

3 Ergebnisse

3.1 Negative Regulation des LEPRb-WT

3.1.1 Abschaltung und Desensitivierung

Die negative Regulation des Leptin-Rezeptors wurde an stabil transfizierten RIN-Zelllinien durchgeführt. Neben der guten Reproduzierbarkeit der Bedingungen in Zellkulturen waren darüber hinaus die umfangreichen Erfahrungen mit dieser Linie in unserem Labor ausschlaggebend für diese Wahl. Als Messparameter wurde die STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen, ein gängiges und robustes Maß für die Rezeptoraktivierung.

In diesem System konnte gezeigt werden, dass während permanenter Stimulation des LEPRb-WT nach raschem Anstieg auch eine schnelle Abnahme der P-STAT3-Spiegel erfolgt. Bereits nach zweistündiger Stimulation hatte die P-STAT3-Konzentration nahezu wieder auf die Höhe der unstimulierten Kontrollzellen abgenommen (Abbildung 3.1-A). Dabei kam es nicht zu einem Abbau des Proteins, wie aus dem Nachweis der gesamten STAT3-Proteinmenge zu erkennen war. Auch nach einer Stimulation von über 24 Stunden erhöhte sich der P-STAT3-Spiegel nicht wieder. Während dieses langen Zeitraums blieb die Aktivität des Leptins unbeeinträchtigt. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass unbehandelte RIN-LEPRb-Zellen, die mit dem leptinhaltigen Zellüberstand nach 24-stündiger Inkubation stimuliert worden waren, eine unverändert starke STAT3-Phosphorylierung vermittelten (Daten nicht gezeigt).

Wurden RIN-LEPRb-WT-Zellen nach 24-stündiger Stimulation erneut für 15 Minuten mit Leptin versetzt, zeigten diese zudem eine verminderte Antwort auf erneute Stimulation im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen (Abbildung 3.1-B). Dieser Effekt der Desensitivierung konnte durch eine mehrstündige Pause zwischen den Stimulationen verringert werden, er verlor sich jedoch auch nach sechsstündiger Pause nicht ganz.

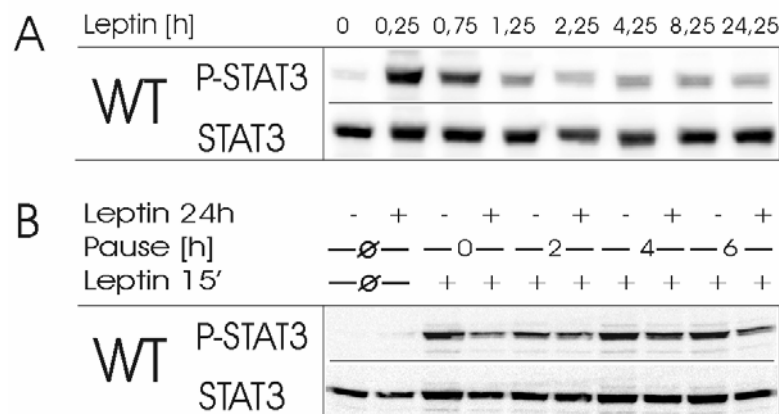


Abbildung 3.1 : Abschaltung und Desensitivierung des LEPRb-WT

- A: RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden mit 20 ng/ml Leptin für den angegebenen Zeitraum stimuliert.
- B: RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden einer 24-stündigen Leptin-Stimulation [20 ng/ml] unterzogen, anschließend einmal mit PBS gewaschen und mit Medium ohne FCS für den angegebenen Zeitraum inkubiert (Pause), worauf eine erneute Stimulation von 15 Minuten folgte.
- A & B: Nach denaturierender Lyse wurden die Gesamtzelllysate per SDS-PAGE aufgetrennt und nach *Western-Blotting* P-STAT3 und anschließend STAT3 mittels Immunreaktion nachgewiesen. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse aus jeweils vier unabhängigen Versuchen.

3.1.2 Internalisierung

Eine naheliegende Erklärung für die beobachtete Abschaltung und die Desensitivierung wäre eine Internalisierung der Leptin-Rezeptoren nach Stimulation mit Leptin. Zunächst wurde daher die Oberflächenexpression des Rezeptors mit Hilfe eines Fusionsproteins aus Leptin und sezernierter alkalischer Phosphatase¹⁰⁶ (Leptin-SEAP) untersucht, dessen Bindung an membranständige Rezeptoren über eine Lumineszenzreaktion detektiert wurde. Als geeigneter Zeitpunkt zur Untersuchung wurden zwei Stunden nach Leptinzugabe gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits eine maximale Abschwächung der STAT3-Phosphorylierung zu beobachten war (Abbildung 3.1). Zudem ist der Zeitraum von zwei Stunden kurz genug, um die beobachteten Änderungen ausschließlich auf die Vorstimulation zurückführen zu können.

¹⁰⁶ *Secreted alkaline phosphatase* (SEAP)

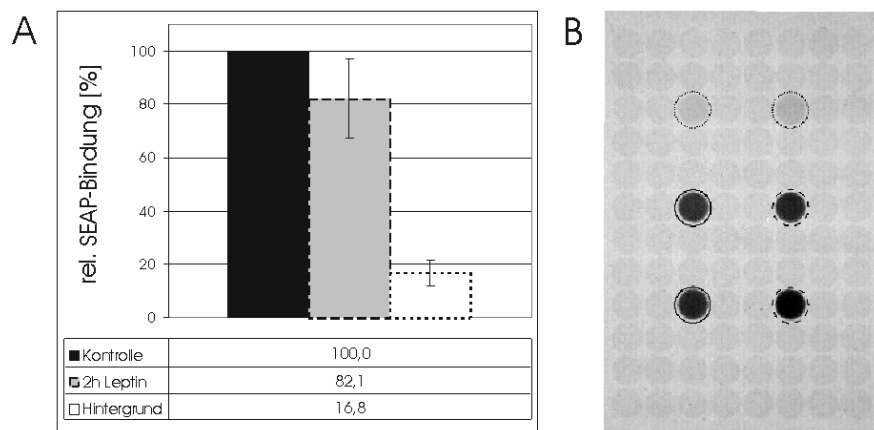


Abbildung 3.2 : Bindungs-Assay zur Untersuchung der LEPRb-Internalisierung

RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden für zwei Stunden mit Leptin stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert gelassen. Ein Waschschrift mit essigsauem Puffer (pH 2,3) diente zur Ablösung des unmarkierten Leptins aus der Vorstimulation von den Rezeptoren. Nach Inkubation mit Leptin-SEAP für 90 Minuten wurden die Zellen gewaschen und spezifisch gebundenes Fusionsprotein durch Umsetzung von CSPD und Lumineszenzmessung quantifiziert. Zur Erfassung der unspezifischen Bindung wurden Zellen neben Leptin-SEAP mit unmarkiertem Leptin in hohem Überschuß (2 µg/ml, ca. 100-fach) inkubiert.

- A: Gezeigt ist das Ergebnis (Mittelwerte ± Standardabweichung) aus sieben Einzelbestimmungen.
 B: Ein exemplarisches Versuchsergebnis; geschlossene Kreise markieren Kontrollproben, während gestrichelte Kreise Proben mit Leptin-Vorstimulation und gepunktete Kreise Proben zur Erfassung unspezifischer Hintergrundbindung markieren.

Als Resultat aus sieben unabhängigen Versuchen gemittelt ergibt sich ein Rückgang der Leptin-SEAP-Bindung als Maß für die Oberflächenexpression des Rezeptors von 22 % (nach Abzug der unspezifischen Bindung) bei den vorstimulierten Zellen. Das Ausmaß der Abschaltung des LEPRb (vgl. Abbildung 3.1-A) übertraf diesen Effekt jedoch bei Weitem und scheint durch Internalisierung des Rezeptors allein nicht erklärbar zu sein. Zudem wäre es möglich, dass ein systematischer Fehler zu einer Überschätzung des Effektes führte: Falls die Ablösung des unmarkierten Leptins aus der Vorstimulation nicht vollständig gelang, wären in diesen Zellen im Vergleich zu den nicht vorstimulierten Kontrollzellen weniger Rezeptoren der Messung zugänglich. Dies würde eine Internalisierung aber lediglich vortäuschen und zu falsch-positiven Ergebnissen führen.

3.1.3 Rezeptor-crosstalk

Die beobachtete Rezeptorabschaltung und Desensitivierung wäre mechanistisch durch eine ausschließliche Auswirkung auf aktivierte Rezeptoren im Sinne einer *cis*-Wirkung vorstellbar. Andererseits könnten jedoch auch diejenigen Rezeptoren desensitiviert werden, die zuvor keiner Stimulation unterlagen. Dies würde einer *trans*-Wirkung entsprechen und wäre durch einen mobilen Faktor erklärbar, der die Information zwischen den Rezeptoren vermittelt. Zudem würde so die Möglichkeit einer Wechselwirkung zwischen Rezeptoren verschiedener Zytokine eröffnet.

Daher sollte ein möglicher *crosstalk* zwischen Leptin-Rezeptor und strukturell nahe verwandten Rezeptoren wie dem Wachstumshormon-Rezeptor¹⁰⁷ oder dem IL-6-Rezeptor untersucht werden.

3.1.3.1 Leptin-Rezeptor und gp130¹⁰⁸

Zur Untersuchung des *crosstalk* zwischen LEPRb und gp130 musste zunächst ein Zellsystem etabliert werden, das die Expression von Leptin-Rezeptor und gp130 in einer Zelle gewährleistete. Dieses System konnte durch sequentielle virale Transfektion einer RIN-Zelllinie mit dem pWZLblasti-LEPRb-WT-Plasmid sowie dem pM5-NRF-Fus-EpoR/gp130-Plasmid erhalten werden. Die dadurch generierte stabile Zelllinie exprimierte sowohl den Leptin-Rezeptor als auch einen chimären Epo/gp130-Rezeptor¹⁰⁹. Die Verwendung der Rezeptorchimäre ermöglichte die Aktivierbarkeit von gp130 ohne Notwendigkeit von gp80¹¹⁰.

Die Prästimulation mit Leptin führte zu einer signifikanten Desensitivierung der LEPRb-Rezeptoren. Der P-STAT3-Spiegel lag nach 24-stündiger Dauerstimulation kaum über dem Hintergrundlevel, und eine erneute Stimulation mit Leptin konnte keine erhöhte Rezeptoraktivierung bewirken (Abbildung 3.3). Im Gegensatz dazu

¹⁰⁷ *Growth hormone receptor*, GH-Rezeptor

¹⁰⁸ Gp130 ist die signaltransduzierende, lange Kette der IL-6-Rezeptoren Familie

¹⁰⁹ Die Chimäre besteht aus dem extrazellulären Teil des murinen Epo-Rezeptors, der an die transmembran- und intrazelluläre Domäne des humanen gp130 fusioniert ist (Fischer *et al.*, 2004)

¹¹⁰ Die spezifitätsvermittelnde, kleine Rezeptorkette ist neben gp130 für die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes notwendig.

