

# 1 Einleitung

## 1.1 Leptin und seine physiologische Wirkungen

Leptin<sup>1</sup> ist ein Hormon aus dem Fettgewebe, dessen wichtigste Funktion die Regulation des Körpergewichts darstellt. Im Jahr 1994 wurde Leptin erstmals als Produkt des *lep*-Gens in der Maus identifiziert (Zhang *et al.*, 1994). Bereits zuvor waren so genannte *obese*-Mäuse<sup>2</sup> des *lep<sup>ob</sup>/lep<sup>ob</sup>*- und *diabetes*-Mäuse<sup>2</sup> des *lepr<sup>db</sup>/lepr<sup>db</sup>*-Genotyps aufgrund ihres massiv adipösen Phänotyps sowie endokrinologischer Pathologien Gegenstand umfangreicher Forschung gewesen (Hummel *et al.*, 1966; Ingalls *et al.*, 1950). Diese Mäuse zeigten in Vergleich zu wildtyp-Mäusen u.a. Hyperphagie<sup>3</sup> und Hypothermie<sup>4</sup>, außerdem Insulinresistenz mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie sowie Infertilität, Störungen der Wundheilung und verminderten Knochenaufbau. Ein Jahr später wurde der Leptin-Rezeptor (LEPR) als Produkt des *lepr*-Gens identifiziert. Die Anomalien der *obese*- sowie der *diabetes*-Mäuse konnten somit auf eine fehlende Expression von Leptin bzw. des Leptin-Rezeptors zurückgeführt werden. Eine Behandlung von Mäusen des



**Abbildung 1.1 : Phänotyp einer *obese*-Maus**

<sup>1</sup> Nach dem griechischen „leptos“ für „dünn“

<sup>2</sup> Die ursprünglichen Symbole waren *ob* (*obese*) für das Leptin-Gen bzw. *db* (*diabetes*) für das Leptin-Rezeptor-Gen.

<sup>3</sup> Erhöhte Nahrungsaufnahme

<sup>4</sup> Erniedrigte Körpertemperatur

*lep<sup>ob</sup>/lep<sup>ob</sup>*-Genotyps mit rekombinantem Leptin führte, wie auch die transgene Expression des Leptin-Rezeptors in *diabetes*-Mäusen zu einer vollständigen Normalisierung des Phänotyps (Chehab *et al.*, 1996; de Luca *et al.*, 2005; Halaas *et al.*, 1995).

Auch beim Menschen konnten das *lep*- und das *lepr*-Gen als Leptin bzw. der Leptin-Rezeptor identifiziert werden, allerdings wurden homozygote Mutationen in diesen Genen beim Menschen äußerst selten beschrieben (Clement *et al.*, 1998; Montague *et al.*, 1997). Die Patienten mit homozygoten Mutationen im *lep*-Gen leiden unter ähnlichen Pathologien wie *obese*-Mäuse und konnten durch Leptin-Substitution erfolgreich therapiert werden (Farooqi *et al.*, 1999).

Wie anhand der zahlreichen Störungen der *obese*- und *diabetes*-Mäuse bereits zu vermuten war, konnten neben der Regulation des Körpergewichts und der Notwendigkeit für die Reproduktion als zentral regulierte Effekte auch periphere Leptinwirkungen wie z.B. die Beeinflussung von Inselzellen (Seufert *et al.*, 1999), eine immunmodulatorische Wirkung (Loffreda *et al.*, 1998), eine Förderung der Wundheilung (Frank *et al.*, 2000) und ein verstärkter Knochenaufbau beschrieben werden (Ducy *et al.*, 2000).

Leptin ist ein 16 kDa großes, Vier-Helix-Bündel-Protein (Kline *et al.*, 1997), welches vorwiegend von Fettzellen ins Blut sezerniert und im Körper verteilt wird. Die zentralen Wirkungen von Leptin werden durch Bindung an hypothalamische Leptin-Rezeptoren vermittelt (de Luca *et al.*, 2005). Hierzu gehören eine Steigerung der Expression von CART<sup>5</sup> und POMC<sup>6</sup> in den entsprechenden Neuronen, sowie eine Hemmung der AgRP<sup>7</sup>- und NP-Y<sup>8</sup> Expression. CART und POMC, letzteres als Vorläufer von  $\alpha$ -MSH<sup>9</sup>, sorgen als anorexigene Stimuli für eine Reduktion des Körpergewichts (Kristensen *et al.*, 1998; Satoh *et al.*, 1998), während NP-Y und AgRP orexigene Wirkung haben und u.a. eine erhöhte Nahrungsaufnahme vermitteln (Ollmann *et al.*, 1997; Schwartz *et al.*, 1996; Stanley *et al.*, 1986).

