größenordnungen des WT-MC4R. Die E_{max} -Werte waren bei der V95I-Mutante nur bei NDP- α -MSH geringfügig erniedrigt. (Abb 12, Tab. 1). Im Gegensatz zu dem beschriebenen vollständigen Funktionsverlust verhält sich die V95I-Mutation eher wie der WT als eine Mutation mit vollständigem Funktionsverlust. Auch zwischen den Funktionen der MC4-Rezeptoren von Braun- und Eisbär wurden keine Unterschiede gefunden, abgesehen von einer etwas geringeren Maximalaktivität. Zusammenfassend konnten keine Unterschiede zwischen der V^{95} und der I^{95} Variante festgestellt werden. Die Identifikation und Reevaluation der V95I Mutante veranschaulicht an einem Beispiel, wie mit der Hilfe des Aminosäurealignments die Auswertung und Interpretation von humanen Mutationen erleichtert werden kann.

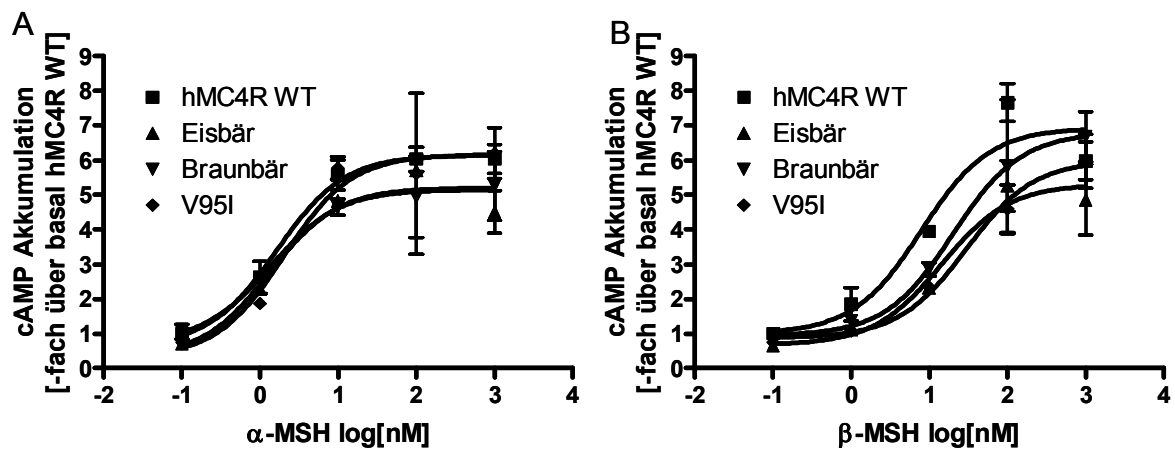


Abbildung 12: Signaltransduktionseigenschaften der Eis- und Braunbären-MC4R und der V95I Mutation im Vergleich mit dem humanen MC4R-WT. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptor exprimierenden COS-7 Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH (A) und β -MSH (B) für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je 3 mal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 183 bis 2258 cpm.

4.2. Punktmutationen in murinen Melanocortinrezeptoren

In einem Spermienarchiv N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU) behandelter Mäuse der Firma *Ingenium* wurden in einem Screening verschiedene Punktmutationen in den Genen *Mc3r* und *Mc4r* identifiziert. Im für den MC3R codierenden Gen waren dies die Missensemutationen Y152C in der zweiten intrazellulären Schleife, L247G und T267P am amino- bzw. carboxyterminalen Ende der sechsten Transmembrandomäne (Abb.13). Im *Mc4r* Gen wurden Mutationen gefunden, die die Aminosäureaustausche Y21H im Aminoterminus, R147S im carboxyterminalen Teil der dritten Transmembrandomäne, I194F im aminoterminalen Teil der fünften Transmembrandomäne, M281R im aminoterminalen Teil und Y302C im carboxyterminalen Teil der siebenten Transmembrandomäne bewirken. Zusätzlich wurde die Mutation S25G untersucht, die in einer Mauslinie, welche als besonders anfällig für diätinduzierte Adipositas im Fachbereich Biologie der Universität Marburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Martin Klingenspor identifiziert wurde. Diese Mutation befindet sich wie die Y21H Mutation im Aminoterminus des Rezeptors.

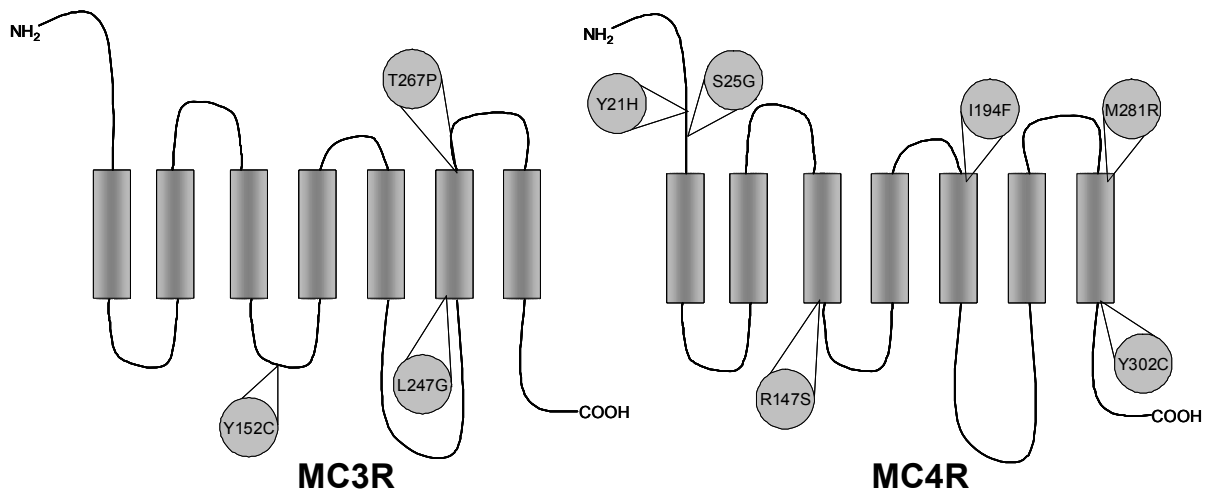


Abbildung 13: Schematische Darstellung der gefundenen murinen Melanocortinrezeptor-Mutationen. Die jeweils sieben Transmembrandomänen sind als Rechtecke dargestellt. Die Lage der gefundenen Mutationen und der jeweilige Aminosäureaustausch sind dargestellt.

4.2.1. Funktionelle Charakterisierung der murinen Melanocortinrezeptor-Mutationen

Zur funktionellen Charakterisierung wurde die mutierte DNA per PCR mit einem Hämagglutinin-Tag versehen und in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDps kloniert. Die Plasmide wurden dann transient in COS-7-Zellen transfiziert um das mutierte Protein zu exprimieren. Die Rezeptoren wurden auf Oberflächenexpression, cAMP-Akkumulation und teilweise auf Ligandenbindungseigenschaften untersucht.

4.2.2. Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC3R

Die Y152C-Mutation wies eine mit dem Wildtyp MC3R vergleichbare Oberflächenexpression auf, während sich bei der L247G-Mutation eine leichte Reduktion der Oberflächenexpression feststellen ließ. Die T267P-Mutation hingegen zeigte eine deutliche, um über zwei Drittel verringerte Oberflächenexpression (Abb. 14 und Tab. 3).

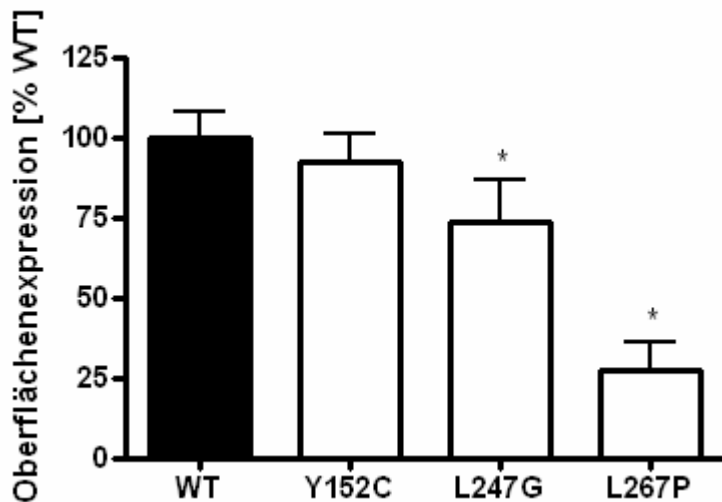


Abbildung 14: Oberflächenexpression der murinen MC3-Rezeptor-Mutanten. COS-7-Zellen wurden mit dem WT-MC3R und den Mutantenkonstrukten transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen formaldehydfixiert und der extrazelluläre Hämagglutinin-Tag immunochemisch quantifiziert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung aus drei bis vier unabhängigen, jeweils in Hexplikaten durchgeführten Experimenten. *: $p < 0,001$ bei One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey Test.

4.2.3. Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften der murinen MC3R Mutanten

Zur Untersuchung der Signaltransduktion wurde nach Stimulation eines dekadisch verdünnten Agonisten die Akkumulation von cAMP als sekundärer Botenstoff in transient transfizierten COS-7-Zellen gemessen. Als Liganden wurden die physiologisch relevanten Peptide α -MSH, β -MSH, γ -MSH sowie der synthetische hochpotente Ligand NDP- α -MSH verwendet. Die Mutationen Y152C und L247G zeigten bei der Stimulation mit allen Liganden eine Verringerung der Maximalstimulation E_{max} (Abb.15, Tab. 3). Die halbmaximale Ligandenkonzentration EC_{50} ist bei der L247G-Mutation verglichen mit dem Wildtyprezeptor um das Doppelte erhöht, während die EC_{50} der Y152C-Mutation nicht verändert ist. Der Rezeptor mit dem T267P-Austausch weist eine stark verminderte Signaltransduktionsfähigkeit auf. Durch die sehr niedrige Maximalstimulation ist es in diesem Fall auch nicht sinnvoll eine EC_{50} zu bestimmen. Diese niedrige Stimulierbarkeit reflektiert die stark verminderte Expression an der Zelloberfläche.

Zusammenfassend konnte für die murinen MC3R Mutanten Y152C und L247G ein partieller, für die T267P-Mutante ein kompletter Funktionsverlust *in vitro* festgestellt werden.

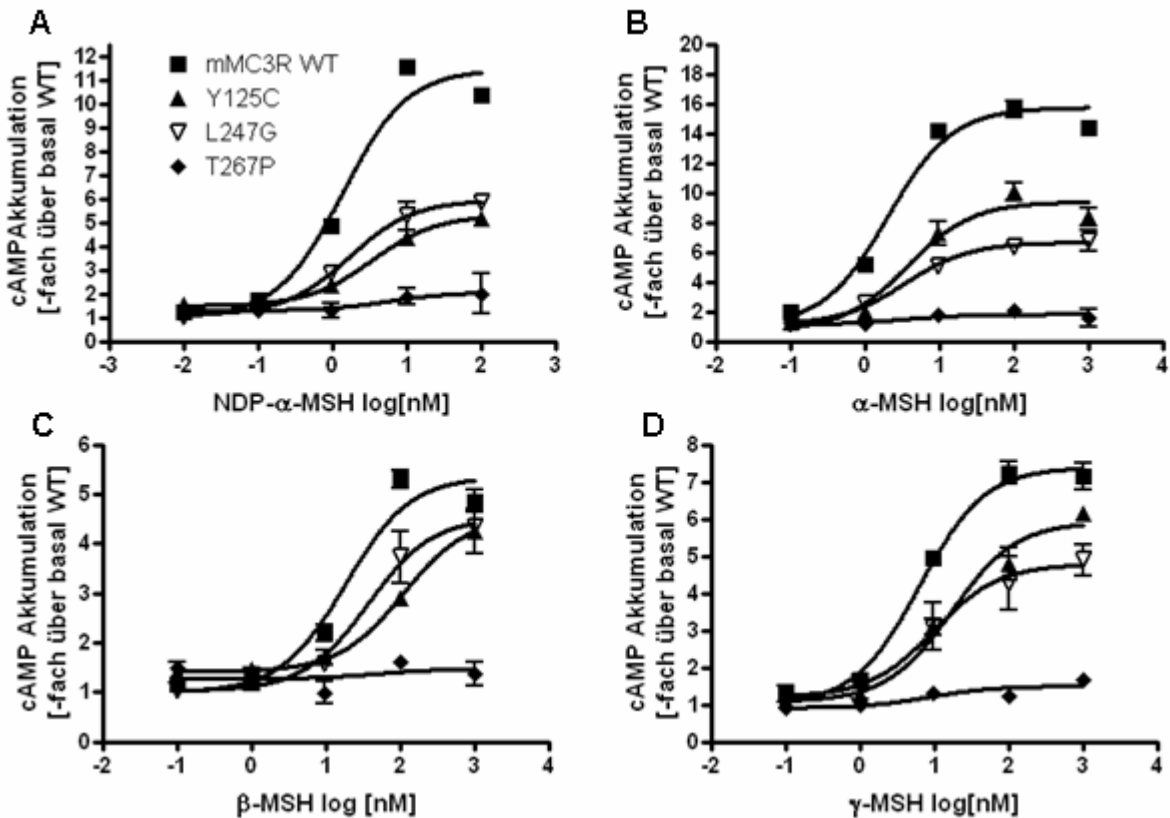


Abbildung 15: cAMP-Akkumulationsassays der mMC3R-Mutanten Y152C, L247G und T267P verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7 Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von (A) NDP- α -MSH, (B) α -MSH, (C) β -MSH und (D) γ -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 191 bis 2909 cpm.

4.2.4. Evolutionäre Konservierung der in den murinen MC3R mutierten Aminosäuren

Die in den Rezeptoren mutierten Aminosäuren wurden auf ihren evolutionären Konservierungsgrad überprüft. Hierzu wurden aus einer Proteindatenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Aminosäuresequenzen von MC3R verschiedener Spezies verglichen (Abb. 16). Für die Y152C- und die L247G-Mutationen ergab der Sequenzabgleich, dass das Tyrosin bzw. das Leucin an der jeweiligen Stelle in den neun in der Datenbank publizierten orthologen Rezeptoren zu 100% konserviert sind. Das Tryptophan an Position 267 ist in den Fischen und einer Amphibie zu einem Serin ausgetauscht. Einen in der Mausmutation gefundenen Austausch zu Prolin, das in der Sekundärstruktur einen Knick der Alpha-Helix bewirken kann und so die Anordnung des Helixbündels stört, existiert in den neun Spezies aber nicht.

icl 2			TM6		
Mensch	VTIFYALR ^H YH	SIMTVRKALT	Mensch	GAVTITIL ^G IG	VFIFCNAPPF LHLVLI ^I ICP
Schimpanse	Schimpanse
SchweinGA	SchweinSL.....
Maus	Maus
RatteS	Ratte
Elefant	I.....RPRP	ElefantS.....
Molch	I.....FV	Molch	..I.....V.....I.....S.....
Dornhai	I.....KR..I	Dornhai	..I.....	I..V.....I.....S.....
ZebrafischV..R..V	ZebrafischS.....	..VC.....I..LVS.....
Identity	:*****	**:**:..	Identity	**:**:***	*: ***** ***:**:

Abbildung 16: Aminosäurealignment neun orthologer MC3 Rezeptoren. Die in den murinen Rezeptoren mutierten Reste sind durch Kästen gekennzeichnet, 100%ige Konservierung ist durch Sterne dargestellt. Punkte in den Aminosäuresequenzen symbolisieren eine identische Aminosäure verglichen mit dem humanen Rezeptor. icl2: zweite intrazelluläre Schleife, TM6: Transmembrandomäne 6.

4.2.5. Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC4R

In der Expression auf der Zelloberfläche weisen die aminoterminalen Mutationen Y21H und S25G sowie die Mutationen R147S und I194F keine Veränderung verglichen mit dem Wildtyp auf (Abb. 17). Im Gegensatz dazu sind nur halb so viel Rezeptoren der M281R-Mutante auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Y302C-Mutation verursacht eine Reduktion der Oberflächenexpression auf ungefähr 65% des Wildtyplevels.

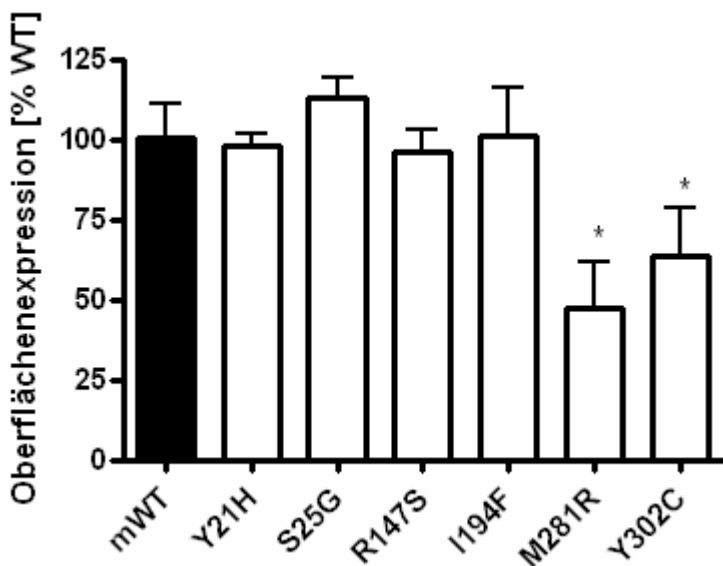


Abbildung 17: Oberflächenexpression der murinen MC4-Rezeptor-Mutanten. COS-7-Zellen wurden mit dem WT-MC4R und den Mutantenkonstrukten transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen formaldehydfixiert und der extrazelluläre Hämagglutinin-Tag immunochemisch quantifiziert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung aus drei bis vier unabhängigen jeweils in Hexplikaten durchgeführten Experimenten. *: p<0,001 bei One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey Test.

4.2.6. Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften der murinen MC4R Mutanten

A) Die Mutanten Y21H, R147S und M281R

In den cAMP-Akkumulations-Assays wurden nach Stimulation mit den Liganden NDP- α -MSH, α -MSH und β -MSH weder in der Maximalstimulation noch in der EC₅₀ bei der Y21H-Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp-MC4R gefunden (Tab 3, Abb. 18). Bei der R147S- und M281R-Mutante ist bei allen getesteten Liganden eine deutliche Reduktion der Maximalstimulation festzustellen. Außerdem führen beide Mutationen zu einer Erhöhung der EC₅₀ unter Stimulation mit den natürlichen Liganden α -MSH und β -MSH (jeweils um mehr als eine Größenordnung), während bei Stimulation mit NDP- α -MSH nur die EC₅₀ der R147S-Mutante um eine Größenordnung erhöht ist. Daraus kann geschlossen werden, dass der Y21H-Aminosäureaustausch zu keiner Änderung der Rezeptorfunktion führt und die R247S-Substitution eine verschlechterte Signaltransduktion bewirkt. Die Mutation M281R verursacht eine verschlechterte Zelloberflächenexpression, was auch eine Reduktion der Signaltransduktionseigenschaften zur Folge hat.

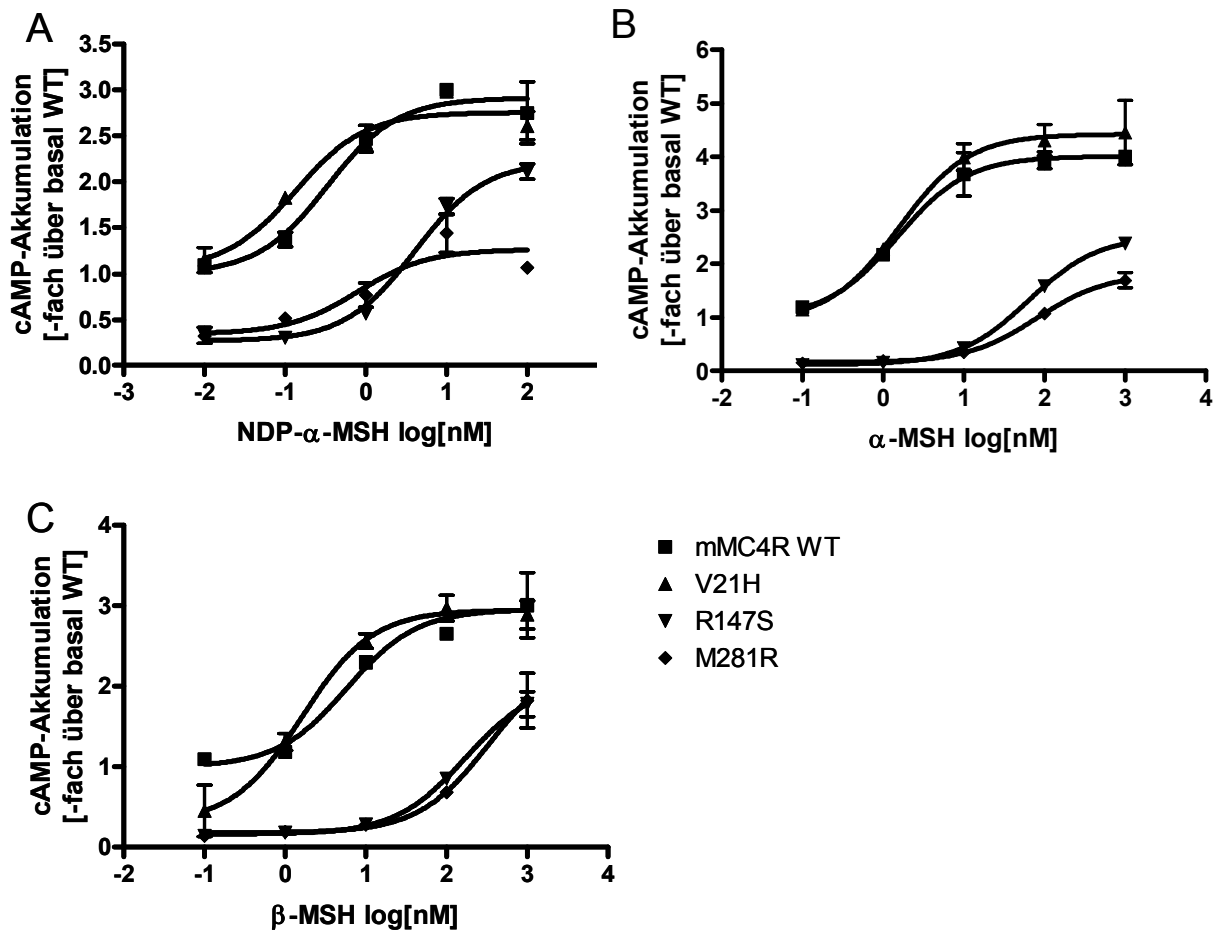


Abbildung 18: cAMP-Akkumulationsassays der mMC4R Mutanten V21H, R147S und M281R verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7 Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von (A) NDP- α -MSH, (B) α -MSH, (C) β -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 112 bis 5568 cpm.

B) Die S25G Mutante

Für den S25G-Aminosäureaustausch konnten bei Stimulation mit den Agonisten NDP- α -MSH, α -MSH und β -MSH weder in Maximalstimulation, noch in der halbmaximale Ligandenkonzentration EC_{50} keine Unterschiede zu den Eigenschaften des murinen Wildtyp-MC4R festgestellt werden (Tab 3, Abb. 19). Gemeinsam mit den Daten der Oberflächenexpression deutet nichts auf einen Effekt dieser Mutation auf die Rezeptorfunktion hin.

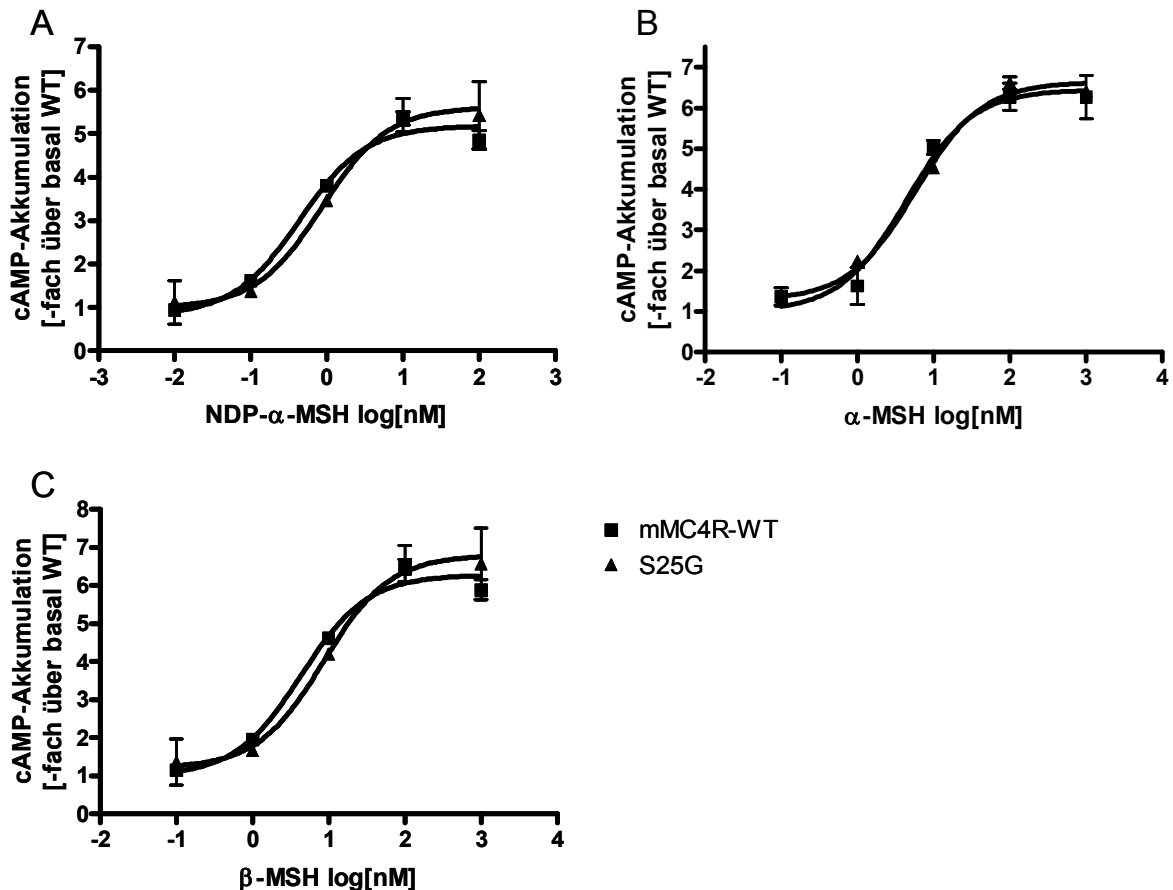


Abbildung 19: cAMP-Akkumulationsassays der mMC4R-Mutante S25G verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von (A) NDP- α -MSH, (B) α -MSH und (C) β -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 964 bis 6636 cpm.

C) Die Mutanten I194F und Y302C

Bei Stimulation mit NDP- α -MSH verhält sich der Rezeptor mit der I194F-Substitution wie der Wildtyp-Rezeptor, wird er aber durch α -MSH oder β -MSH stimuliert, erhält man zu höheren Ligandenkonzentrationen verschobene Dosis-Wirkungs-Kurven. Bei sehr hohen Konzentrationen von α -MSH und β -MSH erreicht die cAMP-Akkumulation Wildtypniveau. Die EC_{50} für α -MSH und β -MSH ist um das 70- bzw. 40-fache erhöht (Tab. 3, Abb. 20). Die Y302C-Mutation bewirkt für alle Liganden einen kompletten Funktionsverlust. Aufgrund der sehr niedrigen Maximalstimulation konnten für diese Mutation auch keine genauen EC_{50} -Werte ermittelt werden. Außerdem wurden diese beiden Mutanten

mit dem in vielen in der Literatur beschriebenen *in vivo* Experimenten verwendeten synthetischen Agonisten Melanotan II (MTII) stimuliert. Die mit MTII stimulierten Rezeptoren verhalten sich entsprechend der Stimulation mit NDP- α -MSH: kein Effekt der I194F-Mutation und ein kompletter Funktionsverlust der Y302C-Mutante.

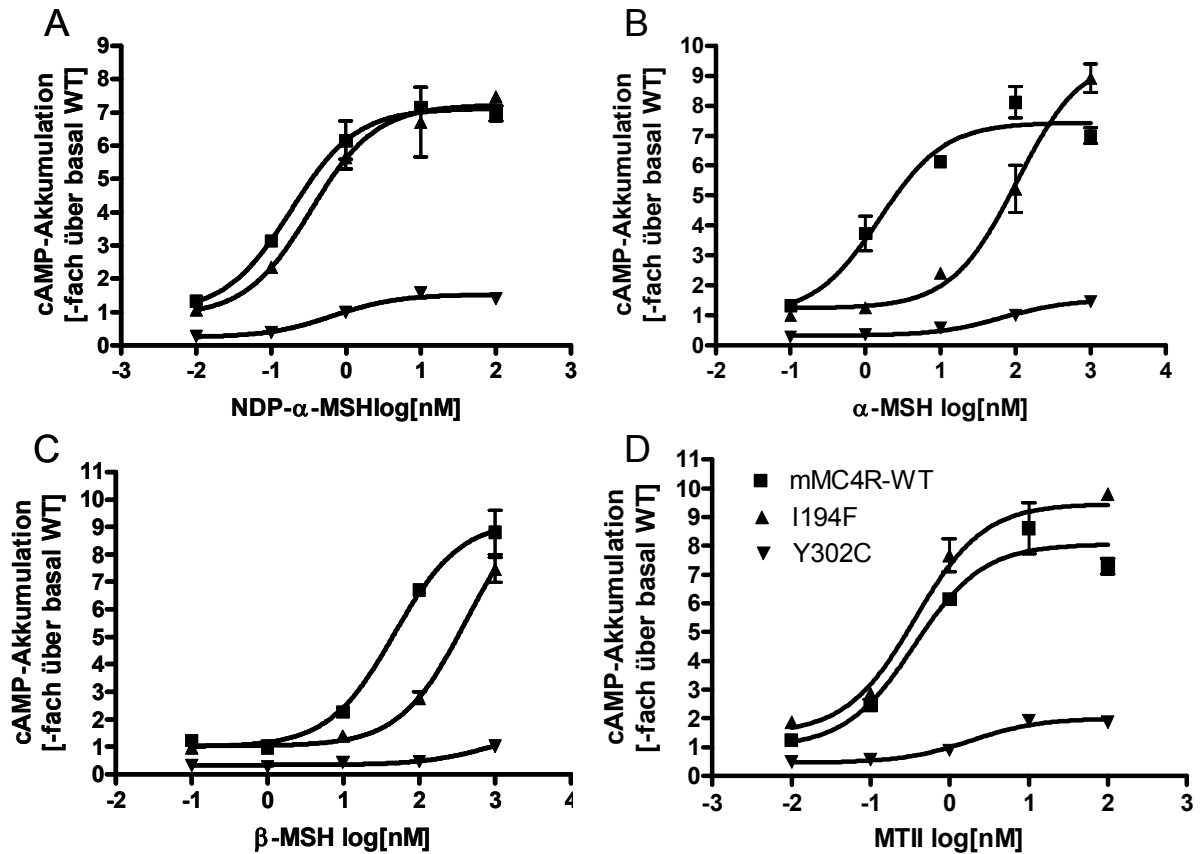


Abbildung 20: cAMP-Akkumulationsassays der mMC4R Mutanten I194F und Y302C verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von (A) NDP- α -MSH, (B) α -MSH, (C) β -MSH und (D) MTII für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 126 bis 6027 cpm.

4.2.7. Evolutionäre Konservierung der in murinen MC4R mutierten Aminosäuren

Die im Aminoterminus gelegenen Aminosäureaustausche sind in den in den Datenbanken gefundenen orthologen MC4R nicht konserviert (siehe Abschnitt 4.1). Dieser geringe Konservierungsgrad passt zu den funktionellen Daten, denn weder bei der Y21H- noch bei der S25G-Mutation konnte eine funktionelle Veränderung verglichen mit dem WT-Rezeptor festgestellt werden. Die Aminosäuren R¹²⁷, M²⁸¹ und Y³⁰² sind zu 100% in über 70 Spezies konserviert. Die Mutationen an diesen drei Positionen führen zu kompletten Funktionsverlusten des Rezeptors bei Stimulation mit allen getesteten Liganden. Das Isoleucin an Position 194 ist in den meisten Fischarten durch ein Leucin substituiert. Auch in einem Säugetier (Rüsselspringer, *Macroscelides proboscideus*) wurde eine Substitution zu Leucin gefunden. Leucin und Isoleucin sind beide hydrophob mit aliphatischen Seitenketten und unterscheiden sich nur wenig in der Größe ihres Restes. Der bei der I194F-Mutation

beobachtete partielle Funktionsverlust nach Stimulation mit α - und β -MSH ist daher eher auf das Einfügen des großen, aromatischen Phenylalanins zurückzuführen.

Tabelle 3: Zusammenfassung der funktionellen Charakterisierung der mMC3R und mMC4R Mutanten: EC₅₀, E_{max} und Oberflächenexpression sind als Mittelwert ± Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils in Duplikaten durchgeführten Experimenten angegeben. n.b.: nicht bestimmt; * EC₅₀ nicht bestimmbar wegen zu geringer E_{max}

	Mutation	NDP- α -MSH		α -MSH		β -MSH		γ -MSH		Oberflächen Expression
		E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	[%WT]
MC3R	WT	100	1,6 ± 0,2	100	2,8 ± 1,0	100	71,6 ± 66,3	100	7,2 ± 1,2	100 ± 8,0
	Y152C	45,1 ± 1,8	4,0 ± 1,9	48,5 ± 11,6	4,4 ± 2,5	76,9 ± 11,6	175,4 ± 91	68,8 ± 16,0	16,6 ± 1,7	92,5 ± 3,7
	L247Q	44,0 ± 11,3	1,5 ± 0,3	42,3 ± 0,1	5,0 ± 2,0	82,9 ± 2,6	36,8 ± 1,2	63,6 ± 1,5	14,2 ± 5,9	73,3 ± 13,4
	T267P	17,7 ± 3,9	*	11,5 ± 4,6	*	31,0 ± 5,8	*	21,4 ± 1,6	*	27,5 ± 8,2
MC4R	WT	100	0,5 ± 0,3	100	1,6 ± 0,1	100	7,8 ± 2,8	n.b.	n.b.	100 ± 10,5
	Y21H	107,3 ± 36	0,2 ± 0,1	96,0 ± 20,2	1,2 ± 0,4	99,8 ± 0,1	2,1 ± 0,7	n.b.	n.b.	97,9 ± 3,7
	S25G	112,9 ± 6,5	0,3 ± 0,2	92,4 ± 22,2	3,0 ± 2,6	111 ± 5,6	6,1 ± 2,7	n.b.	n.b.	112,7 ± 6,4
	R147S	69,2 ± 8,9	5,3 ± 1,4	62,6 ± 0,6	59,7 ± 5,8	79,3 ± 14,1	161 ± 14	n.b.	n.b.	96,3 ± 6,7
	I194F	102,7 ± 1,7	0,6 ± 0,4	129,4 ± 0,7	104,6 ± 0,8	110,2 ± 1,7	326 ± 122	n.b.	n.b.	96,3 ± 6,7
	M281R	55,3 ± 10,9	0,8 ± 0,3	40,9 ± 6,2	76,2 ± 6,0	63,7 ± 23,0	276 ± 74	n.b.	n.b.	47,6 ± 14,0
	Y302C	20,7 ± 3,0	*	20,9 ± 0,6	*	16,6 ± 0,1	*	n.b.	n.b.	63,6 ± 15,3

4.2.8. Ligandenbindung der I194F- und der Y302C- Mutante

Eine verminderte Signaltransduktion kann verschiedene Ursachen haben: Eine verminderte Ligandenbindung und/oder eine verminderte Aktivierbarkeit des Rezeptors.

Da in den Signaltransduktionseigenschaften bei der I194F-Mutante deutliche Unterschiede zwischen NDP- α -MSH und α -MSH festgestellt werden konnten, wurde diese Mutante auch auf ihre Ligandenbindungseigenschaften dieser beiden Peptide untersucht. Als Vergleich wurde die Y302C-Mutante mituntersucht.

Als Tracer wurde ^{125}I -NDP- α -MSH verwendet, der mit unmarkiertem (kaltem) NDP- α -MSH oder α -MSH verdrängt wurde. Die maximale Bindung (B_{\max}) des ^{125}I -markierten NDP- α -MSH an den MC4R wurde durch die I194F Mutation nicht beeinträchtigt (Tab. 4, Abb. 21). Der Y302C-Rezeptor bindet verglichen mit dem Wildtyp nur etwa 35% des Liganden. Wie zuvor gezeigt, wird die Y302C Mutante zu 65% des Wildtyplevels an der Zelloberfläche exprimiert. Zusätzlich zu der reduzierten Oberflächenexpression kommt eine um die Hälfte reduzierte Ligandenbindung hinzu.

Tabelle 4: Verdrängung von ^{125}I -NDP- α -MSH durch α -MSH und NDP- α -MSH an WT-MC4R, I194F-Mutante und Y302C-Mutante in transient transfizierten COS-7 Zellen. B_{\max} : maximale Bindung; IC_{50} : halmaximale Inhibitorkonzentration; n.b.: aufgrund der geringen B_{\max} wurde die IC_{50} nicht bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

	B_{\max} [% B_{\max} WT]	α -MSH IC_{50} [nM]	NDP- α -MSH IC_{50} [nM]
mMC4R-WT	100	54 \pm 43	1,1 \pm 0,4
I194F	97,7 \pm 9,8	152 \pm 105	0,5 \pm 0,1
Y302C	35,2 \pm 3,5	n.b.	n.b.

An der I194F-Mutante lässt sich der radioaktiv markierte Ligand verglichen mit dem WT durch NDP- α -MSH besser (ca. halbe IC_{50}), durch α -MSH schlechter verdrängen (ca. dreifache IC_{50}). Die Unterschiede sind aber zu gering und im t-Test nicht signifikant, als dass diese leicht veränderten Bindungseigenschaften die um die bis zu 70-fache erhöhte EC_{50} der cAMP-Akkumulation erklären könnte. Die I194F-Mutante kann α -MSH zwar binden, die Bindung führt aber vermutlich nicht zu der zur Aktivierung notwendigen Konformationsänderung des Rezeptors, die wiederum für die Aktivierung des G-Proteins nötig ist und die intrazelluläre Signalkaskade startet.