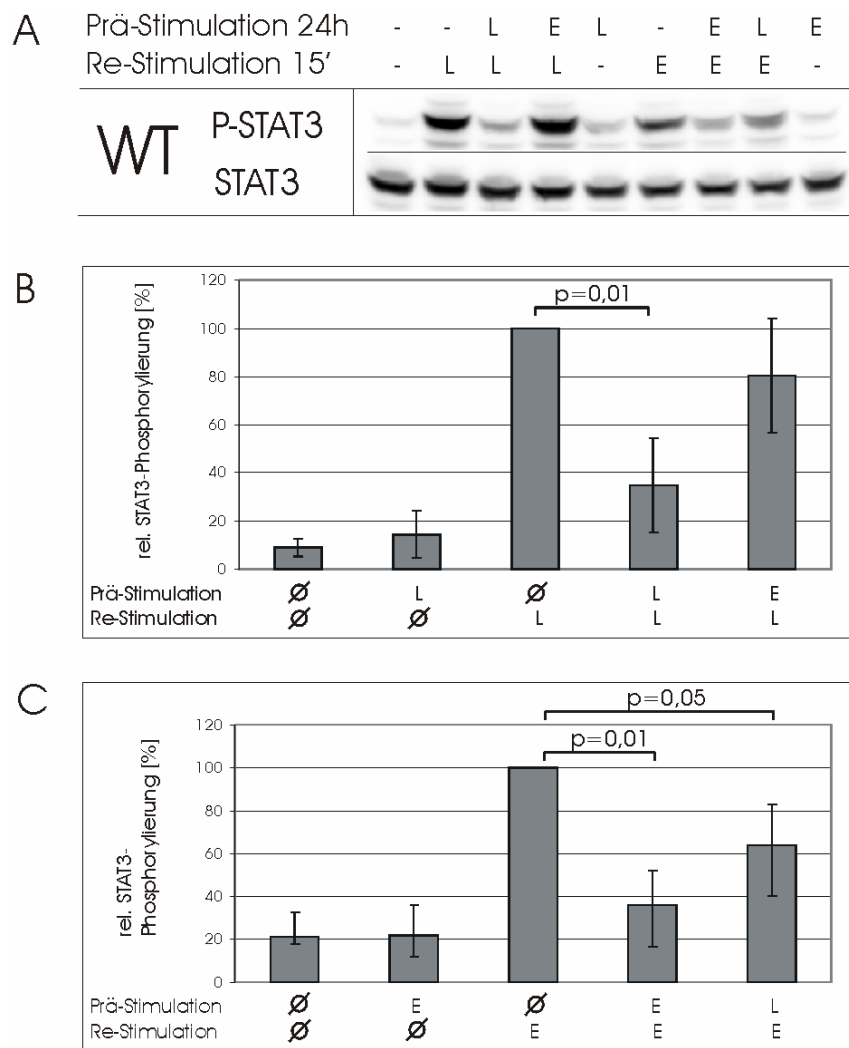


Abbildung 3.3 : Crosstalk zwischen dem LEPRb und einer EpoR/gp130-Chimäre

RIN-LEPRb-WT+EpoR/gp130-Zellen wurden für 24 h mit Leptin [20ng/ml] oder Epo [7u] vorstimuliert. Nach Waschen mit PBS wurden sie mit Leptin (L) oder Epo (E) nochmals kurz (15 Minuten) stimuliert, und die Aktivierung des zuletzt stimulierten Rezeptors durch Nachweis von P-STAT3 gemessen.

A: Gezeigt ist repräsentativer Versuch

B & C: Die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von vier unabhängigen Versuchen, relative STAT3-Aktivierung bezogen auf 15-minütige Leptin-Stimulation (B) bzw. Epostimulation (C).

hatte die vorherige Stimulation der EpoR/gp130-Chimäre durch Epo nur wenig Effekt auf die Re-Stimulierbarkeit der Leptin-Rezeptoren. Der chimäre Rezeptor selbst hingegen war nach Prästimulation nur zu ungefähr 40 % wieder aktivierbar und auch die Vorbehandlung mit Leptin führte zu einer deutlichen und signifikanten Desensitivierung. Somit wirkte sich die Leptin-induzierte Desensitivierung nicht nur

auf die Leptin-Rezeptoren aus, sondern konnte auch eine Beeinträchtigung der Aktivierbarkeit anderer Rezeptoren im Sinne einer *trans*-Wirkung vermitteln.

3.1.3.2 Leptin-Rezeptor und Wachstumshormon-Rezeptor

Der Leptin-Rezeptor vermittelt wie der IL-6-Rezeptor vor allem eine Aktivierung von STAT3. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein *crosstalk* auch zwischen dem LEPRb und einem Rezeptor stattfindet, dessen Stimulation nicht primär die Aktivierung von STAT3 zur Folge hat. Der Wachstumshormon-Rezeptor vermittelt insbesondere die Aktivierung von STAT5 und wird in RIN-LEPRb-WT-Zellen endogen exprimiert. Für diese Versuche war deshalb die Etablierung eines neuen Zellsystems nicht notwendig und RIN-LEPRb-WT-Zellen konnten für diese Experimente herangezogen werden. Nach 24-stündiger Vorstimulation und einer variablen Pause, in der die Zellen keiner Stimulation unterlagen, wurde erneut stimuliert und die resultierende STAT-Aktivierung gemessen. Die stimulationsfreie Zeit diente der Regeneration des Signalwegs und dem Abbau von phosphoryliertem STAT5, um die Effekte einer erneuten Stimulation der Messung zugänglich zu machen. Wie gp130 war auch der GH-Rezeptor in seiner STAT-Aktivierung durch vorhergehende Leptin-Stimulation beeinträchtigt.

Diese Kreuz-Desensitivierung war jedoch schwächer und kürzer andauernd als die Hemmung des LEPRb durch Leptin (Abbildung 3.4-A). Eine Stimulation mit GH hatte keinen Effekt auf die nachfolgende STAT3-Phosphorylierung durch den LEPRb, während hierdurch eine erneute GH-Rezeptor-Aktivierung deutlich und anhaltend gehemmt wurde (Abbildung 3.4-B und C). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Aktivierung des Leptin-Rezeptors ein Desensitivierungssignal generiert wird, das nicht nur auf Leptin-Rezeptor- sondern auch auf GH-Rezeptor- und gp130-vermittelte STAT-Aktivierung im Sinne einer Beeinträchtigung der Wiederaktivierbarkeit einwirkt. In vergleichbarer Weise, wenngleich tendenziell schwächer wurde die Aktivierbarkeit des LEPRb auch durch Prästimulation des GH-Rezeptors und der gp130-Untereinheit gehemmt.

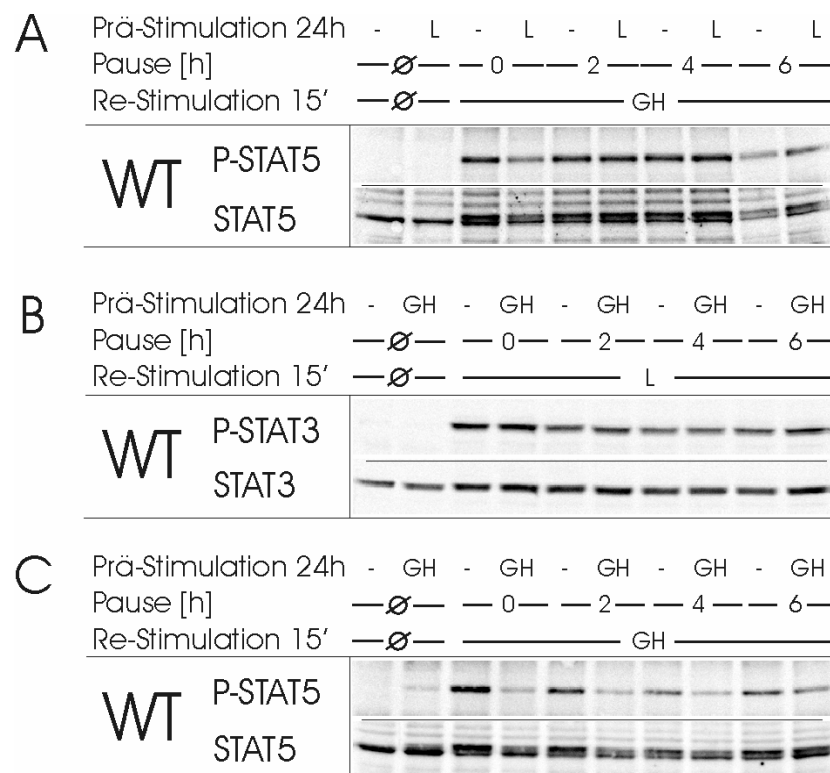


Abbildung 3.4 : Crosstalk zwischen dem LEPRb und dem GH-Rezeptor

RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden für 24 h mit dem angegebenen Zytokin vorstimuliert. Nach Waschen mit PBS und einer unterschiedlich langen Erholungsphase (Pause), in der die Zellen serumfrei inkubiert wurden, folgte eine erneute kurze Stimulation mit Leptin (L) oder Wachstumshormon (GH). Anschließend wurde die Aktivierung des zuletzt stimulierten Rezeptors durch Nachweis von P-STAT3 bzw. P-STAT5 gemessen. Die Doppelbande beim STAT5-Nachweis kommt durch die Retardierung des phosphorylierten Proteins im Gel zustande. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse von je drei unabhängigen Experimenten.

- A: Vorstimulation mit Leptin [20 ng/ml] und Restimulation mit Wachstumshormon.
 B: Vorstimulation mit Wachstumshormon und Restimulation mit Leptin [20 ng/ml]
 C: Vorstimulation mit Wachstumshormon und Restimulation mit Wachstumshormon

3.1.4 Aktive Genexpression

Die Erkenntnis, dass eine Kommunikation der Desensitivierung zwischen verschiedenen Rezeptoren auftreten kann, warf sogleich die Frage auf, ob dieser mobile Faktor stimulationsunabhängig in der Zelle vorlag, oder erst de novo produziert werden musste. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluss von Actinomycin D und Cycloheximid auf die Abschaltung untersucht. Als Inhibitoren der Transkription bzw. der Translation verhindern beide Stoffe eine Expression des

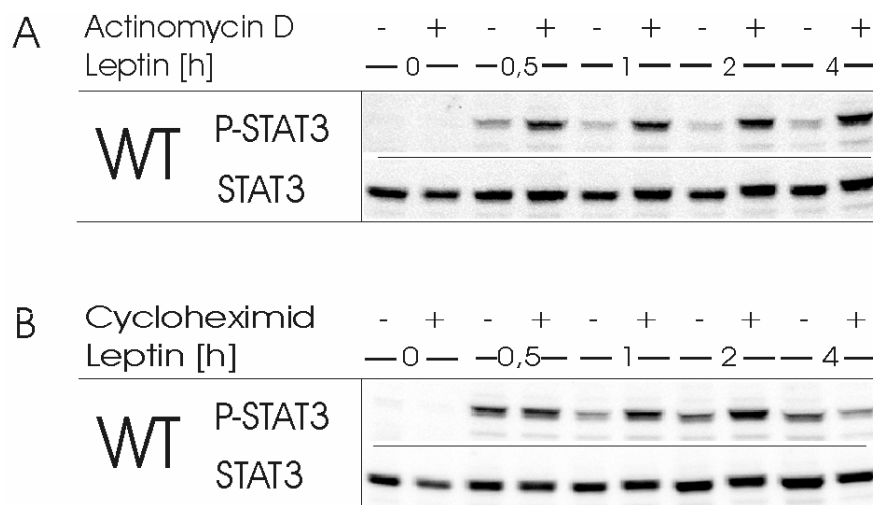


Abbildung 3.5 : Inhibition der Proteinexpression verhindert Abschaltung des LEPRb

RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden wie angegeben mit Actinomycin D [5 µg/ml] oder Cycloheximid [10 µg/ml] inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Zellen zusätzlich mit 20 ng/ml Leptin für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Nach einer nativen Lyse wurden die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und P-STAT3 mit phosphospezifischem Antikörper nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von jeweils zwei unabhängigen Versuchen pro Inhibitor.

postulierten mobilen Faktors, wodurch eine Differenzierung zwischen beiden Mechanismen ermöglicht wird.