---

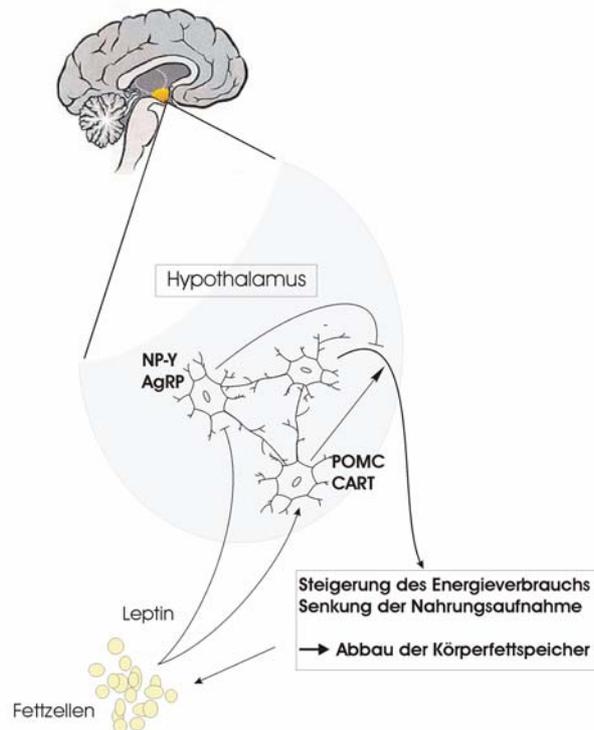
<sup>5</sup> *Cocaine and amphetamine-regulated transcript*

<sup>6</sup> *Proopiomelanocortin*

<sup>7</sup> *Agouti-related protein*

<sup>8</sup> *Neuropeptide Y*

<sup>9</sup>  *$\alpha$ -Melanocyte stimulating hormone*



**Abbildung 1.2 : Der Leptin-Regelkreis**

Das Schema zeigt die Wirkung von Leptin aus dem Fettgewebe auf hypothalamische Neuronen und den daraus resultierenden Einfluss auf die energetische Homöostase.

Die Sezernierung von Leptin aus Fettzellen zeigt eine hohe Korrelation mit dem gesamten Fettgehalt des Körpers. Hohe Leptinspiegel führen über oben genannte Regulationsmechanismen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Energieaufnahme und -verbrauch mit der Folge, dass vermehrt Fettreserven abgebaut werden. Leptin nimmt so die Funktion einer Regelgröße in diesem System ein und gewährleistet eine kontrollierte Energiespeicherung.

In der großen Mehrheit der Fälle kann die Adipositas des Menschen jedoch nicht wie bei der *obese*-Maus auf einen Mangel an Leptin zurückgeführt werden. Vielmehr werden bei Fettleibigkeit die physiologischen Wirkungen von Leptin trotz hoher Leptin-Plasmaspiegel nicht erzielt (Frederich *et al.*, 1995), ein Phänomen, das als Leptin-Resistenz bezeichnet wird. Aufgrund dieser Resistenzentwicklung erscheint eine substitutive Therapie bei Adipositas im Rückblick wenig Erfolg versprechend und erfüllte auch in klinischen Studien nicht die hohen Erwartungen (Gura, 1999; Heymsfield *et al.*, 1999). Als Therapeutikum erfolgreich erwies sich Leptin hingegen in der Behandlung congenitaler oder medikamenteninduzierter Lipodystrophie, wie

sie beispielsweise häufig unter Behandlung mit antiretroviralen Medikamenten auftritt. Hier konnte Leptin die Stoffwechsellage dieser Patienten positiv beeinflussen (Oral *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2002).