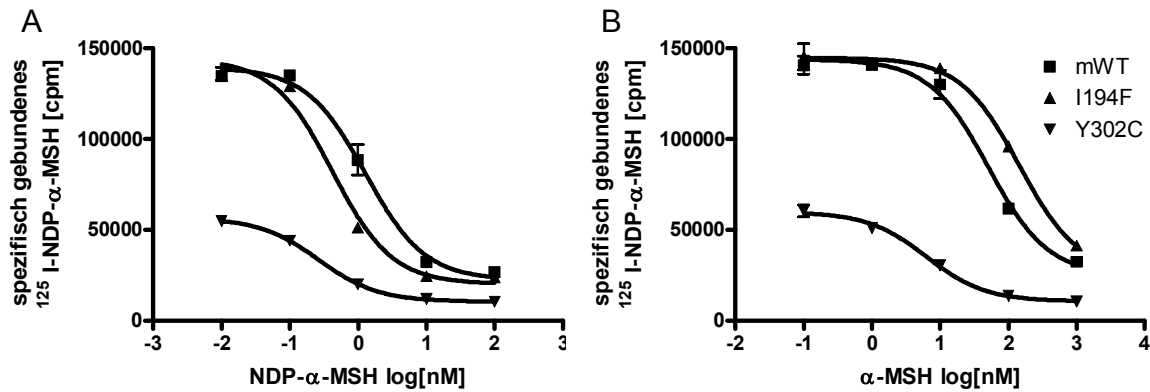


Abbildung 21: ^{125}I -NDP- α -MSH-Bindungsstudien an transient transfizierten COS-7-Zellen. Bindung von 50nM ^{125}I -NDP- α -MSH an den WT-MC4R, die I194F-Mutante und die Y302C-Mutante wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von nicht markiertem (A) NDP- α -MSH oder (B) α -MSH über Nacht bei 4°C kompetitiert. Die Bindung von ^{125}I -NDP- α -MSH ist auf der Ordinate als Counts per Minute (cpm) angegeben. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist abgebildet.

4.2.9. Effekt der I194F- und der Y302C-mMC4R-Mutationen auf das Körpergewicht *in vivo*

Um eine Übertragbarkeit von *in vitro* Charakterisierungen von Melanocortinrezeptormutationen zu zeigen, wurden zwei funktionell unterschiedliche MC4R-Mutationen ausgewählt, die auch *in vivo* untersucht werden sollten. Mauslinien mit der partiell inaktiven I194F-Mutation und der komplett inaktiven Y302C-Mutation wurden in einem C3HeB/FeJ/C57Bl/6J 50/50% gemischten Hintergrund von der Firma *Ingenium Pharmaceuticals* erzeugt. Homo- und heterozygote Mutationsträger dieser beiden Mauslinien wurden bezüglich ihrer Körpergewichtsentwicklung untersucht (Tab. 5 und Abb. 22).

Tabelle 5: Das Körpergewicht homozygoter Mutationsträger im Alter von 11 bzw. 18 Wochen prozentual bezogen auf das durchschnittliche Gewicht der Wildtyp Tiere. *signifikanter Unterschied zwischen beiden Mutationen; t-Test, $p < 0,05$

Geschlecht	Genotyp	Gewicht [% WT]	
		11. Woche	18. Woche
Weibchen	I194F/I194F	138 ± 29	147 ± 23
	Y302C/Y302C	169 ± 21 *	173 ± 18 *
Männchen	I194F/I194F	116 ± 15	123 ± 15
	Y302C/Y302C	138 ± 13 *	139 ± 15

Nach 11 und nach 18 Wochen sind beide mutationstragenden Tiere schwerer als altersgleiche Wildtypiere. Vergleicht man die beiden mutationstragenden Linien im Alter von 11 bzw. 18 Wochen miteinander, weisen Weibchen der Y302C-Linie ein signifikant höheres Körpergewicht als die die I194F-Mutation tragenden Weibchen auf. Für die Männchen ist dieser Unterschied nur im Alter von 11 Wochen signifikant. In den *in vitro* Experimenten konnte eine bis zu 70-fach erhöhte EC_{50} für die I194F-Mutation nach Stimulation mit dem einzigen in Mäusen physiologisch relevanten Agonisten α -MSH gezeigt werden. Diese erniedrigte Affinität reicht aus, um ein vom Wildtyp unterschiedliches

Körpergewicht zu erreichen, verglichen mit den Y302C-Mäusen kompensiert die noch verbliebene Aktivität die Erhöhung des Körpergewichtes zumindest teilweise.

Generell ist die Gewichtszunahme beider Linien für die Weibchen deutlicher. Wie schon für MC4R-knockout-Mäuse gezeigt (Huzar et al., 1997) liegen heterozygote Träger der komplett inaktiven Y302C-Mutation phänotypisch zwischen homozygoten und Wildtyp Tieren (Abb. 22). Vergleichbar mit den Daten der knockout-Mäuse tritt dieser Effekt deutlicher bei den Weibchen auf.

Heterozygote Weibchen und Männchen der I194F-Linie weisen eher ein mit den homozygoten Mutationsträgern vergleichbares Körpergewicht auf. Ein t-Test zum Vergleich der heterozygoten Tiere mit den homozygoten Tieren ergab für beide Geschlechter in der 18. Woche keine Signifikanz ($p > 0,05$).

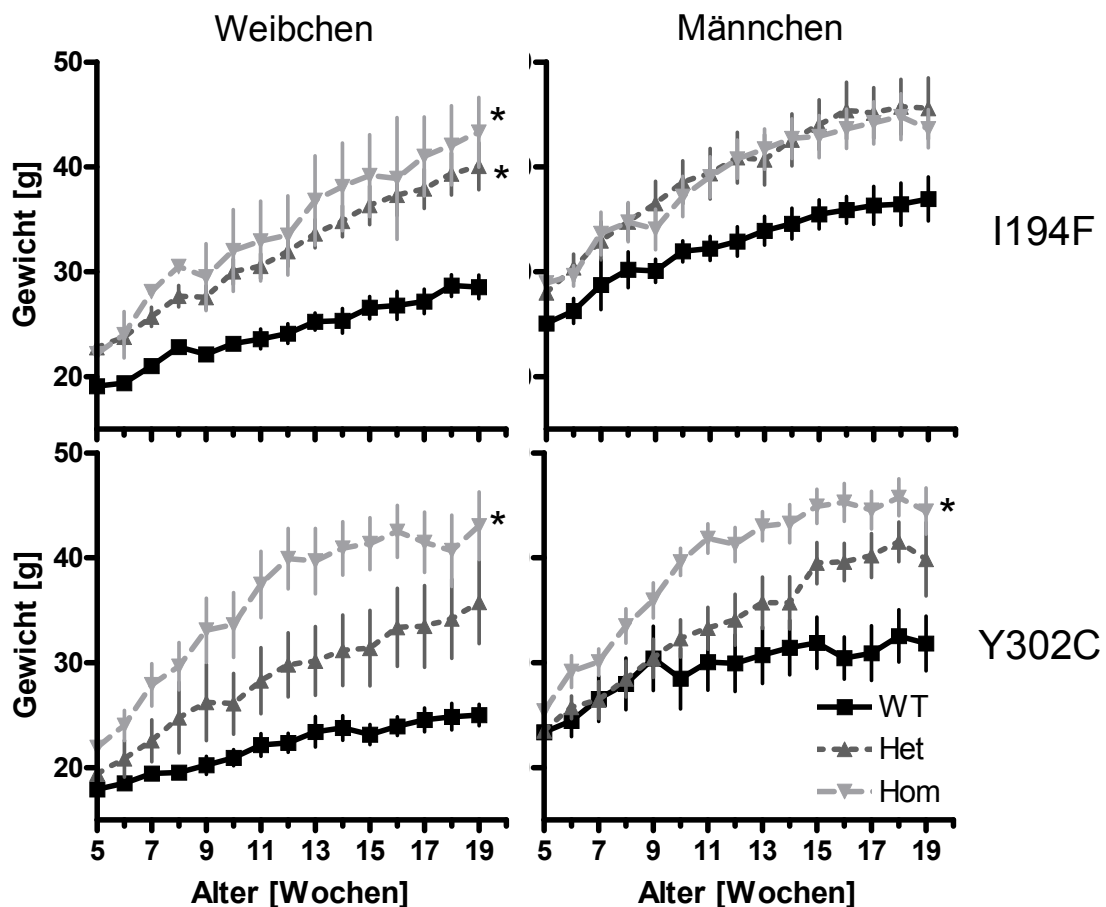


Abbildung 22: Wachstumskurven der die I194F- (oben) und die Y302C-Mutation (unten) tragenden Tiere. Die Wachstumskurven sind nach den Geschlechtern der Tiere aufgeteilt (Weibchen links und Männchen rechts). Die Gewichte der Tiere im Alter von 5 bis 19 Wochen sind angegeben. Für alle Tiere $n=5$, außer für weibliche I194F homozygote $n=3$. *signifikanter Unterschied zu WT Mäusen (post hoc Scheffé's Test; $P < 0,05$). Für die homozygoten Männchen der I194-Linie konnte ein Trend beobachtet werden ($p = 0,062$) hom:homozygot; het:heterozygot; WT: Wild Typ

4.2.10. Untersuchung eines dominant-negativen Effekts der I194F Mutante

Da sich die Gewichtsverläufe der hetero- und homozygoten I194F-Tiere entsprachen, wurde zusätzlich untersucht, ob sich eine Coexpression des I194F-Rezeptors auf den WT-Rezeptor auswirkt. Ein solcher Effekt wurde schon für die D90N Mutation des humanen MC4R gezeigt (Biebermann et al., 2003) und kann dann auftreten, wenn die Signaltransduktion, aber nicht die Oberflächenexpression und Ligandenbindungseigenschaften durch die Mutation beeinträchtigt sind. Durch Bildung von Heterodimeren von WT- und mutierten Rezeptoren können inaktive Dimere entstehen und so einen dominant-negativen Effekt verursachen.

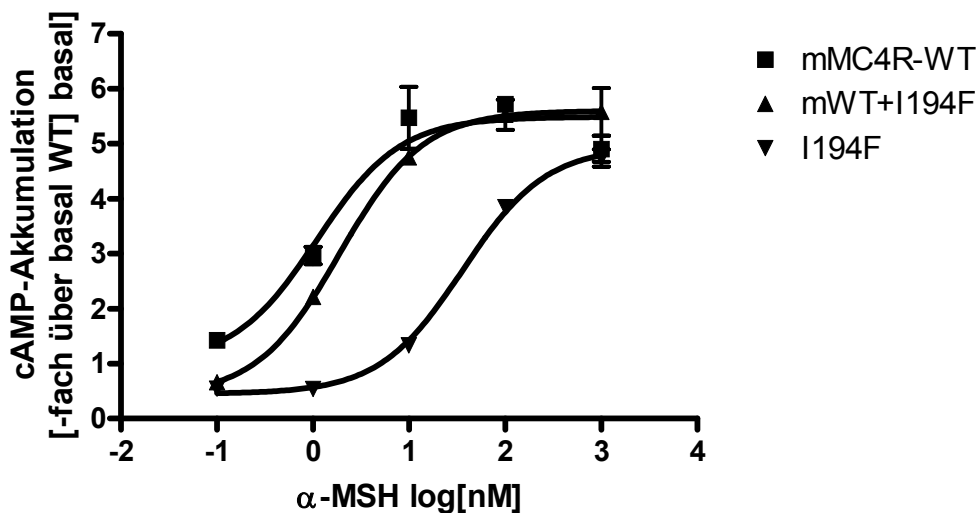


Abbildung 23: cAMP Akkumulationsassay der I194F Mutante kotransfiziert mit dem Wildtyp verglichen mit den einzelnen Konstrukten. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Rezeptorexprimierenden COS-7 Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Pro 6-well-Platte wurden insgesamt 3 μ g Plasmid-DNA transfiziert, bei Kotransfektion 1,5 μ g pro Konstrukt. Die Grafik repräsentiert ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 803 bis 3091 cpm.

Cotransfektion von mMC4R-WT mit dem I194F-Konstrukt hat nur wenig Auswirkung auf die EC_{50} nach α -MSH Stimulation (Tab. 6, Abb23). Diese Serie von Experimenten wurde einige Monate später als die in Tab. 6 ausgewerteten Experimente durchgeführt. Es wurden hier andere Chargen von Zellen, Liganden und Plasmidpräparationen verwendet. Die I194F Mutation zeigt noch immer einen partiellen Funktionsverlust, allerdings ist die EC_{50} in dieser Reihe von Experimenten nur um das 30-fache verglichen mit der WT- EC_{50} erhöht. Im Vergleich zum WT Homodimer ist die des WT/I194F Heterodimers etwa verdreifacht, das kann aber auch durch das Wegfangen von Liganden durch partiell inaktive I194F Homodimere bzw. durch Transfektion von der halben Menge an WT-mMC4R-Plasmid-DNA verursacht worden sein. Da diese Versuche in einem Überexpressionssystem durchgeführt wurden und da es sich bei der I194F-Mutation nur um eine partielle Funktionsverlustmutation handelt, kann es außerdem sein, dass ein eventueller dominant-negativer Effekt zu gering ist, um hier gemessen werden zu können. Diese *in vitro* Daten deuten nicht auf einen

dominant negativen Effekt durch dimerisierungsvermittelte Inhibition des WT Rezeptors durch den mutierten Rezeptor als Ursache für den adipösen Phänotyp der heterozygoten I194F-Mäuse hin.

Tabelle 6: Funktionelle Charakterisierung von mMC4R WT, I194F und WT/I194F Kcotransfection. Transient transfizierte COS-7 Zellen wurden mit α -MSH stimuliert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen aus drei unabhängigen Experimenten.

	E_{\max} [% WT]	EC_{50} [nM]
WT	100	$1,2 \pm 0,2$
WT+I194F	$93,8 \pm 8,0$	$4,2 \pm 2,7$
I194F	$95,8 \pm 9,5$	$35,6 \pm 3,9$

4.3. Funktionelle Charakterisierung von in der Normalbevölkerung vorkommenden humanen MC4R-Punktmutationen

In verschiedenen Studien wurden MC4R-Mutationen in übergewichtigen bzw. adipösen Patientenkollektiven gefunden, mit einer Häufigkeit von bis zu 5% bei Kollektiven mit frühmanifesten Adipositas. Es gibt bisher jedoch keine Information darüber, wie häufig Mutationen in diesem Gen in der Durchschnittsbevölkerung auftreten. Daher wurde das MC4R-Gen in einer 4068 Individuen umfassenden Normalbevölkerungskohorte (KORA-S4= Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg, Survey 4) von der Arbeitsgruppe um Anke Hinney in Essen sequenziert. Hierbei wurden insgesamt 16 verschiedene nichtsynonymie Mutationen in der kodierenden Region des MC4R und 4 stille Mutationen gefunden. Alle Mutationsträger waren heterozygot. Neben acht bereits beschriebenen Mutationen (R18C, S30F, T112M, S127L, R165Q, G181D, I226H und V253I) wurden auch acht unbekannte bzw. uncharakterisierte Mutationen identifiziert (R7C, A70T, T112K, Q156R, H158R, V166I, M200V und R236H).

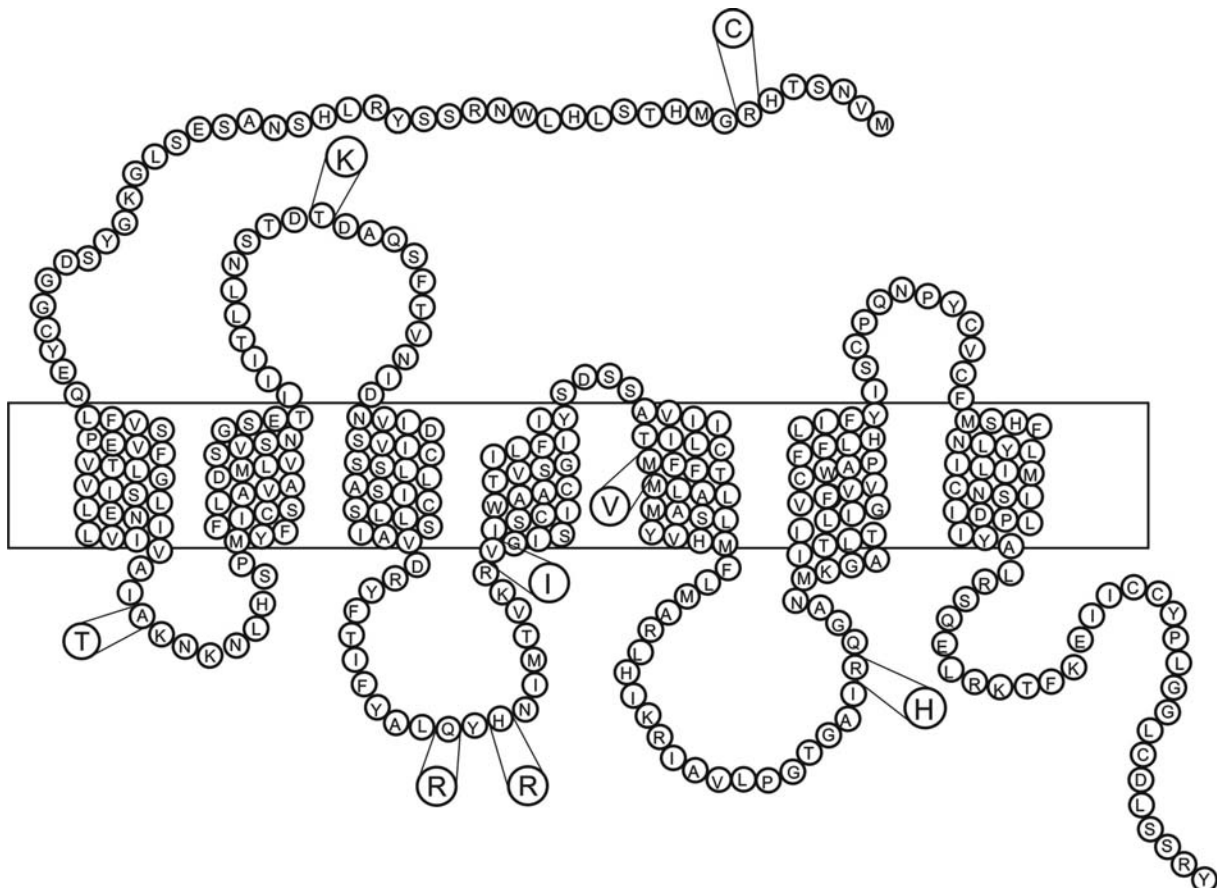


Abbildung 24: Schematische Darstellung der in einer Normalpopulation (KORA) gefundenen MC4R-Mutationen: Die sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben und als Kreise dargestellt. Bei den Mutationen stellt der kleine Kreis die WT-Aminosäure und der grosse Kreis den Austausch dar. Bei den Mutationen handelt es sich um die Austausch R7C, A70T, T112K, Q156R, H158R, V166I, M200V und R236H.

Die R7C-Mutation befindet sich im Aminoterminus des MC4R, die A70T in der ersten intrazellulären Schleife, die T112K-Mutation in der ersten extrazellulären Schleife, die beiden Argininaustausche Q156R und H156R in der zweiten extrazellulären Schleife, die V166I-Mutation im Übergang der

zweiten intrazellulären Schleife zur vierten Transmembrandomäne, der Austausch M200V in der fünften Transmembrandomäne und die R236H-Substitution in der dritten intrazellulären Schleife.

Die funktionelle Charakterisierung dieser unbekanntenen Mutationen ist Gegenstand dieses Abschnitts. Dazu wurde aus der genomischen DNA der Mutationsträger per PCR die kodierende Region des MC4R amplifiziert. In einer zweiten PCR wurden Primer mit passenden Schnittstellen zur Klonierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDps verwendet. Außerdem beinhaltete der Vorwärtsprimer die für den Hämagglutinin-Tag codierende Sequenz, so dass das exprimierte Protein am Aminoterminus HA-markiert war. Die Plasmide wurden dann transient in COS-7-Zellen transfiziert um die mutierten Proteine zu exprimieren. Die Rezeptoren wurden auf Oberflächenexpression und cAMP-Akkumulation nach Ligandenstimulation untersucht.

4.3.1. Untersuchung der Oberflächenexpression der mutierten MC4R

Im Zelloberflächen-ELISA zeigten die Konstrukte R7C, A70T, Q156R, H158R, M200V und R236H eine mit dem Wildtyp vergleichbare Oberflächenexpression (Abb. 25, Tab. 7). Der Rezeptor mit dem T112K-Austausch zeigte eine leichte Reduktion der Oberflächenexpression, während ca. halb soviel V166I-Rezeptoren verglichen mit WT-Rezeptoren an der Zelloberfläche exprimiert waren.

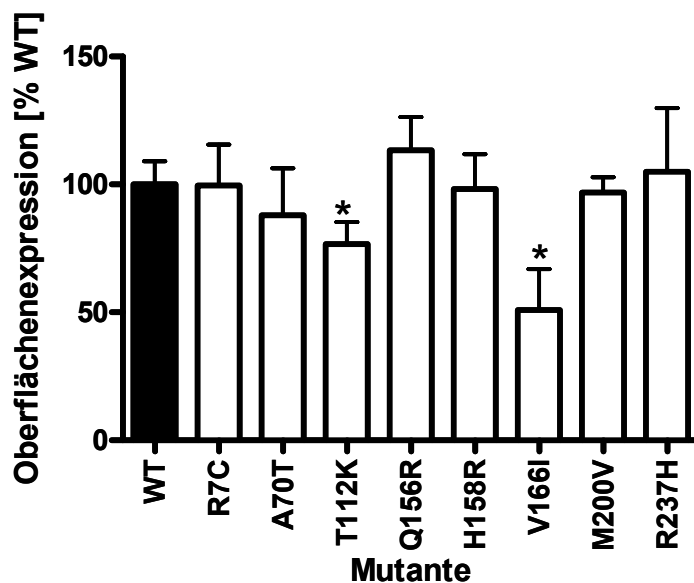


Abbildung 25: Oberflächenexpression der humanen MC4-Rezeptor-Mutanten. COS-7-Zellen wurden mit dem WT-MC4R und den Mutantenkonstrukten transfiziert. Nach drei Tagen wurden die Zellen formaldehydfixiert und der extrazelluläre Hämagglutinin-Tag immunochemisch quantifiziert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichung aus drei bis vier unabhängigen jeweils in Hexplikaten durchgeführten Experimenten normalisiert auf den WT. *: $p < 0,05$ bei One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test bezogen auf den WT.

4.3.2. Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften von humanen MC4R-Mutationen

Zur Untersuchung der Signaltransduktionseigenschaften der mutierten Rezeptoren wurden transient mit den Rezeptorkonstrukten transfizierte COS-7-Zellen mit verschiedenen Ligandenkonzentrationen für 45 min stimuliert. Das intrazellulär akkumulierte cAMP wurde als Anzeigewert bestimmt. Zunächst

fiel aber schon in unstimulierten Zellen eine erhöhte Basalaktivität der H165R-Mutante auf. Während die Basalaktivität bei den anderen untersuchten Mutanten mit der des Wildtyps vergleichbar war, war bei der H165R-Mutante eine 6-fach erhöhte cAMP-Akkumulation feststellbar (Abb. 26, Tab. 7).

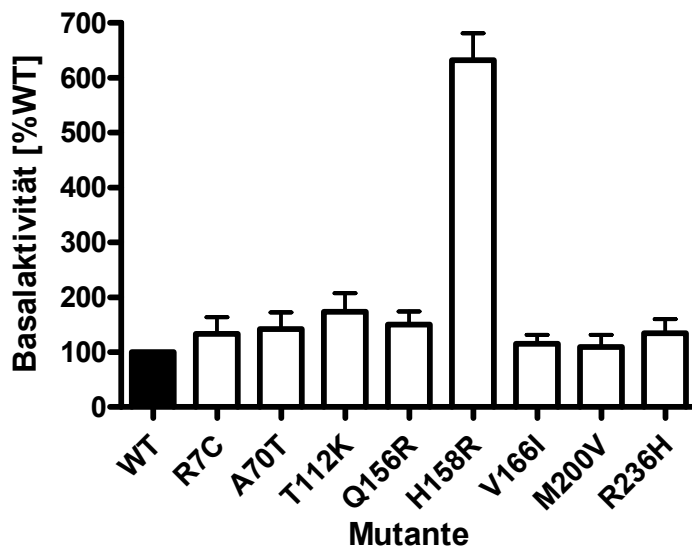


Abbildung 26: Basalaktivität der MC4R-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit IBMX-haltigem Medium für 45 Minuten inkubiert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert (WT=100%). Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt.

Es handelt sich bei dieser Mutante um eine konstitutiv aktive Mutation, das wurde auch anhand der Dosis-Wirkungs-Kurven bestätigt. Hier zeigte sich für die H158R-Mutante nicht nur eine erhöhte Basalaktivität, sondern auch eine etwa anderthalbfache Maximalstimulation bei α -MSH.

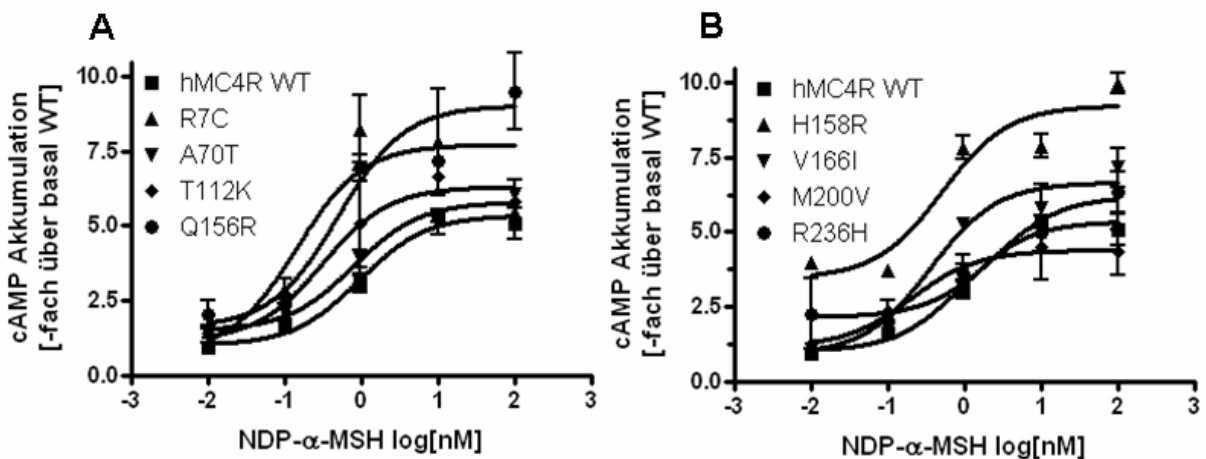


Abbildung 27: cAMP-Akkumulationsassays der in der Normalbevölkerung gefundenen MC4R-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von NDP- α -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 487 bis 4777 cpm.

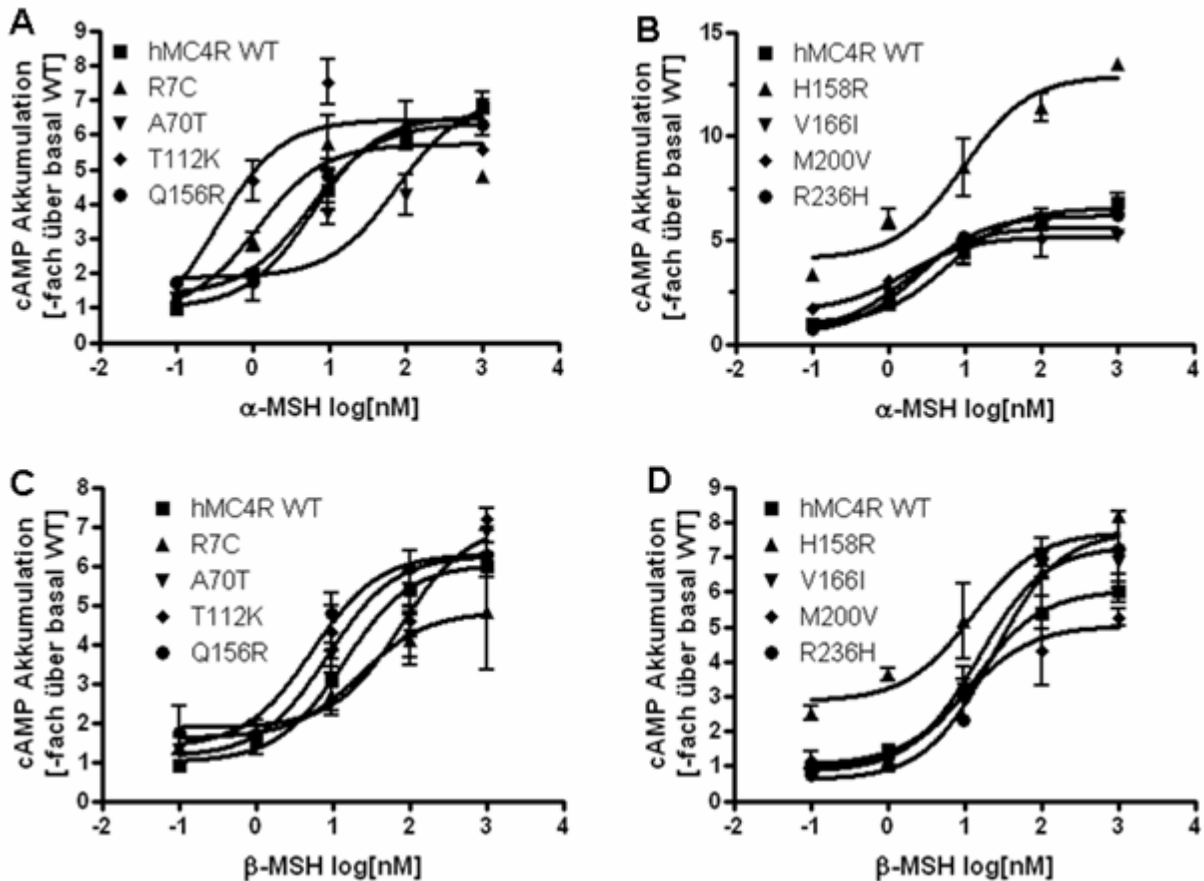


Abbildung 28: cAMP-Akkumulationsassays der in der Normalbevölkerung gefundenen MC4R-Mutanten verglichen mit dem Wildtyp. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH (A und B) bzw. β -MSH (C und D) für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 317 bis 4777 cpm.

Die halbmaximale Ligandenkonzentration ist bei Stimulation mit β -MSH um eine Größenordnung erniedrigt, bei NDP- α -MSH und α -MSH unterscheidet sich die EC_{50} nur wenig von der des WT-Rezeptors (Abb. 27/28 und Tab. 7).

Auch wenn in einzelnen Versuchen kleinere Abweichungen in EC_{50} - und E_{max} -Werten zu beobachten waren, weisen alle anderen Mutationen im Mittel keine großen Unterschiede in der EC_{50} auf, bei den Mutationen T112K, Q156R und M200V kann höchstens eine geringe Erniedrigung der EC_{50} bei Stimulation mit den beiden natürlichen Agonisten α - und β -MSH gemessen werden, was eher für einen leichten konstitutiv aktivierenden Effekt spricht. Dieser Effekt ist aber geringer als eine Größenordnung (ca. 1/7 bei der T112K-Mutante und α -MSH-Stimulation), so dass auch diese Mutationen als Mutationen ohne funktionellen Effekt zu betrachten sind. Auch die V166I-Mutation, die eine um die Hälfte reduzierte Oberflächenexpression zeigt, ist in der maximalen cAMP-Akkumulation unauffällig. Die E_{max} -Werte liegen zwischen 122% der des WT (bei NDP- α -MSH-Stimulation) und 87% (bei α -MSH-Stimulation), somit wird auch diese Mutation wie eine WT-Mutation klassifiziert. Woher die Diskrepanz zwischen den beiden Methoden kommt, ist mit dem hier verwendeten experimentellen Aufbau nicht zu erklären.

Tabelle 7: Funktionelle Charakterisierung der in der Normalbevölkerung gefundenen humanen MC4R Mutationen. EC_{50} , E_{max} und Oberflächenexpression sind als Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens 3 unabhängigen, jeweils in Duplikaten bzw. Hexplikaten (ELISA) durchgeführten Experimenten angegeben.

Konstrukt	cAMP-Akkumulation							Oberflächen- expression [% WT]
	Basal	NDP- α -MSH		α -MSH		β -MSH		
	[-fach basal WT]	E_{max} [% E_{maxWT}]	EC_{50} [nM]	E_{max} [% E_{maxWT}]	EC_{50} [nM]	E_{max} [% E_{maxWT}]	EC_{50} [nM]	
WT	1	100	0,81 \pm 0,33	100	5,1 \pm 2,4	100	16,0 \pm 8,7	100 \pm 9,0
R7C	1,33 \pm 0,53	75 \pm 21	0,14 \pm 0,02	79 \pm 17	1,3 \pm 0,2	83 \pm 18	48,0 \pm 22	100 \pm 8,9
A70T	1,42 \pm 0,52	120 \pm 27	0,4 \pm 0,37	115 \pm 8	1,4 \pm 0,6	103 \pm 20	12,4 \pm 2,1	87 \pm 18,4
T112K	1,72 \pm 0,45	120 \pm 5,8	0,15 \pm 0,05	97 \pm 13	0,7 \pm 0,5	112 \pm 24	6,4 \pm 3,7	77 \pm 8,7
Q156R	1,50 \pm 0,41	79 \pm 17	0,51 \pm 0,2	82 \pm 25	1,0 \pm 0,9	92 \pm 20	9,1 \pm 7,5	113 \pm 12,9
H158R	6,32 \pm 0,69	135 \pm 22	0,3 \pm 0,18	142 \pm 23	2,6 \pm 1,5	122 \pm 15	1,8 \pm 1,1	98 \pm 13,5
V166I	1,2 \pm 0,29	122 \pm 8,6	0,31 \pm 0,07	87 \pm 8,2	3,8 \pm 1,1	105 \pm 20	29 \pm 14	50 \pm 16,0
M200V	1,1 \pm 0,38	78 \pm 9,3	0,23 \pm 0,02	84 \pm 2,7	1,8 \pm 0,9	91 \pm 27	4,3 \pm 3,1	96 \pm 6,0
R236H	1,4 \pm 0,43	105 \pm 10	1,5 \pm 0,28	97 \pm 7,6	3,0 \pm 1,2	96 \pm 21	18 \pm 6,8	105 \pm 24,9

Um den Effekt der MC4R-Mutationen auf das Körpergewicht der Mutationsträger zu untersuchen, wurden die BMI-Werte der Personen mit den Durchschnitts-BMI-Werten verglichen. Anhand von alters- und geschlechtsabhängigen Perzentilen wurde so ein SDS-Wert bestimmt. Wie in Tabelle 8 gezeigt, war von den Mutationsträgern keine Person adipös ($\text{BMI} \geq 30$), und auch keine Person wies einen SDS-Wert über 2 bzw. unter -2 auf.

Tabelle 8: Phänotypische Beschreibung der Mutationsträger. Alter und Body-Mass-Index der Mutationsträger sind angegeben, sowie die BMI Perzentile und der SDS-Wert bezüglich einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrollgruppe. In der letzten Spalte ist der Mutationseffekt auf die Rezeptorfunktion beschrieben.

Mutation	Geschlecht	Alter [Jahre]	BMI	BMI- Perzentile	SDS- Wert	Funktion
R7C	M	65	28,45	55	0,13	wie WT
A70T	M	45	24,88	29	-0,55	wie WT
T112K	F	48	28,48	47	-0,08	wie WT, aber verringerte OF-Expression
Q156R	F	27	29,00	87	1,11	wie WT
H158R	M	45	28,44	60	0,24	konstitutive Aktivität
M200V	M	68	24,30	15	-1,03	wie WT
V166I	F	29	19,02	12	-1,16	wie WT, aber verringerte OF-Expression
R236H	F	67	28,24	48	-0,57	wie WT

Die Trägerin der Q156K-Mutation ist mit einem BMI von 29 zwar übergewichtig, aber noch nicht adipös, die Mutation scheint aber nicht der Grund für das hohe Körpergewicht zu sein, da die Mutation die Funktion des Rezeptorproteins zumindest mit den hier verwendeten Methoden nicht beeinträchtigt. Der Träger der konstitutiv aktiven H158R-Mutation besitzt einen BMI von 28,44, ist definitionsgemäß also übergewichtig, aber noch nicht adipös. Ein alters- und geschlechtsabhängiger Vergleich zeigt, dass der BMI dieser Person auf der 60. BMI-Perzentile liegt und so ein eher durchschnittliches Körpergewicht aufweist. Die V166I-Mutation wurde bei einer weiblichen Person gefunden, deren BMI knapp unter 20 liegt und die somit noch normalgewichtig ist (Untergewicht beginnt bei Erwachsenen definitionsgemäß ab einem $\text{BMI} \leq 18,9$). Funktionell konnte bei dieser Mutation nur eine verringerte Oberflächenexpression nachgewiesen werden.

4.3.3. Analyse der evolutionären Konservierung der humanen MC4R-Mutationen

Die in der Normalbevölkerung gefundenen Aminosäureaustausche wurden mit den in orthologen MC4R gefundenen Aminosäurevarianten verglichen (siehe Abb. 8). Die R7C-Mutation liegt im Aminoterminus des MC4Rs, der generell sehr gering konserviert ist. Ein Cystein an genau dieser Position existiert in keinem der orthologen Rezeptoren, Nager besitzen an dieser Position ein Glutamin, Schweine und Elefanten ein Histidin und verschiedene Fugu-Spezies ein Prolin. Das Alanin an Position 70 ist ebenso wenig konserviert, in MC4Rs von Fischen findet man an dieser Position

Isoleucin und Valin. Ein Threonin kommt bei den Orthologen nicht vor. Die T112K-Mutation liegt in der zwischen Säugern und Fischen sehr heterologen ersten extrazellulären Schleife, in der es viele Variationen gibt. Den Austausch von Glutamin zu Arginin an Position 156 findet man bei einigen Fischen wieder, wohingegen das Histidin zwei Aminosäuren weiter an Position 158 zu 100% konserviert ist. An der Position des Valins 166 findet man beim Heilbutt ein Glycin. Den Austausch von Methionin zu Valin an Position 200 in TM 5 findet man bei vielen Säugern wieder, z.B. beim Minkwal, beim Flusspferd oder bei Fledermäusen. Auch den Austausch von Arginin zu Histidin an Position 236 in der dritten intrazellulären Schleife findet man z.B. beim Klippschliefer, in der Fledermaus (*Rhogessa io*) und beim Heilbutt.