Während die Stimulation des LEPRb – wie bereits beschrieben – zur schnellen Abschaltung des Rezeptors führte, blieben die P-STAT3-Spiegel unter dem Einfluss sowohl von Actinomycin D als auch von Cycloheximid auf dem Niveau der kurzen Stimulation und zeigten auch nach bis zu vier Stunden keinen Rückgang (Abbildung 3.5). Actinomycin D hatte bereits nach 30 Minuten Stimulation einen deutlichen Effekt, wohingegen der Effekt von Cycloheximid erst nach einer Stunde zu sehen war. Dies könnte durch eine schnellere Penetration von Actinomycin D durch die Zellmembran erklärt werden. Nach längerer Inkubation wies Cycloheximid einen toxischen Effekt auf die Zellen auf, der bei Versuchen mit längerer Inkubationsphase zu einer abnehmenden Responsivität gegenüber Leptin führt (Daten nicht gezeigt) und in Abbildung 3.5-B bereits nach vier Stunden zu beobachten war.

Die Notwendigkeit von aktiver Genexpression für die Abschaltung legt die Vermutung nahe, dass durch die Aktivierung des Leptin-Rezeptors die Neusynthese eines Proteins initiiert wird, das dann als diffusibles Signal in der Zelle vorliegt und eine *trans*-Wirkung ermöglicht.

3.2 Einfluss der Tyrosinreste

Die drei intrazellulären Tyrosinreste des murinen Leptin-Rezeptors sind nicht nur für die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs relevant, sie sind als Proteinbindungsstellen auch für die negative Regulation von Bedeutung.

Die Bedeutung der Tyrosine Y 985 und Y 1077 für die negative Regulation unter besonderer Berücksichtigung der Interaktionen mit SOCS1 und SOCS3 sollte daher mit Hilfe der Tyrosin/Phenylalanin-Punktmutanten (vgl. Abschnitt 2.1.4.1) näher charakterisiert werden. Zunächst wurde die Aktivierung der Rezeptoren anhand der STAT3-vermittelten Luziferaseexpression in Reporter-Gen-Assays untersucht. Diese Versuche liefern als Resultat ein Integral der Promotoraktivierung über die gesamte Stimulationszeit von 16 Stunden und bieten damit einen weiteren Zugang zur Untersuchung der Rezeptor-Regulation. In diesen Versuchen wurde die Zelllinie HIT aus Hamster-Inselzellen und die humane Leberzelllinie HepG2 eingesetzt.

Die untersuchten Tyrosin/Phenylalanin-Rezeptormutanten, deren Y 985 durch Phenylalanin (F) ersetzt worden war, zeigten im Reporter-Gen-Assay eine deutliche Erhöhung der Leptin-abhängigen Promotoraktivierung (Abbildung 3.6). Dies steht in Übereinstimmung mit der Rolle dieses Tyrosins als Bindungsstelle inhibitorischer Proteine. Die zusätzliche Mutation von Y 1077 zu Phenylalanin resultierte in einer nochmaligen signifikanten Erhöhung der Promotoraktivierung. Dies deutet auf die Beteiligung des Y 1077 an der negativen Regulation des LEPRb hin, die sich allerdings ausschließlich zusammen mit der Mutation des Y 985 zu Phenylalanin auswirkt und bei vorhandenem Y 985 nicht nachzuweisen ist.

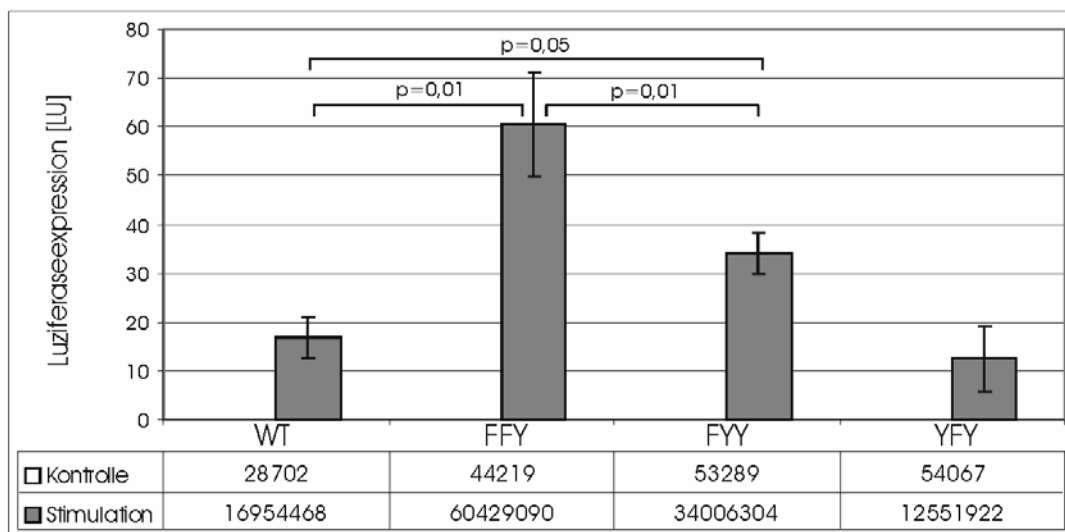


Abbildung 3.6 : Differentielle Promotoraktivierung durch LEPRb-Punktmutanten

HepG2-Zellen wurden mit der angegebenen Rezeptormutante transfiziert. Nach Stimulation mit Leptin [100 ng/ml] für 16 h wurde die Rezeptoraktivierung mittels *Luziferase-Assay* nachgewiesen. Die unstimulierten Kontrollen sind wegen der geringen Luziferase-Aktivitäten in der Abbildung nicht zu sehen. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus drei bzw. vier (FFY) unabhängigen Versuchen.

3.2.1 Abschaltung und Desensitivierung der Y/F-Punktmutanten

Es wurde im Folgenden untersucht, inwieweit sich die Effekte der negativen Regulation der Promotoraktivierung auch auf Proteinebene im Western-Blot beobachten ließen. Die Versuche wurden zur besseren Vergleichbarkeit analog zu den Versuchen aus Abschnitt 3.1.1 durchgeführt. Zunächst mussten hierfür die entsprechenden RIN-Zelllinien erzeugt werden, die die jeweiligen Rezeptormutanten stabil exprimierten. Die Linien RIN-LEPRb-FYY und RIN-LEPRb-YFY wurden wie in Abschnitt 2.4.3.3 beschrieben hergestellt, die Linie RIN-LEPRb-FFY stand in unserem Labor bereits zur Verfügung. Die Zellen wurden wie angegeben behandelt und die STAT3-Phosphorylierung als Maß für die Rezeptoraktivität im Zeitverlauf nach Stimulation nachgewiesen (Abbildung 3.7).

Während die P-STAT3-Spiegel bereits nach zwei Stunden langer Stimulation des LEPRb-WT kaum mehr über dem Niveau der unstimulierten Kontrolle lagen, und sowohl die FYY- als auch die YFY-Mutante dem wildtyp-LEPRb im Zeitverlauf der

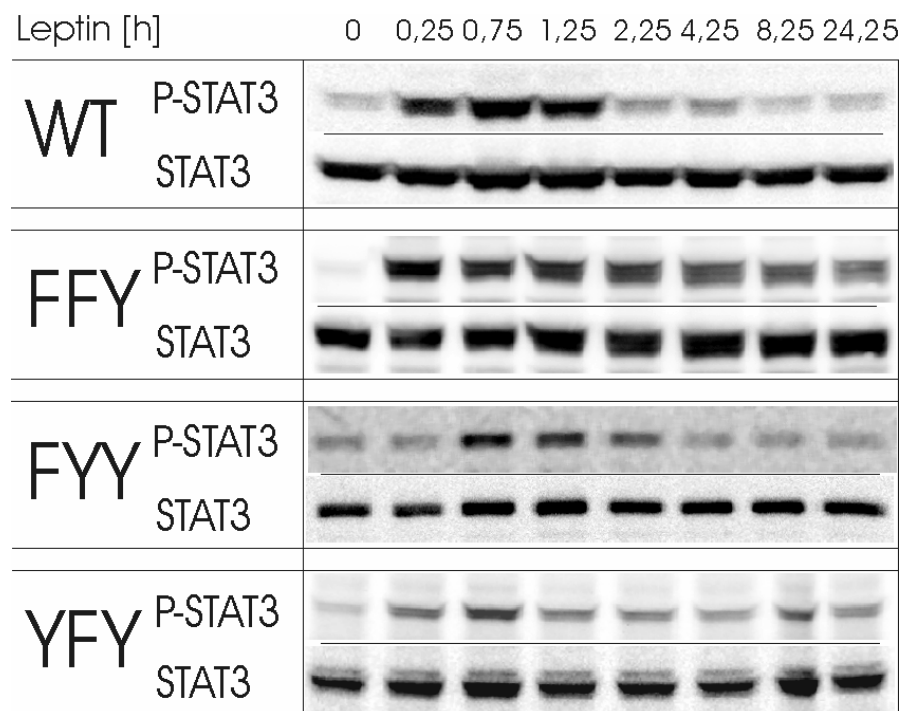


Abbildung 3.7 : Abschaltung der LEPRb-Punktmutanten

RIN-Zellen, die die angegebene Rezeptormutante stabil exprimieren, wurden für die angegebenen Zeiträume mit 20ng/ml Leptin stimuliert. Nach denaturierender Lyse, SDS-PAGE und *Western-Blotting* wurden P-STAT3 und STAT3 mittels spezifischer Antikörper detektiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse aus zwei (YFY) oder jeweils drei (WT, FFY, FYY) Versuchen.

STAT3-Aktivierung im Wesentlichen glichen, zeigte die FFY-Mutante eine lang anhaltende Phosphorylierung von STAT3, die auch nach 24-stündiger Stimulation noch deutlich detektierbar war.

Dieses Ergebnis deutet auf die Notwendigkeit eines der Tyrosine 985 oder 1077 hin, die beide ausreichen, um eine Abschaltung der Rezeptoraktivierung innerhalb von zwei Stunden zu vermitteln. Erst die Mutation dieser beiden Tyrosine zusammen führt zu einer deutlich verlängerten Rezeptoraktivierung.