## 1.2 Der Leptin-Rezeptor

Die Klonierung des murinen Leptin-Rezeptors als Produkt des *lepr*-Gens gelang erstmals 1995 (Tartaglia *et al.*, 1995). Es existieren mindestens die fünf Isoformen LEPRa-e, als Resultat alternativen Spleißens (Lee *et al.*, 1996) oder proteolytischer Spaltung an der Membran (*ectodomain shedding*) (Ge *et al.*, 2002). Neben dem löslichen Rezeptor LEPR<sub>e</sub>, der im Blut in hohem Maße an Leptin gebunden vorliegt und möglicherweise Transportfunktion übernimmt (Lammert *et al.*, 2001), existieren mehrere Formen mit kurzen, intrazellulären Domänen von 31 bis 38 Aminosäuren (AS) und die lange Form, LEPR<sub>b</sub>. Diese umfasst insgesamt 1162 AS und unterscheidet sich von allen anderen durch die lange, 301 AS umfassende, intrazelluläre Domäne. Der LEPR<sub>b</sub> ist als einzige Isoform in der Lage, die Wirkungen von Leptin zu vermitteln. Dies kommt bereits in der Tatsache zum Ausdruck, dass *diabetes*-Mäuse alle Spleißvarianten bis auf LEPR<sub>b</sub> normal exprimieren, die Phänotypen der *obese*- und der *diabetes*-Maus sich jedoch weitgehend gleichen. Der LEPR<sub>b</sub> wird hauptsächlich im Hypothalamus, insbesondere im *Nucleus arcuatus* exprimiert, allerdings wurde er u.a. auch in  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Kieffer *et al.*, 1996), in Fettgewebe (Kutoh *et al.*, 1998), im Magen (Mix *et al.*, 2000) und im Ovar (Karlsson *et al.*, 1997) nachgewiesen.

Der LEPR<sub>b</sub> weist eine erkennbare Sequenzähnlichkeit zu Zytokin-Rezeptoren der Klasse I auf, mit gp130<sup>10</sup>, der signaltransduzierenden Kette des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6-R) und dem G-CSF-Rezeptor<sup>11</sup> als nächsten Verwandten. Charakteristisch für diese Rezeptoren sind vier konservierte Cystein-Reste im extrazellulären N-Terminus, ausserdem ein Membran-proximales Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS) Motiv, das vermutlich die Ligandenbindung beeinflusst (Yamasaki *et al.*, 1997). Intrazellulär finden sich ein Prolin-reiches Motiv und eine

---

<sup>10</sup> *Glycoprotein 130*

<sup>11</sup> *Granulocyte macrophage stimulating factor*

konservierte Region hydrophober Aminosäuren, Box1- bzw. Box2-Motiv genannt, die für die Bindung der Janus-Kinasen (JAKs) verantwortlich sind (Tanner *et al.*, 1995). Außerdem befinden sich dort eine unterschiedliche Anzahl an phosphorylierbaren Tyrosinresten (Y), im Fall des murinen LEPRb die Positionen Y 985, Y 1077 und Y 1138. Wie alle Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren aktiviert auch der Leptin-Rezeptor den JAK/STAT<sup>12</sup>-Signalweg.

### 1.3 Signaltransduktion des Leptin-Rezeptors

Rezeptoren ohne intrinsische Kinase-Aktivität benötigen assoziierte Tyrosinkinasen, die durch Phosphorylierung die Aktivität von Proteinen modulieren und somit spezifische Signalwege aktivieren können.

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor werden die assoziierten Janus-Kinasen aktiviert und trans-autophosphorylieren sich gegenseitig an Tyrosinresten in ihren jeweiligen Aktivierungsschleifen (Hubbard *et al.*, 1998). Die Aktivierung dieser Rezeptoren wird im Allgemeinen auf eine Dimerisierung nach Ligandenbindung zurückgeführt, jedoch mehren sich inzwischen Hinweise auf ein Vorliegen der Rezeptoren als präformierte Dimere und eine Aktivierung durch ligandeninduzierte Konformationsänderung. Dies wurde im Speziellen auch für den LEPRb bestätigt (Couturier und Jockers, 2003; Devos *et al.*, 1997). Nach der trans-Autophosphorylierung der JAKs werden zudem spezifische Tyrosinreste in der intrazellulären Domäne des Rezeptors phosphoryliert. Als Phosphotyrosin (P-Y)-Motive bilden sie zusammen mit den umliegenden Aminosäuren Bindungsstellen für STAT-Proteine, aber auch für andere Proteine mit SH2<sup>13</sup>-Domänen wie beispielsweise SOCS3<sup>14</sup> oder GRB2<sup>15</sup>. Nach der Bindung an den Rezeptor werden auch die STATs von den JAKs phosphoryliert, woraufhin sie sich vom Rezeptor lösen und als Dimere in den Zellkern wandern, wo sie die Transkription von Zielgenen modulieren.