4.3.4. Untersuchung der Wirkung von AgRP auf die konstitutiv aktive H158R-Mutante

Da Aktivierung des MC4R eine anorexigene Antwort bewirkt und Funktionsverlustmutationen einen adipösen Phänotyp nach sich ziehen, wäre es logisch, dass eine konstitutiv aktivierende Mutation, die hohe cAMP-Spiegel in einem hypothalamischen Neuron erzeugt, das Gegenteil bewirkt und somit einen dünnen, anorektischen Phänotyp bei einem Mutationsträger verursacht.

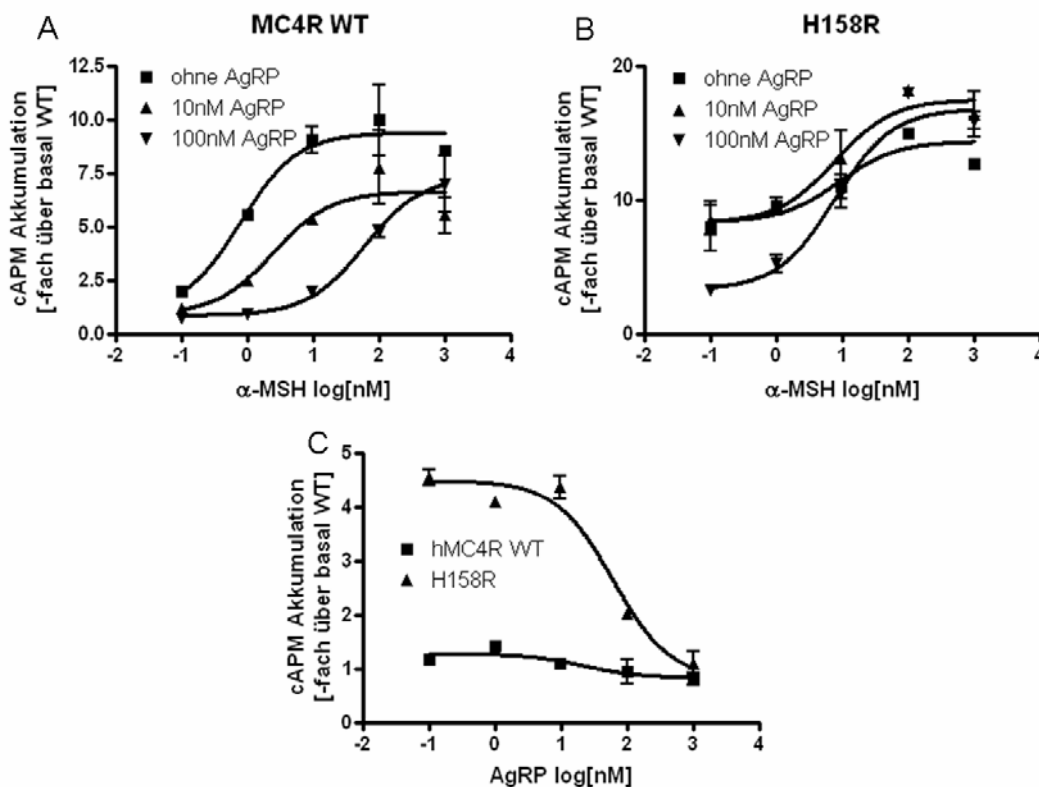


Abbildung 29: Antagonismus von AgRP(87-132) am MC4R-WT (A) und H158R (B) Konstrukten bei α -MSH-Stimulation und inverser Agonismus von AgRP allein. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden α -MSH und konstanten AgRP(87-132)-Konzentrationen für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafik repräsentiert ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 130 bis 5345 cpm

Die bisher einzige gefundene aktivierende MC4R-Mutation wurde jedoch paradoxerweise in einer extrem adipösen französischen Patientin gefunden und führt zu einem Austausch von Leucin zu Glutamin (L250Q) am intrazellulären Ende der sechsten Transmembrandomäne (Vaisse et al., 2000). Allerdings konnte an diesem Rezeptor noch der endogene inverse Antagonist AgRP wirken und die Basalaktivität dosisabhängig verringern. Dieser Mechanismus soll hier auch für die in einem Probanden mit normalem BMI gefundene H158R-Mutation untersucht werden. In mit Rezeptorkonstrukten transient transfizierten COS-7-Zellen kann eine dosisabhängige Verringerung der basalen cAMP-Produktion sowohl beim Wildtyp als auch bei der konstitutiv aktiven Mutante gezeigt werden (Abb. 29C). Außerdem wurde der antagonistische Effekt von AgRP auf die α -MSH abhängige cAMP-Akkumulation an WT und H158R untersucht. Dazu wurden transient transfizierte Zellen je mit variablen Konzentrationen von α -MSH in Gegenwart einer konstanten Konzentration AgRP(81-132) stimuliert. Hierbei zeigte sich am WT-Konstrukt bei steigenden AgRP-Konzentrationen eine Absenkung der Basalaktivität und der E_{max} sowie eine Verschiebung der EC_{50} zu höheren Konzentrationen (Abb. 29A und Tab. 9). So erhöht sich die EC_{50} bei α -MSH in Gegenwart von 100 μ M um 2 Größenordnungen verglichen mit der EC_{50} von α -MSH allein. Bei der Mutante ist die EC_{50} von AgRP zwar um ein Fünffaches höher als am WT-MC4R, allerdings ist hierbei zu beachten, dass bei letzterem die Basalaktivität sehr gering und somit die Genauigkeit der EC_{50} -Bestimmung gering ist. Im Unterschied zum MC4R-WT ist die EC_{50} von α -MSH unabhängig von der AgRP-Konzentration (Abb 29B und Tab. 9). Das bedeutet, dass AgRP seinen inversen Agonismus an der H158R-Mutante wie beim WT-MC4R ausübt, die antagonistische Wirkung als Kompetitor von α -MSH jedoch verliert.

Tabelle 9: EC_{50} -Werte von AgRP als inverser Agonist und von α -MSH in Gegenwart verschiedener AgRP-Konzentrationen. Transient transfizierte Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH bzw. AgRP stimuliert. Die halbmaximale Ligandenkonzentration wurde mittels der GraphPadPrism Software berechnet. Die Tabelle gibt Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten an.

Liganden	EC_{50} [nM]	
	WT	H158R
AgRP(81-132)	14,0 \pm 10,0	52,5 \pm 27,1
α -MSH	1,1 \pm 0,5	6,1 \pm 4,5
α -MSH+10 μ M AgRP	4,0 \pm 1,2	6,8 \pm 2,4
α -MSH+100 μ M AgRP	109,5 \pm 54,6	8,8 \pm 0,8

Zur weiteren Untersuchung des Mechanismus der H158R Mutation wurde durch ortsgerichtete Mutagenese das Histidin an Position 158 durch ein Alanin ersetzt. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob die Daueraktivierung der H158R-Mutante durch das Fehlen des Histidins oder durch das Vorhandensein des Arginins verursacht wird. Es zeigte sich in cAMP-Akkumulationsassays eine vergleichbar hohe Basalaktivität der H158A-Mutante verglichen mit der H158R (Abb 30). Daraus lässt sich schließen, dass das Histidin in der zweiten intrazellulären Schleife wichtig für die Aufrechterhaltung des inaktiven Zustandes des MC4R ist. Das Histidin ist nicht nur in den orthologen MC4R vollständig konserviert, sondern auch in allen der fünf humanen Melanocortinrezeptoren

vorhanden, was auf eine wichtige Rolle nicht nur im MC4R sondern auch in den übrigen Melanocortinrezeptoren hindeutet.

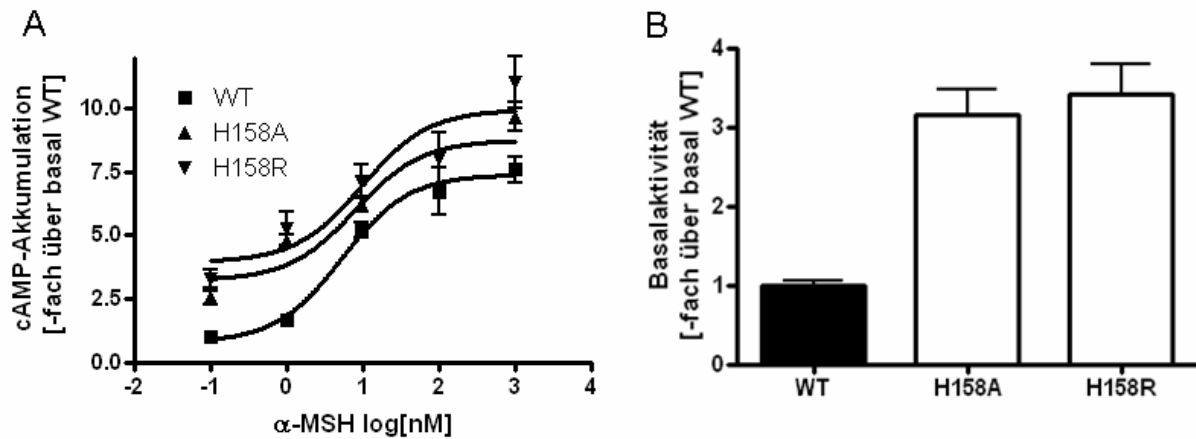


Abbildung 30: Vergleich der Signaltransduktionseigenschaften der H158A-Mutation mit dem WT und der H158R-Mutation: 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden α -MSH-Konzentrationen für 45 Minuten stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration immunologisch mittels Alpha-Screen-Technologie bestimmt. Die Konzentrationen wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. (A) Die Grafik repräsentiert ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen cAMP-Konzentrationen reichten von bis 23 bis 330 nM (B) Vergleich der basalen cAMP-Akkumulation des WT-MC4R und den H158A/R-Konstrukten. Die Grafik zeigt Mittelwerte \pm SEM.

4.4. Funktionelle Charakterisierung von Serinpunktmutationen in der dritten Transmembrandomäne des humanen Melanocortin-4-Rezeptors

In MC4R-Mutationsscreenings bei adipösen Patienten wurde die heterozygote Mutation S136F und als compound heterozygote Mutationen auf verschiedenen Allelen die Aminosäureaustausche S127L und S139R identifiziert (für genauere Patientenbeschreibungen und Stammbäume siehe Abb. A3 und A4 im Anhang). Während es sich bei der S136F- und der S139R-Mutation um neue, bisher noch nicht beschriebene Mutationen handelt, war die S127L-Mutation schon bekannt, die bisher entweder als heterozygote bzw. als compound heterozygote Mutation mit der R165W gefunden wurde (Valli-Jaakola et al., 2004; Hinney et al., 2003; Lubrano-Barthellier et al., 2003). Alle diese Mutationen liegen in der dritten Transmembrandomäne des MC4R und sind evolutionär zu 100% konserviert (siehe 4.1). In dieser Arbeit sollte eine Charakterisierung der neu gefundenen Mutationen erfolgen. Da kürzlich die Homodimerisierung des MC4R gezeigt werden konnte (Biebermann et al., 2003), sollten außerdem die Signaltransduktioneigenschaften von kotransfizierten MC4R-Konstrukten untersucht werden (S136F+WT bzw. S127L+S139R), um die Situation im Patienten nachzustellen. Zunächst zeigte sich im Oberflächen-ELISA eine leicht aber nicht signifikant verringerte Oberflächenexpression der S136F-Mutante. Die S127L-Mutante war zu 1/4 weniger an der Oberfläche exprimiert, wohingegen die Oberflächenexpression der S139R stark reduziert war (Abb. 31A). Bindungsexperimente mit ^{125}I markiertem NDP- α -MSH bestätigten diese Ergebnisse (Abb. 31B). Die cAMP-Akkumulationsassays ergaben einen vollkommenen Verlust der Signaltransduktion der S136F-Mutante nach Stimulation mit NDP- α -MSH, α -MSH und β -MSH (Abb. 32A/B und Tab. 10).

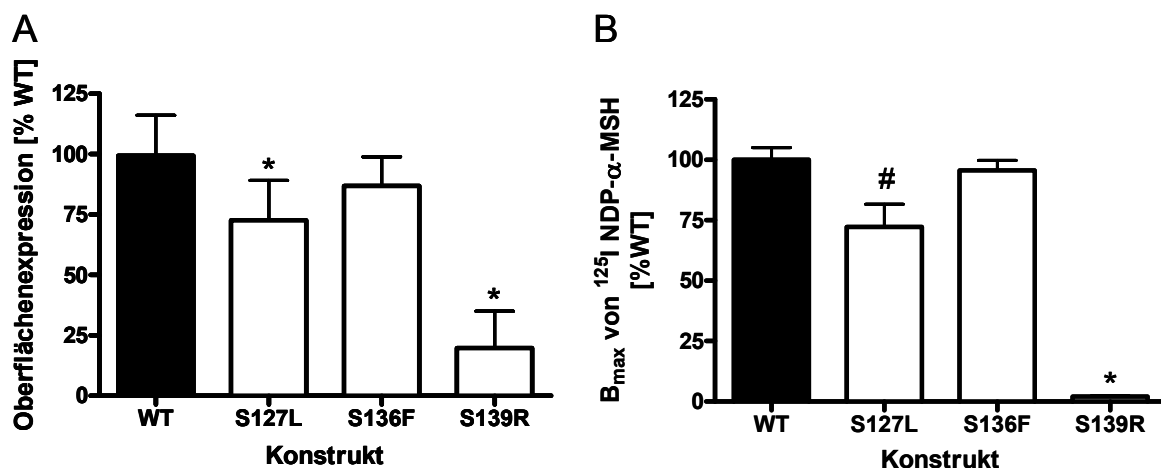


Abbildung 31: Zelloberflächenexpression und Ligandenbindung von hMC4R-Konstrukten verglichen mit hMC4R-WT. (A) Aminoterminal HA-getaggte Rezeptorkonstrukte wurden 48h nach Transfektion in COS-7-Zellen formaldehydfixiert und mit einem Anti-HA-Biotin-Antikörperkonjugat und Streptavidin-POD detektiert. Peroxidaseaktivität wurde photometrisch gemessen, die OD einer GFP-transfizierten Kontrolle wurde abgezogen. Die Werte wurden dann auf die OD des WT-MC4R bezogen. (B) 48h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit ^{125}I -NDP- α -MSH inkubiert, gewaschen und mit 0,1M NaOH lysiert. Die Lysate wurden dann im γ -Counter gemessen. Die Grafiken zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen drei unabhängiger Experimente, von denen jedes in Quadrupletts bzw in Dupletts durchgeführt wurde. Die gemessenen OD-Werte lagen zwischen 0,44 für GFP und 1,24 für hMC4R-WT, die gemessenen cpm zwischen 35801 für hMC4R WT und 425 für das S136F-Konstrukt. *: $p < 0,001$; #: $p < 0,01$ bei One-Way-ANOVA mit anschließendem Tukey-Test verglichen mit dem WT-MC4R.

Es handelt sich bei dieser Mutante also um einen an der Oberfläche lokalisierten, den Liganden bindenden Rezeptor, der das G-Protein zur intrazellulären Signalweiterleitung nicht aktivieren kann. Die S139R-Mutation konnte durch diese Liganden auch nicht stimuliert werden, was mit der stark reduzierten Oberflächenexpression begründet werden kann. Wie schon in den oben genannten Veröffentlichungen gezeigt wurde, weist die S127L-Mutation eine leicht zu höheren Konzentrationen verschobene EC_{50} bei einer etwa verdoppelten Basalaktivität auf (Tab. 10). In Kotransfektionsexperimenten wurden gleiche Mengen hMC4R-WT und S136F-bzw. S127L- und S139R-Vektor transfiziert (je 1,5 μ g/12-well-Platte). Als Kontrolle wurde ein Membranprotein, der Schilddrüsenhormontransporter MCT8, mit dem hMC4R-WT kotransfiziert. Dabei wurde die Menge der transfizierten Gesamt-DNA beibehalten (3 μ g/12-well-Platte). Verglichen mit der Dosis-Wirkungs-Kurve des allein transfizierten hMC4R-WT zeigte sich eine bei der MC4R/MCT8 Kotransfektion nur eine leichte Verringerung der Maximalstimulation, die EC_{50} blieb bei NDP- α -MSH und α -MSH unverändert und verdoppelte sich bei β -MSH-Stimulation. Bei Kotransfektion von hMC4R-WT und dem S136F-Konstrukt verringerte sich die E_{max} in gleichem Maße, zusätzlich verdoppelte sich die EC_{50} nach Stimulation mit den natürlichen Liganden α - und NDP- α -MSH (Abb. 32A/B und Tab. 10). Bei Stimulation mit β -MSH war eine Erhöhung der EC_{50} um das Vierzehnfache zu beobachten.

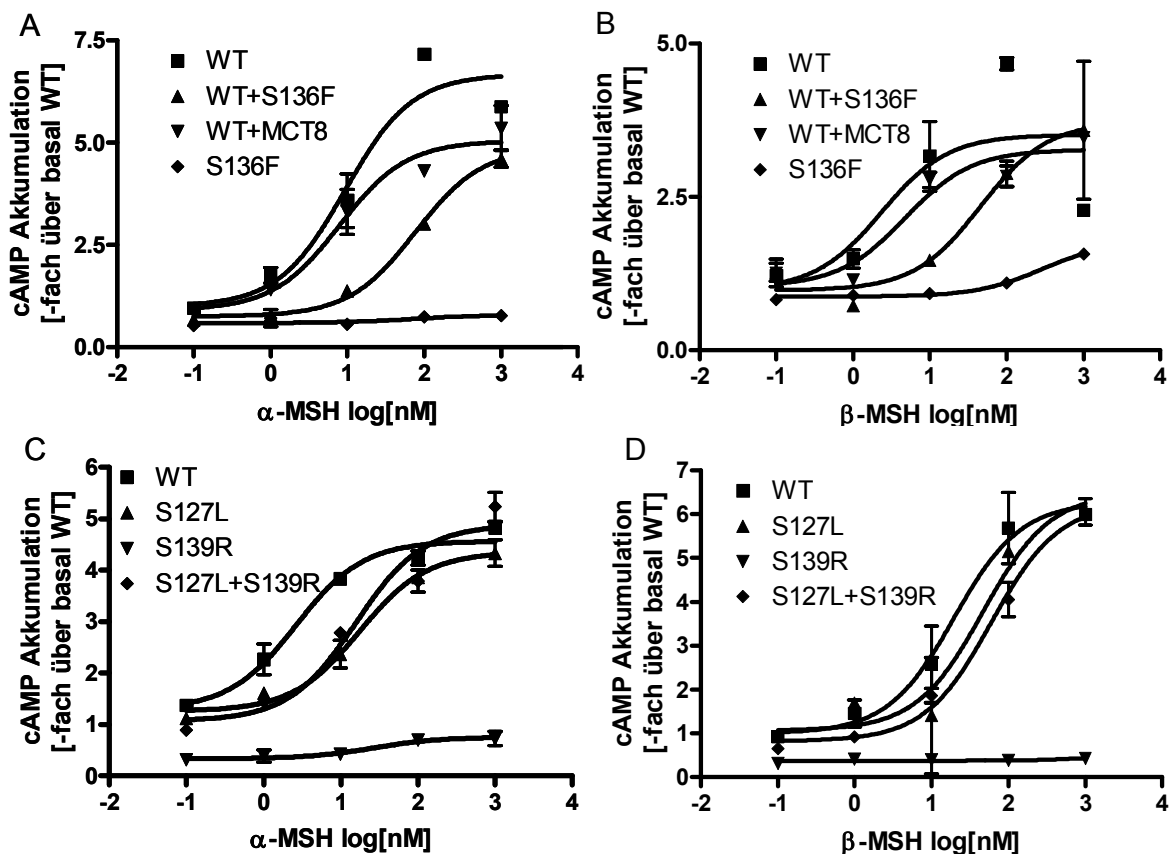


Abbildung 32: cAMP-Akkumulationsassays der einzelnen oder kotransfizierten MC4R-Serinmutanten. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von α -MSH (A und C) bzw. β -MSH (B und D) für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. Die Grafiken repräsentieren ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen Werte reichten von 186 bis 6241 cpm.

Die statistische Auswertung ergab für die β -MSH-Stimulationen einen signifikanten Unterschied der EC_{50} der WT/S136F-Koexpression verglichen mit dem einzeln transfizierten WT-MC4R und der WT/MCT8-Koexpression. Die Koexpression der S127L- und der S139R-Mutanten ergab, verglichen mit dem einzeln transfizierten S127L-MC4R, nur bei β -MSH-Stimulation eine Verdopplung der EC_{50} , während bei α -MSH-Stimulation kein Unterschied bemerkbar war (Abb. 32 C/D und Tab. 10). Der dominant-negative Effekt des S136F-Rezeptors auf den WT könnte durch Bildung eines Heterodimers hervorgerufen werden. Um zu untersuchen ob der WT-MC4R in der Lage ist mit der S136F-Mutante ein Dimer zu bilden, wurden Sandwich-ELISAs durchgeführt.

Hierbei wurden differentiell carboxyterminal FLAG und aminoterminal HA markierte Rezeptorkonstrukte in COS-7-Zellen kotransfiziert. Membranlysate werden dann an eine mit Anti-FLAG-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte gebunden und der HA-Tag immunochemisch detektiert (Abb. 34).

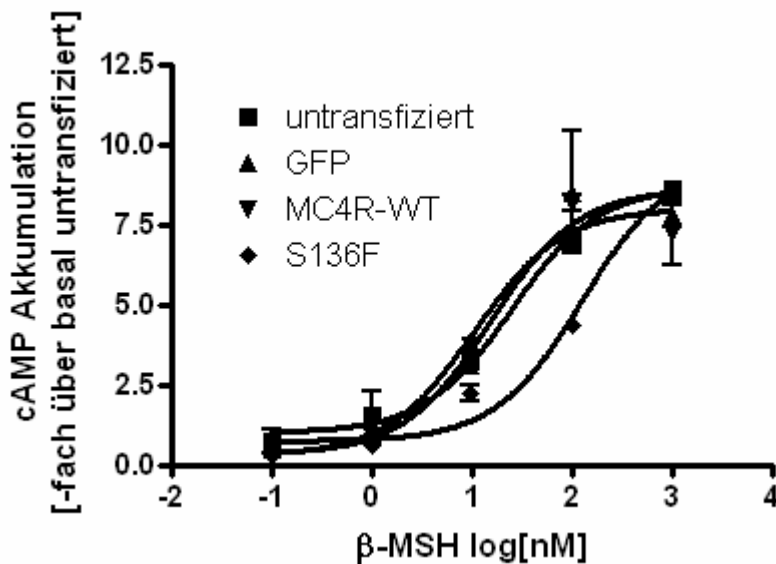


Abbildung 33: cAMP-Akkumulationsassay von mit MC4R-Konstrukten kotransfizierten stabilen CHO-hMC4R-WT-Zellen. Stabil mit hMC4R-WT transfizierte CHO-Zellen wurden mit GFP- MC4R-WT-Vektor oder der S136F-Mutante transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden Konzentrationen von β -MSH für 45 Minuten stimuliert. Tritiummarkiertes cAMP wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und im β -Counter quantifiziert. Die gemessenen cpm wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert und reichten von 111,6 bis 2787,4 cpm. Die EC_{50} betrug 25,3 nM für die untransfizierten, 15,6 für die mit MC4R-WT, 10,7 für die mit GFP und 126,8 für die mit der S136F Mutante transfizierten CHO-MC4R-WT Zellen.

Verglichen mit den einzeln transfizierten Konstrukten konnten so WT/WT-Dimere und WT/S136F-Dimere detektiert werden. Als weitere Negativkontrolle diente die Kotransfektion des MC4R-FLAG mit einem MCT8-HA-Konstrukt und als Positivkontrolle der doppelt markierte (N-HA und C-FLAG) hMC4R.

Exemplarisch wurden stabil transfizierte CHO-Zellen mit MC4R-WT oder GFP als Negativkontrollen und gleichzeitiger Transfektionskontrolle und mit dem S136F-Konstrukt transfiziert und mit β -MSH stimuliert. Auch bei diesem Experiment ließ sich eine Verschiebung der EC_{50} um das 10-12-fache beobachten (Abb. 33). Bei diesem Versuchsaufbau ist allerdings zu beachten, dass die Verhältnisse des stabil transfizierten MC4R-WT und dem zutransfizierten Konstrukt ungewiss sind.

Tabelle 10: Funktionelle Charakterisierung der Serinmutanten des humanen MC4R. Die in der Tabelle angegebenen Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten dar, von denen jedes in Duplikaten durchgeführt wurde. *: nicht bestimmbar wegen zu geringer E_{max} ; /: nicht bestimmt.

	NDP- α -MSH			α -MSH		β -MSH		Oberflächen- expression [%WT]
	Basal [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	EC ₅₀ [nM]	E _{max} [%WT]	
MC4R WT	100	0,59 \pm 0,04	100	5,67 \pm 3,00	100	6,21 \pm 4,35	100	99,4 \pm 16,7
S136F	/	*	14 \pm 1	*	18 \pm 1	*	23 \pm 2	86,8 \pm 12,1
S127L	174 \pm 22	0,79 \pm 0,87	121 \pm 19	17,8 \pm 11,5	103 \pm 15	25,6 \pm 14,5	108 \pm 9	72,5 \pm 16,6
S139R	57 \pm 36	*	7 \pm 2	*	19 \pm 4	*	15 \pm 13	19,7 \pm 15,3
WT+S136F	/	2,13 \pm 1,04	77 \pm 11	13,37 \pm 6,93	76 \pm 8	92,0 \pm 51,6	109 \pm 26	/
WT+MCT8	/	0,44 \pm 0,08	87 \pm 21	5,29 \pm 2,51	80 \pm 5	16,5 \pm 11,0	92 \pm 4	/
S127L+S139R	92 \pm 16	0,47 \pm 0,1	112,7 \pm 2	11,2 \pm 3,8	108 \pm 7	51,1 \pm 8,3	98 \pm 3	/

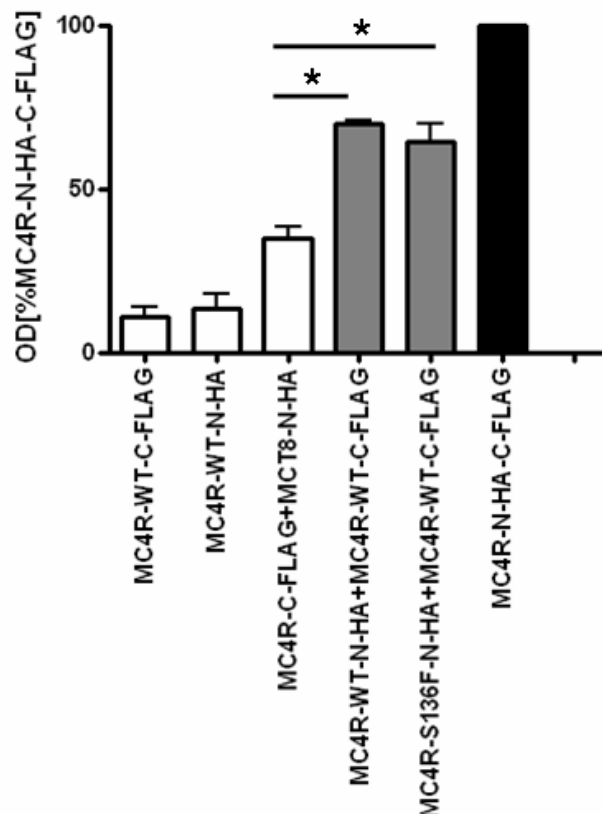


Abbildung 34: Sandwich ELISA zum Nachweis von Dimerisierung von MC4R-WT und MC4R-S136F. Einzeln oder kotransfizierte COS-7-Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet und die Membranproteine aufgereinigt. FLAG-markierte Membranproteine wurden auf einer Anti-FLAG-Antikörper beschichteten Platte gebunden, HA-markierte Proteine mittels ELISA gegen den HA-Tag nachgewiesen. Als weiße Balken sind die Negativkontrollen, als schwarzer Balken der als Positivkontrolle dienende doppelt markierte MC4R dargestellt. *: $p < 0,05$; One-Way ANOVA und anschließender Tukey Test)

Um den Mechanismus weiter zu untersuchen, wie der Austausch von S¹³⁹ zu Arginin zu einem so dramatischen Funktionsverlust führt, wurde diese Position durch ortsgerichtete Mutagenese zu einem hydrophoben Isoleucin substituiert. Ein am Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie (FMP) generiertes Computermodell des MC4Rs suggeriert, dass das Arginin eine neue Interaktion mit I¹⁷⁰ in TM4 eingehen könnte (siehe Diskussion). Die Untersuchung der Signaltransduktion ergab, dass die S139I-Mutante im Gegensatz zur S139R-Mutante zu etwa 50% des WT-MC4R durch α -MSH stimulierbar ist. Substitution von S139 durch Isoleucin bewirkt also nur einen partiellen Funktionsverlust.

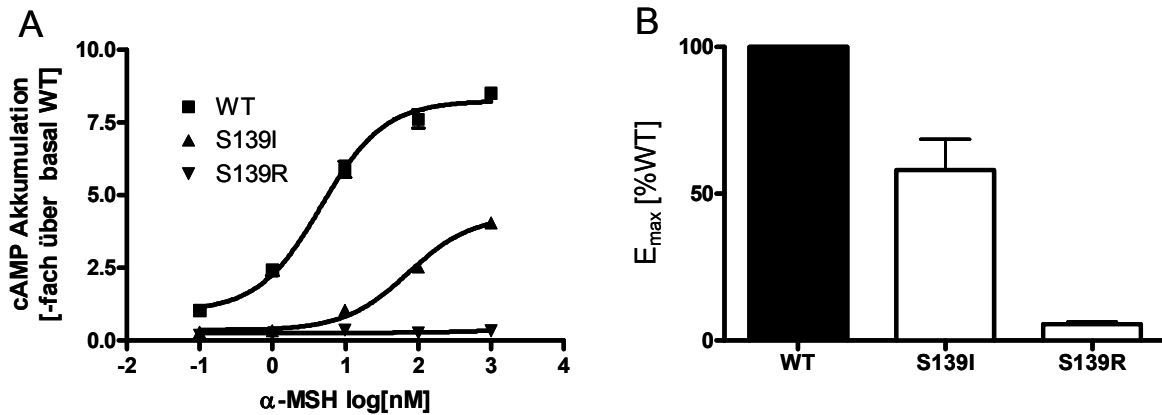


Abbildung 35: Vergleich der Signaltransduktionseigenschaften der S139R-Mutation mit dem WT und der S139I-Mutation: 48 Stunden nach Transfektion wurden die rezeptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden α -MSH-Konzentrationen für 45 Minuten stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration immunologisch mittels Alpha-Screen-Technologie bestimmt. Die Konzentrationen wurden mit dem Basalwert des WT normalisiert. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt und je dreimal wiederholt. (A) Die Grafik repräsentiert ein charakteristisches Experiment. Die gemessenen cAMP-Konzentrationen reichten von 18 bis 177 nM. (B) Die aus drei Experimenten gemittelten EC_{50} Werte \pm Standardabweichung betragen für den WT: $4,5 \pm 1,1$ nM und für die S139I-Mutante $76 \pm 28,5$ nM. Die aus drei Experimenten gemittelten E_{max} -Werte sind gezeigt.

4.5. Identifikation des bevorzugten Start-ATGs des humanen MC3R

Zwei Polymorphismen des humanen MC3Rs (T6K und V81I) wurden in Assoziationsstudien mit Übergewicht und Adipositas im Kindesalter assoziiert. Keine der beiden Mutationen verursacht dramatische Effekte auf die Signaltransduktion. Liegen beide Mutationen auf einem Allel, konnte eine geringe Erniedrigung der Maximalstimulation gezeigt werden (Feng et al., 2005). Eine ligandenunabhängige Bestimmung der Oberflächenexpression wurde bisher nicht durchgeführt. Es wurde die codierende DNA des humanen MC3R in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDps hinter einen aminoterminalen HA-Tag kloniert (schwarz in Abb. 36). Dann wurden Zelloberflächen-ELISAs gegen den HA-Tag durchgeführt. Hierbei zeigte sich verglichen mit dem humanen MC4R als Kontrollkonstrukt nur eine extrem geringe Oberflächenexpression (Abb. 37). Wie am Anfang des Ergebnisteils gezeigt wurde, konnte auch der murine MC3R problemlos an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Bei einem Alignment von orthologen MC3-Rezeptoren fällt auf, dass bis auf den Menschen und seinen nächsten Verwandten, den Schimpansen, das Start-ATG fehlt und ein weiter 3' gelegenes ATG zur Translationsinitiation benutzt wird (Abb. 38).

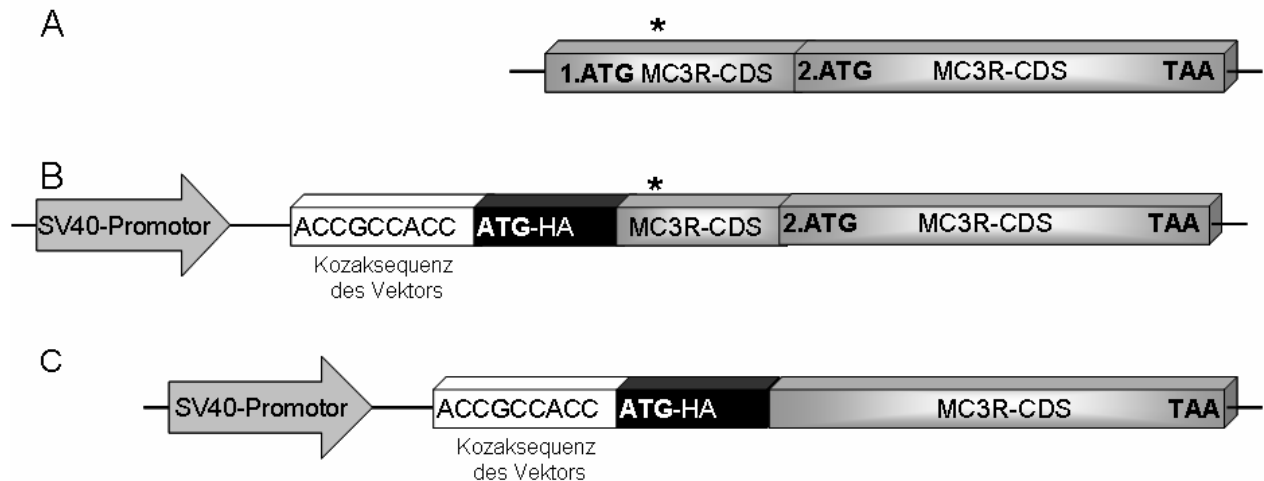


Abbildung 36: Schematische Darstellung der hMC3R-NHA Konstrukte. Dargestellt ist der nicht maßstabsgetreue Aufbau der klonierten Vektorkonstrukte pcDps-hMC3R-N-HA-1.ATG (B) und pcDps-hMC3R-N-HA-2.ATG (C) im Vergleich zur genomischen Sequenz (A). Der Stern kennzeichnet die relative Position der T6K-Mutation. Als Pfeil ist der SV40-Promotor des Vektors, als weiße Box die Kozaksequenz des Vektors, als schwarze Box der HA-Tag und als graue Box die codierende MC3R-Sequenz dargestellt.

Dieses ATG findet sich auch in *Homo sapiens* und *Pan troglodytes* und soll im Weiteren als 2. ATG bezeichnet werden. Interessant ist hierbei, dass die T6K-Mutation zwischen den beiden ATGs liegt und dass das Lysin, die in der Datenbank angegebene Aminosäure, an dieser Position beim Schimpansen-MC3R gefunden wurde. Zur weiteren Untersuchung wurde der HA-Tag nun direkt an die Stelle des zweiten ATGs kloniert (Abb 36C). Im Oberflächen-ELISA zeigte sich eine schwache Expression für das Konstrukt, das am 1.ATG beginnt und stärkere Expression für das Konstrukt, das mit dem 2.ATG beginnt (Abb. 37). Die Oberflächenexpression des 2.ATG-WT-Konstrukts ist nun mit der des hMC4R vergleichbar ($p > 0,05$ mit One-Way ANOVA und anschließendem Tukey-Test). Es muss allerdings auch beim 1.ATG-Konstrukt Rezeptorprotein translatiert werden, da in cAMP-Akkumulationsexperimenten das 1.ATG-Konstrukt genau so gut mit α -MSH stimulierbar ist, wie das

2.ATG-Konstrukt (Abb. 39). Diese Daten deuten darauf hin, dass zumindest in diesem *in vitro* Zellsystem bei Transfektion des 1.ATG-Vektors das ATG des Tags trotz der starken Kozaksequenz des Vektors überlesen und das 2.ATG als Translationsstart präferiert wird.

