

4 Diskussion

Die Mechanismen der negativen Regulation des Leptin-Rezeptors sind insbesondere vor dem Hintergrund der Resistenzentwicklung bei Adipositas von großem Interesse. In dieser Arbeit wurde daher die Abschaltung und Desensitivierung des Leptin-Rezeptors und einiger Tyrosin/Phenylalanin-Mutanten in einem Modell-Zellsystem untersucht. Berichte über die Leptin-Responsivität der Insulinom-Zelllinie RINm5F (Morton *et al.*, 1999) konnten in unserem Labor nicht bestätigt werden (Hekerman, 2004). Daher wurden diese Untersuchungen nach viraler Transfektion in einem stabil exprimierenden RIN-Zellsystem durchgeführt. Die von Morton *et al.* beschriebene STAT3-Aktivierung wurde allerdings nach Inkubation mit einer äußerst hohen Leptin-Konzentration von 100 nM beobachtet, wohingegen in unserer Arbeitsgruppe eine Konzentration von 20 ng/ml (entsprechend 1,2 nM) verwendet wurde. Unter Berücksichtigung der endogenen Leptinspiegel von ungefähr 7,5 ng/ml für normalgewichtige und 30 ng/ml für übergewichtige Menschen (Considine *et al.*, 1996) schien dadurch die Gefahr von unspezifischen Effekten begrenzt werden zu können. Auch für alle anderen Versuche wurde eine Leptin-Konzentration von maximal 100 ng/ml eingesetzt.

Ferner wurden einige Mechanismen der negativen Regulation hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Resistenzentwicklung des LEPRb untersucht, sowie strukturelle Voraussetzungen für die Wirkung einiger inhibitorischer Proteine erforscht. Die mechanistischen Untersuchungen wurden in Zellkultur-Modellen unter stabilen und transienten Expressionsbedingungen durchgeführt, da die gut kontrollierbaren Bedingungen in Zellkultur-Systemen für Untersuchungen von molekularen Mechanismen vorteilhaft sind, und eine gut definierte Zelllinie mit endogener LEPRb-Expression nicht zur Verfügung steht.

4.1 Kinetik der Signalwegabschaltung

Notwendige Voraussetzung für die Beeinflussung des Körpergewichts durch Leptin ist die Aktivierung von STAT3 (Bates *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2004). Da die Aktivierung aller STAT-Proteine die Phosphorylierung eines definierten Tyrosinrests, im Fall von STAT3 des Tyrosins 705, voraussetzt (Schindler und Darnell, 1995),

kann der Nachweis dieser Phosphorylierung als Maß für die STAT3-Aktivierung verwendet werden.

Die LEPRb-WT-induzierte STAT3-Phosphorylierung verläuft trotz dauerhafter Leptin-Stimulation transient und geht innerhalb von zwei Stunden fast bis auf das Hintergrund-Niveau zurück (Abbildung 3.1). Auch im Verlauf weiterer Stimulation steigt die STAT3-Phosphorylierung nicht wieder an, zudem kann der Rezeptor nach 24-stündiger Behandlung keine STAT3-Aktivierung mehr vermitteln. Diese Desensitivierung des LEPRb kann als Modell der *in-vivo* auftretenden Resistenz gelten und unterstützt die These, dass ein Defekt auf Signaltransduktions-Ebene an der Resistenzentwicklung beteiligt ist (Bence *et al.*, 2006; Bjorbaek *et al.*, 1998; Muenzberg *et al.*, 2005). Die von uns beobachtete Kinetik stimmt dabei mit den Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen von stabil transfizierten HEK293-Zellen der Gruppe um M.G. Myers überein (Dunn *et al.*, 2005), die während der Entstehung dieser Arbeit veröffentlicht wurden.

Die Beteiligung des Tyrosins 985 an der Inhibition durch SOCS3 (Bjorbaek *et al.*, 2000) und SHP2 (Carpenter *et al.*, 1998) legte den Ansatz nahe, den Einfluss von Y/F-Punktmutanten des LEPRb auf die negative Regulation zu untersuchen. Tyrosin 1138 des LEPRb ist für die STAT3-Aktivierung und damit für die Detektion des phosphorylierten STAT3 notwendig, deshalb wurden lediglich Mutationen der Tyrosine Y 985 und Y 1077 untersucht. Beide Tyrosinreste sind in Säugetieren hoch konserviert, jedoch ist lediglich die Rolle von Y 985 allgemein anerkannt, während über eine Beteiligung von Y 1077 an der Signaltransduktion und an der negativen Regulation zwar berichtet wird (Eyckerman *et al.*, 2000; Hekerman *et al.*, 2005), von anderen Autoren aber eine Phosphorylierung und damit jegliche funktionelle Bedeutung des Y 1077 verneint wird (Muenzberg *et al.*, 2005).