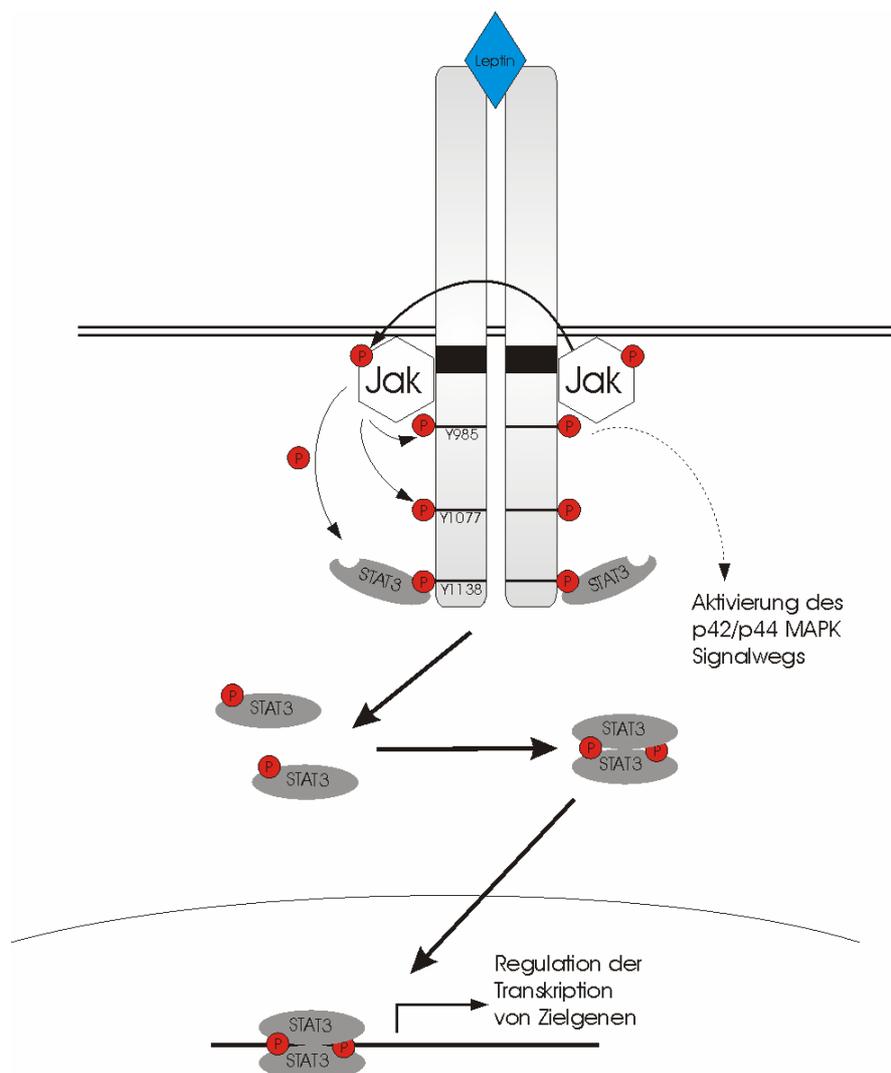
---

<sup>12</sup> *Janus kinase / signal transducer and activator of transcription*

<sup>13</sup> *Src homology 2*

<sup>14</sup> *Suppressor of cytokine signalling*

<sup>15</sup> *Growth factor receptor-bound protein 2*



**Abbildung 1.3 : Der JAK/STAT-Signalweg**

Die Abbildung zeigt schematisch den Leptin-Rezeptor und die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs am Beispiel von STAT3. Außerdem ist die Aktivierung des p42/p44 MAP-Kinase Signalwegs über Tyrosin 985 angedeutet. Der Membran-proximale, schwarz unterlegte Bereich repräsentiert die Box1/Box2-Region.

Die Untersuchung von Leptin-Rezeptor-Tyrosinmutanten zeigt, dass Y 1138 die Aktivierung von STAT3 und STAT5, und Y 1077 nur eine Aktivierung von STAT5 vermitteln kann (Hekerman *et al.*, 2005). Y 985 hingegen ist als Bindungsstelle für eine Aktivierung des p42/p44 MAPK<sup>16</sup>-Signalwegs notwendig (Bjorbaek *et al.*, 1997),

<sup>16</sup> *Mitogen-activated protein kinase*

außerdem binden negativ regulatorische Proteine wie SHP2<sup>17</sup> und SOCS3 an dieses Phosphotyrosin.

Auch die Aktivierung der PI-3-Kinase<sup>18</sup> durch den LEPR wurde gezeigt (Niswender *et al.*, 2003).