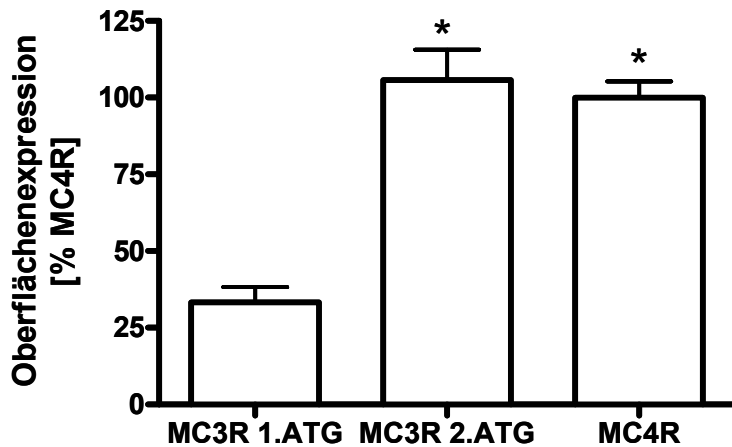


Abbildung 37: Zelloberflächenexpression von hMC3R-Konstrukten verglichen mit dem hMC4R. Aminoterminale HA-getaggte-Rezeptorkonstrukte wurden 48h nach Transfektion in COS-7-Zellen formaldehydfixiert und mit einem Anti-HA-Biotin-Antikörperkonjugat und Streptavidin-POD detektiert. Peroxidaseaktivität wurde photometrisch gemessen, die OD einer GFP-transfizierten Kontrolle wurde abgezogen. Die Werte wurden dann auf die gemittelte OD des MC4R bezogen. Die Grafik zeigt Mittelwerte und SEM drei unabhängiger Experimente, von denen jedes in Quadrupletts durchgeführt wurde. Die gemessenen OD-Werte lagen zwischen 0,16 für GFP und 1,185 für MC3R 2.ATG. *: signifikanter Unterschied zum MC3R 1.ATG ($p < 0,001$ mit one-way ANOVA und Tukey-Post-hoc-Test).

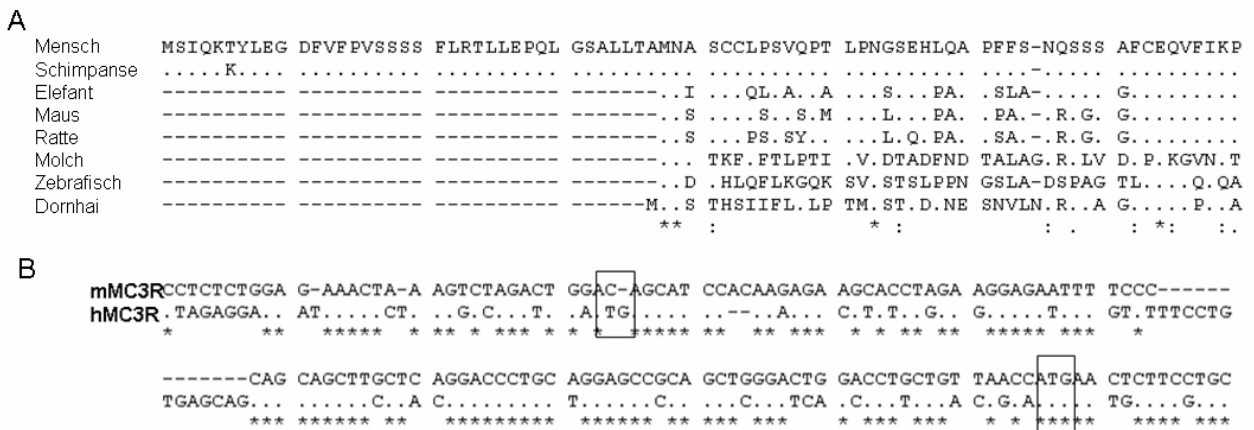


Abbildung 38: Alignment von orthologen MC3R-Sequenzen im Bereich der putativen Start-ATGs auf (A) Protein- und (B) DNA-Ebene. Identische Aminosäuren bzw. Basen der Orthologen sind in der humanen Sequenz als Punkte und darunter als Sterne dargestellt. Fehlende Aminosäuren bzw. Basen sind durch Striche gekennzeichnet. Die beiden Start-ATGs des humanen und des murinen MC3Rs sind durch Kästchen markiert. Das Alignment wurde mit der GENTle-Software erstellt und es wurde ein Clustal-W-Algorithmus verwendet. Die Sequenzen wurden der NCBI-Nukleotiddatenbank entnommen.

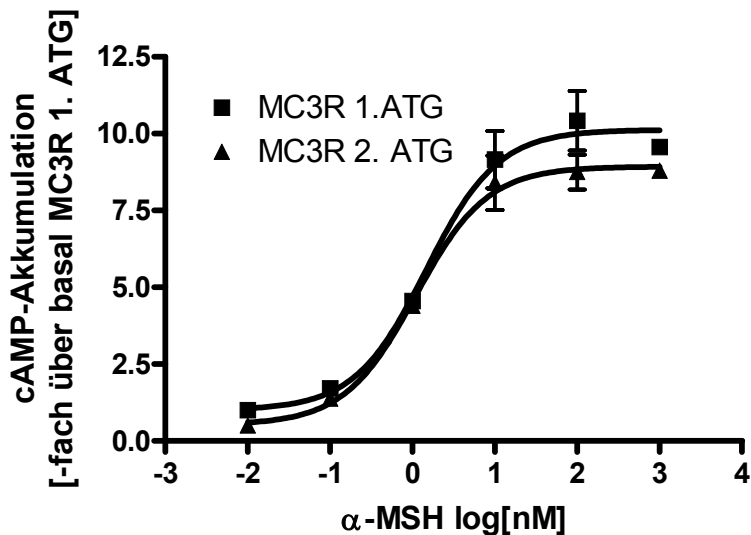


Abbildung 39: Vergleich der Signaltransduktionseigenschaften der humanen vom 1. bzw. 2. ATG klonierten MC3R. 48 Stunden nach Transfektion wurden die receptorexprimierenden COS-7-Zellen mit dekadisch aufsteigenden α -MSH für 45 Minuten stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration immunologisch mittels Alpha-Screen-Technologie bestimmt. Die Konzentrationen wurden mit dem Basalwert des MC3R-1.ATG-Konstruktes normalisiert. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Die Grafik repräsentiert ein charakteristisches Experiment.

Eine andere Erklärung wäre das posttranslationale Abspalten eines kurzen aminoterminalen Fragments vor dem 2. Methionin, wodurch der aminoterminalen HA-Tag vom Rezeptorprotein abgetrennt werden würde.

Um zu untersuchen, welches der beiden Codons des humanen MC3R bevorzugt zur Translationsinitiation benutzt wird, wurde ein Fragment beginnend 90 Basen vor dem ersten ATG bis 90 Basen nach dem zweiten ATG in den pcDps-Vektor unter Berücksichtigung des Leserahmens vor eine GFP-cDNA kloniert. Das Start-ATG des GFPs war in diesem Vektor deletiert. Somit entstand ein Konstrukt beginnend von der 5'-UTR bis zum Ende des Aminoterminus des hMC3R, bei dem beide Start-Codons des MC3R in ihrer natürlichen Umgebung lagen. Nach Transfektion in COS-7-Zellen konnte so die Effizienz der Translation durch Messung der durch das GFP erzeugten Fluoreszenz bestimmt werden. In weiteren ortsgerichteten Mutageneseschritten wurden die Start-Codons zu TTG-Codons mutiert, so dass neben dem WT-Konstrukt (ATG/ATG) auch Konstrukte ohne das erste (TTG/ATG) bzw. ohne das zweite (ATG/TTG) oder ganz ohne Startcodons (TTG/TTG) entstanden (Abb. 40A). Als Kontrollen wurde der Vektor mit nur der GFP-cDNA ohne ATG (Leervektor) und der Vektor pEGFP verwendet. Die Messung ergab eine ca. 3-fach höhere Fluoreszenz des Vektors mit dem klonierten MC3R-Fragment verglichen mit dem Leervektor (Abb. 40B; One-Way ANOVA mit Tukey's Post Hoc Test $p < 0,001$). Wurde das erste ATG zu einem TTG mutiert, verursachte das keinen Unterschied verglichen mit dem Konstrukt mit beiden ATG-Codons ($p > 0,05$).

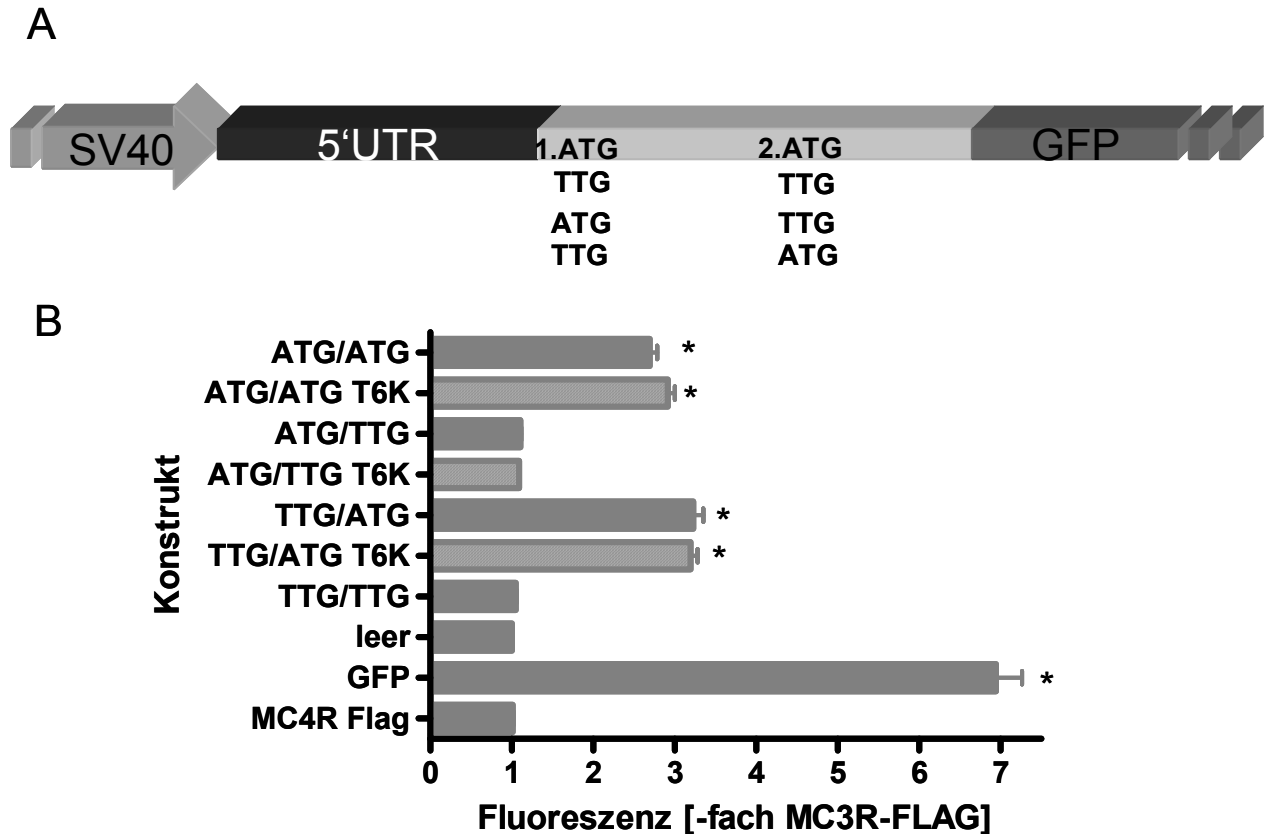


Abbildung 40: Identifizierung des bevorzugten Start-ATGs des humanen MC3-Rezeptors. (A) Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte: Nach dem SV40-Promotor folgt die 5'-UTR des MC3R gefolgt von einem aminoterminalen Fragment der codierenden MC3R-Sequenz, die ein Fusionsprotein mit dem 3' gelegenen GFP bildet. Desweiteren wurden Konstrukte mit jeweils einem oder keinem Startcodon hergestellt. (B) Gemessene Fluoreszenz als Messgröße für die Translationseffizienz. 48 nach Transfektion in COS-7 Zellen wurden die Zellen chemisch lysiert und die GFP-Fluoreszenz photometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes in Quadrupletts durchgeführt wurde. Die einzelnen Messwerte wurden mittels Division durch den Wert des Leervektors normalisiert und lagen im Bereich von 76 bis 720. *: Signifikanter Unterschied zum TTG/TTG Konstrukt ($p < 0,001$ bei One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test).

Das Konstrukt ohne das zweite ATG (ATG/TTG) verursachte genauso wenig eine Translation des GFPs wie das Konstrukt in dem beide ATGs (TTG/TTG) fehlten und verhielt sich wie der Leervektor ($p > 0,05$). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass es sich bei dem zweiten Start-ATG des MC3-Rezeptors um das Bevorzugte handelt. Das erste Startcodon wird dabei überlesen und führt nicht zur Translationsinitiation. Desweiteren wurde die T6K-Variante auf die Translationsinitiation untersucht. Dazu wurde das zu dem Aminosäureaustausch führende Cytosin zu Adenin ausgetauscht (ACG \rightarrow AAG). Dieser Austausch führte in keinem der Konstrukte (ATG/ATG; ATG/TTG; TTG/ATG) zu einer Veränderung der Translationseffizienz. Der Vergleich der T mit der K Variante ergab für keines der Konstrukte eine Signifikanz ($p > 0,05$ bei One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test). Der T6K-Polymorphismus liegt vor dem zweiten und eigentlichen Start-ATG und somit nicht mehr im proteinogenen Bereich. Auch auf die Translationseffizienz oder die Wahl des ATGs des Translationstartes hat er in dem hier verwendeten *in vitro* System keinen Einfluss.

4.6. Identifikation eines Protein-Protein-Interaktionspartners von TrkB

4.6.1. Hefe-2-Hybrid-Screen von TrkB- und MC4R-Fragmenten gegen Gehirnproteine

In einem Hefe-2-Hybrid (Y2H)-Screen sollte nach neuen Interaktionspartnern zweier in der hypothalamischen Appetitregulation beteiligter Rezeptoren, dem G-Protein gekoppelte MC4-Rezeptor und der Rezeptortyrosinkinase TrkB, gesucht werden. Der Y2H-Screen basiert auf Koexpression des zu untersuchenden mit der LexA-DNA-Bindungsdomäne fusionierten Baitproteins mit potentiellen mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusionierten Prey-Proteinen. Bei einer Interaktion von Bait und Prey Protein wird die Transkription eines Reportergens aktiviert.

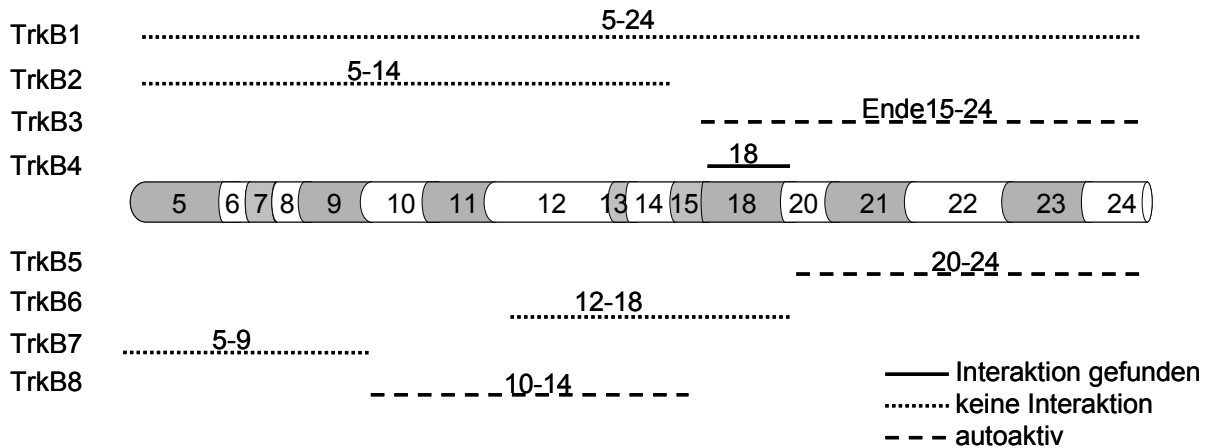


Abbildung 41: schematische Abbildung der im Hefe-2-Hybrid eingesetzten TrkB-Fragmente. Die Fragmente sind als Linien über und unter der schematischen Exonstruktur des TrkB Proteins dargestellt. Eine gepunktete Linie bedeutet, dass keine Interaktion gefunden wurde, gestrichelte Linien kennzeichnen autoaktive Fragmente.

Beide Rezeptoren wurden sowohl in voller Länge als auch in kleineren Fragmenten in den Hefevektor pBTM117c C-terminal ohne Verschiebung des Leserahmens hinter die DNA-Bindungsdomäne des LexA-Gens kloniert. Für die Klonierung der TrkB-cDNA wurde kommerziell erworbene humane Gehirn-RNA unter Verwendung von oligo-dT-Primern in cDNA revers transkribiert und zunächst in den Topoisomerasevektor pCR2.1 ligiert. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass nur die full-length-Variante ohne Exon 17 amplifiziert werden konnte. Die Fragmente wurden dann mit den entsprechenden Schnittstellen enthaltenden Primern reamplifiziert und dann in den pACT4-1b über Sal- und Not-Schnittstellen kloniert.

Die MC4R-Konstrukte wurden aus einem bereits vorhandenen MC4R-pcDps amplifiziert. Zusätzlich zum gesamten MC4R wurden noch folgende Fragmente kloniert:

1. N-Terminus-icl1
2. TM3-TM5
3. TM5-ecl3
4. TM6-C-Terminus

Abb. 41 stellt schematisch die klonierten Fragmente für TrkB dar. In der Arbeitsgruppe von Prof. Wanker am MDC Berlin-Buch wurden die Konstrukte in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm L40ccu MATa transformiert und als Köder (Bait) in einem automatisierten Yeast-2-Hybrid Screen gegen ~10.000 in humanem Gehirn exprimierte Beuteproteine (Prey) auf Interaktion getestet. Die Prey-

Proteine waren an die Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins in dem Vektor pACT4-1b kloniert und in den Hefestamm L40cc MAT α transformiert. Im high-throughput-Screen wurden Bait- und Prey-Stämme gemischt und auf SD2 (Mangelmedium ohne Leucin und Tryptophan) gespottet, um auf diploide, Bait und Preyplasmide tragende Stämme zu selektieren. Von dort wurden die Kolonien auf SD4 Medium (Mangelmedium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Uracil) um auf die Reportergene *HIS3* und *URA3* zu selektieren, welche nur bei einer Interaktion von Bait- und Preyprotein aktiviert werden. Um eventuelle Autoaktivität eines Baitproteins zu überprüfen wurden zuvor haploide, nur mit dem Baitvektor transformierte Hefen auf SD4 gespottet. So erwiesen sich die Konstrukte TrkB3, TrkB5 und TrkB8 als autoaktiv und wurden aus dem Screen ausgeschlossen (Abb. 41). Als zusätzliche Kontrolle der Interaktion wurden die diploiden Hefezellen auf Nylonmembranen über SD2 Medium überpickt, um die Aktivität des dritten Reportergens *lacZ* zu überprüfen. Für keines der MC4R-Konstrukte konnte eine Interaktion mit den Bait-Proteinen gezeigt werden, auch für den Großteil der TrkB-Fragmente war der Screen negativ. Nur für das Fragment Trkb4, das nur aus Exon 18 der intrazellulären Juxtamembrandomäne besteht, konnten Protein-Protein-Interaktionen gezeigt werden (Abb. 42). Ansequenzierung der drei Preyvektoren identifizierte Prey 1 als C20orf40 (=LSM14B), Prey 2 als Septin3 Splicevariante a und Prey 3 als Upstream of NRAS (UNR).

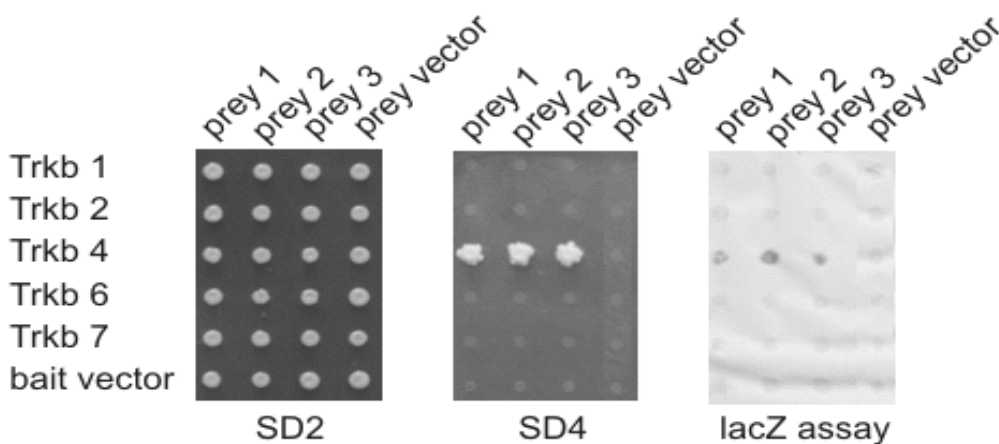


Abbildung 42: Ergebnis des Yeast-2-Hybrid Screens. links: Wachstum diploider Kolonien auf SD2-Medium, mitte: Aktivierung der Reportergene *HIS3* und *URA3* auf SD4-Mangelmedium, rechts Aktivierung des *lacZ* Reportergens auf über SD2-Medium platzierter Nitrozellulosemembran. Prey1:C20orf40; Prey2: Sept3_a, Prey3: UNR

Über die Funktion von c20orf40 ist bisher nichts bekannt. Da es sich bei UNR um ein in den Translationsvorgang involviertes Protein handelt (Cornelis et al., 2005), das auf den ersten Blick wenig mit TrkB/BDNF-Signaltransduktion zu tun hat, wurde die Interaktion mit Septin3 weiter untersucht. Septine sind GTP-bindende Proteine, die mit der Zellmembran und Aktin- bzw. Microtubulocytoskeleton assoziiert sind. Sie besitzen eine N-terminal gelegene prolinreiche von Septin zu Septin variable Region, gefolgt von einer zur Membranassoziation wichtigen polybasischen Domäne. C-Terminal davon befindet sich die GTP-Bindungsdomäne. Die meisten Septine enden am C-Terminus mit einer variablen coiled-coiled-Domäne, die bei den Septinen 3, 9 und 12 fehlt (Spiliotis und Nelson, 2005). Das als Preyprotein klonierte Fragment beginnt nach 75 Aminosäuren innerhalb der GTP-Bindungsdomäne und ist 270 Aminosäuren lang. Es existieren drei verschieden

Splicevarianten des humanen Sept3 (Methner et al., 2001). Die Variante Sept3_b ist 8 Aminosäuren länger als Sept3_a, außerdem unterscheiden sich die 8 C-terminalen Aminosäuren voneinander (Abb. 44C). Zusätzlich existiert noch ein drittes Transkript, das nur aus den 71 N-Terminalen Aminosäuren besteht.

4.6.2. Verifikation der Interaktion zwischen Sept3 und TrkB mittels GST-Pulldown-Assay

Zur Verifikation des Yeast-2-Hybrid-Experiments wurde zunächst die Septin cDNA aus dem pACT-Vektor über *Sall/NotI* in den GST-Fusionsvektor pGEX-6P2 umgehängt, wodurch ein C-Terminal an die Gluthathion-S-Transferase fusioniertes Konstrukt unter Kontrolle eines bakteriellen durch IPTG induzierbaren Tac-Promotors erzeugt wurde.

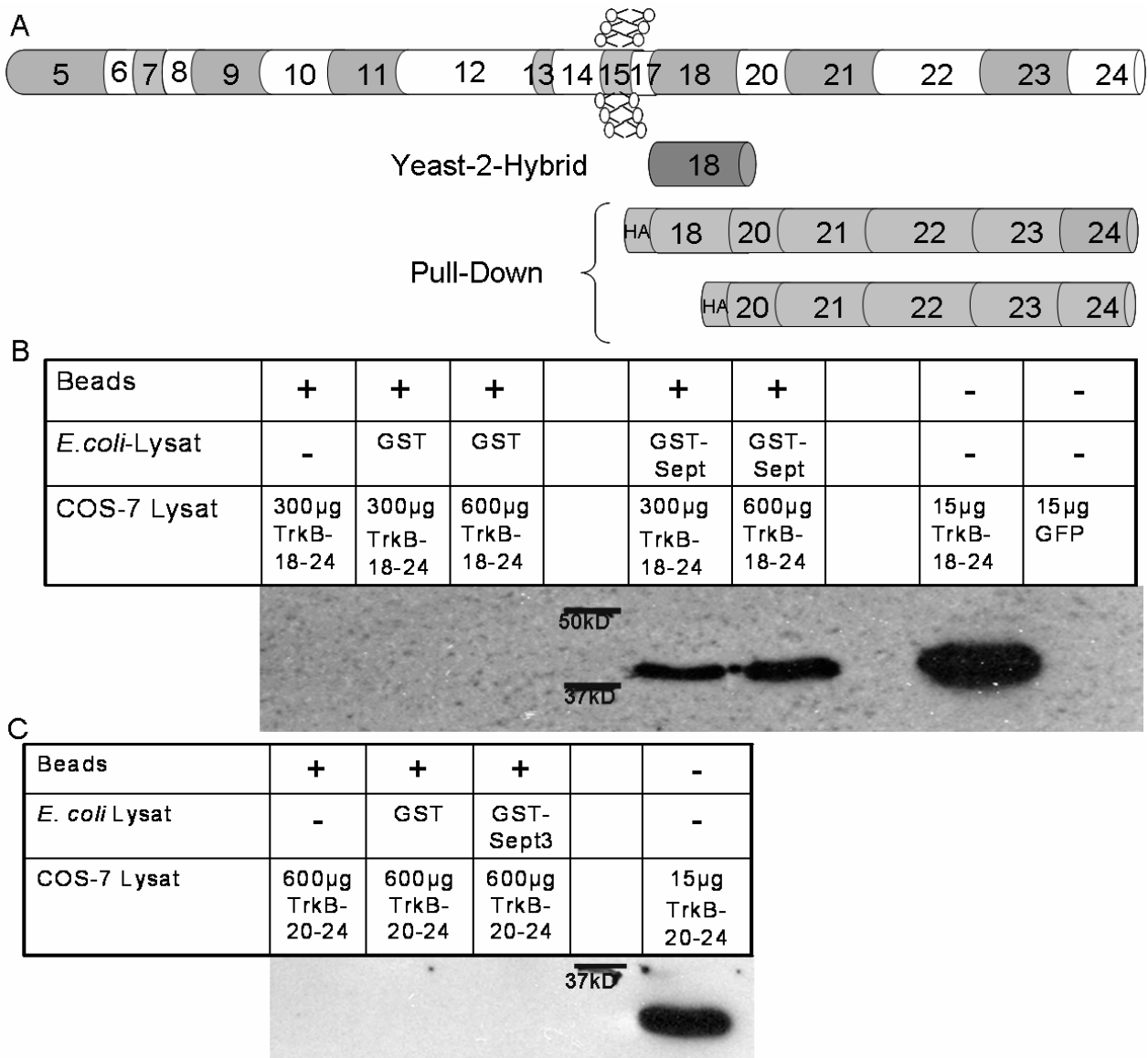


Abbildung 43: GST-Pulldown-Assay zum Nachweis der *in vitro* Interaktion von TrkB und Sept3. A) Schematische Darstellung der im Pulldown-Assay eingesetzten Fragmente im Vergleich zum gesamten Protein und dem im Y2H-Screen identifizierten Fragment. B und C) *E. coli*-Lysate wurden mit Gluthathion-Agarosebeads inkubiert, gewaschen und dann mit COS-7-Lysaten inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Beads in Loadingpuffer gekocht, der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Immunodetektion der TrkB-Konstrukte erfolgte mittels Anti-HA-Biotin und Streptavidin-POD.

Das nur aus Exon 18 bestehende TrkB-Fragment konnte aufgrund seines geringen Molekulargewichtes nur schlecht in COS-7-Zellen exprimiert bzw. im Westernblot detektiert werden. Daher wurde die gesamte intrazelluläre Domäne zusammen mit einem aminoterminal lokalisierten, zur immunologischen Detektion dienenden, HA Tag über XhoI/EcoRI Schnittstellen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Wie in Abb. 43B ersichtlich, konnte im GST-Pulldown Assay die Interaktion der intrazellulären Domäne des TrkB (TrkB 18-24) mit dem GST-fusionierten Sept3_a Fragment verifiziert werden. In dem gezeigten Assay wurden zwei verschiedene Mengen COS-7 Lysat, 300 bzw. 600 µg Protein, eingesetzt. Bei beiden Ansätzen mit GST-fusioniertem Sept3 wurde wie direkt im COS-7-Lysat ein etwa 40kD großes Protein detektiert, das der erwarteten Größe entsprach. In den Negativkontrollen (Gluthathionbeads allein und Gluthathionbeads inkubiert mit GST-Lysat) konnte kein HA-markiertes TrkB-Fragment detektiert werden. Um zu zeigen, dass nur die durch Exon 18 kodierte juxtamembranäre Domäne für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist, wurden weitere Pulldown-Assays mit einem die Exons 20-24 umfassenden TrkB Fragment durchgeführt (Abb 43 C). Dieses Experiment diente außerdem als Kontrolle für unspezifische Interaktionen. Tatsächlich fand zwischen dem entsprechend kleineren, etwa 35 kD großen Fragment und dem GST-markierten Sept3_a Fragment keine Bindung statt.

4.6.3. Einschränkung der Interaktionsdomänen von TrkB und Sept3

Um zu untersuchen, ob der in den beiden Sept3 Splicevarianten verschiedene Carboxyterminus eine Rolle bei der Interaktion mit TrkB spielt, wurde aus kommerzieller humaner Gehirn-RNA, die revers in cDNA transkribiert wurde, die Splicevariante b amplifiziert und kloniert.

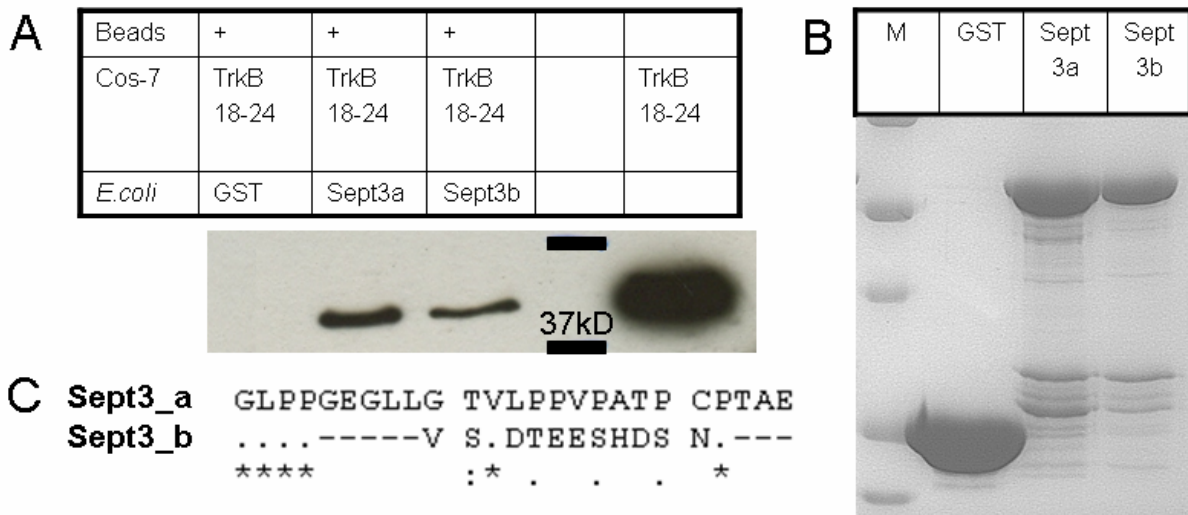


Abbildung 44: Einfluß der Sept3 Splicvarianten auf die Interaktion mit TrkB. (A) GST-Pulldownassay von GST-Sept3_a bzw. 3_b und HA-TrkB-18-24. *E. coli* Lysate wurden mit Gluthathion-Agarosebeads inkubiert, gewaschen und dann mit COS-7 Lysaten inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Beads in Loadingpuffer gekocht, der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Immunodetektion der TrkB-Konstrukte erfolgte mittels Anti-HA-Biotin und Streptavidin-POD. (B) Comassie-gefärbtes Gel der an die Gluthathionbeads gebundenen Proteine nach dem Pulldown-Assay. (C) Aminosäurealignment der in den Sept3-Splicevarianten unterschiedlichen Carboxytermini. Identische Aminosäuren sind als Punkte und darunter als Sterne dargestellt. Fehlende Aminosäuren sind durch Striche gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit der GENTle-Software erstellt und es wurde ein Clustal-W-Algorithmus verwendet. Die Sequenzen wurden der NCBI-Nukleotiddatenbank entnommen.

Analog zur bereits in den *E. coli* Expressionsvektor klonierten Splicevariante a wurde dann das Sept3_b ab der 75. Aminosäure carboxyterminal hinter die GST-Sequenz des pGEX-6P2 ligiert und in den *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus RP transformiert.

Abb. 44A zeigt, dass auch bei Sept3_b eine Interaktion mit TrkB 18-24 stattfindet. Die etwas schwächere Bande kommt durch die schlechtere Expression von dem Sept3_b-GST-Fusionsprotein zustande, wie in dem in Abb. 44B gezeigten Comassie-Gel zu sehen ist

Eine wichtige Region der Juxtamembrandomäne ist die Shc-Bindungsstelle. Diese ist in allen drei Neurotrophinrezeptoren identisch und beinhaltet ein Tyrosin, das bei Aktivierung des Rezeptors phosphoryliert wird. Die Bindung von Shc erfolgt dann an der phosphorylierten Bindungsstelle. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von Sept3 phosphorylierungsabhängig ist, wurde ein TrkB-Konstrukt erstellt, dessen Tyrosin im Shc-Bindungsmotiv durch ein Phenylalanin ersetzt ist (TrkB Y516F), wodurch eine Phosphorylierung verhindert wird. Im Pulldown-Assay gegen GST-Sept3 konnten sowohl das WT-Konstrukt als auch die Y516F-Mutante kopräzipitiert werden (Abb. 45A). Die TrkB-Sept3-Interaktion geschieht also unabhängig von der Phosphorylierung der Shc Bindungsstelle.

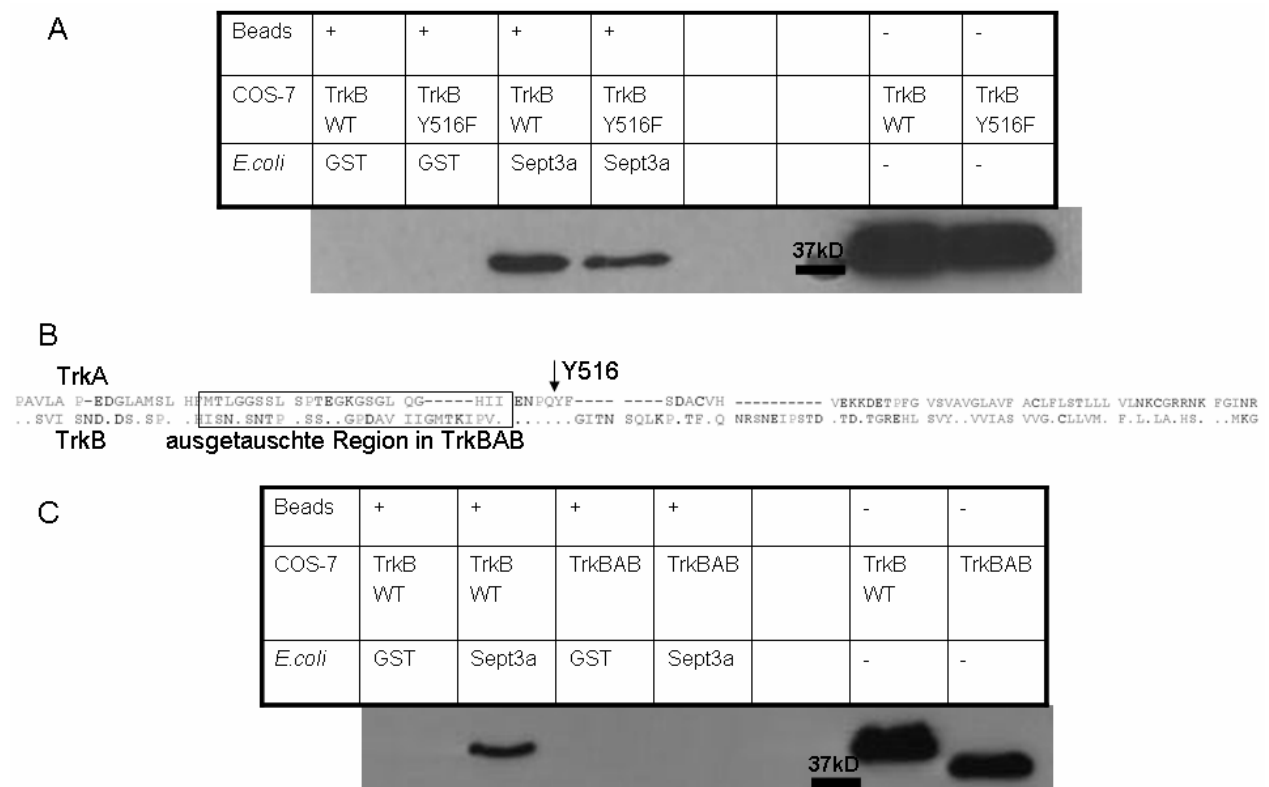


Abbildung 45: Einfluss der Phosphorylierung der Shc-Bindungsstelle (A) und einer N-terminal angrenzenden Region (C) in der Juxtamembrandomäne von TrkB auf die Bindung an Sept3. (A) und (C) GST-Pulldown-Assays mit Sept3 und HA-markierten TrkB-Konstrukten. *E. coli*-Lysate wurden mit Gluthathion-Agarosebeads inkubiert, gewaschen und dann mit COS-7-Lysaten inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurden die Beads in Loadingpuffer gekocht, der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran geblottet. Immunodetektion der TrkB-Konstrukte erfolgte mittels Anti-HA-Biotin und Streptavidin-POD. (B) Aminosäurealignment der Juxtamembrandomäne von TrkA und TrkB. Identische Aminosäuren sind als Punkte dargestellt. Fehlende Aminosäuren sind durch Striche gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit der GENTle-Software erstellt und es wurde ein Clustal-W Algorithmus verwendet. Das Tyrosin 516 und die im TrkBAB ausgetauschte Region sind gekennzeichnet.

Über die Funktion der restlichen Juxtamembrandomäne ist nicht viel bekannt. Chen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass nach Ligandenbindung internalisiertes TrkB in PC12-Zellen degradiert, TrkA hingegen recycelt wird und an die Zelloberfläche zurückgelangt (Chen et al., 2005). Wird die Juxtamembrandomäne von TrkB durch die von TrkA ersetzt, wird das Hybridkonstrukt wie TrkA recycelt. Die Autoren konnten die kritische Region auf einige Aminosäuren aminoterminal der Shc-Bindungsstelle eingrenzen.