Für die Desensitivierung nach 24-stündiger Stimulation konnte gezeigt werden, dass weder die Mutation von Y 985 oder Y 1077 allein, noch die Mutation der beiden Tyrosine zusammen eine relevante Veränderung gegenüber der Desensitivierung des LEPRb-WT verursachte (Abbildung 3.8). Alle untersuchten Rezeptormutanten zeigen eine starke Resistenz gegenüber erneuter Stimulierbarkeit. Auch die Doppelmutante, die im Abschaltungsversuch eine deutlich verzögerte Reaktion auf

3.2.2 Die Rolle der SOCS-Proteine bei der Desensitivierung

Einige Proteine der SOCS-Familie, insbesondere SOCS3 und SOCS1, sind bereits als Inhibitoren vieler Zytokin-Rezeptoren charakterisiert worden (Song und Shuai, 1998; Starr *et al.*, 1997). Die Expression von SOCS3 wird nach Stimulation des LEPRb STAT3-abhängig über Y 1138 induziert, woraufhin SOCS3 nach Bindung an P-Y 985 die Janus-Kinase hemmt. Dadurch ergibt sich ein Mechanismus der *feedback*-Inhibition des Leptin-Rezeptors durch SOCS3 (Bjorbaek *et al.*, 2000). Hingegen inhibiert SOCS1 den Signalweg über eine direkte Interaktion mit JAK2 (Endo *et al.*, 1997).

Es sollte im Folgenden untersucht werden, welche Rolle SOCS1 und SOCS3 bei der negativen Regulation des LEPRb in unseren Systemen einnehmen und welche Tyrosinreste gegebenenfalls einen Einfluss auf die Wirkung dieser SOCS-Proteine ausüben können.

3.2.2.1 Induktion der SOCS-Expression

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Leptin-induzierte Steigerung der SOCS-Expression in unserem Zellsystem stattfindet. Zum Nachweis von SOCS1-mRNA-Transkripten nach Leptin-Stimulation von RIN-LEPRb-WT-Zellen mittels Northern-Blot-Hybridisierung wurde eine Blotmembran hybridisiert, die bereits aus der Untersuchung differenzieller Effekte nach Stimulation mit Leptin und Interleukin 1 (IL-1) durch Paul Hekerman (Hekerman, 2004) zur Verfügung stand.

In RIN-LEPRb-WT-Zellen war eine schnelle, aber transiente Induktion der SOCS3 Expression bereits nach einer Stunde nachgewiesen worden, die jedoch nach drei Stunden wieder abgenommen hatte (Abbildung 3.9). Die Expression von SOCS1-mRNA-Transkripten wurde jedoch zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung

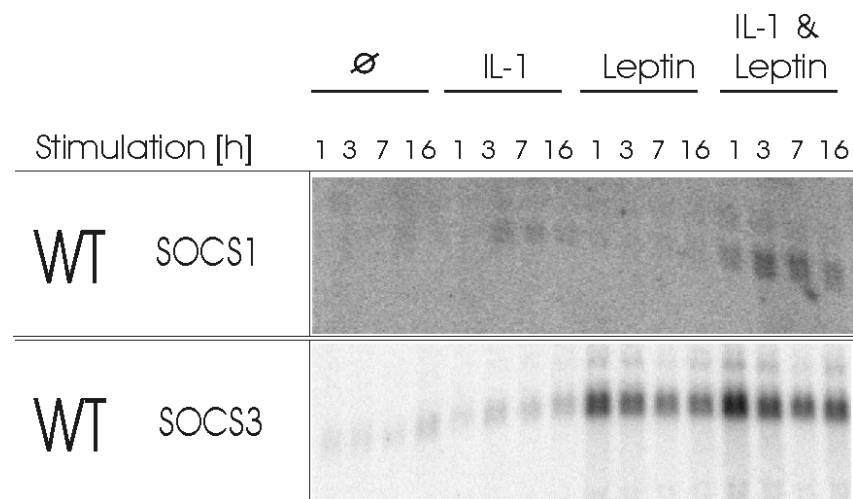


Abbildung 3.9 : Induktion der SOCS1- bzw. SOCS3-Genexpression

RIN-LEPRb-WT-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Leptin stimuliert [100 ng/ml]. Nach der Extraktion der gesamt-RNA wurde diese über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und SOCS1- bzw. SOCS3-mRNA durch Hybridisierung mit spezifischen, radioaktiv markierten cDNA-Sonden identifiziert. Die SOCS3-Hybridisierung wurde zur besseren Vergleichbarkeit aus (Hekerman, 2004) übernommen.

durch die Stimulation mit Leptin verändert. Die deutliche Zunahme von SOCS1-mRNA-Transkripten nach IL-1-Stimulation und mehr noch nach gleichzeitiger Inkubation mit IL-1 und Leptin zeigt jedoch die prinzipielle Nachweisbarkeit des Effekts.

In Abschnitt 3.1.4 wurde jedoch bereits die Notwendigkeit aktiver Genexpression für die Abschaltung gezeigt, daher kann die Abschaltung des LEPRb-Signals nicht durch eine *feedback*-Inhibition mit SOCS1-Beteiligung erklärt werden. Da SOCS3 in Gegensatz dazu eine Leptin-responsive Hochregulation zeigt, könnte die gezeigte Abschaltung durch die SOCS3-*feedback* Inhibition erklärt werden.

3.2.2.2 Die Wirkung von SOCS3

SOCS3 wird nach Stimulation des Leptin-Rezeptors STAT3-abhängig exprimiert und kann durch Bindung an das Tyrosin 985 des LEPRb die weitere Aktivierung des Rezeptors vermindern. Da die bisherigen Ergebnisse jedoch auch eine Beteiligung des Y 1077 an der negativen Regulation nahelegen, sollte der differentielle Effekt einer SOCS3-Überexpression auf die LEPRb-Y/F-Punktmutanten untersucht werden.

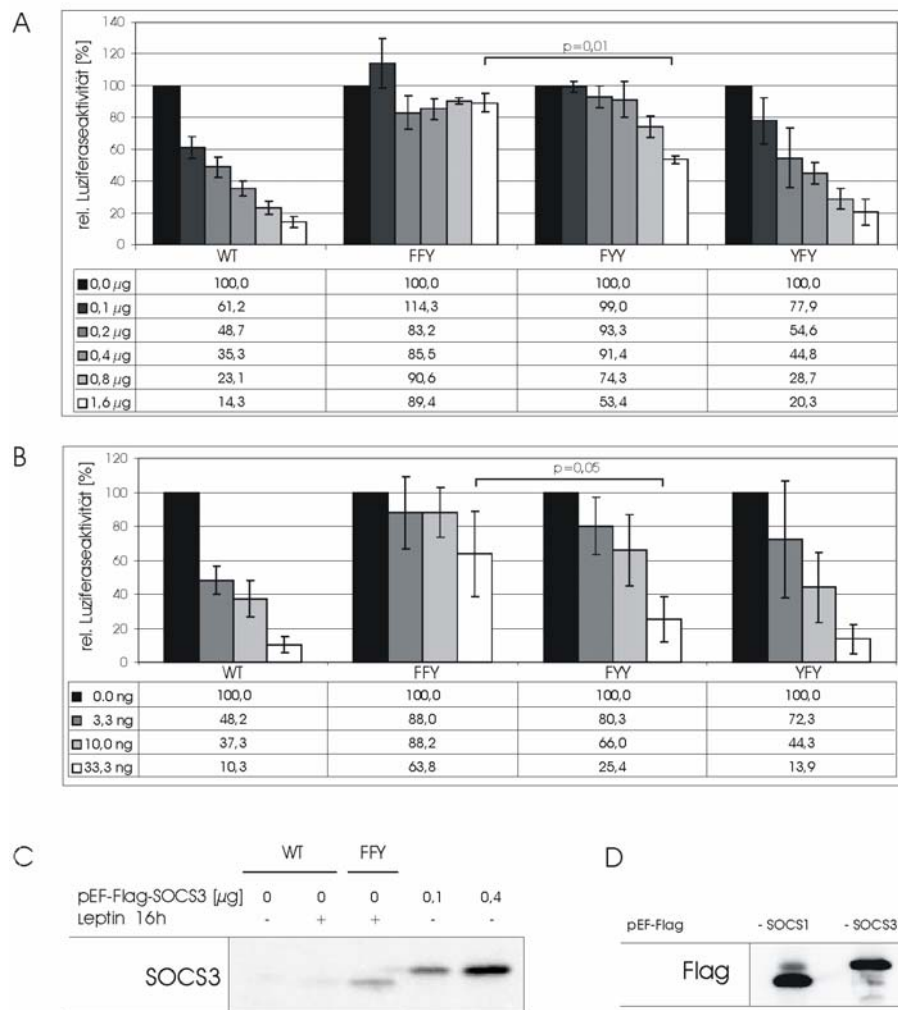


Abbildung 3.10 : Einfluss der SOCS3-Überexpression auf die Rezeptoraktivität

- A: HIT-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pEF-Flag-SOCS3-Plasmid transfiziert und die Luziferase-Aktivität nach 16 h Stimulation mit 100 ng/ml Leptin gemessen.
- B: Wie in A, jedoch mit HepG2-Zellen durchgeführt.
- A & B: Die Ergebnisse der Reporter-*Assays* in den Teilabbildungen A und B wurden auf die Werte der Kontrollzellen, die nicht mit SOCS3- sondern lediglich mit Kontrollplasmid transfiziert worden waren, normalisiert. Angegeben sind die gemittelten Werte (\pm Standardabweichung) aus drei unabhängigen Versuchen.
- C: In HIT-Zellen wurde die angegebene Rezeptormutante oder die angegebenen Mengen pEF-Flag-SOCS3-Plasmid exprimiert. Nach 16 h Leptin-Stimulation [100 ng/ml] wurden die Zellen lysiert und SOCS3-Spiegel mittels Immunpräzipitation und anschließender Detektion (mit biotinyliertem SOCS3-Antikörper) via Western-Blot verglichen¹¹¹.
- D: HIT-Zellen wurden gleichen Mengen pEF-Flag-SOCS3- bzw. pEF-Flag-SOCS1-Plasmid transfiziert. Nach 30 Stunden wurden die Zellen lysiert und die SOCS-Proteine mittels Western-Blot und Immundetektion nachgewiesen.

¹¹¹ Die höhere Masse des überexprimierten Proteins ist durch das fusionierte *Flag*-Epitop zu erklären.

Die Überexpression von SOCS3 führte in HIT-Zellen konzentrationsabhängig zu einer Hemmung der Aktivierung des LEPRb-WT, wie auch der LEPRb-FYY und LEPRb-YFY Mutanten (Abbildung 3.10-A). Während der wildtyp-Rezeptor und der LEPRb-YFY jedoch in vergleichbarer Weise bereits durch geringe Mengen SOCS3-Plasmid gehemmt wurden, war für die Mutanten ohne Tyrosin 985 eine deutlich geringere Sensitivität für SOCS3 festzustellen. Vergleicht man die Mutanten LEPRb-FYY und LEPRb-FFY untereinander, so zeigt sich eine Inhibition des LEPRb-FYY bei hohen Konzentrationen von SOCS3 (bis zu 1,6 µg transfiziertem Plasmid) wohingegen der Rezeptor ohne diese beiden Tyrosine keiner Beeinflussung durch SOCS3 unterlag.

Dieses Experiment wurde mit der Hepatom-Zelllinie HepG2 wiederholt, um einen direkten Vergleich mit geplanten *knockdown*-Experimenten zu ermöglichen.

In diesen Zellen war das LEPRb-FFY Konstrukt erst durch 33 ng SOCS3-Plasmid in der Aktivierung beeinträchtigt, jedoch in geringerem Ausmaß als die LEPRb-FYY Mutante, während sich der LEPRb-WT und der LEPRb-YFY weitaus anfälliger für SOCS3-Einfluss zeigten (Abbildung 3.10-B). Die beiden verwendeten Zelllinien zeigten frappierende Unterschiede in den Plasmidkonzentrationen, die zum Erzielen vergleichbarer Effekte zutransfiziert werden mussten. Über eine mögliche Ursache hierfür kann nur spekuliert werden, eventuell unterliegt die Proteinexpression in diesen Zellen einer unterschiedlichen Regulation.