In unserem Modell war die Mutation von Tyrosin 985 nicht ausreichend, um die Abschaltung oder die Desensitivierung des LEPRb zu verhindern. Vielmehr konnte erst nach Mutation der beiden Tyrosine Y 985 und Y 1077 eine erheblich verzögerte Abschaltung festgestellt werden (Abbildung 3.7). Daraus folgt, dass beide untersuchten Tyrosinreste eine Abschaltung des Rezeptors vermitteln können. Auch für Tyrosin 1077 wurde die Beteiligung an der negativen Regulation über eine SOCS3-Bindung im Reporter-gen-Assay beschrieben (Eyckerman *et al.*, 1999; Eyckerman *et al.*, 2000), dies steht in Übereinstimmung mit unserem Befund.

Bei 24-stündiger Vorstimulation stellt sich das Ergebnis jedoch anders dar (Abbildung 3.8). Unter diesen Bedingungen war kein Einfluss der Tyrosinreste auf die Desensitivierung der Rezeptoren zu erkennen, hier zeigte selbst die LEPRb-FFY Mutante eine Resistenz gegen erneute Stimulation. Der Tyrosin-abhängige Mechanismus der Abschaltung scheint also nach längerer Stimulation durch einen Tyrosin-unabhängigen Modus der Desensitivierung überlagert zu werden. Für eine Rezeptorchimäre mit mutiertem Y 985 wurde nach 12-stündiger Stimulation ebenfalls eine Desensitivierung gefunden (Dunn *et al.*, 2005), was darauf hinweisen könnte, dass sich bereits nach diesem Zeitpunkt der Tyrosin-unabhängige Effekt der Desensitivierung auswirkt.

4.2 Rezeptor-Oberflächenexpression

Ein potentieller Mechanismus der negativen Regulation wäre eine Abnahme der Oberflächen-Expression des LEPRb. Aus dem Zusammenspiel von Internalisierung und Transport zur Membranoberfläche ergibt sich ein Gleichgewicht des Anteils der Rezeptorproteine in der Zellmembran. Nur dieser Anteil kann durch Bindung eines Liganden an die Rezeptoren beeinflusst werden. Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren ist insbesondere eine Steigerung der Internalisierungsrate bekannt, (Ferguson *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996) und auch bei Zytokin-Rezeptoren ist dies als Mechanismus zur Terminierung der Rezeptoraktivierung beschrieben worden (Fukamachi *et al.*, 1987; Wei *et al.*, 2006). Eine verstärkte Internalisierung konnte für verwandte Rezeptoren wie GH- und Epo-Rezeptor gezeigt werden. Dieser Mechanismus verläuft Ubiquitin-vermittelt und führt die Rezeptoren dem proteasomalen Abbau zu (Strous *et al.*, 1996; Verdier *et al.*, 1998).

In RIN-LEPRb-WT Zellen wurde nach zweistündiger Stimulation mit 20 ng/ml Leptin (1,2 nM) eine Abnahme der Rezeptor-Oberflächenexpression um 22 % gefunden (Abbildung 3.2), was den Effekt der Abschaltung nur zum Teil erklären könnte.

Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zur LEPRb-Internalisierung sind widersprüchlich: Die Arbeitsgruppe um Y. Rouillé fand keine Änderung der LEPRb-Oberflächenexpression nach 15-minütiger Stimulation mit 100 nM Leptin (Belouzard *et al.*, 2004), Uotani *et al.* maßen eine Abnahme der Rezeptor-Oberflächenexpression von 65 % nach 90-minütiger Stimulation mit 1 nM Leptin (Uotani *et al.*, 1999) und Barr *et al.* fanden einen Rückgang der

LEPRb-Oberflächenexpression um 65% nach 16-stündiger Stimulation mit 6 nM Leptin (Barr *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse wurden in transient transfizierten HeLa¹¹⁶-Zellen bzw. in einer stabilen CHO¹¹⁷-Zelllinie oder transient transfizierten COS-7 Zellen generiert, worauf die großen Unterschiede unter Umständen zurückgeführt werden könnten.