Um zu untersuchen, ob auch TrkA mit Sept3 interagiert, wurde ein dem TrkB 18-24 entsprechendes TrkA-Fragment amplifiziert und aminoterminal HA epitopmarkiert. Dieses Fragment konnte allerdings nur in unzureichenden Mengen in COS-7-Zellen exprimiert werden. Daher wurde die von Chen und Mitarbeitern beschriebene Region im TrkB 18-24 mittels overlap-PCR durch die homologe TrkA-Sequenz ersetzt (Abb. 45B), was in einem gut exprimierbaren Protein resultierte. Dieses Hybridprotein (TrkBAB) konnte im GST-Pulldown-Assay nicht an Sept3 binden (Abb 45C). Das deutet darauf hin, dass diese N-terminal der Shc-Bindungsstelle gelegene Region essentiell für die TrkB-Sept3-Interaktion ist.

4.6.4. Subzelluläre Colokalisation von fluoreszenzmarkiertem TrkB und Sept3 in PC12 Zellen

In einem weiteren Ansatz sollte die zelluläre Colokalisation von Sept3 und TrkB in neuronalen Zellen untersucht werden. Dazu wurde das gesamte TrkB unter Einhaltung des Leserahmens aminoterminal vor ein im Vektor pEYFP-N1 vorhandes YFP kloniert. Das gesamte Sept3_b wurde carboxyterminal hinter CFP in den pECFP-C1-Vektor kloniert. Zur Expression wurde die Zelllinie PC12 verwendet, eine aus Ratten gewonnene Phäochromocytomzelllinie, die sich bei Zugabe von Nervenwachstumsfaktor (NGF) zu einem neuronalen Typ differenzieren lässt. Unter Benutzung des Amaxa-Nucleofectionssystems wurden zunächst beide Vektoren in undifferenzierte, in Suspension vorliegende PC12-Zellen cotransfiziert, und nach der Transfektion mit NGF-haltigem Medium in Zellkulturschalen mit kollagenbeschichteten Glasplättchen ausgesät. Nach etwa einer Woche waren die Zellen ausdifferenziert und wurden im konfokalen Mikroskop analysiert. Abbildung 46 zeigt eine kotransfizierte und zu einem Neuron ausdifferenzierte PC12-Zelle. Eine Kolokalisation des YFP-markierten TrkB mit dem CFP-makierten Sept3 ist sowohl an den Enden der neuronalen Fortsätze als auch im Zellkörper zu erkennen.

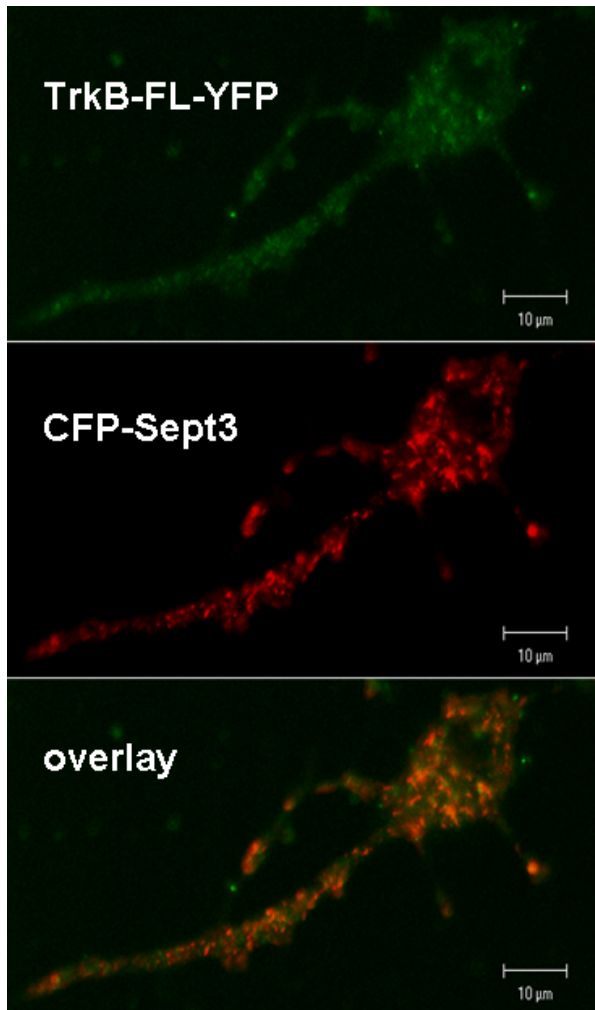


Abbildung 46: Colokalisation von TrkB und Sept3 in differenzierten PC12-Zellen. Konukleofizierte PC12 Zellen wurden 5 Tage lang mit 300 ng/ml NGF zu Neuronen differenziert. Bilder der lebenden Zellen wurden unter Verwendung des konfokalen Mikroskops LSM 510 meta ausgerüstet mit einem 458 nm- bzw. einem 488 nm-Laser zur Anregung und eines LP505 Emissionsfilters aufgenommen. Oben (grün): Carboxyterminal YFP markiertes TrkB-FL; Mitte (rot): Aminoterminal markiertes Sept3; Unten: Überlagertes Bild von TrkB-YFP und Sept3-CFP.

5. Diskussion

5.1. Evolutionärer Ansatz zur Auswertung von Mutationen des MC4R

In adipösen Patienten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen eine Vielzahl von MC4R-Mutationen identifiziert. Diese Mutationen sind nicht immer funktionell relevant und verteilen sich über die Aminosäuren des gesamten Rezeptors. Die Identifikation evolutionär besonders konservierter Bereiche würde eine nützliche Hilfe zur Auswertung neuer oder bereits gefundener Mutationen darstellen. In einem evolutionären Ansatz wurden Datenbanken nach bereits vorhandenen MC4R-Sequenzen verschiedener Vertebraten durchsucht. Desweiteren wurden über 30 neue orthologe MC4R partiell kloniert. Die Klonierung aus genomischer DNA war deshalb möglich, da der MC4R nur ein Exon besitzt. Aus dem Alignment der insgesamt 70 Aminosäuresequenzen konnten dann stark oder schwach konservierte Bereiche oder einzelne konservierte Aminosäuren identifiziert werden. Hier fiel auf, dass der ecl1 am wenigsten konserviert ist und auch als einzige Domäne (ausgenommen die N- bzw. C-Termini) eine Längenvariation aufweist. Die N- und C-Termini sind die am geringsten konservierten Domänen des MC4R, was darauf schließen lässt, dass diese beiden Domänen wenig Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors haben. Die Heterogenität der Termini machte es schwer, neue orthologe Rezeptoren in voller Länge zu amplifizieren. Alle verfügbaren Sequenzen des C-Terminus weisen ein für eine mögliche Palmytylierung zur Membranverankerung wichtiges Cystein auf, allerdings fehlt in einigen Fisch-MC4R das im humanen MC4R für das Membrantrafficking wichtige Dileucin-Motiv (VanLeeuwen et al., 2003). Bei den Transmembrandomänen ist TM3 am meisten konserviert, TM4 am geringsten. Alle fünf extrazellulären Cysteine sind konserviert, was noch einmal die Wichtigkeit der Disulfidbrücke im elc3 hervorhebt (Tarnow et al., 2003). Exemplarisch wurden zunächst acht orthologe MC4R funktionell auf Signaltransduktion, Oberflächenexpression und Ligandenbindung untersucht. Hier konnten nur Effekte festgestellt werden, die deutlich geringer als die von (partiellen) Funktionsverlustmutationen waren. Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass ein nicht funktionell charakterisierter orthologer Rezeptor funktionell inaktiv ist. Da der MC4R aber auch eine Rolle im Sexualverhalten spielt (Van der Ploeg et al., 2002), ist anzunehmen, dass ein funktionsuntüchtiger MC4R evolutionär ungünstig wäre. Variationen der kodierenden Sequenzen der MC4-Rezeptoren sind vermutlich nicht für unterschiedliche Körpergewichte oder Körperzusammensetzungen von verschiedenen Spezies verantwortlich. Orthologe Promotorregionen wurden wegen ihrer Heterogenität nicht untersucht, es ist daher nicht auszuschließen, dass auf regulatorischer Ebene Unterschiede der MC4R-Expression existieren. Es ist auch zu beachten, dass die hier charakterisierten orthologen Rezeptorkonstrukte die humanen N- und C-Termini besaßen. Bei Mutationen im N-Terminus des humanen MC4R konnte ein Einfluss auf die Basalaktivität beobachtet werden (Srinivasan et al., 2004). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die geringe Konservierung des N-Terminus in den orthologen MC4R die konstitutive Aktivität der Rezeptoren beeinflusst.

Vergleicht man in humanen Probanden gefundene Mutationen und deren funktionellen Effekt mit dem Konservierungsgrad der entsprechenden Position, fällt auf, dass an zu 100% konservierten Positionen häufiger Funktionsverlustmutationen gefunden werden, als Mutationen ohne Effekt. An nicht konservierten Positionen treten mehr Mutationen auf, die sich wie der WT verhalten, als Mutationen,

die einen Funktionsverlust hervorrufen. Dass Mutationen an unkonservierten Positionen einen Funktionsverlust bewirken können, ist durch die Aminosäure bedingt, zu der die Position ausgetauscht ist. So ist es z.B. nicht verwunderlich, dass ein Austausch von Isoleucin zum geladenen Lysin an der Position 125 zu einem Funktionsverlust führt. Andersherum gibt es Mutationen an 100% konservierten Positionen, die keinen Funktionsverlust bewirken. Es ist möglich, dass diese Positionen in anderen, nicht untersuchten Spezies nicht konserviert sind. Bewirkt eine als funktionell relevant charakterisierte Mutation einen Aminosäureaustausch, der auch in einem der orthologen Rezeptoren zu finden ist, deutet das darauf hin, dass der Rezeptor dieser Spezies nicht funktionsfähig ist. Dieses ist bei der V95I Mutation aufgetreten, die auch beim Eisbären gefunden wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass der Eisbär als Anpassung an seine arktische und maritime Umgebung Vorteile aus einem veränderten Metabolismus oder einer erhöhten Fettspeicherung zieht. Zusätzlich wurden die Sequenzen verschiedener Ursidae-Spezies amplifiziert und sequenziert. Keine der untersuchten Spezies wies den V95I-Aminosäureaustausch auf, auch nicht der nächste Verwandte des Eisbären, der Braunbär (*Ursos arctos*). Braun- und Eisbären gingen vor 300.000 Jahren aus einem gemeinsamen Vorfahren hervor (Talbot und Shields, 1996). Um auszuschließen, dass der Eisbär, dessen MC4R sequenziert wurde, Träger einer seltenen Variante ist, wurden zusätzlich die MC4R von fünf weiteren Eis- und Braunbären untersucht. Alle Braunbären weisen – wie alle anderen untersuchten Spezies – an dieser Position ein Valin, alle Eisbären ein Isoleucin auf. Signaltransduktionseigenschaften des Eisbären-MC4R wurden mit denen des humanen und des Braunbären verglichen und zeigten keine Unterschiede. Um zu verifizieren, dass die humane V95I-Mutation tatsächlich wie beschrieben eine vollständige Funktionsverlustmutation ist, wurde diese Mutation mittels ortsgerechter Mutagenese erstellt und auf Signaltransduktionseigenschaften hin untersucht. Hier konnte kein Unterschied zum humanen MC4R-WT festgestellt werden. Nach Durchführung dieser Arbeiten wurde im NCBI-Trace-Archive mit dem Gürteltier (*Dasyurus novemcinctus*) ein weiterer orthologer MC4R identifiziert, der die Isoleucinvariante an dieser Position trägt. Diese Daten unterstreichen die Aussagekraft des Orthologenvergleiches zur Vorhersage und zur Auswertung des Effektes von in humanen Individuen gefundenen MC4R Mutationen.

Der MC4R ist während der 450 Millionen Jahre andauernden Evolution der Vertebraten in Struktur und Funktion hochkonserviert. Es konnte gezeigt werden, dass eine starke Korrelation zwischen konservierten Aminosäuren und der funktionellen Relevanz von MC4R-Mutationen besteht. Adipositas ist ein multifaktorieller Phänotyp, daher müssen auch in adipösen Patienten gefundene Mutationen nicht zwangsläufig zu einem Funktionsverlust führen. Die Reevaluation von in der Literatur beschriebenen Mutationen kann –wie bei der V95I-Mutation – in Betracht gezogen werden. Der Orthologenvergleich besitzt eine hohe Aussagekraft zur Abschätzung der funktionellen Relevanz einer Mutation, allerdings wird auf *in vitro* Assays nicht verzichtet werden können. Zur Ergänzung und zur Erleichterung einer Interpretation kann dieser evolutionäre Ansatz aber angewendet werden. In dieser Arbeit wird er im Folgenden zur Diskussion von in Mensch und Maus gefundenen Mutationen eingesetzt.

5.2. *N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea -induzierte Mutationen in murinen Melanocortinrezeptoren

Durch das Keimbahnmutagen *N*-Ethyl-*N*-Nitrosourea hervorgerufene Mutationen bieten einen alternativen Ansatz zu knockout-Strategien zur Untersuchung von Genprodukten im Mausmodell. Das Screenen einer Spermienbank ENU-behandelter Mäuse ist zeitsparender als herkömmliche knockout-Ansätze. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit, statt vollständiger Funktionsverlustmutationen hypomorphe bzw. partiell inaktivierende Mutationen zu finden, die besonders bei Genen, deren vollständige Deletion letal wäre, vorteilhaft ist. Allerdings weist die ENU-Methode zwei entscheidende Nachteile auf: 1) Es kann nicht vorausgesetzt werden, dass das zu untersuchende Gen von einer Mutation betroffen ist, und 2) wenn eine Mutation in dem gewünschten Gen gefunden wurde, bedarf es einer funktionellen Charakterisierung, um eine Funktionsveränderung (meistens einen Funktionsverlust) festzustellen. Zur Überprüfung dieses Ansatzes wurden zwei schon gut untersuchte GPCRs ausgewählt, die in der Appetitregulation eine Rolle spielen: Die Melanocortinrezeptoren 3 und 4. GPCRs eignen sich besonders für ein Screening, da sie oft intronlos sind oder nur ein codierendes Exon besitzen und sie durch den bekannten Signalweg vergleichsweise einfach funktionell zu charakterisieren sind. In dem über 9000 Proben umfassenden Spermienarchiv ENU-behandelter Mäuse der Firma Ingenium wurden im MC3R drei Missensemutationen (Y152C, L247G und T267P), im MC4R fünf Missensemutationen (Y21H, R147S, I194F, M281R und Y302C) identifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Charakterisierung ergab für die MC3R-Mutationen einen partiellen Funktionsverlust für die Y152C- und die L247G-Mutante und einen vollständigen Funktionsverlust für die T267P-Mutante, der hauptsächlich durch eine stark verminderte Zelloberflächenexpression verursacht wird. Das Tyrosin an Position 152 und das Leucin an Position 247 sind in neun orthologen MC3-Rezeptoren vollständig konserviert, was auf eine essentielle Funktion dieser beiden Aminosäuren schließen lässt. Das Tryptophan an Position 267 ist in Fischen und im Molch, sowie im humanen MC4R durch ein Serin substituiert. Im hMC4R führt die Substitution dieses Serins durch ein Cystein zwar zu einem partiellen Funktionsverlust aber nicht zu einer reduzierten Oberflächenexpression (Tarnow et al., 2003). Die Substitution durch ein Prolin im Übergang von TM6 zum dritten extrazellulären Loop verursacht vermutlich einen Knick in der Aminosäurenkette und führt so zu einer Fehlfaltung des Rezeptors, was wiederum zu einer intrazellulären Retention führt. Von den im MC4R gefundenen Mutationen hat nur der im Aminoterminus gelegene Y21H-Austausch keinen Effekt auf die Rezeptorfunktion. Die Mutationen R147S, I194F und M281R führen zu einem partiellen, die Y302C-Mutation zu einem vollständigen Funktionsverlust. Evolutionär sind das Arginin an Position 147, das Methionin an Position 281 und das Tyrosin an Position 302 in 70 Spezies zu 100% konserviert, das Isoleucin an Position 194 ist in einigen Fischen und beim Rüsselspringer (*Macroscelides proboscideus*) durch ein Leucin substituiert. Das R¹⁷⁴ liegt im in vielen GPCRs der Rhodopsinfamilie konservierten DRY-, das Y³⁰² im NPXXY-Motiv (Wess, 1998). Beide Motive spielen eine wichtige Rolle in der Rezeptoraktivierung und Mutationen an diesen Positionen können die Signaltransduktion eines Rezeptors vermindern. Die Mutation M281R liegt am aminoterminalen Ende von TM7. Ein Austausch des hydrophoben Methionins an dieser Position durch das große, polare und geladene Arginin scheint die Faltung des Proteins zu stören und führt zu einer verschlechterten Oberflächenexpression und dadurch zu einer

verminderten Maximalstimulation. Außerdem ist die EC_{50} der natürlichen Liganden stark erhöht, die EC_{50} von NDP- α -MSH unverändert. Dieser Effekt ist noch deutlicher bei der I194F-Mutation zu beobachten, allerdings bewirkt diese Mutation keine Verminderung der Oberflächenexpression und auch die Maximalstimulation ist in der Höhe des Wildtyps. Auch der synthetische Agonist MTII stimuliert die I194F vergleichbar mit dem WT. Bindungsstudien ergaben, dass vergleichbar viel 125 I-NDP- α -MSH an die I194F-Mutante und an den WT bindet. Bei Verdrängung mit unmarkiertem NDP- α -MSH liegt die IC_{50} von Mutante und WT in der gleichen Größenordnung, bei Verdrängung mit α -MSH ist sie um das 3-fache erhöht. Die genaue Position der Bindungstasche des MC4R ist nicht bekannt, es gibt allerdings Arbeiten, die für die Ligandenbindung wichtige Aminosäuren identifizierten. So sind Isoleucine an den Positionen 125, 129 und 291 im hMC4R an der Bildung einer hydrophoben Tasche beteiligt (Hogan et al., 2006). Alle diese Isoleucine liegen in den extrazellulären Bereichen von TM3 bzw. TM7. I291 liegt über dem NPXXY-Motiv und könnte bei Ligandenbindung zur Rotation von TM6 führen. Es ist daher vorstellbar, dass auch I¹⁹⁴ am extrazellulären Ende von TM5 zur Rezeptoraktivierung durch α -MSH beiträgt.

Die ENU-induzierten Mutationen bieten eine gute Gelegenheit, MC4R-Punktmutationen *in vivo* zu untersuchen. Es gibt zwar schon seit längerer Zeit ein knockout-Modell (Huszar et al., 1997), Mäuse mit funktionell relevanten Missensemutationen im MC4R existieren bisher aber nicht. Da Patienten mit MC4R-Mutationen überwiegend Träger von heterozygoten Missensemutationen sind, die dann funktionell charakterisiert werden, um Rückschlüsse auf den Einfluss auf den Phänotyp des Patienten zu ziehen, stellen Mäuse mit Missensemutationen ein gutes Modell zur Überprüfung der Übertragbarkeit von *in vitro*-Experimenten auf einen *in vivo* Phänotyp dar. Dazu wurden als partiell inaktivierende Mutation die I194F-Mutation und als vollständig inaktivierende Mutation die Y302C-Mutation ausgewählt. Beide Mauslinien wurden von der Firma Ingenium in einem C3HeB/FeJ/C57BL/6J gemischten Stamm durch *in vitro* Fertilisation erstellt. In den Gewichtsverläufen wiesen beide homozygote Linien ein höheres Körpergewicht als die WT-Tiere auf. Die Adipositas der homozygoten Y302C-Tiere verläuft schwerer und entwickelt sich früher als bei den homozygoten I194F-Tieren, was den Unterschied zwischen einer vollständigen und einer partiellen Funktionsverlustmutante widerspiegelt. Hier stimmen die *in vivo* Daten mit den *in vitro* Daten überein: je schwerer der molekulare Defekt, desto schwerer ist die Ausprägung der Adipositas. Außerdem sind die Charakteristika der Y302C Mäuse mit den von Huszar und Mitarbeitern beschriebenen knockout-Mäusen vergleichbar: die Gewichtsverläufe der heterozygoten Y302C-Tiere liegen zwischen den homozygoten Tieren und den WT-Tieren, und die Adipositas ist in beiden Linien bei den Weibchen ausgeprägter als bei Männchen. Die heterozygoten I194F-Tiere zeigen allerdings keinen intermediären Phänotyp sondern weisen einen den homozygoten Tieren ähnelnden Gewichtsverlauf auf. Die I194F-Mutation wird in den Mauslinien also dominant vererbt. Obwohl es durch den multifaktoriellen Phänotyp der Adipositas bei Patienten schwierig ist Genotyp-Phänotyp Korrelationen herauszuarbeiten, wurde gezeigt, dass MC4R Mutationen kodominant vererbt werden (Farooqi et al., 2003). Auch in einer konsanguinen Familie, in der der seltene Fall einer partiell inaktivierenden homozygoten MC4R Mutation (C271R) auftritt, sind die homozygoten Familienmitglieder deutlich übergewichtiger als heterozygote Träger. Bei den heterozygoten Trägern sind die weiblichen

Familienmitglieder stärker betroffen als die männlichen (Tarnow et al., 2003). Dieser aus acht Personen bestehende Stammbaum ist allerdings statistisch nicht auswertbar.

Eine mögliche Erklärung für die dominante Vererbung der I194F-Mutation wäre das Vorhandensein eines dominant-negativen Effekts der Mutation auf WT-Rezeptoren bei Bildung eines Rezeptordi- oder oligomers. Da der Membrantransport der I194F-Mutante nicht beeinträchtigt ist, ist die Bildung membranständiger Rezeptorheteromere möglich. Koexpression von Mutante und WT-Rezeptor führten *in vitro* allerdings nicht zu einer Veränderung der durch Ligandenstimulation induzierten cAMP-Akkumulation. Wodurch trotzdem eine dominante Vererbung des adipösen Phänotyps der I194F-Mutation zustande kommt, konnte nicht geklärt werden, aber da alle *in vitro* Experimente in einem heterologen Überexpressionssystem durchgeführt wurden, können Interaktionen mit anderen Faktoren, die in hypothalamischen Neuronen eine Rolle spielen, nicht ausgeschlossen werden.

Nach der Veröffentlichung dieser Daten wurden von einer anderen Arbeitsgruppe ähnliche Ergebnisse erzielt (Meehan et al., 2006). Auch dort wurden zwei ENU-induzierte Mutationen in murinen MC4-Rezeptoren gefunden und untersucht: die an der gleichen Position wie die I194F liegende I194T und die im NPXXY Motif liegende L300P Mutation. Funktionelle *in vitro* Experimente zeigten, dass auch die I194T Mutation für α -MSH eine partielle Funktionsverlustmutation darstellt, für NDP- α -MSH aber kein Unterschied zum WT-Rezeptor zu bemerken ist. Die L300P Mutation ist eine vollständige Funktionsverlustmutation, die aber an der Oberfläche exprimiert ist. *In vivo* sind die I194T Tiere schwerer als WT-Mäuse, zeigen aber eine etwas mildere Adipositas als die L300P Tiere. Die heterozygoten I194T Mäuse zeigen hier allerdings im Gegensatz zur I194F Linie einen intermediären Phänotyp. Dafür es verschiedene Erklärungen geben: 1) Die I194T-Mäuse haben einen C57BL/6J-Hintergrund, während die I194F-Mäuse in einen 50%/50% C3HeB/FeJ/C57BL/6J Hintergrund gekreuzt wurden, 2) Die I194T-Mutation hat eine verglichen mit dem WT 10-fach erhöhte EC_{50} für α -MSH, während die I194F eine bis zu 70-fach erhöhte EC_{50} aufweist. Es ist erstaunlich, dass bei zwei unabhängigen Experimenten einer ENU-induzierten Mutagenese die identische Aminosäure betroffen ist, da bisher keine Mechanismen für Hotspots bei ENU-Mutagenesen bekannt sind. Phenylalanin ist eine große aromatische und hydrophobe Aminosäure, Threonin eine kleine polare Aminosäure und das native Isoleucin eine kleine hydrophobe Aminosäure. Da die Substitutionen des Isoleucins durch die beiden unterschiedlichen Aminosäuren einen ähnlichen pharmakologischen Phänotyp verursachen, kann man daraus schliessen, dass das I194 für die Aktivierung durch α -MSH aber nicht durch NDP- α -MSH eine wichtige Rolle spielt. Als zusätzlicher Beweis wäre die Untersuchung einer durch ortsgerechte Mutagenese erstellten I194A-Mutation hilfreich.

5.3. Funktionelle Charakterisierung von in der Normalpopulation gefundenen MC4R-Mutationen

Die meisten der bisher beschriebenen MC4R-Mutationen wurden in Kollektiven adipöser Kinder und Jugendlicher gefunden. In den Stammbäumen der Familien der Indexpatienten wurden aber auch Mutationsträger mit normalen oder nur leicht erhöhten BMI-Werten gefunden (Farooqi et al., 2003; Vaisse et al., 2000; Valli-Jaakila et al., 2004; Tarnow et al., 2003). Der *in vivo* beobachtete Effekt von Mutationen im MC4R auf das Körpergewicht wird also außerdem von weiteren genetischen Faktoren

sowie Umwelteinflüssen modifiziert. Bisher gibt es keine Daten über das Auftreten von MC4R-Mutationen in einer Normalpopulation. Kooperationspartner der Universität Essen screenen daher ein die Durchschnittspopulation repräsentierendes Kollektiv nach MC4R-Mutationen. Dieses KORA-S4 (Kooperative Gesundheitsforschung im Raum Augsburg, Survey 4) umfasste 4086 Individuen, von denen 23% adipös und 66% übergewichtig waren. Insgesamt wurden in diesem Kollektiv 16 zu einem Aminosäureaustausch führende, heterozygote Mutationen gefunden. Acht Mutationen waren bisher noch nicht beschrieben. Phänotypisch war keiner der Mutationsträger adipös, alle BMIs lagen unter 30, was vermuten lässt, dass es sich bei den gefundenen Mutationen um Mutationen ohne Funktionsverlust handelt. Die funktionelle Charakterisierung dieser Mutationen erfolgte in dieser Arbeit. Die funktionelle Charakterisierung ergab nur geringe Unterschiede in den EC_{50} - und den E_{max} -Werten. Lediglich die H158R-Mutation fiel durch eine erhöhte Basalaktivität auf. Dieser Effekt wird im folgenden Abschnitt ausführlich diskutiert. Das deckt sich auch mit der evolutionären Konservierung der Aminosäurepositionen. Von den untersuchten Austauschungen liegt nur die H158R-Mutation an einer zu 100% konservierten Position. Es wurden ausserdem acht bereits beschriebene und charakterisierte Mutationen im KORA-S4-Kollektiv gefunden. Die Mutation T112M wurde in neun Probanden gefunden, von denen nur eine Probandin adipös war. Diese Mutation wurde bereits von verschiedenen Gruppen als funktionell nicht relevant charakterisiert (Tabelle A1). Die Träger der restlichen Mutationen waren nicht adipös. Die Mutationen S127L, R165Q und G181D waren bereits als partielle oder vollständige Funktionsverlustmutationen, die Mutationen R18C, S30F und I226T als wie WT charakterisiert worden (Tabelle A1). Die inaktivierenden Mutationen wurden in normal- oder übergewichtigen, nicht aber in adipösen Probanden gefunden. Bei den bisher untersuchten Kollektiven von Kindern und Jugendlichen mit extremer, frühmanifesten Adipositas wurden je nach Studie 2,5% - 6% Mutationsträger identifiziert (Farooqi et al., 2003). Im KORA-Kollektiv, das Probanden im Alter von 25-74 beinhaltet, konnte kein adipöser Träger einer funktionell relevanten Mutation gefunden werden. Es ist möglich, dass sich der Grad der Adipositas eines MC4R-Mutationsträgers mit fortschreitendem Alter verringert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei englischen MC4R-Mutationsträgern gemacht (Farooqi und O'Rahilly, 2006). Daher kann geschlossen werden, dass Mutationen im MC4R einen größeren Einfluss auf die Adipositas im Kinder- und Jugendalter als auf die Adipositas im Erwachsenenalter haben. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass funktionell relevante MC4R-Mutationen in der deutschen Gesamtbevölkerung selten sind und zur Entwicklung der Adipositasepidemie eine untergeordnete Rolle spielen.

5.4. Die aktivierende Mutation H158R in der zweiten intrazellulären Schleife des hMC4Rs

In einem normalgewichtigen Probanden wurde die heterozygote Mutation H158R identifiziert. Funktionell wurde diese Mutation als konstitutiv aktivierend charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Basalaktivität sowohl bei dem WT-MC4R als auch bei der H158R-Mutante mit dem endogen exprimierten inversen Agonisten AgRP dosisabhängig verringert werden konnte. Desweiteren wurde die Wirkung des AgRP als Antagonist am WT und an der Mutante bei α -MSH-Stimulation untersucht. Hier zeigte sich beim WT-MC4R eine Steigerung der EC_{50} für α -MSH in Gegenwart von hohen AgRP-Konzentrationen. Bei der H158R-Mutante blieb die EC_{50} auch bei 100nM AgRP identisch mit der EC_{50}

in Abwesenheit des Antagonisten. Ein Vergleich mit dem Aminosäurealignment von 70 orthologen MC4-Rezeptoren zeigt die vollständige Konservierung des Histidins an dieser Position. Außerdem ist diese Seitenkette auch in allen fünf humanen Melanocortinrezeptoren konserviert. In anderen Klasse A-GPCRs kommt ein Histidin in der Mitte der zweiten intrazellulären Schleife nicht zwangsläufig vor, obwohl die Länge dieser Schleife zwischen den GPCRs konserviert ist (Otaki et al., 2001). Um zu untersuchen, ob das Fehlen des Histidins oder das Vorhandensein des Arginins die Daueraktivierung der H158R-Mutante verursacht, wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese das Histidin zu einem kleinen und ungeladenen Alanin ausgetauscht. Dieser H158A-Rezeptor wies in funktionellen Untersuchungen eine vergleichbar hohe Basalaktivität wie die H158R-Mutante auf. Dass ein zusätzliches Arginin die Daueraktivität verursacht, ist schon deshalb unwahrscheinlich, da der zwei Aminosäuren weiter aminoterminal gelegene und auch in einigen orthologen vorkommende Austausch Q156R keine Auswirkungen auf die Basalaktivität hatte. Zusammenfassend führen diese Ergebnisse zu dem Schluss, daß das Histidin in der Mitte der zweiten intrazellulären Schleife der Melanocortinrezeptoren eine Rolle für die Stabilisierung des inaktiven Zustandes des MC4R spielt. Es stellt sich allerdings die Frage, warum sich eine so stark konstitutiv aktivierende Mutation nicht phänotypisch auswirkt. Zwar wurde die Mutation nur heterozygot gefunden, eine aktivierende Mutation sollte aber den cAMP-Spiegel in den MC4R-exprimierenden Neuronen erhöhen und so zu einem geringeren Appetit führen. Dass es sich bei dem Melanocortinregelkreis um ein sehr sensibles System handelt, zeigen die adipösen Phänotypen der heterozygoten MC4R-knockout-Mäuse (Huszar et al., 1997) und Punktmutationsträger. Da es sich bei der Adipositas um einen multifaktoriellen Phänotyp handelt, könnte man mutmaßen, daß der Proband ohne die eventuell vor Adipositas schützende Mutation ein höheres Körpergewicht aufweisen würde. Leider ist es im KORA-Kollektiv nicht möglich, weitere Informationen über den Stammbaum des Probanden oder über die Körpergewichtsdaten und Genotypen der Familienmitglieder zu erhalten. Das Vorhandensein des endogenen inversen Agonisten AgRP lässt aber eine andere Erklärung zu: da sowohl POMC- als auch AgRP-exprimierende Neuronen zu denselben MC4R-exprimierenden Neuronen des *Nucleus paraventricularis* projizieren, sind an einer solchen Synapse sowohl Konzentrationen von α - und β -MSH als auch AgRP vorhanden. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß die Basalaktivität der H158R-Mutante durch AgRP gesenkt wird. Die EC_{50} bei α -MSH-Stimulation hingegen wurde nicht durch hohe AgRP-Konzentrationen beeinflusst und lag in etwa bei der des WT-MC4R in Abwesenheit von AgRP. AgRP wirkt also an der H158R-Mutation als inverser Agonist, aber nicht als Antagonist. In einem vereinfacht angenommenen melanocortinergen Regelkreis würde ein daueraktiver Rezeptor theoretisch eine verringerte Nahrungsaufnahme verursachen, was wiederum in niedrigen Leptinspiegeln resultierte. Das hätte eine verringerte POMC- und eine erhöhte AgRP-Expression zur Folge. Nimmt man physiologisch hohe Konzentrationen von AgRP und niedrige Konzentrationen von MSH an, entspräche die intrazelluläre cAMP-Akkumulation der Mutante der des WT-Rezeptors und das System wäre wieder im Gleichgewicht.

Die einzige im MC4R bekannte konstitutiv aktivierende Mutation L250Q wurde paradoxerweise in einer stark übergewichtigen Patientin gefunden (Vaisse et al., 2000). Im Gegensatz zur H158R-Mutation steigt die EC_{50} bei dieser Mutation in Gegenwart von höher werdenden AgRP-Konzentrationen wie beim Wildtyp an, die Basalaktivität läßt sich auch bei dieser Mutation durch

AgRP reduzieren (Proneth et al., 2006). Man könnte postulieren, daß bei hohen AgRP-Konzentrationen die EC_{50} der H158R-Mutation unverändert bleibt, die EC_{50} der L250Q-Mutation aber steigt, was einem partiellen Funktionsverlust entspräche. Hier würden niedrige MSH-Konzentrationen und hohe AgRP-Konzentrationen zu einer geringeren Rezeptoraktivierung als beim WT oder der H158R-Mutante führen, was eine erhöhte Nahrungsaufnahme und Adipositas verursachen würde.

Eine alternative Erklärung wäre die Desensibilisierung von daueraktiven MC4R durch Internalisierung und darauffolgenden Abbau des Rezeptorproteins. Diese Möglichkeit wurde bereits für die L250Q-Mutation diskutiert (Proneth et al., 2006), und würde durch das Fehlen von MC4-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die Unterbrechung des Regelkreises den adipösen Phänotyp des Mutationsträgers erklären. Die Untersuchung der Zelloberflächenexpression der H158R-Mutante ergab keinen Unterschied zur Expression des WT-Rezeptors. Diese Experimente wurden allerdings in transient transfizierten COS-7-Zellen, also in einem Überexpressionssystem durchgeführt. Außerdem exprimieren COS-7-Zellen das zur Internalisierung von GPCRs essentielle Adapterprotein β -Arrestin nur in geringen Mengen (Ménard et al., 1997). In HEK293-Zellen oder in mit β -Arrestin kointransfizierten COS-7 Zellen konnte eine Internalisierung des MC4R und auch des MC3R durch sowohl durch α -MSH als auch durch AgRP gezeigt werden (Breit et al., 2006).

5.5. Die MC4R Mutationen S136F, S127L, S139R und dominant-negative Effekte

Wie aus dem Orthologenvergleich ersichtlich, ist die dritte Transmembrandomäne des MC4R die am höchsten konservierte. In dieser Domäne finden sich fünf zu 100% konservierte Serine. Mutationen an drei dieser Positionen wurden in adipösen Patienten identifiziert. Die heterozygot bei einer extrem adipösen Patientin gefundene S136F-Mutation wurde auf Signaltransduktionseigenschaften untersucht. Der mutierte Rezeptor ist wie der WT an der Zelloberfläche exprimiert und weist auch keine Veränderung in der Ligandenbindung auf. Allerdings findet keine Signaltransduktion in Form von ligandenstimulierter cAMP-Akkumulation statt. Diese Merkmale sind Voraussetzungen für einen eventuellen dominant-negativen Effekt, wie er bereits bei der D90N Mutation im MC4R beobachtet wurde (Biebermann et al., 2003). Im Sandwich-ELISA konnte eine Dimerisierung des WT-MC4R mit dem mutierten S136F-Rezeptor nachgewiesen werden. Eine Erhöhung der EC_{50} um das 3-14-fache konnte für die endogenen MC4R-Liganden sowohl bei Kointransfektion von WT und S136F-Mutante in COS-7-Zellen als auch durch Transfektion der Mutante in stabil mit WT-MC4R transfizierten CHO-Zellen gezeigt werden. Eine Erhöhung der EC_{50} um das Doppelte könnte man durch das „Wegfangen“ des Liganden durch eine signaltransduktionsdefiziente Rezeptormutante erklären, bei einer Erhöhung um das 10-fache handelt es sich um einen klaren dominant-negativen Effekt. Im Bezug auf das ternäre Komplexmodell für die Aktivierung von GPCRs (Kenakin, 2004) ist das Gleichgewicht des WT/Mutante-Heterodimers zum inaktiven Zustand verschoben. Dieser Effekt ist für β -MSH deutlicher als für α -MSH. Da β -MSH vermutlich der im Menschen wichtigere Ligand ist (Biebermann et al., 2006; Lee et al., 2006), kann das durchaus eine physiologische Rolle für die Mutationsträgerin spielen.

Ein auf den Kristallstrukturen des β 2AR beruhendes Computermodell des humanen MC4R wurde am FMP Berlin von Gunnar Kleinau und Gerd Krause entwickelt. In diesem Modell ist zu erkennen, dass

die Asparaginsäure an Position 90 in TM2 und das Serin an Position 136 in TM3 mit dem Asparagin 294 und der Asparaginsäure 298 in TM7 ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk bilden (Abb. 47). Somit liegen D⁹⁰ und S¹³⁶ in derselben Mikrodomäne des Rezeptors und sind über Wassermoleküle miteinander verknüpft.