Notwendige Voraussetzung für die Regulation des Körpergewichts ist in erster Linie die Aktivierung von STAT3 über Tyrosin 1138. Dies konnte mit Hilfe von transgenen Mäusen gezeigt werden, die einen mutierten LEPRb exprimierten. In diesem Rezeptor war die STAT3-Bindungsstelle Y 1138 durch ein Serin ersetzt worden, was spezifisch die STAT3-Aktivierung ausschaltete (Bates *et al.*, 2003). Der adipöse Phänotyp dieser Maus glich dem von *diabetes*-Mäusen. Auch Mäuse mit neuronalem *stat3-knockout* bestätigten durch ihre extreme Fettleibigkeit diesen Zusammenhang (Gao *et al.*, 2004). Hinsichtlich der Beeinflussung der Fertilität jedoch führen diese Ansätze zu widersprüchlichen Ergebnissen. Während die Mäuse mit mutiertem LEPRb fertil sind und daher vermuten lassen, dass dieser Effekt nicht über STAT3 vermittelt wird, gleichen Mäuse mit neuronalem *stat3-knockout* hinsichtlich der Sterilität den *diabetes*-Mäusen. Welche Leptin-Effekte STAT3-unabhängig vermittelt werden, bedarf deshalb weiterer Untersuchungen.

### 1.3.1 Die Janus-Kinasen

Der Leptin-Rezeptor besitzt wie alle Zytokin-Rezeptoren der Klasse I keine intrinsische Kinase-Aktivität. Die zentrale Funktion der Phosphorylierung übernehmen die Janus-Kinasen, die wegen ihres charakteristischen Aufbaus mit Kinase- und Pseudokinase-Domäne nach dem zweigesichtigen römischen Gott Janus benannt wurden<sup>19</sup> (Ihle, 1995). Die Janus-Kinasen sind 125-134 kDa große, zytoplasmatische Proteine, deren vier Vertreter in Säugetieren mit JAK1-3 und TYK2<sup>20</sup> bezeichnet werden<sup>21</sup>. Sie zeigen einen strukturellen Aufbau aus sieben *Janus Homology* Domänen, JH1-7. Die C-terminal gelegenen Domänen JH1 und

---

<sup>17</sup> *SH2 domain containing phosphatase 2*

<sup>18</sup> Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase

<sup>19</sup> Ursprünglich war die Bezeichnung ein Akronym für „*just another kinase*“, (Darnell *et al.*, 1994).

<sup>20</sup> *Tyrosine kinase 2*

<sup>21</sup> Auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde ein Vertreter der JAK-Proteine identifiziert und *hopscotch (hop)* genannt (Perrimon und Mahowald, 1986).

JH2 repräsentieren die Kinasedomäne bzw. die Pseudokinasedomäne. Während weitgehende strukturelle Ähnlichkeiten vorhanden sind, beinhaltet nur JH1 das charakteristische E/DYY Motiv, dessen Phosphorylierung Voraussetzung für die Aktivierung ist. Folglich besitzt die Pseudokinase-Domäne keine Kinase-Aktivität, sie scheint aber eine Rolle bei der Regulation der Basalaktivität der JAKs zu übernehmen (Saharinen *et al.*, 2000). Die Domänen JH3-JH4 bilden eine SH2-Domäne, die jedoch keine klassische Funktion als Bindungspartner von Phosphotyrosin-Domänen zu übernehmen scheint (Radtke *et al.*, 2005). Die N-terminale FERM<sup>22</sup>-Domäne wird von JH5-JH7 gebildet und ist mitunter für die Rezeptorenbindung sowie für die Regulation der Kinase-Aktivität verantwortlich (Hilkens *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001).

Bis auf JAK3, das vorwiegend in myeloischen und lymphoiden Vorläuferzellen gebildet wird (Gurniak und Berg, 1996), werden die anderen JAKs ubiquitär exprimiert.