Um die Proteinmenge, die nach Überexpression in den Zellen gebildet wird, mit der endogen erreichbaren Konzentration nach Stimulation des LEPRb zu vergleichen, wurden HIT-Zellen mit SOCS3- oder LEPRb-Plasmid transfiziert und stimuliert. Zur direkten Vergleichbarkeit mit den Reporter-gen-Assays wurden die gleichen Bedingungen hinsichtlich Inkubations- und Stimulationszeiten eingehalten. Nach der Lyse wurden die Mengen an SOCS3-Protein mittels Immunpräzipitation und Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 3.10-C). In HIT-Zellen wurde der SOCS3-Spiegel durch Leptin-Stimulation deutlich erhöht, jedoch erreicht lediglich die FFY-Mutante Konzentrationen, die der Überexpression mit 0,1 µg Plasmid vergleichbar waren. Dieses Ergebnis ist allerdings im Gegensatz zum Reporter-gen-Assay, der die Expression der Luziferase über einen Zeitraum von 16 Stunden wiedergibt, eine Momentaufnahme. Es kann vor dem Hintergrund der

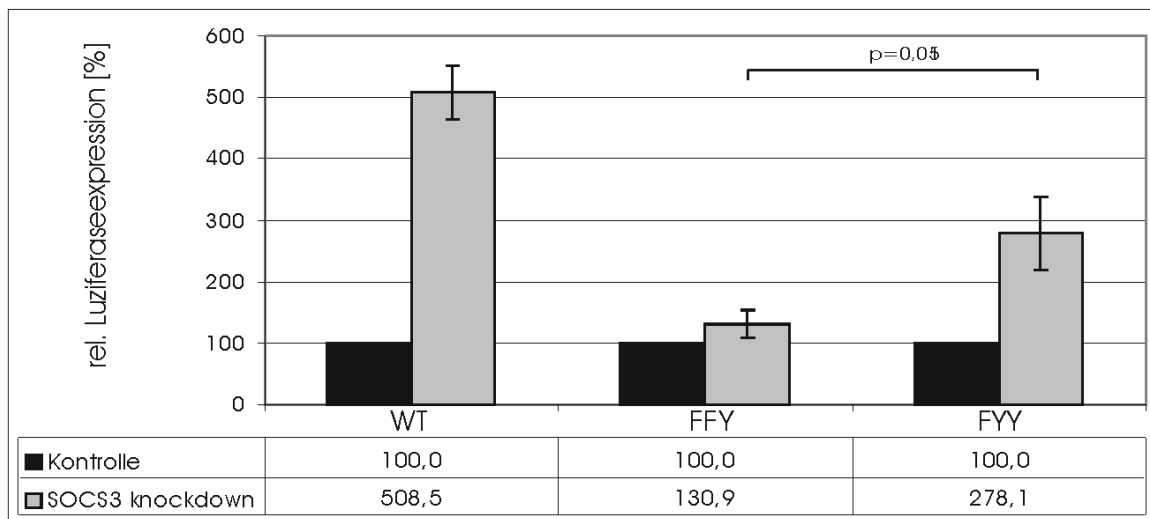


Abbildung 3.11 : Einfluss des SOCS3-knockdown auf die Rezeptoraktivität

In HepG2-Zellen wurden die LEPRb-Mutanten (0,15 µg/well) mit 0,3 µg/well des pSuperSOCS3-Plasmids („SOCS3 knockdown“) oder mit der gleichen Menge des leeren pSuper-Vektors („Kontrolle“) exprimiert. 54 Stunden nach der Transfektion wurden alle Zellen mit 100 ng/ml Leptin für 16 h stimuliert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität gemessen und auf die β-Galactosidase-Aktivität normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (± Standardabweichung) dreier unabhängiger Versuche.

schnellen und transienten Induktion der SOCS3-Expression durch Leptin (vgl. Abbildung 3.9) nicht ausgeschlossen werden, dass zu früheren Zeitpunkten der Stimulation, insbesondere des LEPRb-WT, höhere Spitzenkonzentrationen erreicht werden.

Um in den nachfolgenden Versuchen die Effekte von überexprimiertem SOCS1 und SOCS3 vergleichen zu können, wurden die resultierenden Proteinmengen in einem Western-Blot-Experiment gegenübergestellt. Die Transfektion gleicher Plasmidmengen resultierte in der Expression vergleichbarer Proteinmengen (Abbildung 3.10-D).

Dieses Ergebnis weist auf einen inhibitorischen Mechanismus hin, der auf einer Wechselwirkung mit Tyrosin 985 beruht, aber nur bei Anwesenheit von Y 1077 in vollem Umfang wirksam werden kann. Wie in den Abschaltungs-Versuchen wurde damit gezeigt, dass der LEPRb-FFY sich in seiner Resistenz gegenüber SOCS3-Wirkung deutlich vom LEPRb-FYY unterscheidet und dadurch eine Beteiligung von Y 1077 an der SOCS3-vermittelten Inhibition nahe legt. Im Gegensatz zu Abschnitt 3.2.1 hatte im Reporteragen-Assay allerdings die Mutation

von Y 985 allein bereits einen deutlichen Effekt, während sich die Mutation von Y 1077 allein nicht auswirkte, sondern nur in Kombination mit einer Mutation des Y 985.

Die Überexpression von Proteinen birgt die Gefahr, unspezifische Effekte hervorzurufen und somit das Ergebnis des Experiments zu verfälschen. Um die differentielle Interaktion von SOCS3 mit den Tyrosinresten 985 und 1077 unter Bedingungen endogener SOCS3-Konzentrationen untersuchen zu können, wurden RNAi-Experimente in der humanen Zelllinie HepG2 durchgeführt. Die transiente Transfektion dieser Zellen machte den Einsatz von RNAi-Plasmiden möglich, die gegen humane RNA-Sequenzen gerichtet waren. Diese Methode erlaubt den gezielten Abbau von Proteinen durch Degradierung der entsprechenden mRNA-Transkripte (Elbashir *et al.*, 2001; Sui *et al.*, 2002). In Reportergen-Assays wurde der Effekt des SOCS3-*knockdown* auf die Aktivität des Leptin-Rezeptors und der Punktmutanten untersucht.

Der gezielte Abbau von SOCS3 führte in LEPRb-WT-exprimierenden Zellen zu einer fünffach höheren Rezeptoraktivität als in Zellen, die zur Kontrolle mit dem Plasmid ohne Zielsequenz transfiziert worden waren (Abbildung 3.11). Die LEPRb-FYY Mutante, deren beschriebene SOCS3 Bindungsstelle Y 985 fehlt, wurde durch den *knockdown* ebenfalls beeinflusst. Die Luziferaseexpression als Maß für die Rezeptoraktivität stieg jedoch nur auf das ungefähr 2,8-fache des Kontrollwerts an. Die LEPRb-FYY Mutante schließlich zeigte keine Steigerung der Promotoraktivierung durch den *knockdown*.

Dieses Ergebnis unterstützt das Resultat aus Abbildung 3.10 und zeigt, dass auch bei endogenen Konzentrationen eine Inhibition des LEPRb-FYY stattfinden kann und erst durch die zusätzliche Mutation von Y 1077 der Einfluss von SOCS3 auf den Rezeptor verhindert wird. Diese Beteiligung von Y 1077 an der negativen Regulation durch SOCS3 Regulation konnte also nicht nur in Überexpressionsversuchen gezeigt werden, sondern war auch unter den Bedingungen endogener intrazellulärer SOCS3- Spiegel nachweisbar.

3.2.2.3 Die Wirkung von SOCS1

Im Gegensatz zu SOCS3 wird für SOCS1 in der Literatur ein Mechanismus der direkten Hemmung der Janus-Kinase diskutiert, der keine Bindung an den Rezeptor selbst voraussetzt (Endo *et al.*, 1997). Es gibt allerdings auch Hinweise auf eine direkte Interaktion mit Phosphotyrosin-Motiven von Zytokin-Rezeptoren wie dem MCSF-Rezeptor¹¹² (Bourette *et al.*, 2001) oder dem EGF-Rezeptor¹¹³ (Xia *et al.*, 2002).

Um die Frage zu klären, ob SOCS1 die LEPRb-Aktivierung über direkte Interaktion mit der assoziierten Janus-Kinase inhibieren kann oder ob auch eine Interaktion mit einem Rezeptortyrosin wie bei SOCS3 stattfindet, wurde der Einfluss von überexprimiertem SOCS1 auf die Aktivierung von LEPRb-Mutanten untersucht.

Die Expression von SOCS1 verminderte konzentrationsabhängig die Aktivierung von LEPRb-WT, LEPRb-FFY, LEPRb-FYY und LEPRb-YFY, wobei jedoch die Rezeptormutanten mit Tyrosin 985 eine höhere Sensitivität gegenüber der SOCS1-Wirkung aufwiesen als die Rezeptoren mit einer mutierten Position 985 (Abbildung 3.12). Die LEPRb-YFY Mutante zeigte über alle Plasmidkonzentrationen hinweg ähnliche Effekte wie der LEPRb-WT, und auch zwischen den Rezeptoren LEPRb-FFY und LEPRb-FYY waren kaum Unterschiede auszumachen.

Dieses Ergebnis lässt auf eine Beteiligung des Tyrosins 985 an der SOCS1-vermittelten Hemmung der LEPRb-Aktivierung schließen und zeigt, dass Tyrosin 1077 keine relevante Funktion für die Interaktion mit SOCS1 übernimmt.

Die Tyrosin-unabhängige Hemmung, die bei der Rezeptormutante LEPRb-FFY nachweisbar ist, bestätigt darüber hinaus den bereits beschriebenen Mechanismus über direkte Interaktion mit JAK2.