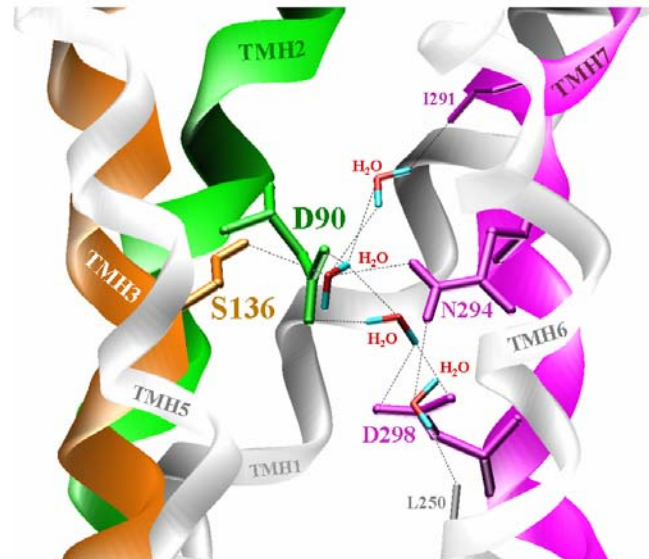


Abbildung 47: Dreidimensionales Strukturmodell des monomeren hMC4R (mit freundlicher Genehmigung von Gerd Krause und Gunnar Kleinau, FMP Berlin). Das Modell wurde basierend auf den Kristallstrukturen des β 2AR erzeugt. Die Aminosäuren D90, S136, N294 und D298 liegen in einer gemeinsamen strukturellen Mikrodomäne und sind über H-Bindungen und vier H₂O Moleküle miteinander verknüpft.

Die Wassermoleküle findet man sowohl in den Röntgenstrukturen des bovinen Rhodopsins als auch im β 2AR (Palczewski et al., 2000; Cherezov et al., 2007).

Das Wasserstoffbrückennetzwerk scheint entscheidend für die Anordnung der Transmembranhelices und für die Aufrechterhaltung des aktivierten Zustandes des MC4Rs zu sein. Mutationen an zwei der Positionen, D90 und S136, wirken sich ähnlich aus. Wahrscheinlich zerstört die Substitution des Serins durch das hydrophobe und sperrigere Phenylalanin das H-Brückennetzwerk. Das führt dazu, dass die durch hydrophobe Abstoßungen hervorgerufene Änderung der Lage des Helixbündels gestört wird und dass der Rezeptor die aktive Konformation in Gegenwart von Liganden nicht mehr annehmen kann. Alle vier Positionen (D90, S136, N294 und D298) sind in über 70 orthologen MC4R zu 100% konserviert. Im Computermodell, das ein Rezeptormonomer beschreibt, sind die Aminosäurereste in das Innere des Rezeptors gerichtet. Daher ist es unwahrscheinlich, dass sie direkt an der Rezeptordimerisierung beteiligt sind. Mutation der Aminosäuren D90 und S136 haben *in vitro* keinen Einfluss auf die Dimerisierung. Es nicht bekannt, wie die Dimerisierung stattfindet und welche Regionen oder Aminosäuren dafür eine Rolle spielen. Extrazelluläre Cysteine konnten für die Dimerisierung des MC4R ausgeschlossen werden (Elsner et al., 2006). Es konnte aber gezeigt werden, dass der Austausch von TM3 und/oder TM2 durch die entsprechenden Regionen des Cannabinoid-Rezeptors Typ 1 (CB1) die Dimerisierung stört (Genetzky, 2007). Der CB1R ist bezogen auf die Aminosäuresequenz der nächste Verwandte der Melanocortinrezeptoren, ist aber nicht in der Lage, mit dem MC4R Heterodimere zu bilden. Für den Chemokinrezeptor konnten zwei kritische Aminosäuren in TM1 und TM4 identifiziert werden, die essentiell für die Dimerisierung und

Signaltransduktion sind (Hernanz-Falcon et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass GPCRs entweder Kontakt-Dimere oder Domain-Swapping-Dimere bilden können. Dominant negative Effekte wären in beiden Modellen vorstellbar.

Die S139R-Mutation wurde in einer adipösen Patientin compound-heterozygot mit der S127L-Mutation gefunden. Der S139R-Rezeptor gelangt nicht an die Zelloberfläche und kann folglich auch nicht signalisieren. Wie schon von anderen gezeigt, weist die S127L-Mutation eine etwas erhöhte Basalaktivität, aber eine zu höheren Werten verschobene EC_{50} auf. Um den nativen Zustand in den Zellen des Patienten zu simulieren, wurden beide Rezeptoren koexprimiert. Hierbei konnte kein dominant-negativer Effekt festgestellt werden, die EC_{50} ist bei α -MSH vergleichbar mit der allein exprimierten S127L-Mutante, bei β -MSH doppelt so hoch. Durch die Kotransfektion der daueraktiven Mutante mit der Funktionsverlustmutante fällt die Basalstimulation allerdings auf einen dem WT entsprechenden Wert. Der dominant-negative Effekt der S127L Mutante wurde bereits untersucht (Elsner et al., 2006), dabei konnte eine Dimerisierung mit dem WT-Rezeptor, aber kein dominant-negativer Effekt gezeigt werden. Ein adipöser Phänotyp der betroffenen Patientin ist hier durch einen Gen-Dosis-Effekt durch einen funktionsuntüchtigen MC4R auf dem einen Allel und durch einen MC4R mit partiellem Funktionsverlust auf dem anderen Allel erklärbar. Da auch die Familienmitglieder, die nur die S139R-Mutation tragen (Abb. A4 im Anhang), massiv adipös sind, ist der Gen-Dosis-Effekt der hier vermutlich entscheidende Mechanismus.

Auch der mögliche Mechanismus der S139R-Mutation wurde anhand des MC4R-Computermodells untersucht. Im Modell interagiert S¹³⁹ über Wasserstoffbrücken mit der Hauptkette von TM2 an der Position des Serins 85 (Abb.48A). S⁸⁵ bildet eine Wasserstoffbrücke zu W¹⁷⁴ in TM4. Alle diese Aminosäuren ragen in das Innere des Membranbündels. Ein Austausch von S¹³⁹ zum grösseren und geladenen Arginin führt möglicherweise zu einer neuen Wasserstoffbrücke (eventuell mit I¹⁷⁰ in TM4). Gleichzeitig wird dadurch die Interaktion von W¹⁷⁴ mit S⁸⁵ gestört (Abb.48B). Das könnte zu einer Instabilisierung und Fehlfaltung des Rezeptors führen.

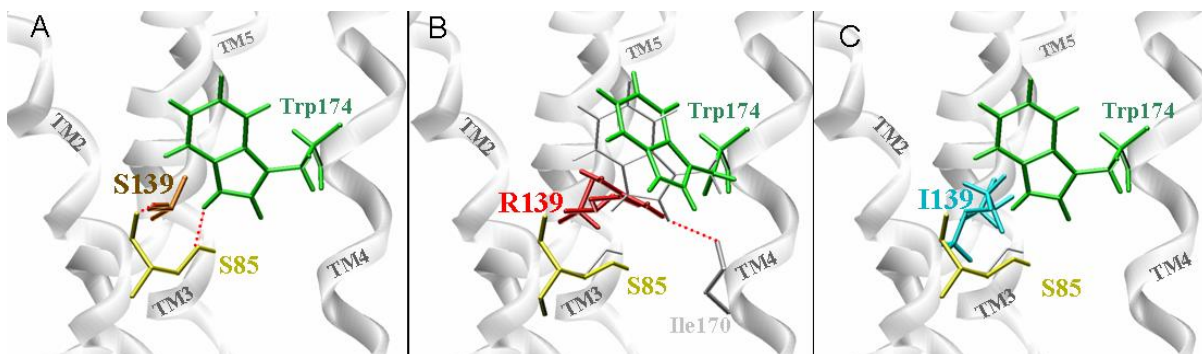


Abbildung 48: Dreidimensionale Strukturmodelle des monomeren hMC4R (mit freundlicher Genehmigung von Gerd Krause und Gunnar Kleinau, FMP Berlin). Das Modell wurde basierend auf den Kristallstrukturen des β 2AR erzeugt. Gezeigt sind Modelle für den WT-MC4R (A), für die S139R-Mutation (B) und für die S139I-Mutation (C). Die Transmembranhelices (TM) sind grau gefärbt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch rote gepunktete Linien gekennzeichnet. Strukturen ausgewählter Aminosäuren sind farbig angegeben. In (B) und (C) geben grau gefärbte Aminosäurenstrukturen die ehemaligen Positionen im WT-Rezeptor an

In Zellkulturexperimenten bewirkte der Austausch des Serinrestes an Position 139 durch Isoleucin eine ~50% E_{max} verglichen mit dem WT Rezeptor, was eine Verbesserung verglichen mit der S139R Mutation darstellt. Im Computermodell liegt das Isoleucin zwischen S⁸⁵ und W¹⁷⁴, verglichen mit dem R¹³⁹-Rezeptor werden die Transmembrandomänen nicht so stark auseinandergedrückt (Abb.48C).

Man könnte annehmen, dass sich Mutationen, die einen dominant-negativen Effekt verursachen, phänotypisch stärker ausprägen als Funktionsverlustmutationen. Phänotypen von Trägern dominant-negativer Mutation müssten somit zwischen heterozygoten Funktionsverlustmutationsträgern und compound-heterozygoten bzw. homozygoten Trägern liegen. Da bisher nur zwei Mutationen mit dominant-negativem Effekt identifiziert wurden, bleibt diese Hypothese aber spekulativ.

5.6. Identifikation des bevorzugten Translationinitiationscodons des humanen MC3R

Neben dem MC4R ist auch der MC3R an der hypothalmischen Gewichtsregulation beteiligt. Neben wenigen in adipösen Patienten identifizierten Punktmutationen werden vor allem zwei zu Aminosäureaustauschenden führenden Polymorphismen T6K und V81I auf Assoziationen mit Adipositas untersucht. Aminoterminal HA-markierte hMC3R-Konstrukte konnten *in vitro* und bei heterologer Expression in COS-7-Zellen nur sehr schlecht an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren der aminoterminal HA-markierte murine MC3R und der humane MC4R sehr gut an der Zelloberfläche detektierbar. Obwohl kaum Oberflächenexpression über immunologische Detektion des HA-Tags des hMC3R nachweisbar war, konnte jedoch eine ligandeninduzierte cAMP-Stimulation beobachtet werden. Das deutet darauf hin, dass der Tag entweder posttranslational abgespalten, oder gar nicht erst translatiert wurde. Der humane MC3R besitzt ein zweites im Leserahmen sitzendes ATG, das 37 Codons weiter 3' im Gen liegt. Ein Vergleich mit einigen orthologen MC3R-Sequenzen zeigte, dass dieses im hMC3R zweite ATG in den meisten Spezies außer dem Menschen und dem Schimpansen das einzige Translationsinitiationscodon ist. Wurde der HA-Tag direkt vor das 2. ATG kloniert, konnte eine dem humanen MC4R entsprechende Zelloberflächenexpression gemessen werden. Der T6K Polymorphismus konnte hierbei nicht untersucht werden, da er bei Benutzung des 2. Startcodons nicht mehr in der codierenden Sequenz liegt. Um auszuschließen, dass es sich bei den gezeigten Effekten um Klonierungsartefakte handelt, wurde ein Bereich des hMC3R Gens beginnend von 90 bp 5' vor dem 1. ATG bis 90 bp 3' des zweiten ATGs vor ein GFP-Reportergen kloniert und durch Mutagenese je eines oder beide Startcodons zu TTG-Codons mutiert. Diese Konstrukte beinhalteten die nativen Sequenzen, die für eine Translationsinitiation des Proteins notwendig sind. Es existiert bisher keine Datenbanksequenz, die die vollständige mRNA mitsamt der 5'UTR des hMC3R angibt. Auch über die Lage des Promoters ist nichts bekannt. Für die hier durchgeführten Experimente wurde eine 5'UTR vor dem 1. ATG von ~90 Basen bzw. von ~200 Basen vom 2.ATG aus gezählt kloniert. Für das Mäusetranskript ist in den Datenbanksequenzen eine ~370 bp lange 5'UTR angegeben. Es zeigte sich in diesen Experimenten, dass nur das zweite ATG (bzw. AUG auf RNA-Ebene) als Translationsstart verwendet wird. Das erste AUG wird nicht benutzt, auch nicht, wenn es das einzig vorhandene ist. Interessanterweise liegt somit die in einigen Studien mit Adipositas assoziierte T6K-

Variante außerhalb des proteinogenen Bereiches. Es konnte bereits gezeigt werden, dass diese Variante keinen Einfluss auf die Signaltransduktion des Rezeptors hat (Feng et al., 2005). Daher wurde der Effekt dieser Variante auf die Translationsinitiation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Translationseffizienz unbeeinflusst von der T6K Variante ist.

In Eukaryonten beginnt der 43S Prä-initiationskomplex den RNA-Strang von der 5' gelegenen CAP-Struktur abzulesen, bis das erste AUG gefunden wird. Im Allgemeinen ist das erste AUG die Stelle, an der der Translationsprozess initiiert wird. Die das AUG-Codon umgebene RNA-Sequenz ist dabei entscheidend, ob das Codon überlesen wird (*leaky scanning*), oder ob hier die Translation beginnt. Marilyn Kozak beschrieb eine Konsensussequenz für einen effektiven Translationsstart in Eukaryonten (Kozak 1981 und 1984). Diese auch als Kozak-Sequenz bezeichnete Konsensussequenz lautet **GCCRCCAUGG** (R bezeichnet ein Purin), wobei die hier fett hervorgehobenen Basen an Position -3 und +4 den größten Einfluss haben. Vergleicht man diese Konsensussequenz mit den Sequenzen der beiden MC3R AUGs, findet man für das erste AUG (GATTGAAUGA) nur eine Übereinstimmung (unterstrichen) an Position -6, für das zweite AUG (ACAGCAATGA) drei Übereinstimmungen an den Positionen -5, -3 und -2. Dieser Vergleich spricht eher für das zweite AUG als wahrscheinlicheres Initiationscodon und stimmt mit den experimentellen Daten überein. Kürzlich wurde durch einen Vergleich von über 2000 humanen Transkripten gezeigt, dass 41% der untersuchten Transkripte ein oder mehrere upstream des eigentlichen Start-AUGs in der 5'UTR gelegene AUGs (uAUGs) besitzen. (Peri und Pandey, 2001). Erstaunlicherweise liegen etwa 48% dieser uAUGs in einem gleich guten oder sogar besseren Kontext als das dazugehörige Start-AUG. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Mechanismen wie *leaky scanning* oder Translationsreinitiation eine größere Rolle spielen als bisher vermutet. Die 5'UTR des μ -Opioid-Rezeptors der Maus besitzt beispielsweise drei im gleichen Leserahmen sitzende uATGs, die mit einem gemeinsamen Stopcodon drei uORFs bilden. Werden diese uAUGs durch Mutagenese deletiert, führt das zu einer effektiveren Translation des Rezeptorproteins (Song et al., 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass diesem Effekt der *leaky-scanning* Mechanismus zugrunde liegt, der zur Regulation der Rezeptorproteinexpression beiträgt.

Da in den Rezeptorkonstrukten der Kontext um das (jeweils erste) ATG identisch ist (5' liegt die UTR des pcDps-Vektors mit einer starken Kozak-Sequenz ACCGCCACCATG; 3' die Sequenz des HA-Tags, vergleiche Abb. 36), und trotzdem das erste ATG überlesen wird, wenn 3' noch ein zweites existiert, deutet das auf eine translationshemmende Wirkung der RNA-Sequenz oder -Struktur des Bereiches zwischen den AUGs hin. Bei einigen Genen existieren sogenannte *internal ribosomal entry sites* (IRES), an denen das Ribosom unabhängig von einer CAP-Struktur ansetzen und am RNA Strang zum nächsten AUG wandern kann. Meistens sind diese Gene viral codiert, es gibt aber auch humane endogene Gene, die eine IRES Sequenz besitzen wie z.B. den IGF-I-Rezeptor (Giraud et al., 2001), VEGF (Huez et al., 1998), oder der für CAP-unabhängige Translation wichtige Faktor UNR (Cornelis et al., 2005). Die mit den Rezeptorkonstrukten erstellten Daten könnten auf eine IRES zwischen den AUGs des MC3Rs hinweisen, es bedarf allerdings noch weiterer Experimente, beispielsweise mit bicystrischen Reporteronstrukten, um hier eine Aussage zu treffen. Bisher wurden IRES in Genen beschrieben, deren Translation auch unter Bedingungen mit geringer CAP-

abhängiger Translation, wie Sauerstoffmangel, Zelltod, Hitzeschock oder der G2/M-Phase des Zellzyklus wichtig ist. Ein physiologischer Sinn für den MC3R unter diesen Bedingungen ist nicht bekannt. Bisher wurde noch kein GPCR beschrieben, der eine IRES besitzt, allerdings konnte schon für den orphan-GPCR GPR34 gezeigt werden, dass auch hier das 3' gelegene AUG bevorzugt zur Translationsinitiation benutzt wird (Engemaier et al., 2006). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte bereits, dass es bei Klonierung des ungetaggenen hMC3R beginnend vom ersten ATG verglichen mit Konstrukten, in denen eines der beiden ATGs durch CTG substituiert wurde keine Unterschiede in der Bindung von NDP- α -MSH, α -MSH und γ -MSH gibt (Schiöth et al., 1996). Leider wurden in dieser Arbeit keine Daten zur Expression der Konstrukte angegeben, es ist jedoch verwunderlich, dass ein Konstrukt ohne 2. ATG in gleicher Höhe exprimiert sein soll als ein WT-Konstrukt.

Zusammenfassend kann man aus diesen Ergebnissen schließen, dass der humane MC3R vom zweiten ATG aus translatiert wird und dass somit der bereits in Assoziationsstudien untersuchte T6K-Polymorphismus nicht im proteinogenen Bereich des Gens liegt. Der Polymorphismus beeinflusst außerdem nicht die Translationseffizienz.

5.7. Identifikation von Sept3 als Protein-Protein-Interaktionspartner von TrkB

Im Yeast-2-Hybrid-Screen konnten mit der hier angewendeten Methode keine Interaktionspartner des MC4R gefunden werden. Da alle untersuchten MC4R-Fragmente Transmembrandomänen beinhalten, ist vermutlich eine für die Aktivierung des Reportergens nötige Kernlokalisierung der Proteine nicht gewährleistet. Hier wäre ein alternativer Ansatz, beispielsweise ein auf das Split-Ubiquitin-System basierender Screen, sinnvoll (Stagljar et al., 1998).

In einem Yeast-Two-Hybrid-Screen konnte eine Interaktion zwischen der juxtamembranären Domäne des TrkB-Proteins und dem Septin Sept3_a nachgewiesen werden. Diese Interaktion konnte *in vitro* mittels GST-Pulldown-Assays bestätigt werden. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen der Bindung der Splicevarianten Sept3_a und Sept3_b an TrkB. Die Bindung geschieht unabhängig von der Phosphorylierung der Shc-Bindungsstelle des TrkB-Rezeptormoleküls. In einem anderen Y2H-Screen mit TrkB-Fragmenten konnte bereits gezeigt werden, dass sich ein aus dem intrazellulären Teil des Rezeptors bestehendes Fragment in Hefe autophosphorylieren konnte. Ein intrazelluläres Fragment ohne die Tyrosinkinasedomäne hingegen wurde unphosphoryliert in den Hefezellen exprimiert (Suzuki et al., 2002). Es ist daher davon auszugehen, dass auch das aus dem Exon 18 bestehende Fragment nicht phosphoryliert vorlag. Daher wurden bereits bekannte Adapter- oder Signalproteine wie Shc, oder Dok5 (Shi et al., 2006), die an die phosphorylierte Shc-Bindungsstelle binden, nicht mit dem Y2H-Screen identifiziert. Die Region der Interaktion konnte auf eine 28 Aminosäuren große, aminoterminal an die Shc-Bindungsstelle angrenzende Region eingegrenzt werden. Desweiteren wurde eine subzelluläre Kolo-kalisation von mit fluoreszierenden Proteinen fusionierten Sept3 und TrkB in neuronal differenzierten PC12-Zellen gezeigt. Da sowohl im Y2H-Screen als auch in den *in vitro*-Pulldownexperimenten ein Septinfragment erst mit der 75. Aminosäure beginnt, fehlen die aminoterminal polybasische Region und die zur GTP-Bindungsdomäne gehörende P-Loop-Region. Die Interaktionsdomäne muß also im C-Terminalen Bereich des Sept3-Proteins liegen und ist vermutlich unabhängig von der GTP-Bindung.

Septine sind eine evolutionär konservierte Familie von GTP-bindenden Proteinen, die beim Trafficking von Vesikeln, bei der Apoptose, bei Umbau des Cytoskeletts, Neurodegeneration und anderen zellulären Vorgängen eine Rolle spielen. In Säugern sind 13 verschiedene Septine bekannt, die in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Hall et al., 2005). Sept3 wird spezifisch im Gehirn und sonst in keinem der getesteten Gewebe exprimiert (Hall et al., 2005; Xue et al., 2004b). In einer anderen Veröffentlichung wurde Sept3 noch zusätzlich zum Gehirn im Herzen und zu einem geringen Teil in der Niere gefunden (Takehashi et al., 2004). Sept3 ist im Gehirn weit exprimiert, in der Ratte konnte Sept3-Protein im Cortex, im Cerebellum, im Sehnerv, im Hippocampus, im Striatum, im Thalamus, im Hypothalamus, im Metencephalon und im Rückenmark nachgewiesen werden (Xue et al., 2004b). Im Alan Brain Atlas ist die mRNA-Expression von Sept3 im Hypothalamus genauer erkennbar, besonders hoch ist sie im PVN, VMH und Arc (www.brain-map.org). Generell konnte Sept3 immunhistochemisch in Gehirnschnitten in Regionen mit hoher Synapsendichte lokalisiert werden. Sept3 wurde zunächst in der Ratte als Substrat der cGMP-abhängigen Protein Kinase (PKG) aber nicht von PKA identifiziert und daher G-Septin genannt (Xue et al., 2000). Im Rattenmodell konnte auch gezeigt werden, dass Sept3 erst im Stadium E18 detektierbar ist, postnatal eine Woche lang ansteigt und dann bis zum 22. postnatalen Tag in konstanter Höhe exprimiert wird. In adulten Tieren konnte eine noch höhere Expression des Proteins gezeigt werden (Xue et al., 2004b). Als Marker für die Entstehung von Synapsen wurde die GTPase Dynamin I benutzt, deren Expression einen ähnlichen Verlauf wie die des Sept3 nahm. In der gleichen Arbeit wurde auch das Vorhandensein von Sept3-Protein in peripheren Membranextrakten von Synaptosomen gezeigt, was für eine spezifische Anreicherung von Sept3 an Nervenenden spricht. Obwohl Septine keine Transmembrandomänen besitzen, weisen sie eine polybasische Region auf, die an membranäre Phospholipide binden kann, wie zunächst für Sept4 gezeigt werden konnte (Zhang et al., 1999). Aufgrund der peripheren Membranlokalisation von Sept3 scheint das auch für dieses Septin zuzutreffen. In hippocampalen Primärkulturen wurde eine Colokalisation von Dynamin I bzw. von dem präsynaptischen Marker Synaptophysin mit Sept3 gezeigt. Beide Proteine spielen eine Rolle in der Prozessierung von synaptischen Vesikeln, was auch eine Funktion für Sept3 für die Endo- oder Exocytose von Vesikeln vermuten lässt (Xue et al., 2004). In elektronenmikroskopischen Studien konnte gezeigt werden, daß Sept3 eher präsynaptisch lokalisiert ist. Es ist bekannt, daß die Neurotrophinrezeptoren nicht nur anterograd sondern auch retrograd signalisieren (zusammengefasst von Zweifel et al., 2005). Nach Bindung des Liganden internalisieren die Trk-Rezeptoren und werden in einem signalisierenden Endosom über einen Dynein-vermittelten Mechanismus an den Mikrotubuli Richtung Nucleus transportiert. Es ist noch nicht bekannt, ob die Internalisierung von Neurotrophinrezeptoren über einen Clathrin/Dynamin-, Caveolin- oder Pincher-vermittelten Mechanismus eingeleitet wird. Viele der Untersuchungen des retrograden Transports wurden mit TrkA durchgeführt, aber auch für TrkB konnte BDNF-induzierte Internalisierung und retrograder Transport gezeigt werden (Watson et al., 1999). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein retrograder Transport des phosphorylierten Rezeptors zum Nucleus nach Stimulation mit BDNF an den Neuriten eine Phosphorylierung von CREB und darauffolgend einen Anstieg der c-Fos-Expression bewirkt. Bedenkt man die durch Colokalisation mit Dynamin und Synaptophysin mögliche Rolle von Sept3 in der Vesikelprozessierung, kann man auf

einen Einfluß von Sept3 auf die Internalisierung und den retrograden Transport von TrkB spekulieren. Kürzlich veröffentlichte Daten belegen, dass Hemmung der Internalisierung von TrkB durch Dynamin- oder Clathrininhibitoren in primären Neuronenkulturen zu einer Verminderung des Akt- aber nicht des Erk-Signalweges führt (Zheng et al., 2008).

Interaktion von Sept3 mit anderen neuronal exprimierten Septinen wie Sept5 und Sept7 konnte in Immunopräzipitationsexperimenten und in Immunfluoreszenzstudien in kultivierten Hippocampusneuronen gezeigt werden (Fujishima et al., 2007). Diese Interaktionen erfolgen über die mittlere, GTP-bindende Domäne. Hier wurde auch bestätigt, dass Sept3 mit seiner polybasischen Region an Phospholipide bindet und dass der P-Loop der Gunaosin-Bindungsdomäne essentiell für die Bildung von Sept3-Oligomerisierung in HEK-293 Zellen ist. In dieser kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde auch eine Sept3-knockout-Maus generiert und untersucht. Es zeigten sich in diesen Mäusen allerdings keine Veränderungen der Gehirnentwicklung und auch die Lokalisation von Synaptophysin in aus knockout-Mäusen kultivierten Neuronen war normal. Die Tiere waren außerdem lebensfähig, fertil und zeigten keine offensichtlichen Verhaltensstörungen. Ob die Tiere ein verändertes Körpergewicht haben oder Veränderungen im Lernverhalten oder des Gedächtnisses aufwiesen, wurde allerdings nicht beschrieben. Hier wäre es interessant, die Nahrungsaufnahme der Sept3-Knockoutmäuse unter verschiedenen Fütterungsbedingungen zu untersuchen.

Es konnte in einem proteomischen Ansatz gezeigt werden, dass Sept3 bzw G-Septin während des Metöstrus des Menstruationszyklus höher exprimiert sind als in den übrigen Phasen (Diao et al., 2007a). In einem Vergleich der hippocampal exprimierten Proteine während des frühen und des späten Metöstrus wurde Sept3 als eines der im späten Metöstrus höher exprimierten Proteine identifiziert (Diao et al., 2007b). Es ist bekannt, daß kognitive Fähigkeiten östrogen- und progesteronabhängig sind (Freeman et al., 1992). Auch konnte eine Östrogenabhängigkeit der hippocampalen synaptischen Plastizität (Woolley et al., 1998) und der Langzeitdepression bzw. Langzeitpotenzierung von hippocampalen Neuronen (Good et al., 1999) gezeigt werden. Da auch TrkB und BDNF bei diesen hippocampalen Prozessen eine Rolle spielen, könnte für Sept3 eine Rolle als Modulator von TrkB in Betracht gezogen werden.

Weitere Experimente sind erforderlich, um eine Modulation von Sept3 auf die TrkB-Signaltransduktion zu zeigen. Ob Sept3 oder dessen Modulation des TrkB-Signalweges im Hypothalamus eine Rolle spielt, muss erst noch weiter untersucht werden.

6. Zusammenfassung

Inaktivierende Mutationen im MC4R sind die häufigste monogenetische Ursache für frühmanifeste Adipositas. Der MC4R ist im Hypothalamus exprimiert und reguliert dort die Nahrungsaufnahme. In dieser Arbeit wurde zunächst der Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren des MC4R aus den Aminosäuresequenzen der MC4R von 70 Vertebraten bestimmt. Die funktionelle Charakterisierung ausgewählter orthologer MC4R ergab nur geringe pharmakologische Unterschiede, daher ist davon auszugehen, dass die konservierten Aminosäuren besonders wichtig, gering konservierte weniger wichtig für die Rezeptorfunktion sind. Ein Vergleich mit in der Literatur beschriebenen humanen Punktmutationen ergab, dass funktionell relevante Mutationen häufiger an konservierten Positionen lagen, wohingegen Mutationen ohne funktionellen Effekt eher an Positionen mit geringem Konservierungsgrad gefunden wurden. Es konnte dadurch eine in der Literatur beschriebene Mutation (V95I) identifiziert und reevaluiert werden. Die bestimmten Konservierungsgrade wurden zur Diskussion weiterer in dieser Arbeit untersuchter Mutationen verwendet und stellen ein nützliches Werkzeug zur Auswertung von in Zukunft gefundenen neuen MC4R-Mutationen dar.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass pharmakologische *in vitro*-Daten mit den Gewichtsverläufen der punktmutationstragenden Tiere übereinstimmen. Die Adipositas der Mäuse mit einer MC4R-Punktmutation, die einen partiellen Funktionsverlust bewirkt (I194F), verlief milder als die der Mäuse mit einer vollständigen Funktionsverlustmutation (Y302C). Diese Mausmodelle sind besser mit den meist heterozygote Punktmutationen tragenden Patienten vergleichbar als herkömmliche knockout-Modelle.

Von Kooperationspartnern wurden in einem Normalpopulationskollektiv neue MC4R-Mutationen identifiziert. Diese neuen Mutationen wurden funktionell charakterisiert. Bis auf die in einem normalgewichtigen Probanden gefundene konstitutiv aktive H158R-Mutation war keine Mutation funktionell relevant. Daher ist zu vermuten, dass MC4R-Mutationen in der Erwachsenenpopulation eine geringere Rolle spielen als in Kollektiven von frühmanifest adipösen Kindern und Jugendlichen. Mit der H158R-Mutation wurde erstmals eine daueraktive, in der zweiten intrazellulären Schleife liegende Mutation gefunden. Das zu 100% konservierte Histidin ist essentiell, den MC4R im inaktiven Zustand zu halten. Es wurde außerdem untersucht, warum sich ein daueraktiver MC4R so wenig auf das Körpergewicht auswirkt. Untersuchungen mit dem endogenen inversen Agonisten AgRP ergaben, dass die Basalaktivität mit AgRP abgesenkt werden konnte. Im Gegensatz zum WT-MC4R konnte der agonistische Effekt von α -MSH nicht durch AgRP kompetitiert werden.

Zwei neue, in extrem adipösen Kindern gefundene MC4R-Mutationen betrafen Serine in der am stärksten konservierten Transmembrandomäne 3. Für beide Mutationen konnte ein kompletter Funktionsverlust gezeigt werden. Die S139R-Mutante wurde nur schwach an der Zelloberfläche exprimiert, und konnte daher auch nicht signalisieren. Die S136F-Mutante hingegen gelangte wie der WT an die Zelloberfläche, zeigte eine unveränderte Ligandenaffinität, konnte aber keine cAMP-Bildung induzieren. Diese Charakteristika wurden bereits bei der MC4R-Mutation D90N beobachtet, für die ein dominant-negativer Effekt gezeigt werden konnte. Auch für die S136F-Mutation konnte eine

Dimerisierung mit dem WT und ein dominant-negativer Effekt gezeigt werden. In einem computerbasierten Strukturmodell des MC4R konnte gezeigt werden, dass die beiden Aminosäuren S¹³⁶ und D⁹⁰ über ein Wasserstoffbrückennetzwerk miteinander verbunden sind.

Die Rolle von Polymorphismen des humanen MC3R in der Adipositas ist umstritten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translation des MC3R erst ab einem weiter 3' liegenden zweiten ATG initiiert wird. Einer der beiden Polymorphismen (T6K) liegt somit außerhalb der proteinogenen Sequenz. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der Polymorphismus keinen Einfluss auf die Stelle und Effektivität der Translationsinitiation hat.

Ein im Signalweg der hypothalamischen Appetitregulation downstream des MC4R gelegener Rezeptor ist der Neurotrophinrezeptor TrkB. In einem Yeast-2-Hybrid-Screen und darauf folgenden GST-Pulldown-Assays konnte die Interaktion des perimembranären GTP-bindenden und neuronal exprimierten Proteins Sept3 mit der juxtamembrandomäne von TrkB gezeigt werden. Die Interaktion geschieht *in vitro* unabhängig von der Phosphorylierung der in der Juxtamembrandomäne gelegenen Shc-Bindungsstelle. In der Literatur beschriebene subzelluläre präsynaptische Kollokalisierung von Sept3 und Dynamin lassen eine Rolle von Sept3 in Endozytose und Internalisierung von TrkB vermuten. Ob das wirklich der Fall ist und inwiefern diese Prozesse in der hypothalamischen Appetitregulation eine Rolle spielen, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit hat einen Beitrag zum Verständnis verschiedener molekularer Mechanismen der hypothalamischen Appetitregulation, Interpretation von MC4R-Mutationen, sowie Genotyp-Phänotyp-Korrelationen geleistet.