Eine Internalisierung des Rezeptors nach Stimulation muss nach dieser Datenlage vermutet werden, jedoch scheint dieser Effekt starken System-individuellen Unterschieden zu unterliegen. Ob eine Internalisierung für die in unserem System nach 24-stündiger Stimulation auftretende Desensitivierung ursächlich war, kann nicht abschließend beurteilt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3 Rezeptor-*crosstalk* und Proteinexpression

Eine negative Regulation über Liganden-induzierte Internalisierung ließe eine ausschließliche Beeinträchtigung stimulierter Rezeptoren erwarten, während nicht-vorstimulierte Rezeptoren keine erhöhte Internalisierungsrate aufweisen sollten. Mit Hilfe von *crosstalk*-Experimenten konnte untersucht werden, ob sich die negative Regulation auf die stimulierte Rezeptoren beschränkte, oder ob auch nicht-vorstimulierte Rezeptoren einem Einfluß durch die Leptin-Stimulation unterlagen. In diesen Experimenten war eine Desensitivierung nicht-vorstimulierter Rezeptoren nachweisbar, was eine Internalisierungs-unabhängige Regulation der Rezeptoren unter diesen Bedingungen nahe legt (Abbildungen 3.3, 3.4). Ähnliche Untersuchungen über den IL-6-Rezeptor haben ebenfalls eine negative Regulation über die Grenzen eines aktivierten Rezeptor-pools hinweg gezeigt (Fischer *et al.*, 2004). Die Desensitivierung sowohl von gp130 als auch des GH-Rezeptors weist darüber hinaus auf die Möglichkeit des *crosstalks* zwischen verwandten Rezeptoren hin. Eine Regulation des LEPRb wäre vor diesem Hintergrund auch durch eine Aktivierung anderer Rezeptoren und damit als Folge eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Zytokine denkbar.

Die Abschaltung des LEPRb konnte durch Unterdrückung der Proteinsynthese nach Inkubation mit den Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren Actinomycin D oder Cycloheximid (CHX) komplett verhindert werden (Abbildung 3.5). Somit wird bereits

¹¹⁶ Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms, benannt nach der Patientin Henrietta Lacks

¹¹⁷ *Chinese hamster ovary*

während der kurzen Stimulationszeit von einer bis vier Stunden die Synthese eines Proteins induziert, das den inhibitorischen Effekt auf den LEPRb vermitteln kann. Wird die Expression dieses Proteins verhindert, ist keine Abschwächung der STAT3-Aktivierung im betrachteten Zeitraum von bis zu vier Stunden zu beobachten. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Abschaltung des LEPRb in unserem System eine aktive Proteinsynthese voraussetzt. In vergleichbaren Untersuchungen wurde auch für den IL-6-Rezeptor eine Verzögerung der Signalabschaltung durch CHX nachgewiesen (Fischer *et al.*, 2004).

4.4 Inhibition durch SOCS1 oder SOCS3

SOCS1 und SOCS3 sind als potente Inhibitoren vieler Zytokin-Rezeptoren beschrieben worden (Bjorbaek *et al.*, 1998; Croker *et al.*, 2003; Kawazoe *et al.*, 2001; Song und Shuai, 1998; Sporri *et al.*, 2001). Bemerkenswerterweise unterscheiden sie sich jedoch im Mechanismus ihrer Wirkung. Während SOCS1 eine direkte Interaktion mit der Aktivierungsschleife der JAK2 eingeht, bindet SOCS3 an phosphorylierte Tyrosinreste der Rezeptorkette und hemmt daraufhin ebenfalls die Aktivität der Rezeptor-assoziierten JAK. Diese Darstellung ist für die Mehrzahl der SOCS/Rezeptor-Kombinationen zutreffend, allerdings existieren auch Berichte über eine Rezeptortyrosin-abhängige Hemmung durch SOCS1 (vgl. Abschnitt 1.4.1).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl SOCS1 als auch SOCS3 die STAT3-vermittelte Promotoraktivierung durch den LEPRb inhibieren können (Abbildungen 3.10 – 3.13). Die Mutation von Tyrosinresten im LEPRb konnte das Ausmaß der Hemmung durch beide SOCS-Proteine beeinträchtigen. Die Interaktion von SOCS3 mit Tyrosin 985 konnte in Reporter- wie auch in *knockdown*-Assays bestätigt werden. Die Mutation von Tyrosin 1077 allein beeinträchtigte die SOCS3-vermittelte Hemmung nicht, führte jedoch bei gleichzeitiger Mutation von Tyrosin 985 zu einer weiteren Erhöhung der Promotoraktivierung.