Auch in diesem Fall sollte das Risiko von Artefakten durch Überexpression ausgeschlossen werden, deshalb wurde mit Hilfe eines *knockdown*-Experiments untersucht, ob die LEPRb-Aktivierung durch Ausschalten des endogenen SOCS1-Proteins beeinträchtigt würde. Dazu wurden die LEPRb-Mutanten

¹¹² *Macrophage colony-stimulating factor*

¹¹³ *Epidermal growth factor*

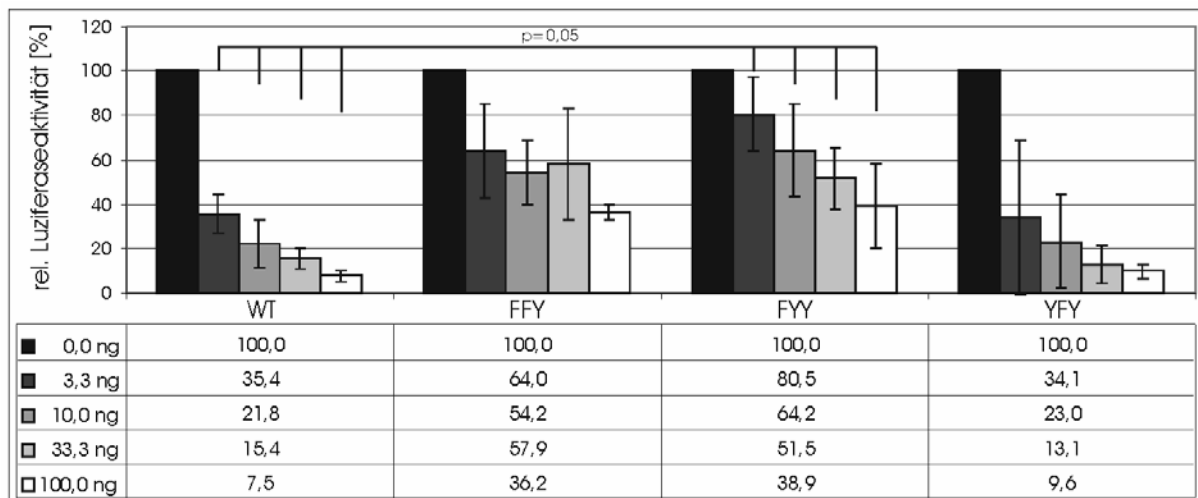


Abbildung 3.12 : Einfluss der SOCS1-Überexpression auf die Rezeptoraktivität

In HepG2-Zellen wurden die Expressionsplasmide für die LEPRb-Mutanten (0,15 µg/well) zusammen mit den angegebenen Mengen (in ng/well) des pEF-Flag-SOCS1-Plasmids exprimiert. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 ng/ml Leptin für 16 h stimuliert. Die Luciferase-Aktivität wurde gemessen und auf die β-Galactosidase-Aktivität normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (± Standardabweichung) dreier unabhängiger Versuche.

zusammen mit dem Plasmid pSM-SOCS1, das für shRNA gegen SOCS1 kodiert, in HepG2-Zellen transfiziert, und die Rezeptoraktivierung über die Luciferase-Aktivität bestimmt. Der *knockdown* von SOCS1 führte im Vergleich zum *knockdown* von SOCS3 zu einer nur geringen Erhöhung der Aktivität des LEPRb-WT sowie der Rezeptoren LEPRb-FYY und LEPRb-YFY um ungefähr 50 %. Die LEPRb-FFY Mutante dagegen wurde durch die Verminderung der SOCS1-Proteine nicht beeinflusst. Dieses Ergebnis bestätigt nicht eine selektive Interaktion von SOCS1 mit Tyrosin 985, vielmehr weist es auf eine undifferenzielle Interaktion mit den Tyrosinen Y 985 oder Y 1077 hin. Nur durch die Mutation beider Tyrosine Y 985 und Y 1077 konnte der Effekt des *knockdown* verhindert werden.

Der Einfluss des *knockdown* auf alle Rezeptormutanten ist jedoch sehr gering und erreichte keine statistische Signifikanz.

Zusammenfassend konnte also eine Inhibition des LEPRb durch SOCS1 gezeigt werden, die zumindest bei Vorliegen hoher Konzentrationen von SOCS1 durch eine Mutation von Y 985 zu Phenylalanin abgeschwächt wird. Da die Expression von SOCS1 durch Leptin jedoch nicht induziert wird (vgl. Abbildung 3.10), ist die dadurch

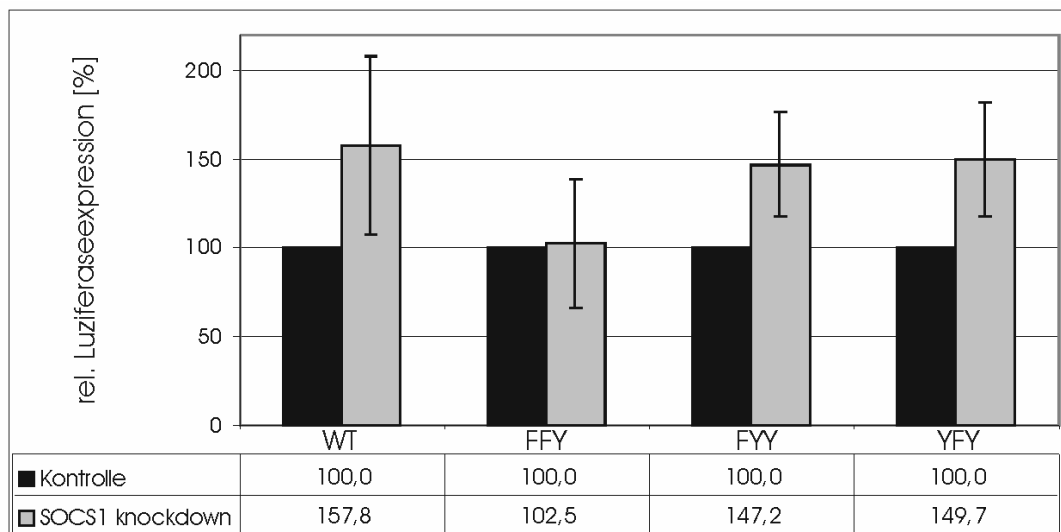


Abbildung 3.13 : Einfluss des SOCS1-knockdown auf die Rezeptoraktivität

HepG2-Zellen wurden mit den LEPRb-Plasmiden (0,15 µg/well) und mit 0,3 µg/well des pSM-SOCS1-Plasmids transfiziert. 54 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 ng/ml Leptin für 16 h stimuliert. Die Luziferase-Aktivitäten wurden anschließend auf die β-Galactosidase-Aktivitäten normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte (± Standardabweichung) aus fünf unabhängigen Versuchen.

vermittelte Inhibition recht schwach ausgeprägt und konkurriert mit der direkten Hemmung der Janus-Kinase durch SOCS1.

3.3 Aktivität der Janus-Kinase im Rezeptorkomplex

Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren zusammen mit den assoziierten JAKs einen stabilen Rezeptorkomplex bilden, der als eine Rezeptortyrosinkinase aufgefasst werden kann (Behrmann *et al.*, 2004; Giese *et al.*, 2003). Als Katalysatoren der multiplen Phosphorylierungsreaktionen sind die assoziierten JAKs entscheidend für die Rezeptoraktivität und für die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs. Mit den SOCS-Proteinen, SHP-2 und PTP1B greifen viele der bisher diskutierten Inhibitoren des JAK/STAT-Signalwegs über eine Hemmung der JAK-Aktivität regulierend in den Signalweg ein.

Die Phosphorylierung im katalytischen Zentrum von Tyrosinkinasen ist eine notwendige Voraussetzung für ihre Aktivität und findet häufigen Gebrauch als indirektes Maß bei der Bestimmung der Rezeptoraktivität (Johnson *et al.*, 1996).

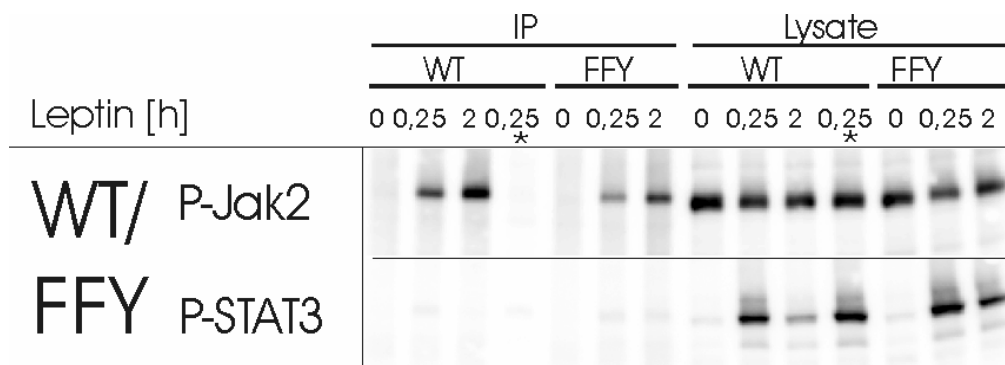


Abbildung 3.14 : Co-Immunfällung des LEPRb-Rezeptorkomplexes

RIN-LEPRb-WT bzw. RIN-LEPRb-FFY-Zellen wurden ausgesät und nach 48 Stunden für weitere 16 Stunden ohne Serum inkubiert. Die Zellen je einer Platte mit 6 cm Durchmesser wurden lysiert, die Lysate anschliessend einer Co-Immunfällung mit *c-Myc*-Antikörper unterzogen. Dadurch wurde das *c-Myc*-Epitop am N-Terminus des LEPRb gebunden und der Rezeptor mit dem gesamten Komplex gefällt. Die Proteine wurden dann von der Sepharose gelöst. Nach SDS-PAGE und *Western-Blotting* wurde die Tyrosin-Phosphorylierung der angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Um herauszufinden, inwieweit die beobachtete Abschaltung des Signalwegs auf eine Inaktivierung der assoziierten Janus-Kinase am Rezeptorkomplex zurückzuführen ist, untersuchten wir die Phosphorylierung der JAK nach Co-Immunpräzipitation mit dem LEPRb. Es muss angemerkt werden, dass der eingesetzte Antikörper sowohl P-JAK2 als auch P-JAK1 gleichermaßen erkennt, denn die beiden Proteine sind in der betreffenden Region der Aktivierungsschleife hoch konserviert.

Wie in Abbildung 3.14 zu sehen ist, nahm die Konzentration an aktiviertem STAT3 in RIN-LEPRb-WT-Zellen nach zweistündiger Stimulation rapide ab, wohingegen in Lysaten von RIN-LEPRb-FFY-Zellen die Menge an phosphoryliertem STAT3 nicht vermindert war. Dies korrelierte überraschenderweise jedoch nicht mit der Phosphorylierung der JAK am Rezeptor, die in beiden Zelllinien nach zwei Stunden keineswegs schwächer war als nach kurzer Stimulation. In den Lysaten beider Zelllinien war keine Leptin-abhängige JAK-Phosphorylierung nachzuweisen, eine Beobachtung, die aus dem Nachweis unspezifischer Proteine durch den Antikörper oder aus differentieller Regulation der JAKs in freier und Rezeptor-gebundener Form resultieren könnte.