7. Literatur

- Adler EM, Gough NR, Blundon JA. **2006**: Differentiation of PC12 cells. *Sci STKE*. 351:tr:9
- Allison DB, Kaprio J, Korkeila M, Koskenvuo M, Neale MC, Hayakawa K. **1996**: The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 20(6): 501-6
- Anand BK, Brobeck JR. **1951**: Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med*. 24(2):123-140
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ. **1999**: Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci*. 19(18): RC26
- Bakker RA, Dees G, Carrillo JJ, Booth RG, López-Gimenez JF, Milligan G, Strange PG, Leurs R. **2004**: Domain swapping in the human histamine H1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 311(1): 131-138
- Baldwin JM. **1993**: The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J*. 12(4): 1693-1703
- Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA. **2001**: Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem*. 276(31): 29171-29177
- Balthasar N, Dalgaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK, Lowell BB. **2005**: Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*. 123(3): 493-505
- Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. **2002**: The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci*. 22(20): 9048-9052
- Berthouze M, Rivail L, Lucas A, Ayoub MA, Russo O, Sicsic S, Fischmeister R, Berque-Bestel I, Jockers R, Lezoualc'h F. **2007**: Two transmembrane Cys residues are involved in 5-HT4 receptor dimerization. *Biochem Biophys Res Commun*. 356(3): 642-647
- Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T, Grüters A. **2003**: Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes*. 52(12): 2984-2988
- Biebermann H, Castaneda TR, van Landeghem F, von Deimling A, Escher F, Brabant G, Hebebrand J, Hinney A, Tschop MH, Grüters A, Krude H. **2006**: A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell Metab*. 3(2): 141-146
- Bouvier M. **2001**: Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2(4): 274-286

-
- Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentos KU, Hoehe MR, Horber FF. **2003**: Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med.* *348(12)*: 1096-1103
- Breit A, Wolff K, Kalwa H, Jarry H, Büch T, Gudermann T. **2006**: The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem.* *281(49)*: 37447-37456
- Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. **2000**: Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* *289(5487)*: 2122-5
- Buckley DJ, Ramachandran J. **1981**: Characterization of corticotropin receptors on adrenocortical cells. *Proc Natl Acad Sci.* *78(12)*: 7431-7435
- Buono P, Pisanisi F, Nardelli C, Ieno L, Capone S, Liguori R, Finelli C, Oriani G, Contaldo F, 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(8)*: 1358-1364
- Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M, Cone RD. **2000**: A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology.* *141(9)*: 3518-3521
- Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. **2000**: Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.* *26(1)*: 97-102
- Chen W, Kelly MA, Opitz-Araya X, Thomas RE, Low MJ, Cone RD. **1997**: Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell.* *91(6)*: 789-798
- Chen ZY, Ieraci A, Tanowitz M, Lee FS. **2005**: A novel endocytic recycling signal distinguishes biological responses of Trk neurotrophin receptors. *Mol Biol Cell.* *16(12)*: 5761-5772
- Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, Rasmussen SG, Thian FS, Kobilka TS, Choi HJ, Kuhn P, Weis WI, Kobilka BK, Stevens RC. **2007**: High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science.* *318(5854)*: 1258-1265
- Chronwall BM, DiMaggio DA, Massari VJ, Pickel VM, Ruggiero DA, O'Donohue TL. **1985**: The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience.* *15(4)*: 1159-1181
- Clark JT, Kalra PS, Kalra SP. **1985**: Neuropeptide Y stimulates feeding but inhibits sexual behavior in rats. *Endocrinology.* *117(6)*: 2435-2442
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lehouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. **1998**: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* *392(6674)*: 398-401

- Cornelis S, Tinton SA, Schepens B, Bruynooghe Y, Beyaert R. **2005**: UNR translation can be driven by an IRES element that is negatively regulated by polypyrimidine tract binding protein. *Nucleic Acids Res.* *33(10)*: 3095-3108
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ. **2001**: Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* *411(6836)*: 480-484
- Cunningham ME, Stephens RM, Kaplan DR, Greene LA. **1997**: Autophosphorylation of activation loop tyrosines regulates signaling by the TRK nerve growth factor receptor. *J Biol Chem.* *272(16)*: 10957-67
- Danforth CH. **1927**: Hereditary adiposity in mice. *J. Hered.* *18*: 868-870
- Deupi X und Kobilka B. **2007**: Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem.* *74*: 137-166
- Diao WF, Höger H, Chen WQ, Pollak A, Lubec G. **2007a**: Estrous-cycle-dependent hippocampal levels of signaling proteins. *Hippocampus.* *17(7)*: 563-576
- Diao WF, Höger H, Chen WQ, Pollak A, Lubec G. **2007b**: Hippocampal signaling protein levels are different in early and late metestrus in the rat. *Biochim Biophys Acta.* *1774(8)*: 1044-1051
- Dubern B, Clément K, Pelloux V, Froguel P, Girardet JP, Guy-Grand B, Tounian P. **2001**: Mutational analysis of melanocortin-4 receptor, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone genes in severely obese children. *J Pediatr.* *139(2)*: 204-209
- Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, Kuhar MJ, Saper CB, Elmquist JK. **1998**: Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron.* *21(6)*: 1375-1385
- Elmquist JK, Bjorbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. **1998**: Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol.* *395(4)*: 535-547
- Elsner A, Tarnow P, Schaefer M, Ambrugger P, Krude H, Grüters A, Biebermann H. **2006**: MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues. *Peptides.* *27(2)*: 372-379
- Engeland A, Bjørge T, Sjøgaard AJ, Tverdal A. **2003**: Body mass index in adolescence in relation to total mortality: 32-year follow-up of 227,000 Norwegian boys and girls. *Am J Epidemiol.* *157(6)*: 517-523
- Engemaier E, Römpler H, Schöneberg T, Schulz A. **2006**: Genomic and supragenomic structure of the nucleotide-like G-protein-coupled receptor GPR34. *Genomics.* *87(2)*: 254-264
- Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, Zhou J, Marks DL, Cone RD. **2000**: The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology.* *141(9)*: 3072-3079
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. **2002**: Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest.* *110(8)*: 1093-1103

- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. **2003**: Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med.* *348(12)*: 1085-1095
- Farooqi S, O'Rahilly S. **2006**: Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev.* *27(7)*: 710-718
- Farrens DL, Altenbach C, Yang K, Hubbell WL, Khorana HG. **1996**: Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin. *Science.* *274(5288)*: 768-770
- Feng N, Young SF, Aguilera G, Puricelli E, Adler-Wailes DC, Sebring NG, Yanovski JA. **2005**: Co-occurrence of two partially inactivating polymorphisms of MC3R is associated with pediatric-onset obesity. *Diabetes.* *54(9)*: 2663-2667
- Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. **2002**: Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA.* *288(14)*: 1723-1727
- Fotiadis D, Liang Y, Filipek S, Saperstein DA, Engel A, Palczewski K. **2003**: Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature.* *421(6919)*: 127-128
- Freeman EW, Weinstock L, Rickels K, Sondheimer SJ, Coutifaris C. **1992**: A placebo-controlled study of effects of oral progesterone on performance and mood. *Br J Clin Pharmacol.* *33(3)*: 293-298
- Fujishima K, Kiyonari H, Kurisu J, Hirano T, Kengaku M. **2007**: Targeted disruption of Sept3, a heteromeric assembly partner of Sept5 and Sept7 in axons, has no effect on developing CNS neurons. *J Neurochem.* *102(1)*: 77-92
- Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. **1993a**: Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *J Biol Chem.* *268(11)*: 8246-5820
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J, Yamada T. **1993b**: Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem.* *268(20)*: 15174-15179
- Genetzky J. **2007**: Untersuchungen zu Dimerisierungsdomänen des humanen MC4-Rezeptors. Diplomarbeit.
- George SR, O'Dowd BF, Lee SP. **2002**: G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* *1(10)*: 808-820
- Gether U. **2000**: Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev.* *21(1)*: 90-113
- Giraud S, Greco A, Brink M, Diaz JJ, Delafontaine P. **2001**: Translation initiation of the insulin-like growth factor I receptor mRNA is mediated by an internal ribosome entry site. *J Biol Chem.* *276(8)*: 5668-5675
- Göhler H, Lalowski M, Stelzl U, Waelter S, Stroedicke M, Worm U, Droege A, Lindenberg KS, Knoblich M, Haenig C, Herbst M, Suopanki J, Scherzinger E, Abraham C, Bauer B, Hasenbank R, Fritzsche A, Ludewig AH, Büssow K, Coleman SH, Gutekunst CA, Landwehrmeyer BG, Lehrach H, Wanker EE. **2004**: A protein interaction network links GIT1, an enhancer of huntingtin aggregation, to Huntington's disease. *Mol Cell.* *15(6)*: 853-865

- Good M, Day M, Muir JL. **1999**: Cyclical changes in endogenous levels of oestrogen modulate the induction of LTD and LTP in the hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci.* *11(12)*: 4476-80
- Gray J, Yeo GS, Cox JJ, Morton J, Adlam AL, Keogh JM, Yanovski JA, El Gharbawy A, Han JC, Tung YC, Hodges JR, Raymond FL, O'rahilly S, Farooqi IS. **2006**: Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes.* *55(12)*: 3366-3371
- Gray J, Yeo G, Hung C, Keogh J, Clayton P, Banerjee K, McAulay A, O'Rahilly S, Farooqi IS. **2007**: Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes.* *31(2)*: 359-364
- Grieco P, Balse PM, Weinberg D, MacNeil T, Hruby VJ. **2000**: D-Amino acid scan of gamma-melanocyte-stimulating hormone: importance of Trp(8) on human MC3 receptor selectivity. *J Med Chem.* *43(26)*: 4998-5002
- Gu W, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB. **1999**: Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes.* *48(3)*: 635-639
- Hadley ME, Hruby VJ, Blanchard J, Dorr RT, Levine N, Dawson BV, al-Obeidi F, Sawyer TK. **1998**: Discovery and development of novel melanogenic drugs. Melanotan-I and -II. *Pharm Biotechnol.* *11*: 575-595
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. **1998**: Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* *1(4)*: 271-272
- Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. **1995**: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* *269(5223)*: 543-546
- Hall PA, Jung K, Hillan KJ, Russell SE. **2005**: Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol.* *206(3)*: 269-278
- Hani EH, Dupont S, Durand E, Dina C, Gallina S, Gantz I, Froguel P. **2001**: Naturally occurring mutations in the melanocortin receptor 3 gene are not associated with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab.* *86(6)*: 2895-2898
- Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nillni EA, Bjørbaek C, Elmquist JK, Flier JS, Hollenberg AN. **2001**: Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* *107(1)*: 111-120
- Hebebrand J, Geller F, Dempfle A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Gerber G, Wermter AK, Horro FF, Blundell J, Schäfer H, Remschmidt H, Herpertz S, Hinney A. **2004**: Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. *Mol Psychiatry.* *9(8)*: 796-800
- Helmert U, Strube H. **2004**: Die Entwicklung der Adipositas in Deutschland im Zeitraum von 1985 bis 2002. *Gesundheitswesen.* *66(7)*: 409-415

- Hernanz-Falcón P, Rodríguez-Frade JM, Serrano A, Juan D, del Sol A, Soriano SF, Roncal F, Gómez L, Valencia A, Martínez-A C, Mellado M. **2004**: Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization. *Nat Immunol.* 5(2): 216-223
- Hetherington AW, Ranson SW. 1940: Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat Rec.* 78: 149-172
- Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J. **2003**: Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(9): 4258-4267
- Hogan K, Peluso S, Gould S, Parsons I, Ryan D, Wu L, Visiers I. **2006**: Mapping the binding site of melanocortin 4 receptor agonists: a hydrophobic pocket formed by I3.28(125), I3.32(129), and I7.42(291) is critical for receptor activation. *J Med Chem.* 49(3): 911-922
- Holst B, Elling CE, Schwartz TW. **2002**: Metal ion-mediated agonism and agonist enhancement in melanocortin MC1 and MC4 receptors. *J Biol Chem.* 277(49): 47662-47670
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. **1996**: A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 273(5277): 974-977
- Huez I, Créancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H. **1998**: Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol.* 18(11): 6178-6190
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. **1997**: Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 88(1): 131-141
- Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS, Ostrega D, Becker KL, Bertagna X, Hutton JC, White A, Dattani MT, Hussain K, Middleton SJ, Nicole TM, Milla PJ, Lindley KJ, O'Rahilly S. **2003**: Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest.* 112(10): 1550-1560
- Jacobson P, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Lönn L, Cowan GS Jr, Sjöström L, Bouchard C. **2002**: Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(10): 4442-4446
- James PT, Rigby N, Leach R; International Obesity Task Force. **2004**: The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 11(1): 3-8

- Jones KR, Fariñas I, Backus C and Reichardt LF. **1994**: Targeted disruption of the brain-derived neurotrophic factor gene perturbs brain and sensory neuron but not motor neuron development. *Cell*. **76**: 989–1000
- Kaplan DR, Martin-Zanca D, Parada LF. **1991**: Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature*. **350(6314)**: 158-160
- Kenakin T. **2004**: Principles: receptor theory in pharmacology. *Trends Pharmacol Sci*. **25(4)**: 186-192
- Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. **2000**: BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J*. **19(6)**: 1290-1300
- Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK. **2003**: Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. **457(3)**: 213-235
- Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M. **1991**: The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*. **66(2)**: 395-403
- Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long LK, Auerbach BA, Joyner AL, Barbacid M. **1993**: Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell*. **75(1)**: 113-122
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. **1999**: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. **402(6762)**: 656-660
- Kopanchuk S, Veiksina S, Mutulis F, Mutule I, Yahorava S, Mandrika I, Petrovska R, Rinken A, Wikberg JE. **2006**: Kinetic evidence for tandemly arranged ligand binding sites in melanocortin 4 receptor complexes. *Neurochem Int*. **49(5)**: 533-542
- Kopelman PG. **2000**: Obesity as a medical problem. *Nature*. **404(6778)**: 635-43
- Kozak M. **1981**: Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res*. **9(20)**: 5233-5252
- Kozak M. **1984**: Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res*. **12(2)**: 857-872
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, von Hippel A, Jaeger U, Johnsen D, Korte W et al. **2001**: Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilk*. **149 (8)**: 807-818
- Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. **1998**: Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*. **9(2)**: 155-157

- Kurth BM, Schaffrath Rosario A. **2007**: The prevalence of overweight and obese children and adolescents living in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. *50(5-6)*: 736-43
- Labbé O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G, Parmentier M. **1994**: Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry*. *33(15)*: 4543-4549
- Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, 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(1)*: 219-224
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. **1996**: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*. *379(6566)*: 632-635
- Lee YS, Poh LK, Loke KY. **2002**: A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. *87(3)*: 1423-6
- Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, Wraight V, Sims M, Vatin V, Meyre D, Shield J, Burren C, Ibrahim Z, Cheetham T, Swift P, Blackwood A, Hung CC, Wareham NJ, Froguel P, Millhauser GL, O'Rahilly S, Farooqi IS. **2006**: A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab*. *3(2)*: 135-140
- Lee YS, Poh LK, Kek BL, Loke KY. **2007**: Role of Melanocortin 3 Receptor Gene in Childhood Obesity. *Diabetes*.
- Lembertas AV, Perusse L, Chagnon YC, Fislser JS, Warden CH, Purcell-Huynh DA, Dionne FT, Gagnon J, Nadeau A, Lusia AJ, Bouchard C. **1997**: Identification of an obesity quantitative trait locus on mouse chromosome 2 and evidence of linkage to body fat and insulin on the human homologous region 20q. *J Clin Invest*. *100(5)*: 1240-7
- Li WD, Joo EJ, Furlong EB, Galvin M, Abel K, Bell CJ, Price RA. **2000**: Melanocortin 3 receptor (MC3R) gene variants in extremely obese women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. *24(2)*: 206-10
- Loos RJ, Rankinen T, Rice T, Rao DC, Leon AS, Skinner JS, Bouchard C, Argyropoulos G. **2005**: Two ethnic-specific polymorphisms in the human Agouti-related protein gene are associated with macronutrient intake. *Am J Clin Nutr*. *82(5)*: 1097-1101
- Lubrano-Berthelie C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C. **2003**: Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet*. *12(2)* : 145-153

-
- Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S, Bertrais S, Hercberg S, Basdevant A, Clement K, 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(5)*: 1811-1818
- Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. **2005**: NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science.* *310(5748)*: 683-685
- Mandrika I, Petrovska R, Wikberg J. **2005**: Melanocortin receptors form constitutive homo- and heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun.* *326(2)*: 349-354
- Marks DL, Hruby V, Brookhart G, Cone RD. **2006**: The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R). *Peptides.* *27(2)*: 259-264
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. **1999**: Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet.* *21(1)*: 119-122
- Martin-Zanca D, Hughes SH, Barbacid M. **1986**: A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature.* *319(6056)*: 743-748
- Mayfield DK, Brown AM, Page GP, Garvey WT, Shriver MD, Argyropoulos G. **2001**: A role for the Agouti-Related Protein promoter in obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* *287(2)*: 568-573
- McGowan MK, Andrews KM, Fenner D, Grossman SP. **1993**: Chronic intrahypothalamic insulin infusion in the rat: behavioral specificity. *Physiol Behav.* *54(5)*: 1031-1034
- Meehan TP, Tabeta K, Du X, Woodward LS, Firozi K, Beutler B, Justice MJ. **2006**: Point mutations in the melanocortin-4 receptor cause variable obesity in mice. *Mamm Genome.* *7(12)*: 1162-1171
- Ménard L, Ferguson SS, Zhang J, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. **1997**: Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol Pharmacol.* *51(5)*: 800-808
- Merlio JP, Ernfors P, Jaber M, Persson H. **1992**: Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience.* *51(3)*: 513-532
- Methner A, Leyboldt F, Joost P, Lewerenz J. **2001**: Human septin 3 on chromosome 22q13.2 is upregulated by neuronal differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* *283(1)*: 48-56
- Michaud EJ, Bultman SJ, Stubbs LJ, Woychik RP. **1993**: The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (Ay/Ay) is associated with the disruption of a novel RNA-binding protein. *Genes Dev.* *7(7A)*: 1203-1213

- Michaud EJ, Bultman SJ, Klebig ML, van Vugt MJ, Stubbs LJ, Russell LB, Woychik RP. **1994**: A molecular model for the genetic and phenotypic characteristics of the mouse lethal yellow (Ay) mutation. *Proc Natl Acad Sci.* *91(7)*: 2562-2566
- Middlemas DS, Lindberg RA, Hunter T. **1991**: TrkB, a neural receptor protein-tyrosine kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Mol Cell Biol.* *11(1)*: 143-153
- Monnot C, Bihoreau C, Conchon S, Curnow KM, Corvol P, Clauser E. **1996**: Polar residues in the transmembrane domains of the type 1 angiotensin II receptor are required for binding and coupling. Reconstitution of the binding site by co-expression of two deficient mutants. *J Biol Chem.* *271(3)*: 1507-1513
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. **1997**: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature.* *387(6636)*: 903-908
- Morrison CD, Morton GJ, Niswender KD, Gelling RW, Schwartz MW. **2005**: Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* *289(6)*: 1051-1057
- Mountjoy KG, Kong PL, Taylor JA, Willard DH, Wilkison WO. **2001**: Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiol Genomics.* *5(1)*: 11-9
- Münzberg H, Huo L, Nillni EA, Hollenberg AN, Bjorbaek C. **2003**: Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology.* *144(5)*: 2121-2131
- Nicholson JR, Peter JC, Lecourt AC, Barde YA, Hofbauer KG. **2007**: Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol.* *19(12)*: 974-982
- Nickolls SA, Maki RA. **2006**: Dimerization of the melanocortin 4 receptor: a study using bioluminescence resonance energy transfer. *Peptides.* *27(2)*: 380-387
- Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. **2001**: AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol.* *15(1)*: 164-167
- Nimnual AS, Yatsula BA, Bar-Sagi D. **1998**: Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the Ras exchanger Sos. *Science.* *279(5350)*: 560-563
- Okada T, Le Trong I, Fox BA, Behnke CA, Stenkamp RE, Palczewski K. **2000**: X-Ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of bovine rhodopsin obtained from mixed micelles. *J Struct Biol.* *130(1)*: 73-80
- Okada T, Fujiyoshi Y, Silow M, Navarro J, Landau EM, Shichida Y. **2002**: Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci.* *99(9)*: 5982-5987

- Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. **1997**: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. *278*(5335): 135-138
- Otaki JM, Firestein S. **2001**: Length analyses of mammalian G-protein-coupled receptors. *J Theor Biol*. *211*(2): 77-100
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. **2000**: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*. *289*(5480): 739-745
- Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. **2007**: Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*. *449*(7159): 228-232
- Peréz P, Coll PM, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV. **1995**: NGF binding to the trk tyrosine kinase receptor requires the extracellular immunoglobulin-like domains. *Mol Cell Neurosci*. *6*(2): 97-105
- Peri S, Pandey A. **2001**: A reassessment of the translation initiation codon in vertebrates. *Trends Genet*. *17*(12): 685-687
- Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. **2004**: Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science*. *304*(5667): 110-115
- Pogozheva ID, Chai BX, Lomize AL, Fong TM, Weinberg DH, Nargund RP, Mulholland MW, Gantz I, Mosberg HI. **2005**: Interactions of human melanocortin 4 receptor with nonpeptide and peptide agonists. *Biochemistry*. *44*(34): 11329-11341
- Pritchard LE, Turnbull AV, White A. **2002**: Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J Endocrinol*. *172*(3): 411-421
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. **1992**: Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol*. *11*(1): 1-20
- Proneth B, Xiang Z, Pogozheva ID, Litherland SA, Gorbatyuk OS, Shaw AM, Millard WJ, Mosberg HI, Haskell-Luevano C. **2006**: Molecular mechanism of the constitutive activation of the L250Q human melanocortin-4 receptor polymorphism. *Chem Biol Drug Des*. *67*(3): 215-229
- Qian S, Chen H, Weingarh D, Trumbauer ME, Novi DE, Guan X, Yu H, Shen Z, Feng Y, Frazier E, Chen A, Camacho RE, Shearman LP, Gopal-Truter S, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Marsh DJ. **2002**: Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol*. *22*(14): 5027-5035
- Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, Burghammer M, Ratnala VR, Sanishvili R, Fischetti RF, Schertler GF, Weis WI, Kobilka BK. **2007**: Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. *450*(7168): 383-387

- Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. **2001**: Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol.* *15(10)*: 1748-1757
- Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA, Bloom SR. **1998**: A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* *139(10)*: 4428-4431
- Sánchez-Laorden BL, Sánchez-Más J, Martínez-Alonso E, Martínez-Menárguez JA, García-Borrón JC, Jiménez-Cervantes C. **2006**: Dimerization of the human melanocortin 1 receptor: functional consequences and dominant-negative effects. *J Invest Dermatol.* *126(1)*: 172-181
- Santini F, Maffei M, Ceccarini G, Pelosini C, Scartabelli G, Rosellini V, Chiellini C, Marsili A, Lisi S, Tonacchera M, Agretti P, Chiovato L, Mammoli C, Vitti P, Pinchera A. **2004**: Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* *89(2)*: 904-908
- Sawyer TK, Sanfilippo PJ, Hruby VJ, Engel MH, Heward CB, Burnett JB, Hadley ME. **1980**: 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity. *Proc Natl Acad Sci.* *77(10)*: 5754-5748
- Schalin-Jantti C, Valli-Jaakola K, Oksanen L, Martelin E, Laitinen K, Krusius T, Mustajoki P, Heikinheimo M, Kontula K. **2003**: Melanocortin-3-receptor gene variants in morbid obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* *27(1)*: 70-74
- Schiöth HB, Chhajlani V, Muceniece R, Klusa V, Wikberg JE. **1996**: Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci.* *59(10)*: 797-801
- Schiöth HB, Muceniece R, Wikberg JE, Szardenings M. **1996a**: Alternative translation initiation codon for the human melanocortin MC3 receptor does not affect the ligand binding. *Eur J Pharmacol.* *314(3)*: 381-384
- Schiöth HB, Muceniece R, Wikberg JE. **1996b**: Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacol Toxicol.* *79(3)*: 161-165
- Schöneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Römpler H, Sangkuhl K. **2004**: Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther.* *104(3)*: 173-206
- Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, Porte D. **1992**: Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology.* *130(6)*: 3608-3616
- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, Weigle DS, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. **1997**: Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes.* *46(12)*: 2119-2123
- Shi L, Liapakis G, Xu R, Guarnieri F, Ballesteros JA, Javitch JA. **2002**: Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch. *J Biol Chem.* *277(43)*: 40989-40996

-
- Shi L, Yue J, You Y, Yin B, Gong Y, Xu C, Qiang B, Yuan J, Liu Y, Peng X. **2006**: Dok5 is substrate of TrkB and TrkC receptors and involved in neurotrophin induced MAPK activation. *Cell Signal*. *18(11)*: 1995-2003
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. **2001**: Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. *50(2)*: 227-232
- Song KY, Hwang CK, Kim CS, Choi HS, Law PY, Wei LN, Loh HH. **2007**: Translational repression of mouse mu opioid receptor expression via leaky scanning. *Nucleic Acids Res*. *35(5)*: 1501-1513
- Spiliotis ET, Nelson WJ. **2006**: Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization. *J Cell Sci*. *119*: 4-10
- Srinivasan S, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin BR, Vaisse C. **2004**: Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest*. *114(8)*: 1158-1164
- Stagljari I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S. **1998**: A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. *95(9)*: 5187-5192
- Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, Yagaloff K, Palmiter RD. **2000**: A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci*. *97(22)*: 12339-12344
- Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR. **1994**: Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- γ 1 to mediate NGF responses. *Neuron*. *12(3)*: 691-705
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM. **2005**: Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci*. *8(10)*: 1356-1363
- Stoilov P, Castren E, Stamm S. **2002**: Analysis of the human TrkB gene genomic organization reveals novel TrkB isoforms, unusual gene length, and splicing mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. *290(3)*: 1054-1065
- Strohmaier C, Carter BD, Urfer R, Barde YA, Dechant G. **1996**: A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*. *15(13)*: 3332-3337
- Stunkard AJ, Foch TT, Hrubec Z. **1986**: A twin study of human obesity. *JAMA*. *256(1)*: 51-54
- Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA. **1996**: Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. *Endocrinology*. *137(5)*: 1627-1633

- Takehashi M, Tanaka S, Stedeford T, Banasik M, Tsukagoshi-Nagai H, Kinoshita N, Kawamata T, Ueda K. **2004**: Expression of septin 3 isoforms in human brain. *Gene Expr.* *11(5-6)*: 271-278
- Talbot SL, Shields GF. **1996**: A phylogeny of the bears (Ursidae) inferred from complete sequences of three mitochondrial genes. *Mol Phylogenet Evol.* *5(3)*: 567-575
- Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. **2006**: Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* *7(2)*: 85-96
- Tao YX, Segaloff DL. **2003**: Functional characterization of melanocortin-4 receptor mutations associated with childhood obesity. *Endocrinology.* *144(10)*: 4544-4551
- Tao YX, Segaloff DL. **2004**: Functional characterization of melanocortin-3 receptor variants identify a loss-of-function mutation involving an amino acid critical for G protein-coupled receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab.* *89(8)*: 3936-3942
- Tao YX, Segaloff DL. **2005**: Functional analyses of melanocortin-4 receptor mutations identified from patients with binge eating disorder and nonobese or obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* *90(10)*: 5632-5638
- Tarnow P, Schoneberg T, Krude H, Gruters A, Biebermann H. **2003**: Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. *J Biol Chem.* *278(49)*: 48666-48673
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E, Heiman ML. **2001**: Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* *50(4)*: 707-709
- Unger TJ, Calderon GA, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M. **2007**: Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J Neurosci.* *27(52)*: 14265-14274
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P. **1998**: A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet.* *20(2)*: 113-114
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. **2000**: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest.* *106(2)*: 253-62
- Valli-Jaakola K, Lipsanen-Nyman M, Oksanen L, Hollenberg AN, Kontula K, Bjorbaek C, Schalin-Jantti C. **2004**: Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese finnish children and adults. *J Clin Endocrinol Metab.* *89(2)*: 940-945
- Van der Ploeg LH, Martin WJ, Howard AD, Nargund RP, Austin CP, Guan X, Drisko J, Cashen D, Sebhat I, Patchett AA, Figueroa DJ, DiLella AG, Connolly BM, Weinberg DH, Tan CP, Palyha OC, Pong SS, MacNeil T, Rosenblum C, Vongs A, Tang R, Yu H, Sailer AW, Fong TM, Huang C, Tota MR, Chang RS, Stearns R, Tamvakopoulos C, Christ G, Drazen DL, Spar BD, Nelson RJ, MacIntyre DE. **2002**: A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci.* *99(17)*: 11381-11386

- VanLeeuwen D, Steffey ME, Donahue C, Ho G, MacKenzie RG. **2003**: Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal di-isoleucine sequence at codons 316/317. *J Biol Chem.* *278(18)*: 15935-15940
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT, Brown A, Rodriguez SS, Weller JR, Wright AC, Bergmann JE, Gaitanaris GA. **2003**: The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci.* *100(8)*: 4903-4908
- Vongs A, Lynn NM, Rosenblum CI. **2004**: Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul Pept.* *120(1-3)*: 113-118
- Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, Pomeroy SL, Segal RA. **1999**: Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci.* *19(18)*: 7889-7900
- Wess J. **1998**: Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther.* *80(3)*: 231-264
- Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SG, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK. **2007**: A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci.* *104(18)*: 7682-7687
- Whorton MR, Jastrzebska B, Park PS, Fotiadis D, Engel A, Palczewski K, Sunahara RK. **2008**: Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *J Biol Chem.* *283(7)*: 4387-4394
- Widmer HR, Kaplan DR, Rabin SJ, Beck KD, Hefti F, Knusel B. **1993**: Rapid phosphorylation of phospholipase C gamma 1 by brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in cultures of embryonic rat cortical neurons. *J Neurochem.* *60(6)*: 2111-2123
- Wilding JP, Gilbey SG, Bailey CJ, Batt RA, Williams G, Ghatei MA, Bloom SR. **1993**: Increased neuropeptide-Y messenger ribonucleic acid (mRNA) and decreased neurotensin mRNA in the hypothalamus of the obese (ob/ob) mouse. *Endocrinology.* *132(5)*: 1939-1944
- Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. **1999**: Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology.* *70(5)*: 306-316
- Wise A, Gearing K, Rees S. **2002**: Target validation of G-protein coupled receptors. *Drug Discov Today.* *7(4)*: 235-246
- Wong J, Love DR, Kyle C, Daniels A, White M, Stewart AW, Schnell AH, Elston RC, Holdaway IM, Mountjoy KG. **2002**: Melanocortin-3 receptor gene variants in a Maori kindred with obesity and early onset type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* *58(1)*: 61-71
- Woolley CS. **1998**: Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm Behav.* *34(2)*: 140-148
- World Health Organization. **2000**: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* *894:i-xii*: 1-253

- Wortley KE, Anderson KD, Yasenchak J, Murphy A, Valenzuela D, Diano S, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Sleeman MW. **2005**: Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. *Cell Metab.* 2(6): 421-427
- Xiang Z, Litherland SA, Sorensen NB, Proneth B, Wood MS, Shaw AM, Millard WJ, 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(23): 7277-7288
- Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. **2000**: The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci.* 20(18): 6888-6897
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. **2003**: Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci.* 736-742: 6(7)
- Xue J, Wang X, Malladi CS, Kinoshita M, Milburn PJ, Lengyel I, Rostas JA, Robinson PJ. **2000**: Phosphorylation of a new brain-specific septin, G-septin, by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 275(14): 10047-10056
- Xue J, Tsang CW, Gai WP, Malladi CS, Trimble WS, Rostas JA, Robinson PJ. **2004**: Septin 3 (G-septin) is a developmentally regulated phosphoprotein enriched in presynaptic nerve terminals. *J Neurochem.* 91(3): 579-590
- Yang W, Kelly T, He J. **2007**: Genetic epidemiology of obesity. *Epidemiol Rev.* 29: 49-61
- Yang YK, Fong TM, Dickinson CJ, Mao C, Li JY, Tota MR, Mosley R, Van Der Ploeg LH, Gantz I. **2000**: Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor. *Biochemistry.* 39(48): 14900-14911
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. **1999**: Obesity in the mouse model of proopiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med.* 5(9): 1066-1070
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S. **1998**: A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet.* 20(2): 111-112
- Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BG, 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(5): 561-574
- Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS. **2004**: A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci.* 7(11): 1187-1189
- Zhang J, Kong C, Xie H, McPherson PS, Grinstein S, Trimble WS. **1999**: Phosphatidylinositol polyphosphate binding to the mammalian septin H5 is modulated by GTP. *Curr Biol.* 9(24): 1458-1467

-
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. **1994**: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. *372(6505)*: 425-32
- Zheng J, Shen WH, Lu TJ, Zhou Y, Chen Q, Wang Z, Xiang T, Zhu YC, Zhang C, Duan S, Xiong ZQ. **2008**: Clathrin-dependent Endocytosis Is Required for TrkB-dependent Akt-mediated Neuronal Protection and Dendritic Growth. *J Biol Chem*. *283(19)*: 13280-13288
- Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. **2005**: Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci*. *6(8)*: 615-625

8. Anhang

Tabelle A1: Natürlich vorkommende Mutationen des humanen MC4R. In der ersten Spalte ist die Position und die WT-Aminosäure angegeben, in der zweiten Spalte die Aminosäuren der entsprechenden Mutationen und in der dritten Spalte die in > 70 Orthologen gefundenen Variationen. In der letzten Spalte ist das Ergebnis der funktionellen Charakterisierung angegeben (**WT**=kein Funktionsverlust, wie WT; **Partiell**=partieller Funktionsverlust und **Vollst.**=vollständiger Funktionsverlust) und die Literaturquelle, in der die Charakterisierung durchgeführt wurde. Wurde die Mutation zwar gefunden aber nicht charakterisiert, ist das mit einem ? angegeben und die Literaturangabe bezieht sich auf die Identifizierung der Mutation.

Position	Mutation zu	Orthologe Varianten	Funktion
Arg7	His, Cys	His, Leu, Pro, Ser	WT (Biebermann, unpubliziert) ?(Lubrano-Barthellier et al, 2003)
Thr11	Ser, Ala	Ala, Pro Leu, His, Gln, Glu, Ser	WT (Tao und Segaloff, 2005; Xiang et al., 2006)
Arg18	Cys, His, Leu	His, Leu, Gln, Ala	WT (Xiang et al., 2006)
Ser30	Phe	Pro, Thr, Ala, Glu, Gly	WT (Xiang et al., 2006, 10, Hinney et al., 2003)
Ser36	Tyr	Pro, Leu, Gly, Ala, Phe, His	? (Larsen et al., 2005)
Asp37	Val	Glu, Ser, Ala, Thr	WT (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Pro48	Ser	Thr	WT (Tao und Segaloff, 2003)
Val50	Met		WT (Tao und Segaloff, 2003)
Phe51	Leu	Cys	WT (Tao und Segaloff, 2005)
Ser58	Cys		Partiell (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Asn62	Ser		Partiell (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Ala70	Thr	Ser, Val, Ile	WT (Biebermann, unpubliziert)
Pro78	Leu		Partiell (Hinney et al., 2003), Vollst. (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Asp90	Asn		Vollst. (Biebermann et al., 2003)
Ser94	Arg	Arg	Vollst. (Hinney et al., 2003)
Val95	Ile	Ile	Vollst. (Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003)
Asn97	Asp	Ile	Vollst. (Xiang et al., 2006; Yeo et al., 2003)
Gly98	Arg	Ala	Vollst. (Tao und Segaloff, 2003)
Ile102	Ser, Thr	Val	Partiell (Tao und Segaloff, 2005, Xiang et al. 2006)
Val103	Ile	Ala, Phe	WT (Vaisse et al., 2000, Xiang et al., 2006, Gu et al., 1999)
Leu106	Pro	Met	Vollst. (Xiang et al., 2006, Yeo et al., 2003)
Thr112	Met, Lys	Lys, Leu, Ser, Gly	WT (Biebermann, unpubliziert, Tao und Segaloff, 2005, Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003, Gu et al., 1999, Valli-Jaakola et al., 2004)
Ile121	Thr	Met, Val	Partiell (Hinney et al., 2003)
Ile125	Lys	Phe, Leu	Vollst. (Xiang et al., 2006, Yeo et al., 2003)
Ser127	Leu		Konst (Hinney et al., 2003), Partiell (Xiang et al., 2006, Valli-Jaakola et al., 2004)
Ile137	Thr		Partiell (Xiang et al., 2006, Gu et al., 1999)
Thr150	Ile	Leu	Partiell (Vaisse et al., 2000, Xiang et al., 2006)
Ala154	Asp		WT (Tao und Segaloff, 2005)
Gln156	Pro, Arg	Arg, Asp	WT (Biebermann, unpubliziert)
Tyr157	Ser		Partiell (Tao und Segaloff, 2003)
Arg165	Trp, Gln		Partiell (Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003, Yeo et al., 2003)
Ile169	Ser	Val, Thr, Met	WT (Xiang et al., 2006)
Ile170	Val	Leu, Thr	WT (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Trp174	Cys		? (Buno et al., 2005)
Ala175	Thr	Thr, Ser	WT (Xiang et al., 2006), Partiell (Yeo et al., 2003)
Thr178	Met	Met, Val, Ser, Ile	WT (Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003)
Gly181	Asp		Vollst. (Hinney et al., 2003)

Met200	Val	Val, Thr, Ile	WT (Tao und Segaloff, 2005)
Phe202	Leu	Leu	? (Jacobson et al., 2002)
Ala219	Val		Partiell (Larsen et al., 2005)
Ile226	Thr		WT (Valli-Jaakola et al., 2004)
Pro230	Leu		WT (Xiang et al., 2006), Const (Hinney et al., 2003)
Gly231	Ser		? (Ma et al., 2004)
Arg236	Cys	His, Trp	? (Lubrano-Barthellier et al, 2003)
Asn240	Ser	Ser (platypus, tuna, red perch)	Partiell (Tao und Segaloff, 2005)
Ala244	Glu		Partiell (Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003)
Leu250	Gln		Const (Vaisse et al., 2000, Xiang et al., 2006)
Ile251	Leu	Leu	WT (Vaisse et al., 2000, Xiang et al., 2006, Hinney et al., 2003)
Gly252	Ser		WT (Hinney et al., 2003), Partiell (Xiang et al., 2006)
Val253	Ile	Ile (tuna, red perch)	WT (Xiang et al., 2006), Partiell (Yeo et al., 2003)
Ile269	Asn	Val	? (Lubrano-Barthellier et al, 2003)
Cys271	Tyr, Arg		Vollst. (Yeo et al., 2003) Partiell (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff. 2003. Tarnow et al.. 2003)
Asn274	Ser		WT (Xiang et al., 2006, Tao und Segaloff, 2003)
Ser295	Pro	Ala	WT (Tao und Segaloff, 2005)
Pro299	Ser, His		Vollst. (Xiang et al., 2006)
Ile301	Thr		Partiell (Vaisse et al., 2000, Xiang et al., 2006)
Glu308	Lys		Partiell (Santini et al., 2004)
Ile316	Ser	Met	Partiell (Xiang et al., 2006, Yeo et al., 2003, VanLeeuwen et al., 2003)
Ile317	Thr	Phe, Cys, Val, Met	WT (Xiang et al., 2006), Partiell (VanLeeuwen et al., 2003)
Leu325	Phe	Ile	Vollst. (Larsen et al., 2005)

H.sapiens	-MVNSTHR--	---CMHTSLH	LWNRSSYR-L	HSNASESLGK	CYSDC--GCY	EQLFVSPVFF	VTLGVISLLE	NILVIVAIAR	MKQLHSPMYF	FICSLAVADM	LVSVSNGSRT	IVITLLNSTD	
C.jacchus	-----	-----	F-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P.troglodytes	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	G.	
M.mullata	-----	---A---	---H---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M.ascicularis	-----	---A---	---H---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P.pygmaeus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
L.catta	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
S.schneus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.aethiops	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M.spretus	-----	MMNST	HHH.Y	---G-	---G-	---HP-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M.muscobus	-----	MMNST	HHH.Y	---G-	---G-	---HP-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
R.norregicus	-----	MMNST	HHH.Y	---HC-	---G-	---H-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A.nomagensis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P.dugraci	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P.obesus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.porcillus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M.surinus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A.cahirinus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
B.scutorostrata	-----	-----	---T---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
B.taumus	-----	MMNST	QPL	---S---	AHG-M	PT.V	---A-	-----	-----	-----	-----	-----	
S.scrofa	-----	MMNST	HHH	---F---	T.G-	---P---	---E-	-----	-----	-----	-----	-----	
O.aries	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
H.iberiensis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.sinnam	-----	-----	---SA-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
F.canus	-----	-NSTH.H-	-----	---F---	T.G-P	---P---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.familiaris	-----	-NSTLQH-	-----	---F---	T.G-Q	---G.T---	---P---	-----	-----	-----	-----	-----	
L.hara	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
P.sibirica	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
Z.californianus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
U.arctos	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
H.malayanus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
U.maritimus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	I	
U.americanus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
N.nasua	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
U.thibetanus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
T.onatus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
A.melanoleuca	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
N.procyonoides	-----	-----	-----	-----	-G.T	---P---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
V.vulpes	-----	-NSTLQH-	-----	---F---	T.G-Q	---T---	---P---	-----	-----	-----	-----	-----	
P.leo	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
T.maratus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
E.macrotus	-----	-M...	HS-	---TR-	---F---	G-	---D---	-----	-----	-----	-----	-----	
L.africana	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
E.tchikiri	-----	MMNST	HQP.TR	---F---	H.N-	---PG-	---P---	---A--R-	-----	-----	-----	-----	
E.europaeus	-----	-----	-----	---F---	H.T.G-	---RC	---T.V	---L---	-----	-----	-----	R	
S.sranicus	-----	-----	-----	-----	---DA-	---R	---AK-	---A--	-----	-----	-----	V	
R.lio	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
M.albescens	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A.I.G.	
M.lucifagus	-----	MMNST	HHHR	---FR-	L.TH-	---P---	---N.E-	---A.Q-	-----	-----	-----	T.A.I.G.	
T.belangeri	-----	-M.A.	HRT	---VVDS-	---F---	G-	---T---	-----	-----	-----	-----	A.I.G.	
P.capensis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
D.norencinctus	-----	---H-	-----	---F---	G-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	I	
C.didactylus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	I	
M.domestica	-----	MMNSTHYVH-	-----	---PT-	---F---	-H.V-	---S	---NDTI-	---L---	-----	-----	D	
M.proboscidens	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
O.auratus	-----	MMNSS	HPH.A.LP.R	---F---	H.QG-	---ACT	---P.AP.Q	---QA	---SC-	---V---	---I.M.	---V.A-	L
G.gallus	-----	MMFT	QHR.TLQP	---F---	Q.NG-	---PG-	---PSA	---H.S-	-----	-----	---I	---V---	MI
A.anser	-----	MMFT	QHR.TLQP	---F---	H.NG-	---CG-	---PHA	---H.S-	-----	-----	---I	---V---	N
X.tropicalis	-----	-MVCIMFT	HHHEP.H-	---YR-	H.RTV-C	---AG-	---NDTKE	---HHS-	-----	---I.T.	---IV.M.	---A.SR	F.V.P.T.
G.aculeatus	-----	MMNST	QSG.LIQCT	---NRSA	CV--	---SPPDNDLAAE	---K.ASA-	-----	---LI.T.	---L.I.	---L.V.	---VA.V.	A.A.IAGGT
D.serio	-----	MMTS	HHH.L.H.FR	---NHSQ-	-----	---ALPVGKPSH	---DRGSAS-	-----	---LI.T.	---L.LV.	---A.V.	---VA.V.	L.A.V.MA.ITGGN
H.hippoglossus	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---LI.T.	---L.LV.	---A.V.	---VA.V.	A.A.I.GGN
T.nigroviridis	-----	MMAT	DPP.LIQDYN	---NCSQT-	-----	---LEADFPDE	---EERESST-	-----	---LI.T.	---L.LV.	---GGA.V.	---VA.V.	A.A.I.GGT
C.surinus	-----	MMTS	HHH.P.H.YR	---NHSQ-	-----	---ALPVGKPDQ	---ERGSST-	-----	---LI.T.	---L.LV.	---A.V.	---VA.V.	L.A.V.MA.ITGGN
C.carpio	-----	MMTS	HHH.LQH.YR	---NHSQ-	-----	---ALPVGKPAQ	---ERGSAS-	-----	---LI.T.	---L.LV.	---A.V.	---VA.V.	L.A.V.MA.ITGGN
O.mykiss	-----	MMNST	DHQ.LISVCY	---TR.L	---TAGT.	---GTLNKD	---E.V	---IK.SST-	-----	---LI.T.	---L.LV.	---A.V.	A.A.I.GGN
S.scantius	-----	MMNSS	FHHRLPETPQ	---R.H.	---	---VARFASAN.S	---RSDCFSS-	-----	---WI.T.	---L.IF.	---A.V.	---VA.V.	AW.F.AM.K.RH
T.subripes	-----	MMAT	DPP.RVQDFS	---NCSQT-	-----	---PETDFPNE	---E-KESST-	-----	---MLI.T.	---L.I.	---VA.V.	---VA.V.	A.A.I.GT
T.chinensis	-----	MMAT	DPP.RVQDFS	---NCSQT-	-----	---PETDFPNE	---E-KESST-	-----	---MLI.T.	---L.I.	---VA.V.	---VA.V.	A.A.I.GT
T.poesilonotus	-----	MMAT	DPP.RVQDFS	---NCSQT-	-----	---PETDFPNE	---E-KESST-	-----	---MLI.T.	---L.I.	---VA.V.	---VA.V.	A.A.I.GT

Abbildung A1: Aminosäurealignment orthologer MC4R. Mit dem humanen MC4R (erste Zeile) identische Aminosäuren sind als Punkte dargestellt, fehlende als Striche. Vom der Sequenz des hMC4R abweichende Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben Code dargestellt.