Dieses Ergebnis bestätigt die unlängst berichtete Möglichkeit der Interaktion von SOCS3 auch mit Tyrosin 1077 (Eyckerman *et al.*, 2000), aber steht im Widerspruch zum Bericht der Gruppe um M.G. Myers, Tyrosin 1077 würde nicht Leptin-abhängig phosphoryliert (Banks *et al.*, 2000) werden. Ein phosphoryliertes Tyrosin wird jedoch allgemein als Voraussetzung für die Interaktion mit der SH2-Domäne von SOCS3 angesehen. Tyrosin 1077 ist in allen bislang untersuchten Säugerarten und auch in

Vögeln und einigen Fisch-Spezies konserviert (Hekerman *et al.*, 2005; Tartaglia, 1997) und kann, neben dem gezeigten Einfluss auf die SOCS3-Wirkung, auch die Aktivierung von STAT5 vermitteln (Hekerman *et al.*, 2005). Banks *et al.* haben die Phosphorylierung der Tyrosine Y 985 und Y 1138 durch Immun-Präzipitation nachweisen können, jedoch keine Phosphorylierung des Tyrosin 1077 gefunden. Neben der Möglichkeit, dass die Dömane um P-Y 1077 durch den verwendeten Antikörper nicht ausreichend affin gebunden wurde, könnte auch die verwendete Zelllinie oder Unterschiede zwischen dem LEPRb und der untersuchten Chimäre aus extrazellulärem Epo-Rezeptor- und intrazellulärem LEPRb-Teil diesen Widerspruch erklären.

Auch für SOCS1 konnte eine dosisabhängige Hemmung des LEPRb, sowie eine Abhängigkeit von Tyrosin 985 des LEPRb gezeigt werden. Im Unterschied zu SOCS3 konnte für SOCS1 keine Interaktion mit Tyrosin 1077 nachgewiesen werden. Die SOCS1-Wirkung wurde durch Mutation beider Tyrosine Y 985 und Y 1077 im Gegensatz zur SOCS3-Wirkung nicht vollständig aufgehoben, was auf einen zusätzlichen Tyrosin-unabhängigen Mechanismus, wahrscheinlich über direkte JAK-Inhibition, hinweist. Eine Bindung von SOCS1 an Rezeptortyrosine wurde auch bei anderen Zytokin-Rezeptoren bereits beobachtet (Bourette *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2002). Die Inhibition durch SOCS1 war allerdings nur bei Überexpression zu beobachten, der *knockdown* von SOCS1 ergab keine signifikante Steigerung der LEPRb-vermittelten Promotoraktivierung. Dies könnte an geringen intrazellulären SOCS1-Konzentrationen liegen, die für eine effektive Hemmung der LEPRb-Aktivierung nicht ausreichen. Die Überexpression von SOCS1 bzw. SOCS3 führte zu einer, in vergleichbarem Ausmaß gehemmten Promotoraktivierung. Damit weisen SOCS1 und SOCS3 hinsichtlich der Hemmung der LEPRb-Signaltransduktion eine vergleichbare *potency* auf.

Während damit eine inhibitorische Wirkung sowohl von SOCS1 als auch von SOCS3 auf den LEPRb gezeigt wurde, kann SOCS1 in unserem System wegen der fehlenden Induktion nicht als Ursache der beobachteten Resistenz gelten. Es könnte jedoch in anderen Zelltypen durchaus auch zu einer Leptin-abhängigen Steigerung der SOCS1-Expression kommen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die SOCS1-Expression über einen *crossstalk*-Mechanismus im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen hochreguliert wird. Die Möglichkeit zur Interaktion von SOCS3 mit beiden Tyrosinen Y 985 und Y 1077 hingegen deckt sich mit den Ergebnissen

der Abschaltkinetik-Versuche (Abbildung 3.7) und bestätigt damit die maßgebliche Rolle von SOCS3 bei der negativen Regulation.