Die Spezifität der Rezeptorbindung ist ebenfalls für JAK3 in höherem Maße gegeben als für JAK1, JAK2 und TYK2. Während für JAK3 bislang ausschließlich eine Interaktion mit der  $\gamma_c$ -Kette<sup>23</sup>, die Teil der IL-2-, IL-4-, IL-7-, IL-9- und IL-15-Rezeptoren ist (Suzuki *et al.*, 2000), gefunden wurde, können letztere in der Regel mit mehreren Rezeptoruntereinheiten interagieren. So bindet JAK1 an gp130 und wird dadurch von allen Rezeptoren der IL-6 Familie (u.a. IL-6R, LIFR<sup>24</sup>, CNTFR<sup>25</sup>) rekrutiert, findet aber nach Bindung an diverse Zytokin-Rezeptor-Einzelketten auch Verwendung bei der Aktivierung z.B. der IL-2-, IL-10- und Interferon-Rezeptoren (IfnR). JAK2 wird von vielen Einzelketten-Rezeptoren wie dem Leptin-Rezeptor, dem Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) oder dem Prolaktin-Rezeptor (PrIR) rekrutiert, außerdem bindet JAK2 an die  $\beta_c$ -Kette<sup>23</sup> und wird damit von den Rezeptoren der  $\beta_c$ -Familie (IL-3R, IL-5R und GMCSF-R<sup>26</sup>) verwendet. Auch TYK2 bindet an verschiedene Untereinheiten von Zytokin-Rezeptoren und trägt damit zur Signaltransduktion z.B. des IL-10- Rezeptors und des IFN- $\alpha$ - $\beta$ -Rezeptors bei.

<sup>22</sup> *Four point one, ezrin, radixin, moesin*

<sup>23</sup> Diese Einzelketten werden als Teil vieler Interleukin-Rezeptor-Subtypen verwendet

<sup>24</sup> *Leukemia inhibitory factor receptor*

<sup>25</sup> *Ciliary neurotrophic factor receptor*

<sup>26</sup> *Granulocyte macrophage colony stimulating factor receptor*

Obwohl die JAKs also eine gewisse Spezifität hinsichtlich der Rezeptor-Assoziation aufweisen, scheint sich dies nicht im Muster der STAT-Aktivierung niederzuschlagen (Stahl *et al.*, 1995).

### 1.3.2 Die STAT-Proteine

Die STAT-Proteinfamilie von Transkriptionsfaktoren umfasst bei Säugern die sieben Mitglieder STAT1-4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Es sind Proteine von 90 - 100 kDa Größe, von denen ein Vertreter auch in *Drosophila melanogaster* gefunden wurde (Hou *et al.*, 1996). Sie unterscheiden sich von anderen Transkriptionsfaktoren durch ihre SH2-Domäne, welche die Bindung an rezeptorständige Phosphotyrosinreste vermittelt. Auch für die Dimerisierung zweier STAT-Proteine, die über eine Interaktion mit einem C-terminal gelegenen, konservierten Tyrosinrest vermittelt wird, ist die SH2-Domäne notwendig. Die DNA-Bindungsdomäne ist zentral im Protein gelegen und vermittelt die Bindung an den Promotor, wobei diese Bindung durch den Einfluss der N-terminalen *coiled-coil* Domäne moduliert werden kann (Xu *et al.*, 1996).

Die SH2-Domänen der verschiedenen STAT-Proteine weisen eine divergierende Spezifität hinsichtlich der Erkennung der rezeptorständigen Phosphotyrosinmotive auf. So wurde das Konsensus-Motiv YXXQ als STAT3-Bindungsstelle identifiziert (Stahl *et al.*, 1995), welches an Position 1138-1141 als YMPQ-Motiv im LEPRb vorhanden ist. Auch für STAT5 ist die Präsenz spezifischer Aminosäuren um ein phosphoryliertes Tyrosin Voraussetzung für eine Bindung (May *et al.*, 1996; Pezet *et al.*, 1997). Die nur recht unscharf definierten Voraussetzungen für die STAT5 Bindung beinhalten hydrophobe, aliphatische AS in Position +1 und +3 und sind im YLGV-Motiv um Position 1077 des LEPRb erfüllt.

## 1.4 Die negative Regulation

Jede zeitlich begrenzte Aktivierung eines Rezeptors verlangt nach Mechanismen zur Terminierung der aktivierten Signaltransduktion. Im Fall des LEPRb könnte es beispielsweise zu fatalem Energiemangel führen, würde das Signal zur Restriktion der Energieaufnahme bei abnehmenden Energiereserven nicht wieder abgeschaltet

werden. Wird trotz dauerhafter Stimulation eine Abschaltung eines Rezeptors induziert, die durch erneute Ligandenbindung nicht wieder durchbrochen werden kann, spricht man von Resistenzentwicklung. Dieses Phänomen ist beispielsweise für den Insulin-Rezeptor bei Diabetes-Typ-II Patienten mit typischerweise erhöhten Insulinspiegeln bekannt. Bei der Adipositas des Menschen liegen normalerweise hohe Plasma-Leptinspiegel vor. Dennoch erfüllt das Leptin seine Wirkung nicht oder nur in unzureichender Weise, weshalb von einer Leptin-Resistenz gesprochen werden kann (Arch, 2005; Zhang und Scarpace, 2006).