Zur Erklärung dieses Befunds könnte sowohl ein Mechanismus mit späterem Eingriff in den Signalweg, zum Beispiel auf die STAT-Dephosphorylierung, herangezogen werden, als auch eine Hemmung der JAK ohne damit einhergehende

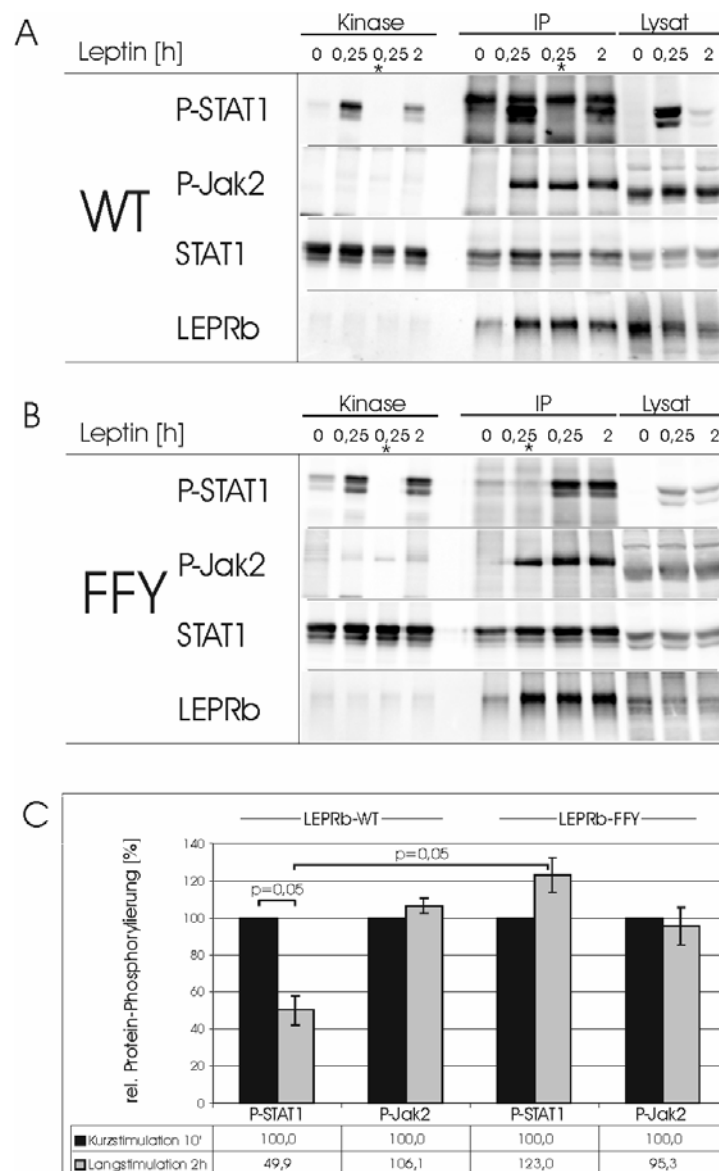


Abbildung 3.15 : Kinase-Assay mit Rezeptor-assoziierten Kinasen

A & B: RIN-LEPRb-WT- bzw. RIN-LEPRb-FFY-Zellen wurden ausgesät und nach 48 Stunden für weitere 16 Stunden ohne Serum inkubiert. Die Zellen je einer Platte mit 6 cm Durchmesser wurden lysiert und einer Co-Immundefällung mit Antikörper gegen das *c-Myc*-Epitop des LEPRb unterzogen. Der gefällte Rezeptorkomplex mit assoziierten Kinasen wurde einem Kinase-Assay unterworfen, wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben. Nach SDS-PAGE und Western-Blotting wurden die angegebenen Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die markierte (*) Spur zeigt die Kontrolle des Kinase-Assays ohne ATP. Die STAT1-Doppelbande erklärt sich durch den Nachweis der α - und der β -Isoform.

C: Gezeigt ist die Zusammenfassung je zweier unabhängiger Versuche (Mittelwert \pm $\frac{1}{2}$ Spannweite).

Dephosphorylierung. Dies würde bedeuten, dass die JAK-Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife des Enzyms nicht hinreichend für die Aktivität der Kinase ist.

Um diese Frage zu klären, wurde der Rezeptorkomplex immungefällt und die Aktivität co-immunpräzipitierter Kinasen katalytisch mit rekombinantem STAT1-Protein als exogenem Substrat *in-vitro* bestimmt (Abbildung 3.15). Aus diesen Versuchen ging das native Lysat der betreffenden Zellen (Lysat), der Überstand der Kinasereaktion mit darin gelöstem STAT1-Protein (Kinase) und der immunpräzipitierte Rezeptorkomplex (IP) als Proben hervor. Um zu kontrollieren, ob die detektierte Kinasereaktion ausschließlich *in-vitro* stattfand, wurde eine Kontrolle ohne Zugabe von ATP zum Kinase-Assay durchgeführt. Dies wurde durch den ausbleibenden Nachweis von P-STAT1 bestätigt.

Wie in bereits in Abbildung 3.14 für STAT3 gezeigt, hatte die Phosphorylierung der endogenen STAT1-Proteine nach zweistündiger Stimulation des LEPRb-WT im Vergleich zur kurzen Stimulation deutlich nachgelassen. Beim LEPRb-FFY hingegen zeigte sich kein Rückgang der STAT-Phosphorylierung (Abbildung 3.15-Lysat). Der Nachweis phosphorylierter JAKs im Präzipitat beider Rezeptoren ergab, dass diese sowohl nach 15-minütiger als auch nach zweistündiger Stimulation unverändert phosphoryliert waren. Die Aktivität der co-immungefällten Kinasen wies jedoch deutliche Unterschiede auf: Mit dem LEPRb-WT nach 15-minütiger Stimulation gefällte Kinasen katalysierten eine deutliche Phosphorylierung von STAT1, hingegen zeigten die Präzipitate nach zweistündiger Stimulation eine stark reduzierte Aktivität, gemessen an der STAT1-Phosphorylierung (Abbildung 3.15-A-Kinase bzw. IP).

Mit dem LEPRb-FFY gefällte Janus-Kinasen wiesen nach 15-minütiger wie auch nach zweistündiger Stimulation eine gleich bleibende Phosphorylierung auf. Im Gegensatz zum LEPRb-WT war auch die Aktivität der Kinase am LEPRb-FFY nach kurzer und nach langer Stimulation vergleichbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass nach zweistündiger Leptin-Stimulation die Aktivität der LEPRb-WT assoziierten Kinase abnimmt, während die Aktivität der LEPRb-FFY gebundenen Kinasen nicht beeinträchtigt wird. Die Phosphorylierung von JAK2 hingegen bleibt in dem betrachteten Zeitraum unverändert und korreliert für den LEPRb-WT nicht mit der Aktivität der Kinase. Damit deutet dieses Ergebnis auf die Beteiligung von SOCS-Proteinen an der Inhibition der JAK hin, da diese eine Hemmung der JAK-Aktivität bewirken, ohne das Protein zu dephosphorylieren.

3.4 Implikationen der Spezifität der JAK-Bindung auf die Signaltransduktion

Zwischen dem Leptin-Rezeptor und verwandten Rezeptoren wie dem IL-6-Rezeptor, dem Erythropoetin-Rezeptor oder dem Wachstumshormon-Rezeptor bestehen grundlegende Parallelen bezüglich der negativen Regulation durch einige Proteine. Insbesondere für den IL-6-Rezeptor wurde eine Tyrosin-abhängige Hemmung durch SOCS3 beschrieben sowie ein Mechanismus der Stimulations-induzierten Desensitivierung, der der beim LEPRb gefundenen sehr ähnlich ist. Vor dem Hintergrund der spezifischen Bindung des LEPRb an JAK2 (Ghilardi und Skoda, 1997) und der Abhängigkeit des IL-6-Rezeptors von JAK1 zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs (Guschin *et al.*, 1995) stellte sich die Frage, ob diese beiden Mitglieder der JAK-Familie keinerlei Beitrag zur Spezifität der aktivierten Signalwege oder zur Charakteristik der Abschaltung oder Desensitivierung leisten können.

Um diese Fragestellung näher untersuchen zu können, wurden LEPRb-Chimären konstruiert, die spezifisch entweder JAK1 oder JAK2 zur Signaltransduktion rekrutieren sollten (vgl. Abbildung 2.1).

Diese Chimären wurden aus dem LEPRb-WT hergestellt, indem dessen JAK-bindender Bereich, die so genannte Box1/2-Region, durch den entsprechenden Bereich des gp130- bzw. des Prolaktin-Rezeptors ersetzt wurde. Für den Prolaktin-Rezeptor waren Ergebnisse publiziert worden, die dessen spezifische Assoziation mit JAK2 gezeigt hatten (Han *et al.*, 1997). Diese Rezeptorchimären zeigten in Reporter-Gen-Assays eine dem wildtyp-Rezeptor vergleichbare Aktivierung eines STAT3-responsiven Promoters. Versuche, eine Chimäre aus LEPRb und Epo-Rezeptor oder IFN- γ -Rezeptor zu konstruieren, resultierten in nicht-funktionellen Rezeptorkonstrukten (Abbildung 3.16).

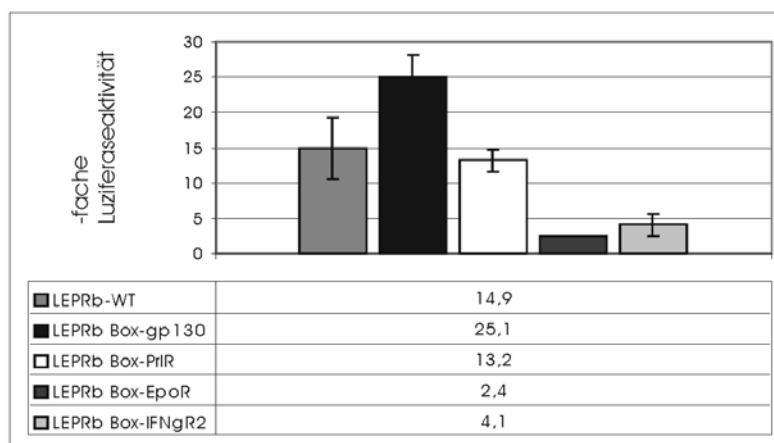


Abbildung 3.16 : Promotoraktivierung durch LEPRb-Chimären

HepG2-Zellen wurden mit der angegebenen Rezeptorchimäre und einem α 2M-kontrollierten Luziferasevektor transfiziert. Nach 16-stündiger Stimulation mit 100 ng/ml Leptin wurden die Zellen lysiert und die Promotoraktivierung gemessen. Angegeben sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) aus je drei Messwerten.

3.4.1 Spezifität der LEPRb-Box1/2-Rezeptorchimären

3.4.1.1 Rezeptoraktivierung in JAK-defizienten Zelllinien

Zunächst sollte die Spezifität der Rezeptorchimären getestet werden. Hierfür wurden sowohl Fibrosarkom-Zelllinien herangezogen, die entweder für JAK1- oder JAK2-defizient sind (U4C bzw. γ 2A), als auch die entsprechende parentale Zelllinie 2C4, die eine endogene Expression von JAK1 und JAK2 aufwies. Diese Zelllinien waren aus der Untersuchung des Interferon- γ -Signalwegs durch chemische Mutagenese und nachfolgende Selektion von nicht-signalkompetenten Zellen hervorgegangen (Mueller *et al.*, 1993; Watling *et al.*, 1993).

Die chimären Rezeptoren LEPRb-Box-gp130 und LEPRb-Box-PrIR sowie der wildtyp-Rezeptor LEPRb-WT wurden in den drei Zelllinien exprimiert und nach Stimulation die Aktivierung von STAT3 nachgewiesen. Wie Abbildung 3.17 zeigt, führte die Stimulation aller drei Rezeptorchimären in der parentalen Zelllinie 2C4, die die endogene Expression von JAK1 und JAK2 gewährleistet, zu einer deutlichen

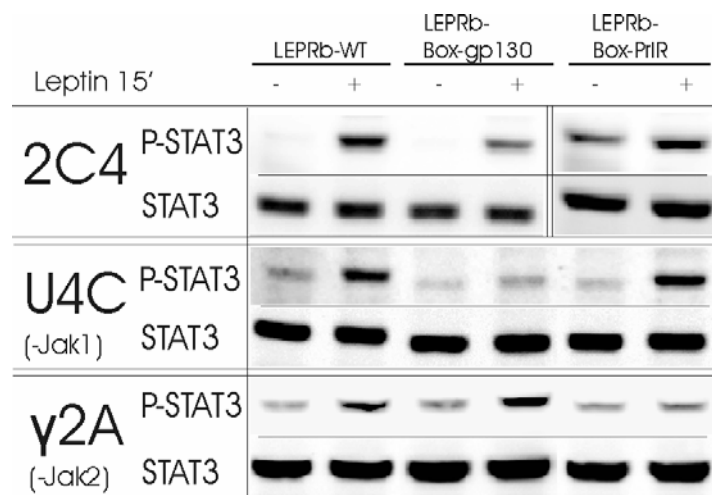


Abbildung 3.17 : STAT3-Aktivierung durch LEPRb-Chimären in JAK-defizienten Zelllinien

U4C-Zellen (JAK1-defizient) bzw. γ 2A-Zellen (JAK2-defizient) wurden in Platten mit 6 cm Durchmesser ausgesät und 24 h später mit je 1 μ g Expressionsplasmid für das angegebene Rezeptorkonstrukt transfiziert. Weitere 48 h später wurden die Zellen für 15 Minuten stimuliert (100 ng/ml Leptin) und einer denaturierenden Lyse unterworfen. Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde STAT3 mit den angegebenen Antikörpern detektiert. Es sind repräsentative Ergebnisse von jeweils zwei (2C4) bzw. vier (U4C, γ 2A) unabhängigen Experimenten gezeigt. Für die 2C4 Zellen sind zwei verschiedene Blots abgebildet.