4.5 Induktion der SOCS1- und SOCS3-Expression

Die Abschaltung des LEPRb hatte sich als abhängig von aktiver Proteinsynthese erwiesen, daher sollte die Leptin-abhängige Expression von SOCS1 und SOCS3 untersucht werden. Mit SOCS3 war bereits ein Mediator der negativen Regulation bekannt, dessen Expression durch Leptin gesteigert wird (Bjorbaek *et al.*, 1998; Emilsson *et al.*, 1999). Eine Untersuchung der Expression weiterer Mitglieder der SOCS-Proteinfamilie wurde in stabil transfizierten CHO Zellen durchgeführt, wobei eine SOCS3-Induktion bestätigt, für SOCS1, SOCS2 und CIS hingegen keine Leptin-abhängige Regulation beschrieben werden konnte (Bjorbaek *et al.*, 1999). Untersuchungen der IL-6-vermittelten Geninduktion ergaben jedoch eine Hochregulation von CIS sowie von SOCS1-3 (Fischer *et al.*, 2004; Niemand *et al.*, 2003; Starr *et al.*, 1997).

In dieser Arbeit wurde eine schnelle, Leptin-abhängige Induktion der SOCS3-mRNA Transkripte auch in RINm5F Zellen bestätigt, wohingegen die Expression von SOCS1 nicht durch Leptin beeinflusst wurde (Abbildung 3.9).

Tabelle 4.1 : Übersicht über die differentiellen Effekte von SOCS1 und SOCS3

Die Tabelle resümiert die Ergebnisse der Abb. 3.9-3.13. Angegeben sind die Induktion des betreffenden Proteins und eine eventuelle Inhibition, die das SOCS-Protein auf den LEPRb bzw. den Rezeptor mit den angegebenen Y/F-Mutationen ausübt.

Inhib.: Inhibition findet statt
 k.I.: Es ist keine Inhibition zu beobachten.

	LEPRb-WT			Y985F		Y1077F	
	Über-expression	knock-down	Induktion	Über-expression	knock-down	Über-expression	knock-down
SOCS1	Inhibition	k.I.	nein	Inhibition	k.I.	k.I.	k.I.
SOCS3	Inhibition	Inhib.	ja	Inhibition	Inhib.	Inhib., wenn Y985 zu F mutiert	Inhib.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere über die Notwendigkeit von aktiver Genexpression, können damit nicht allein durch eine SOCS1-Wirkung erklärt werden. Das geringe Ausmaß der Effekte von SOCS1 in *knockdown*-Versuchen könnte damit auf die konstitutiv niedrigen, intrazellulären SOCS1-Mengen zurückgeführt werden.

4.6 Negative Regulation durch JAK-Inhibition

Die Janus-Kinasen spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Zytokin-Rezeptoren. Ihre Kinase-Aktivität ist zentrale Voraussetzung für die Aktivierung weiterer Signalproteine, daher ist die Inhibition der JAKs ein effektiver Mechanismus der negativen Regulation.

Obwohl für viele der beschriebenen Inhibitoren von Zytokin-Rezeptoren eine Hemmung der JAK-Aktivität angenommen wird, ist der genaue Mechanismus der Hemmung in keinem Fall genau aufgeklärt.

Für die Tyrosin-Phosphatasen PTP1B und SHP2 wurde eine Dephosphorylierung von JAKs beschrieben (Kim *et al.*, 1998; Li und Friedman, 1999; Myers *et al.*, 2001), aber als Substrate werden auch Rezeptortyrosine (Lothgren *et al.*, 2001) oder STAT-Faktoren (Kaszubska *et al.*, 2002; Lund *et al.*, 2005) diskutiert. Für die Inhibition der Signalweg-Aktivierung jedenfalls ist die Phosphatase-Aktivität unverzichtbar (Lund *et al.*, 2005). Dies unterscheidet die Phosphatasen von den SOCS-Proteinen, die ihre inhibitorische Wirkung durch eine Interaktion mit der katalytischen Domäne der JAKs entfalten (Endo *et al.*, 1997), ohne diese zu desphosphorylieren.