Verschiedene molekulare Mechanismen werden als Ursachen für diese Resistenzentwicklung diskutiert. Möglicherweise ist eine limitierte Transportkapazität durch die Blut-Hirn-Schranke mitverantwortlich für die unzureichende Wirkung des Serum-Leptins an den hypothalamischen Rezeptoren (Caro *et al.*, 1996; El-Haschimi *et al.*, 2000).

Viele Zytokin-Rezeptoren werden nach Bindung ihres Liganden internalisiert und degradiert (Dittrich *et al.*, 1996; Thiel *et al.*, 1999), was auch als mechanistische Ursache für die Leptin-Resistenz denkbar wäre. Eine Resistenzentwicklung auf Rezeptorebene kann für den LEPRb als gesichert angenommen werden (Bence *et al.*, 2006; Bjorbaek *et al.*, 1998; Zhang und Scarpace, 2006) und auch für Resistenzmechanismen die *downstream* des LEPRb liegen, wie z.B. AgRP- und NP-Y *downregulation*, wurden Hinweise gefunden (Korner *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund scheint die Resistenzentwicklung nicht monokausal erklärbar zu sein, sondern auf mehrere Ursachen zurückgeführt werden zu können. Dennoch würde eine genauere Aufklärung der Mechanismen die Hoffnung nähren, potentielle Angriffspunkte für die medikamentöse Behandlung der Leptin-Resistenz zu identifizieren.

#### **1.4.1 Die Familie der SOCS-Proteine**

Es sind acht SOCS-Proteine, SOCS1-7 und CIS<sup>27</sup> in Säugern bekannt (Hilton *et al.*, 1998). Aufgrund der zeitgleichen Erstbeschreibung von SOCS1 durch mehrere Gruppen (Endo *et al.*, 1997; Naka *et al.*, 1997; Starr *et al.*, 1997) findet man diese

---

<sup>27</sup> *Cytokine inducible SH2-containing protein*

Proteine auch unter den Bezeichnungen JAB<sup>28</sup>, SSI<sup>29</sup> oder CISH<sup>27</sup>. Am besten sind bislang SOCS1-3 sowie CIS untersucht und infolgedessen als Inhibitoren vieler verschiedener Zytokin-Rezeptoren beschrieben worden. Alle Mitglieder der Familie gleichen sich im strukturellen Aufbau. Neben einer N-terminalen, SOCS-Box genannten, Region, weisen sie eine SH2-Domäne und eine so genannte KIR<sup>30</sup>-Region auf. Obwohl der strukturelle Aufbau weitestgehend gleich ist, unterscheiden sich die einzelnen Proteine im Mechanismus der Hemmung. So konnte für SOCS1 eine Hemmung der JAK2 über direkte, SH2-vermittelte Interaktion gezeigt werden (Yasukawa *et al.*, 1999), wohingegen bei SOCS2 und CIS die negative Regulation über eine SH2-vermittelte Interaktion mit der Rezeptorkette stattfindet (Greenhalgh *et al.*, 2005; Yoshimura *et al.*, 1995). Über eine direkte JAK-Interaktion wurde auch für SOCS3 berichtet (Sasaki *et al.*, 2000), hauptsächlich scheint die Wirkung jedoch über eine Rezeptorbindung stattzufinden (Nicholson *et al.*, 1999). Die Interaktion von SOCS3 mit dem LEPRb findet über phosphoryliertes Tyrosin 985 statt (Bjorbaek *et al.*, 2000), während Tyrosin 1138 für die Induktion der SOCS3-Expression notwendig ist (Banks *et al.*, 2000).

Neben einer inhibitorischen Wirkung der SOCS-Proteine über die Hemmung der JAK-Aktivität scheint zudem eine Forcierung der proteasomalen Degradation der Janus-Kinase möglich zu sein (Frantsve *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999).

Von den SOCS-Proteinen scheint insbesondere SOCS3 als Mediator der molekularen Leptin-Resistenz eine wichtige Rolle zu spielen. Im Gegensatz zu *socs3*<sup>-/-</sup>-Mäusen sind sowohl heterozygote *socs3*<sup>+/-</sup>-Mäuse als auch Mäuse mit Gehirn-spezifischem *socs3-knockout* lebensfähig und weisen eine gesteigerte Leptin-Sensitivität auf (Howard *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist in Mäusen mit Nahrungs-induziertem Übergewicht<sup>31</sup> eine erhöhte SOCS3-Expression im *Nucleus arcuatus*, der Region mit der dichtesten LEPRb-Expression, gefunden worden (Muenzberg *et al.*, 2004).