STAT3-Aktivierung. In U4C Zellen ohne JAK1 hingegen war die LEPRb-Box-gp130-Chimäre erwartungsgemäß nicht in der Lage, STAT3-Phosphorylierung zu vermitteln, während die beiden anderen Rezeptoren eine starke Leptin-abhängige STAT3-Antwort zeigten. In der JAK2-defizienten Zelllinie γ 2A wiederum führte die Stimulation des LEPRb-Box-PrIR nicht zu einer STAT3-Aktivierung, während sowohl der LEPRb-WT als auch die LEPRb-Box-gp130-Chimäre gleichermaßen die Phosphorylierung von STAT3 vermitteln konnten.

Dieses Ergebnis zeigt die Notwendigkeit der Anwesenheit von JAK1 bzw. JAK2 für die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs durch den LEPRb-Box-gp130 bzw. LEPRb-Box-PrIR und damit die Selektivität dieser Chimären für JAK1 bzw. JAK2. Eine Rekrutierung von TYK2 oder auch JAK3 kann damit ausgeschlossen werden, da diese Isoformen in allen untersuchten Zellen exprimiert werden.

Der wildtyp-Leptin-Rezeptor war in beiden defizienten Zelllinien, also sowohl ohne JAK1 als auch ohne JAK2, weiterhin in der Lage, Leptin-abhängig die

Phosphorylierung von STAT3 zu vermitteln. Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu publizierten Berichten, der LEPRb wäre hinsichtlich der Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs auf die Anwesenheit von JAK2 angewiesen (Ghilardi und Skoda, 1997).

3.4.1.2 Auswirkungen eines JAK2-*knockdown*

Die Ergebnisse über die Spezifität des Leptin-Rezeptors und der LEPRb-Chimären aus den defizienten Zelllinien sollten mit Hilfe eines RNAi-Ansatzes überprüft werden. Diese Methode erlaubt den zielgerichteten Abbau bestimmter mRNA. Hierfür muss die *silencing* RNA transfiziert werden oder deren intrazelluläre Produktion durch Transfektion von Plasmiden mit entsprechenden Sequenzen gewährleistet werden. Damit kann die Konzentration eines bestimmten Proteins in der Zelle gezielt minimiert werden. Für diese Arbeit sollte der Einfluss eines JAK2-*knockdown* auf die Aktivierung der Rezeptorkonstrukte mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays untersucht werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus Abschnitt 3.4.1.1 zeigte sich in diesem Ansatz eine Abnahme der STAT3-kontrollierten Expression des Reportergens um 47 % für den LEPRb-Box-PrIR, während die Aktivität des LEPRb-Box-gp130 und des LEPRb-WT nur um 15 % bzw. 23 % abnahm.

Erwartungsgemäß zeigte der LEPRb-Box-PrIR die größte Abnahme der Aktivierung, während der Effekt auf den LEPRb-Box-gp130 am kleinsten war, was mit dem Ausmaß der Rekrutierung von JAK2 durch die Rezeptoren korreliert.

Der LEPRb-Box-PrIR wurde durch den *knockdown* von JAK2 signifikant stärker beeinträchtigt als der wildtyp-Leptin-Rezeptor.

Damit wird das Ergebnis aus Abbildung 3.17 bestätigt, dass der LEPRb-WT keine ausgeprägte Spezifität für JAK2 zeigt und sowohl mit JAK1 als auch mit JAK2 eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs vermitteln kann.

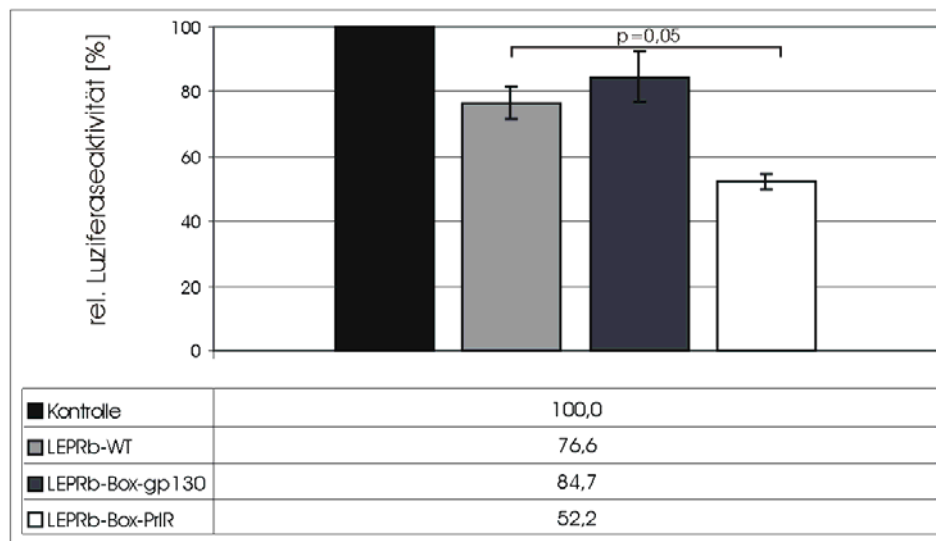


Abbildung 3.18 : Einfluss des JAK2-knockdown auf die Rezeptoraktivierung

HepG2-Zellen wurden in 6-well-multidish-Platten ausgesät (150.000 Zellen/well) und 5 Minuten später mit den angegebenen Rezeptorchimären transfiziert. Nach 54 Stunden wurde das Medium gewechselt und alle Zellen wurden für weitere 16 Stunden ohne Serum und mit 100 ng/ml Leptin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität sowie die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt.

Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche (\pm Standardabweichung).

3.4.2 Differentielle Inhibition der LEPRb-Rezeptorchimären

Aufgrund der zentralen Rolle der Janus-Kinasen bei der Signaltransduktion des Leptin-Rezeptors und anderer Zytokin-Rezeptoren ist die Kontrolle der JAK-Aktivität ein wichtiger Mechanismus der negativen Regulation dieser Rezeptoren. Einige der bisher beschriebenen, inhibitorischen Proteine sind in der Lage, die Aktivität der JAKs herabzusetzen. Auch für die Entwicklung synthetischer Substanzen ist dies ein interessanter Ansatz des Eingriffs in die Signaltransduktion vieler Rezeptoren.

Für einige der wichtigsten Inhibitoren sollte daher die differentielle Inhibition von JAK1 und JAK2 mit Hilfe der JAK-spezifischen Rezeptorchimären untersucht werden. Dies wurde in einem Reporter-Gen-Assay durchgeführt, der das Ausmaß der Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren quantifizierbar machte.

Der Einsatz aller untersuchten Inhibitoren hatte eine deutliche Hemmung der Rezeptoraktivierung zur Folge (Abbildung 3.19). Dabei war die Menge der

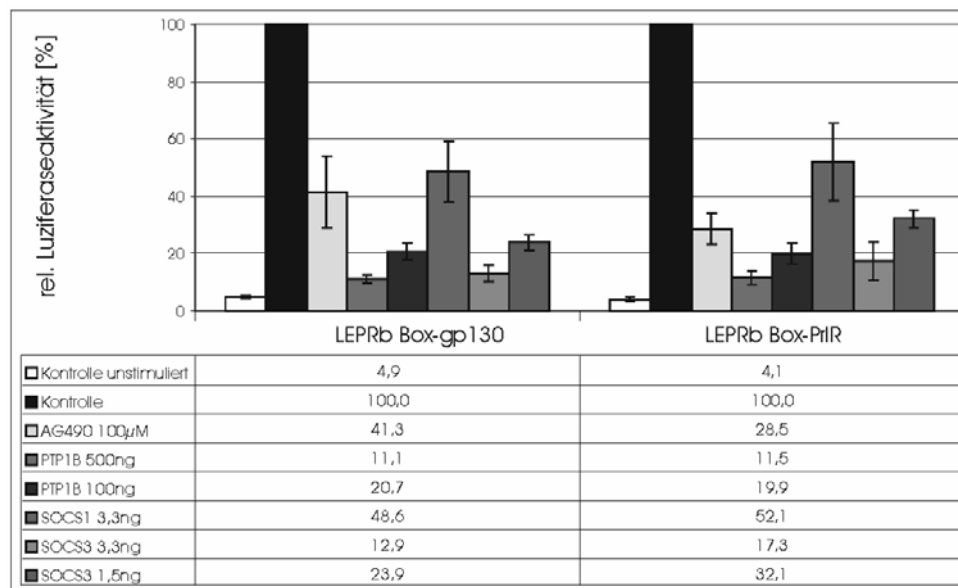


Abbildung 3.19 : Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Rezeptoraktivierung

HepG2-Zellen wurden in 6-well-*multidish* Platten zu je 150.000 Zellen/well ausgesät und 24 h später mit den Expressionsplasmiden für die angegebene Rezeptorchimäre (0,15 µg/well) und für das jeweilige inhibitorische Protein transfiziert. AG490 wurde 30 Minuten vor Stimulation zugegeben (100µM). Ca. 30 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 16 h ohne Serum und mit 100ng/ml Leptin inkubiert. Die Zellen wurden lysiert die Luziferase-Aktivität sowie die β-Galactosidase-Aktivität bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche (± Standardabweichung).

zutransfizierten Plasmide bzw. die Konzentration von AG490¹¹⁴, so gewählt, dass die Inhibition im submaximalen Bereich lag.

Es waren jedoch keine Unterschiede im Ausmaß der Hemmung zwischen den beiden untersuchten Rezeptoren zu beobachten. Auch AG490, ein als spezifischer JAK2-Inhibitor beschriebenes Tyrphostin (Meydan *et al.*, 1996), sowie PTP1B¹¹⁵, für das eine Interaktion mit JAK2 nicht aber mit JAK1 gezeigt werden konnte (Myers *et al.*, 2001), hatten keinen differentiellen Effekt auf die Aktivierung beider Rezeptoren. Dieses Experiment legt den Schluss nahe, dass die untersuchten Inhibitoren im Ausmaß der Hemmung keine Spezifität bezüglich der Rezeptor-assoziierten JAK zeigen.

¹¹⁴ Tyrphostin B42

¹¹⁵ Protein Tyrosin Phosphatase 1B