H. sapiens	TD-AQSFTVN	IDNVIDSVIC	SLLASICSL	LSIAVDRVFT	IPYALQYHNI	MTVKRVCISI	SCINAACTVS	GILFIIYSDS	SAVIICLITH	FFTMLALMAS	LYVHMPLMAR	LHIKRIAVLP
C. jacchus									E			
P. troglodytes												
M. mulatta												
M. fascicularis						R. I.						
P. pygmaeus								V				
L. catta												
S. schimms												
C. aethiops												
M. spretus						R. I.						
M. musculus						R. I.		V	S	V		
R. norvegicus						R. I.		V	S	V		
A. nannacusensis						R. I.		V	S	V		
P. duprasi						R. I.		V	S	V		
P. obesus						R. I.		V	S	V		
C. porcellus						R. I.						
M. auratus						R. I.						
A. californicus		X				R. I.						
B. acutirostrata		G				A. I.				V		
B. taeniurus		D				A. T.	A	V		V		
S. scrofa						R. I.		V		V		
O. aries					S	R. A. T.	A	V		V		
H. iberiensis						R. I.						
C. sinum						R. I.						
F. catus						R. I.						
C. familiaris						R. I.						
L. hirta						R. I.						
F. sibirica		X				R. I.						
Z. californianus						R. I.						
U. arctos						R. I.						
H. malayanus						R. I.						
U. marinus						R. I.						
U. americanus						R. I.						
N. nasuta						R. I.						
U. thibetanus						R. I.						
T. ornatus						R. I.						
A. melanoleuca						R. I.						
N. procyonoides						R. I.						
V. vulpes						R. I.						
P. leo						R. I.		V				
T. monstus						R. I.						
E. macinus						R. I.						
L. africana						R. I.						
E. telhara						IL		V				F
E. europaeus						VI		T				
S. uraneus						R. I.		S				
R. lo						IL	V	A		V	SV	L
M. albescens		K	S	E		IL		A		E	V	SV
M. hirsutus		K	P	SE		IL		A		E	V	SV
T. belangeri						R. I.						
P. capensis						R. I.						
D. novemchicus		S		L		R. I.	G		V	E	A	
C. didactylus						R. I.						
M. domestica						R. I.						
M. proboscideus			G			C	A	IL	T			
O. anatinus		GGA		A		T	GR	VI	C	T	A	VAT
G. gallus												
A. niger												
X. tropicalis		KN	T	HII	V	IL						
G. aculeatus		LTIPVALEN	M	F	M							
D. rerio		LTNRE	IIK	M	F	M						
H. hippoglossus		LTIPVTLIKS	M	F	M							
T. nigroviridis		LTIPARLIK	M	F	M							
C. auratus		LTNRE	IIK	M	IF	M						
C. carpio		LTNRE	IIK	M	IF	M						
O. mykiss		LTNRE	IIK	M	IF	M						
S. scardafias		LTADENLIK	M	F	M							
T. trutta		LTIPATLIK	M	F	M							
T. chunensis		LTIPATLIK	M	F	M							
T. poecilnotus		LAIPATLIK	M	F	M							

Fortsetzung Abb. A1

H.sapiens	CTGAIRQGAN	MKGAITLTLI	IGVFWVCWAP	FPLHLIFYIS	CPQNPYCVCF	MSHFNLVLLI	IMCNSIIDPL	IYALRSQELR	KTFKEIICCY	PLGC-LCDLS	SRY--
D.jacchus							V			S	
P.troglodytes											
M.mulatta							V				
M.fascicularis							V				
P.pygmaeus											
L.catta	T										
S.schreus											
D.aethiops							V				
M.spretus	T	T		L			AV		F	I.E	
M.muscuhus	T	T		L			AV		F	I.E	
R.norvegicus	T			L			AV		F	I.E.P.G	
A.nomasuensis	T			L			AV				
P.digarsi	T			L			AV				
P.obesus	P			L			AV				
P.porcillus	T			L			AV		AI	WEA	
M.suratus	T			L			AV		AI	WEA	
A.cahirinus	T			L			AV				
B.acutorostrata	T								AI	WRP-V	
B.taurus	S.T									S	
B.scrofa	T										
D.aries							V				
H.liberiensis											
D.stamm	T										
F.catus	T										
F.familiaris	T										
L.lutra											
P.sibirica	R.T										
L.californianus	T										
U.arctos	T										
H.malayanus	T										
U.maritimus	T								LLL	S	
U.americanus	T										
N.nasua											
U.thibetanus	T										
F.ornatus	T										
A.melanoleuca	T										
N.procyonoides											
V.vulpes	T										
P.leo	T										
F.manatus											
E.macdonus	T						V				
L.africana	T						V				
E.telhiri										S.D	
E.europaensis	P.H									S	RY--
J.arnensis	T		V								N
R.io	T.H										
M.albescens	T			T.A	H		L				
M.laciniatus	T			T.A	R		L		N		VRS
F.belangeri	T						V	P		R	P
P.cupensis	VH						V				
D.noveboracensis	P	P			T						
D.didactylus											
M.domestica	T					F				T	P.A.G
M.proboscidens											
D.auratus	P.V	S	V		V	H				D.VY	S
F.galbus	P					Y	F		F	C.N.R	P.GK
A.anser	P					Y	F		F	C.S.R	P.GK
K.tropicalis	NSV	VT		L.A	S	V	R	I	V	MM	CM.IW.F.S
F.aculeatus	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M
D.nerio	N.P.W.A		I	L	LM	R		M	V	I	F.M
H.hippoglossus	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M
F.riogroviensis	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M
F.suratus	N.P.W.A		I	L	LM	R	I	M	V	I	F.M
D.carpio	NAP.W.A		I	L	LM	R	I	M	V	I	F.M
D.mykiss	NVP	R		L	LM	R	A	M	V	I	F.M
F.acanthias	N	V	A		L	M	LM		M	V	I
F.rubripes	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M
F.chinensis	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M
F.pocilonotus	NAP.H	R		L	LM.T	R	T	M	V	I	F.M

Fortsetzung Abb. A1

Tabelle A2: Bezeichnung und Herkunft der für das Alignment der Orthologen MC4R verwendeten Sequenzen bzw. DNA-Materials

Name	Spezies	Quelle
Mammalia Primaten		
Weissbüschelaffe	<i>Callithrix jacchus</i>	Dr T. Haaf, MPI molekulare Genetik Berlin, Deutschland
Schimpanse	<i>Pan troglodytes</i>	NCBI accession: XM_523945.2
Rhesusaffe	<i>Macaca mulatta</i>	NCBI accession: XM_001088600.1
Javaneraffe	<i>Macaca fascicularis</i>	NCBI accession: AB083317.1
Orangutan	<i>Pongo pygmaeus</i>	Dr M. Rocchi, University of Bari, Italy
Katta	<i>Lemur catta</i>	Dr J. Rhyne, University of Maryland, Baltimore, USA
Totenkopffäffchen	<i>Saimiri sciureus</i>	Dr W. Enard, MPI, Leipzig, Deutschland
Grüne Meerkatze	<i>Cercopithecus aethiops</i>	ATCC – cell collection
Mensch	<i>Homo sapiens</i>	NCBI accession: NM_005912.2
Mammalia Rodentia		
Algerische Hausmaus	<i>Mus spretus</i>	NCBI accession: AY684821.1
Hausmaus	<i>Mus musculus</i>	NCBI accession: NM_016977.2
Wanderratte	<i>Rattus norvegicus</i>	NCBI accession: NM_013099.2
Namaqua Buschratte	<i>Aethomys namaquensis</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Fettschwanz Rennmaus	<i>Pachyuromys duprasi</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Fette Sandratte	<i>Psammomys obesus</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Meerschwein	<i>Cavia porcellus</i>	Dipl. Biol. M. Buske, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland
Goldhamster	<i>Mesocricetus auratus</i>	Dipl. Biol. M. Buske, Umweltbundesamt, Berlin, Deutschland
Ägyptische Stachelmaus	<i>Acomys cahirinus</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Mammalia Macrosceliddea		
Rüsselspringer	<i>Macroscelides proboscideus</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Mammalia Cetartiodactyla		
Minkwal	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	Dr P. J. Palsboll, University of Wales, U.K.
Rind	<i>Bos taurus</i>	NCBI accession: AF265221.1
Hausschwein	<i>Sus scrofa domestica</i>	NCBI accession: AB021664.1
Schaf	<i>Ovis aries</i>	NCBI accession: AF345913
Zwergflusspferd	<i>Hexaprotodon liberiensis</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Breitmaulnashorn	<i>Ceratotherium simum</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Carnivora		
Katze	<i>Felis catus</i>	NCBI <i>Felis catus</i> -trace archive: gnl ti 845355683 u.a.
Hund	<i>Canis familiaris</i>	NCBI accession: DQ084210.2
Fischotter	<i>Lutra lutra</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Baikalrobbe	<i>Phoca sibirica</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Kalifornischer Seelöwe	<i>Zalophus californianus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Braunbär	<i>Ursus arctos</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Malaienbär	<i>Helarctos malayanus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Eisbär	<i>Ursus maritimus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Schwarzbär	<i>Ursus americanus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Nasenbär	<i>Nasua nasua</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Kragenbär	<i>Ursus thibetanus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland

Brillenbär	<i>Tremarctos ornatus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Panda	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Marderhund	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	NCBI accession: DQ022187.1
Rotfuchs	<i>Vulpes vulpes</i>	NCBI accession: DQ663625.1
Löwe	<i>Panthera leo</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Sirenia		
Seekuh	<i>Trichechus manatus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Proboscidea		
Asiatischer Elefant	<i>Elephas maximus</i>	NCBI accession: DQ648863.1
Afrikanischer Elefant	<i>Loxodonta africana</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Afrosoricida		
kl. Igeltenrek	<i>Echinops telfairi</i>	NCBI <i>Echinops telfairi</i> -trace archive: gnl ti 663784197 u.a.
Mammalia Eulipotyphla		
Igel	<i>Erinaceus europaeus</i>	NCBI <i>Erinaceus europaeus</i> -trace archive: gnl ti 919502043 u.a.
Rotzahnspezmaus	<i>Sorex araneus</i>	NCBI <i>Sorex araneus</i> -trace archive: gnl ti 898446963 u.a.
Mammalia Chiroptera		
Glattnasenfledermaus	<i>Rhogeessa io</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mausohrfledermaus	<i>Myotis albescens</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mausohrfledermaus	<i>Myotis lucifugus</i>	NCBI <i>Myotis lucifugus</i> -trace archive: gnl ti 977466579 u.a.
Mammalia Scandentia		
Spitzhörnchen	<i>Tupaia belangeri</i>	NCBI <i>Tupaia belangeri</i> -trace archive: gnl ti 1021565283 u.a.
Mammalia Folivora		
Faultier	<i>Choloepus didactylus</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Procaviidae		
Klippschliefer	<i>Procavia capensis</i>	Dr C. Pitra, IZW, Berlin, Deutschland
Mammalia Dasypodidae		
Neunbinden-Gürteltier	<i>Dasypus novemcinctus</i>	NCBI <i>Dasypus novem.</i> -trace archive: gnl ti 605452691
Mammalia Didelphimorphia		
Spitzmaus-Beutelratte	<i>Monodelphis domestica</i>	ATCC – cell collection
Mammalia Monotremata		
Schnabeltier	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	NCBI <i>Ornith. anatinus</i> -trace archive: gnl ti 740588964 u.a.
Aves		
Huhn	<i>Gallus gallus</i>	NCBI accession: NM_001031514.1
Gans	<i>Anser anser</i>	NCBI accession: DQ482582.1
Amphibia		
Krallenfrosch	<i>Xenopus tropicalis</i>	UCSC Genome Browser Database X trop. scaffold_95:306057-306954
Pisces		
Stichling	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	NCBI <i>Gasterosteus aculeatus</i> -trace archive: gnl ti 864777216
Zebrabärbling	<i>Dario rerio</i>	NCBI accession: AY161850.1
Heilbutt	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland
Kugelfisch	<i>Takifugu rubripes</i>	NCBI accession: AY227794.1
Grüner Kugelfisch	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	NCBI accession: AY332240.1
Goldfisch	<i>Carassius auratus</i>	NCBI accession: AJ534337.1
Forelle	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	NCBI accession: AY534915.1

Dornhai	<i>Squalus acanthias</i>	NCBI accession: AY169401.1
Kugelfisch	<i>Takifugu chinensis</i>	NCBI accession: AB073675.1
Kugelfisch	<i>Takifugu poecilonotus</i>	NCBI accession: AB073678.1
Kugelfisch	<i>Cyprinus carpio</i>	Dipl. Biol. C. Kern, Zoo Leipzig, Deutschland



Abbildung A2: Vektorkarten der Plasmide pcDNA3, pCDps-MC4R, pACT4-1b, pBTM117c, pECFP-C1, pEYFP-N1 und pGEX-6P-2

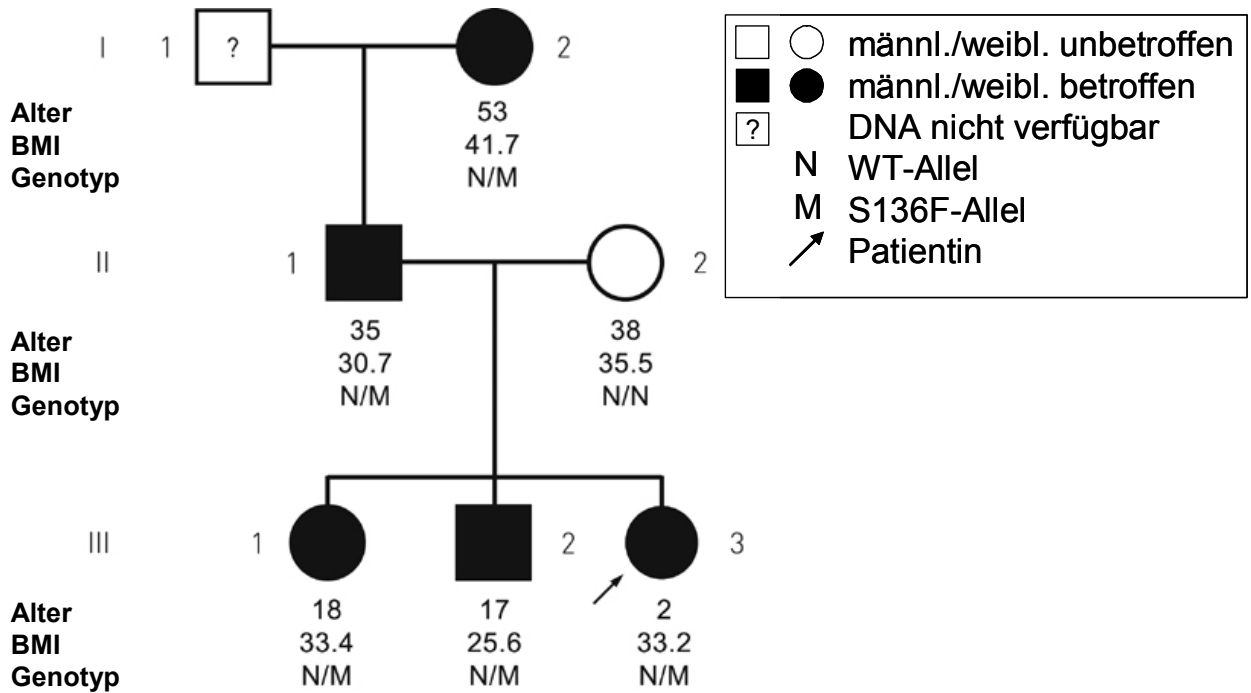


Abbildung A3: Stammbaum der Familie der S136F-Mutationsträgerin. Alle Mutationsträger sind adipös (I2: väterliche Großmutter: BMI 41,7 kg/m², >99. Perzentile, II1: Vater: BMI 30,7 kg/m², 96. Perzentile, III1 ältere Schwester: BMI 33,4 kg/m², >99. Perzentile und II2: älterer Bruder: BMI 25,6 kg/m², 94. Perzentile. Der Vater (95 kg, 1,76 m) berichtete von einem maximalen Gewicht von 112 kg, der Bruder (81 kg, 1,74 m) von einem Gewicht von 115 kg im Alter von 14 Jahren. Die ältere Schwester (100 kg, 1,73 m) wog im Alter von 17 Jahren 120 kg. Für alle Mutationsträger wurde eine übermäßige Gewichtszunahme im erste Lebensjahr berichtet. Die Indexpatientin wog 30,3 kg (>99. Perzentile), und war 95,5 cm groß (>97. Perzentile). Ihr Geburtsgewicht betrug 4190 g und die Gewichtszunahme begann im zweiten Lebensmonat.

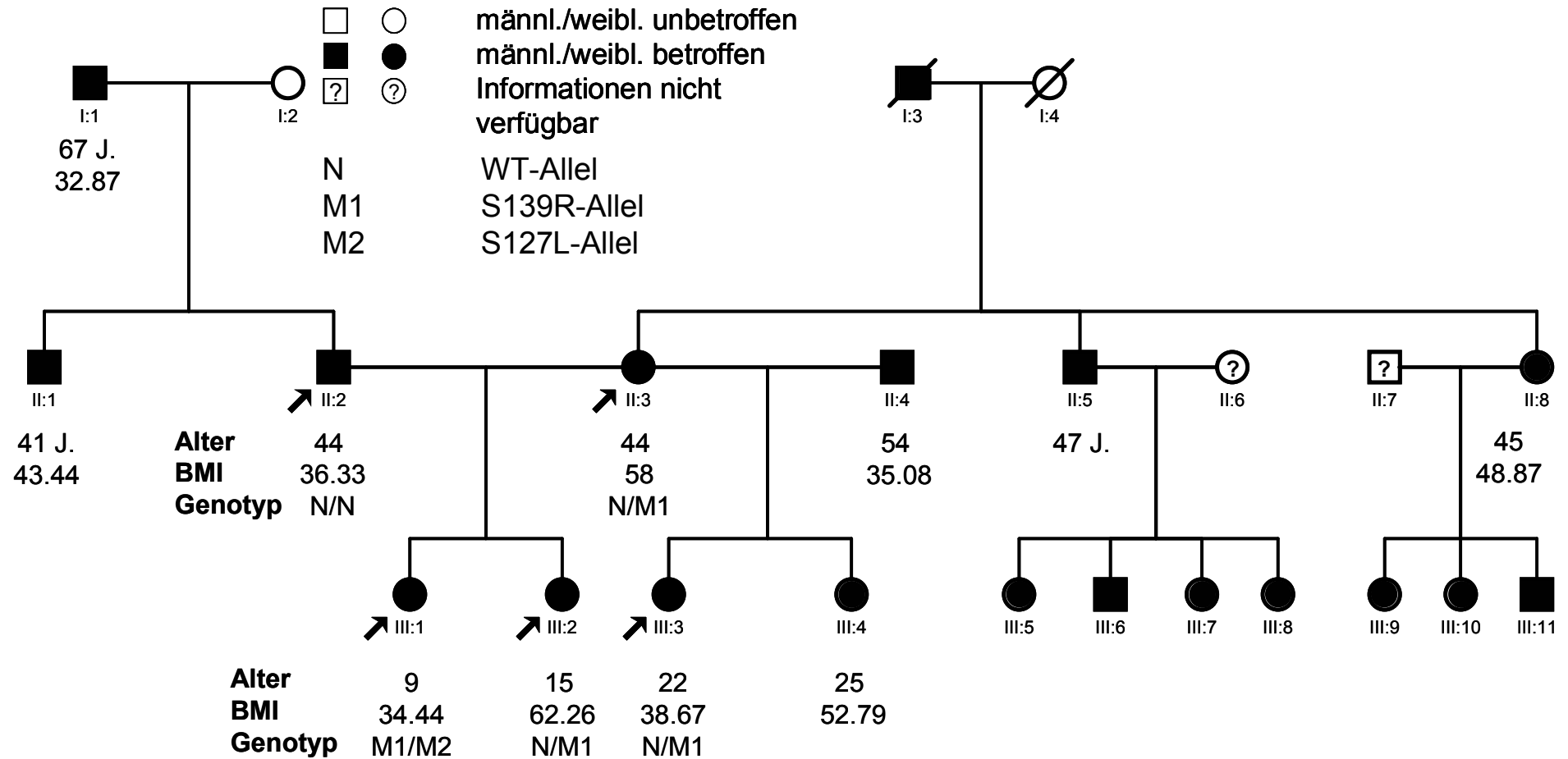


Abbildung A4: Stammbaum der Familie mit der compound-heterozygoten S127L/S139R-MC4R-Mutation. Alle MC4R-Mutationsträger sind massiv adipös. Die Gewichtszunahme der Patientin mit der Doppelmutation (III.1: 71 kg und 1,44m, BMI>99. Perzentile) sowie die der heterozygoten Mutationsträger (Schwester, III.2: 143,2 kg und 1,51m, BMI>99 Perzentile; Halbschwester III.3: 99 kg, 1,60 m, Mutter, II.3: 135,7 kg, 1,53 m), begann mit 2 Jahren.

Tabelle A2 Liste der verwendeten Oligonukleotide. Die vier Basen sind im Ein-Buchstaben-Code A,G,C,T angegeben. In den degenerierten Primern bedeutet S=G/C, Y=C/T, R=A/G, W=A/T, M=A/C, K=G/T, I=Inosin, B=C/G/T, D=A/G/T, V=A/C/G und N=A/C/G/T

Klonierung des humanen MC4R

hMC4R-NHA-F	GCCGCCATGTACCCCTACGATGTCCCCGACTACGCCGTGAACTCCACCCACCGTGGG
hMC4R-Spe-R	GGACTAGTTTAATATCTGCTAGACAAGTC
hMC4R-FLAG-Spe-R	CTAGACTAGTTTACTTATCGTCATCGTCCTTATAGTCATATCTGCTAGACAAGTCAC
hMC4R-F	GCCGCCATGGTGAAGTCCACCCACCGTGGG

Klonierung des humanen MC3R

AatII-hMC3-2ATG-F	ACGACGTCCCCGACTACGCCAATGCTTCGTGCTGCCTGCCC
AatII-hMC3-1ATG-F	ACGACGTCCCCGACTACGCCAGCATCCAAAAGACGTATCTGG
hMC3R-Spe-R	ACTAGTCTATCCCAAGTTCATGCCG

Klonierung orthologer MC4R

OLIGO.28 (reamp-Bsu36i)	GCAACTTTTTGTCTCTCCTGAGGTGT
OLIGO.29	GCAACTTTTTGTCTCTCCTGAGGTCT
OLIGO.30 (reamp BspEI)	CCTCAKTTCTTGRCTCCGGAGNGCRTA
OLIGO.13	ACYTCYCTCCACYCTGGAACCGCAGC
OLIGO.14	CTGGGYRTCATCAGCYTSYTGGMRAA
OLIGO.15	CTCIIIGAGGTSTTYSTSACDCTSGG
OLIGO.16	GGATGCTACGAGCARCTBYTBRTNTC
OLIGO.17	TTAATAYYTGCYAGRYAAVTCACA
OLIGO.18	ATGAACTCCACCCAYCACCATGGMATGCATACTTC
OLIGO.19	ATGAACTCCACMSAICMTCNTGG
OLIGO.20	ATGAACTCCACMSAICMCCNTGG
OLIGO.21	ATTCARRGAAATGAACRCCWCASATCMYCMTGG
OLIGO.22	ARGTGSAGGAANAANGNGCCCAGCA
OLIGO.23	ATGAGRTACAWGTTTRAARTGNGACATGAA
OLIGO.24	CAGATGATCTCYTTGAADGYTTYC
OLIGO.25	AGCARCAGAWIATYTCYTTGAANGTYTT
OLIGO.26	TCTGCCTCATCACCRGTGTTCTTCRCCATG
OLIGO.27	CATGGTGAAGAACAYGSTDATRAGGCAGA
OLIGO.31	AGCAGCAGMKKATYTCYTTGAAGGT
OLIGO.32	CCTCAGYTCYTGRCTCCGSAGKGCATA
OLIGO.33	TTTTGTCTCYCCYGAGGTGTTTGTGAC
OLIGO.34	CGAGCAGCTVYKSATCTCSACKGAGGT

Klonierung von Maus Melanocortinrezeptoren in pcDps

mMC4R-NHA-F	GCCGCCAGTTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCCGTGAACTCCACCCACCACCATGGC
mMC4R-Spe-R	GACTAGTCACTTAATACCTGCTAGACAAC
mMC3R-NHA-F	GCCGCCATGTACCCCTACGATGTCCCCGACTACGCCAAGTCTTCTGCTGCCTGTC
mMC3R-Spe-R	GACTAGTTAGCCCAAGTTCATGCTGTTG

Klonierung von TrkB/MC4R Fragmenten in Y2H-Vektoren

TrkB-5-Sal-F	ATGTCGACGATGTCGTCCTGGATAAGGTG
TrkB-10-Sal-F	TCGTCGACGTTGCCATCTGCAAATCTG
TrkB-18-Sal-F	ATGTCGACGTTTGGCATGAAAAGGCCAGCC
TrkB-12-Sal-F	TCGTCGACGGCACCAACTACTACATTC
TrkB-20-Sal-F	TCGTCGACGGTTCAGCACATCAAGCGAC
TrkB-9-Not-R	AGCGGCCGCACAATTGGGTATCTGCAG
TrkB-18-Not-R	CTGCGGCCGCTGTGTCTGGCTTGAGCTG
TrkB-14-Not-R	AGCGGCCGCCGAGAGATGTTCCCGACCGG
TrkB-20-Not-R	TAGCGGCCGCTCGCTTGATGTGCTGAAC
TrkB-24-Not-R	TAGCGGCCGCTAGAAATGTCCAGGTAGAC
Mc4-NT-Sal-F	TCGTCGACGGTGAAGTCCACCCACCGTG
Mc4-tm3-Sal-F	TCGTCGACGATTTGCAGCCTGCTTTC
Mc4-tm5-Sal-F	TCGTCGACGTCTCTATATCCACATG
Mc4-tm6-Sal-F	TCGTCGACGACTTCTTGTCTCAGAATCC
Mc4-CT-Not-R	ACGCGGCCGCATATCTGCTAGACAAGTC

Mc4-icl1-Not-R	ACGCGGCCGCGCTGCAGATGAAAAAGTAC
Mc4-tm5-Not-R	ACGCGGCCGCCATGGTGTAGGAGCAGATG
Mc4-ecl3-Not-R	ACGCGGCCGCGCCAATCAGGATTGGAACG
Klonierung von TrkB und Sept3 in pECFP-C1 bzw pEYFP-N1	
Sept3-CT-XhoI-F	ATCTCGAGCTTCAGAGCTGGTGCCTGAGCC
Sept3A-CT-Hind-R	TAAGAAGCTTTCATTCAGCAGTGGGGCAGG
TrkB-5-Xho-F	ATCTCGAGATGTCGTCTGGATAAGGTG
TrkB-24-Eco-R	CAGAATTCGGCCTAGAATGTCCAGGTAG
Klonierung von TrkB/TrkA-Fragmenten in pcDNA3	
TrkB-18-NHA-AatII-F	TACGACGTCCCCGACTACGCCTCCAAGTTTGGCATGAAAG
TrkB-24-Xho-R	GGC CTC GAG CTA GCC TAG AAT GTC CAG G
TrkB20-NHA-AatII-F	TACGACGTCCCCGACTACGCCGTTTCAGCACATCAAGCGAC
HA-Adapter	GCCGCCGCCATGTACCCCTACGACGTCCCCGACTACGCC
TrkA-icd-AatII-F	CGACGTCCCCGACTACGCCCGGCTGTGCTGGCTCCAG
TrkA-icd-Xho-R	CTCGAGCTAGCCCAGGACATCCAGGTAG
MC3R Start-ATG	
MC3R-90-Kpn-F	GCGGTACCGTCTCTTCCCTCCACCCTCTC
MC3R-NT-EcoRV-R	GCGATATCGGCGCTGCTGCTCTGGTTGC
MC3R_Mut1ATG-F	CTCTAAGGCCAGATTGATTGAGCATCCAAAAGAC
MC3R_Mut1ATG-R	GTCTTTTGGATGCTCAATCAATCTGGCCTTAGAG
MC3R_Mut2ATGII-F	GCCCTTCTGACAGCATTGAATGCTTCGTGCTGCC
MC3R_Mut2ATGII-R	GGCAGCACGAAGCATTCAATGCTGTCAGAAGGGC
MC3R_T6K-F	AGCATCCAAAAGAAGTATCTGGAGGGAG
MC3R_T6K-R	CTCCCTCCAGATACTTCTTTTGGATGCT
Mutageneseprimer	
TrkB-YF-F	GTCATTGAAAATCCCCAGTTCTTTGGCATCACCAAC
TrkB-YF-R	GTTGGTGTGCCAAAGAAGTGGGGATTTTCAATGAC
hMC4R-H158A-F	CTTCTATGCTCTCCAGTACGCTAACATTATGACAGTTAAGC
hMC4R-H158A-R	GCTTAACTGTCATAATGTTAGCGTACTGGAGAGCATAGAAG
hMC4R-V95I-F	GCTGGTGAGCATTTCAAATGG
hMC4R-V95I-R	CCATTTGAAATGCTCACCAGC
hMC4R-S139I-F	CTTGCTTGCATCCATTTGCATCCTGCTTTCAATTGCAGTG
hMC4R-S139I-R	CACTGCAATTGAAAGCAGGATGCAAATGGATGCAAGCAAG
Primer für Overlap-PCR	
TrkB/A_H1_F	CTGCCAGCCCCTCCATCACATGACATTGGGTGGCAGCTC
TrkB/A_H1_R	AAAGTACTGGGGATTTTCAATGTGGCCTTGGAGCCCAGAG
TrkB_H1-F	ATTGAAAATCCCCAGTACTTTG
TrkB_H1-R	GTGATGGAGTGGGCTGGCAG
Primer zur Plasmidsequenzierung	
CD-F	TAGGCCTGTACGGAAGTG
hMC4R-Seq-F	GTACCATAACATTATGACAG
pBTM-F	TGCTAGATCTTCGTCAGCAG
pBTM-R	AGCAACCTGACCTACAGG
pACT-F	TACCACTACAATGGATGATGT
pACT-R	TGAGATGGTGCACGATGCAC
pGEX-F	TATAGCATGGCCTTTGCAGG
pGEX-R	TGTCAGAGGTTTTACCG
M13F	GTAAAACGACGGCCAG
M13R	CACGAAACAGCTATGAC
SP6-R	CAAACAACAGATGCCTGG
T7-F	CTGCTTACTGGCTTATCG
YFP-C1-SeqF	CAAAGACCCCAACGAAGCGC
YFP-C1-SeqR	GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTG
pEGFP-F	GTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGAC
pEGFP-R	GGGTCAGCTTGCCGTAGGTGG

**Primer zur
Genotypisierung**

mMC4R-F	GGATCCCCAGAGCTTCACCG
mMC4R-R	GACTAGTCACTTAATACCTGCTAG
mMC4R-I194F-deg-R	GAACATGGAAATGAGGCAGATCA

9. Abkürzungen

ACTH	adrenocorticotrophes Hormon	MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
AgRP	Agouti-Related Protein	MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor
ARC	Nucleus arcuatus	MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
β 2-AR	β -adrenerger Rezeptor Typ 2	MC5R	Melanocortin-5-Rezeptor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor	MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
bp	Basenpaare	MCT8	Monocarbyxylattransporter 8
β -LPH	β -Lipotrophin	MTII	Melanotan II
B_{max}	Maximale Bindung	N-AT	N-Acetyltransferase
BMI	Body Mass Index	NDP- α -MSH	[Nle4-DPhe7]- α -MSH
BSA	Bovines Serum Albumin	NGF	Nerve Growth Factor
cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat	NPY	Neuropeptid Y
CHO	Chinese Hamster Ovary Epithelzellen aus Hamsterovarien	OB-R	Leptinrezeptor
CFP	Cyan Fluorescent Protein	OD	optische Dichte
CLIP	Corticotrophin-Like-Intermediate- Lobe-Peptide	PAM	Peptidyl- α -amidating Monooxygenase
COS-7	CV1 Origin SV40 Fibroblastenzellen der Niere von <i>Ceropithecus aethiops</i>	PC1/2	Prohormonconvertase 1 bzw 2
CPE	Carboxypeptidase E	PC12	Phäochromocytomzelllinie der Ratte
cpm	counts per minute	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium	PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PKB	Protein Kinase B = Akt
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration	POMC	Proopiomelanocortin
ecl	extrazelluläre Schleife	PVN	nucleus paraventricularis
E_{max}	Maximalstimulation	RNA	Ribonukleinsäure
ERK	extracellular-signal related kinase = MAPK	RPMI	Medium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
FKS	Fetales Kälberserum	RQ	Respiratorischer Quotient
GFP	Green Fluorescent Protein	SDS- PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Poly- Acrylamid-Gel-Elektrophorese
GH	Wachstumshormon	Shc	Src homology 2 domain containing
GHSR	Growth Hormone Secretagogue Receptor	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
GST	Glutathion-S-Transferase	TM	Transmembrandomäne
HA	Hämagglutinin	TMH	Transmembranhelix
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-Xanthin	TRH	Thyrotropin Releasing Hormon
HS	Pferdeserum	TrkA	Tropomyosin Related Kinase A
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration	TrkB	Tropomyosin Related Kinase B
icl	intrazelluläre Schleife	VMH	ventromedialer Hypothalamus
IR	Insulinrezeptor	UTR	Untranslatierte Region
LHA	laterales hypothalamisches Areal	WT	Wildtyp
kD	Kilodalton	Y2H	Yeast-Two-Hybrid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase = ERK	YFP	Yellow Fluorescent Protein
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor		

Abkürzungen der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
/	Nle	Norleucin

10. Eigene Publikationen

Tarnow P, Schöneberg T, Krude H, Grüters A, Biebermann H.: Mutationally induced disulfide bond formation within the third extracellular loop causes melanocortin 4 receptor inactivation in patients with obesity. **2003**: *J Biol Chem.* 278(49):48666-73

Wiegand S, Maikowski U, Blankenstein O, Biebermann H, **Tarnow P**, Grüters A: Type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in European children and adolescents with obesity -- a problem that is no longer restricted to minority groups. **2004**: *Eur J Endocrinol.* 151(2):199-206.

Biebermann H, Ambrugger P, **Tarnow P**, von Moers A, Schweizer U, Grüters A.: Extended clinical phenotype, endocrine investigations and functional studies of a loss-of-function mutation A150V in the thyroid hormone specific transporter MCT8. **2005**: *Eur J Endocrinol.* 153(3): 359-366.

Elsner A, **Tarnow P**, Schäfer M, Ambrugger P, Krude H, Grüters A, Biebermann H.: MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues. **2006**: *Peptides.* 27(2): 372-379.

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

Grosse J, **Tarnow P**, Römpler H, Schneider B, Sedlmeier R, Huffstadt U, Korthaus D, Nehls M, Wattler S, Schöneberg T, Biebermann H, Augustin M.: N-Ethyl-N-Nitrosourea-Based Generation of Mouse Models for Mutant G-Protein-Coupled Receptors. **2006**: *Physiol Genomics.* 26(3): 209-217.

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

Stäubert C*, **Tarnow P***, Brumm H, Pitra C, Gudermann T, Grüters A, Schöneberg T, Biebermann H, Römpler H.: Evolutionary aspects in evaluating mutations in the melanocortin 4 receptor. **2007**: *Endocrinology.* 148(10): 4642-4648

*: geteilte Erstautorenschaft

Tarnow P, Rediger A, Brumm H, Ambrugger P, Rettenbacher E, Widhalm K, Hinney A., Kleinau G, Schäfer M, Hebebrand J, Krause G, Grüters A, Biebermann H.: A heterozygous mutation in the third transmembrane domain causes a dominant-negative effect on signaling capability of the MC4R. *Obesity Facts* **2008**, angenommen.