Auch die Hochregulation der SOCS3-Expression durch Leptin lässt eine Beteiligung von SOCS3 an der Resistenzentwicklung plausibel erscheinen.

---

<sup>28</sup> *JAK binding protein*

<sup>29</sup> *STAT-induced STAT inhibitor*

<sup>30</sup> *Kinase inhibitory region*

<sup>31</sup> *Diet-induced obesity*

## 1.4.2 Die Phosphatasen PTP1B und SHP2

PTP1B<sup>32</sup> und die verwandte Phosphatase TC-PTP<sup>33</sup> können durch Dephosphorylierung von JAK2- und STAT3-Proteinen die LEPRb-Signaltransduktion inhibieren (Lund *et al.*, 2005; Simoncic *et al.*, 2002). Der Phänotyp einer *ptpn1*<sup>34</sup>-knockout Maus, die eine Resistenz gegen ernährungsbedingte Gewichtszunahme zeigt (Elchebly *et al.*, 1999), sowie eine in-vitro festgestellte Hemmung der Leptin-Rezeptor-Signaltransduktion (Kaszubska *et al.*, 2002) sprechen für eine Beteiligung dieser Phosphatase an der Entstehung der Leptin-Resistenz. Der genaue Mechanismus bleibt bislang jedoch ungeklärt, insbesondere die Lokalisation von PTP1B am endoplasmatischen Retikulum (Frangioni *et al.*, 1992) ist nicht ohne weiteres mit der Dephosphorylierung Rezeptor-assoziiierter JAKs in Übereinstimmung zu bringen.

Die konstitutiv exprimierte Phosphatase SHP2 kann die Signaltransduktion mehrerer Zytokin-Rezeptoren hemmen (Agazie und Hayman, 2003; Schaper *et al.*, 1998) und scheint auch im Kontext der LEPRb-Inhibition von Bedeutung zu sein (Zhang *et al.*, 2004). Die Hemmung des LEPRb setzt eine Bindung von SHP2 an Tyrosin 985 voraus. Somit konkurriert SHP2 mit SOCS3 um dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor.

Es gibt jedoch auch Hinweise auf eine aktivierende Funktion von SHP2. In Zellkultur sowie in einem transgenen Maus-Modell verstärkte SHP2 die Leptin-induzierte Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Bjorbaek *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004).

---

<sup>32</sup> *Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B*

<sup>33</sup> *T-cell phosphatase*

<sup>34</sup> Das für PTP1B kodierende Gen wird mit dem Symbol *ptpn1* gekennzeichnet.

## 1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der negativen Regulation des Leptin-Rezeptors. Insbesondere der Zustand der Leptin-Resistenz sollte in einem Zellsystem nachgebildet und deren zugrunde liegende Mechanismen auf molekularer Ebene charakterisiert werden.

In Ermangelung einer hypothalamischen Zelllinie mit endogener LEPRb-Expression wurde als Modellsystem eine retroviral transfizierbare Zelllinie gewählt. Dieses System erlaubte zudem die differenzielle Untersuchung verschiedener Tyrosin/Phenylalanin (Y/F)-Punktmutanten, wodurch die Beteiligung der einzelnen Rezeptortyrosine untersucht werden konnte.

Verschiedene, grundlegende Möglichkeiten der negativen Regulation sollten in dieser Arbeit auf eine Beteiligung an der LEPRb-Abschaltung und -Desensitivierung hin überprüft werden.

Weiterhin sollte die negative Regulation durch einige, bereits bekannte Proteine mechanistisch charakterisiert, und deren Beteiligung insbesondere an der Resistenzentwicklung untersucht werden.

Als weiterer Schwerpunkt wurde die Spezifität der JAK-Bindung an Rezeptoren adressiert. Es sollten die Sequenzabschnitte in der Rezeptorkette identifiziert werden, die die Spezifität der Bindung maßgeblich bestimmen. Darauf aufbauend könnten Rezeptorchimären mit ausgeprägter JAK-Spezifität hergestellt werden, die in weiteren Untersuchungen über den Einfluss der Janus-Kinase auf die negative Regulation durch bereits bekannte Inhibitoren des LEPRb eingesetzt werden sollten.