Eine Differenzierung zwischen diesen prinzipiellen Möglichkeiten der Abschaltung wurde durch die Untersuchungen zur Kinase-Aktivität der Rezeptor-gebundenen JAK in dieser Arbeit ermöglicht. Zudem konnte durch diesen Ansatz die Abschaltung des LEPRb auf der Ebene des Rezeptorkomplexes gezeigt, und damit die Versuche mit den indirekten Meßgrößen STAT-Phosphorylierung und Promotoraktivierung bestätigt werden.

Um in diesen Versuchen die ausschließliche Erfassung der Rezeptor-gebundenen JAK zu gewährleisten, wurde der Rezeptorkomplex immungefällt, und die Kinase-Assays *in vitro* mit exogenem Substrat durchgeführt. Damit konnte die

Verfälschung des Ergebnisses durch Liganden-unabhängig phosphorylierte JAK, die im Lysat der Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 3.14), verhindert werden.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen zeigen, dass die Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife der JAK nach zweistündiger Leptin-Stimulation nicht mit der STAT3-Phosphorylierung korreliert (Abbildung 3.14). Die Aktivität der Rezeptor-gebundenen JAK ist nach Stimulation des LEPRb-WT verringert, ohne dass sich dies in einem verminderten Ausmaß der JAK-Phosphorylierung niederschlägt (Abbildung 3.15). Damit kann die Abschaltung des LEPRb-WT in unserem System nicht durch direkte Dephosphorylierung der Janus-Kinase erklärt werden. Es kann hingegen nicht ausgeschlossen werden, dass eine Phosphatase über STAT3- oder LEPRb-Dephosphorylierung zur Abschaltung beiträgt. Jedoch konnte eine Abnahme der Kinase-Aktivität der JAK klar gezeigt werden, daher ist definitiv die Inhibition der Janus-Kinase eine Ursache der beobachteten Abschaltung. Die Aufhebung dieses Effekts bei der LEPRb-FFY Mutante spricht für eine Interaktion mit einem Rezeptortyrosin, wie sie für SOCS3 bekannt ist.

4.7 Die Spezifität der JAK-Bindung

Wie einleitend ausgeführt wurde, unterliegt die JAK-Assoziation an Zytokin-Rezeptorketten einer gewissen Spezifität, deren strukturelle Grundlagen jedoch bislang nicht aufgeklärt sind. Die Membran-proximalen Box1- bzw. Box2-Regionen in Zytokin-Rezeptoren wurden als notwendige Voraussetzung für die Bindung von JAKs identifiziert (Ihle und Kerr, 1995; Murakami *et al.*, 1991). Box1 ist eine konservierte Prolin-reiche Sequenz von acht Aminosäuren, während die Box2-Region eine weniger konservierte Domäne hydrophober Aminosäuren C-terminal davon darstellt. Verschiedene Gruppen haben mit Hilfe von Deletionsmutationen die minimal notwendige Rezeptorregion zu definieren versucht, die zur Signalwegaktivierung des LEPRb vorhanden sein muss. Bahrenberg *et al.* zeigten mit Hilfe von Reporter-Gen-Assays, dass die Minimalanforderungen an die Rezeptorkette das Vorhandensein des Box1-Motivs, nicht jedoch des Box-2 Motivs, beinhalten (Bahrenberg *et al.*, 2002). Kloek *et al.* untersuchten den Nachweis der JAK2-Phosphorylierung und kamen ebenfalls zu diesem Ergebnis (Kloek *et al.*, 2002). Auch für andere Zytokin-Rezeptoren wurde dies gezeigt (Tanner *et al.*, 1995). Am Beispiel des IL-6-Rezeptors wurde die Box2-Region jedoch als notwendig für die

Proliferation einer wachstumsfaktorabhängigen Zelllinie erkannt (Murakami *et al.*, 1991). Welche Sequenzabschnitte in der Rezeptorkette die Spezifität der JAK-Rezeptor-Assoziation bedingen, und in welcher Weise die Spezifität der JAK-Bindung Folgen für die Signalweg-Aktivierung hat, ist bislang nicht genau untersucht worden.

Obwohl in der spezifischen Bindung der JAK-Isoformen an Zytokin-Rezeptorketten zum Ausdruck kommt, dass die JAKs untereinander nicht vollkommen austauschbar sind, gibt es bislang keine Erkenntnisse über den Einfluss, den die spezifisch Rezeptor-gebundene JAK-Isoform auf Signaltransduktion und negative Regulation des jeweiligen Rezeptors ausübt.

Während die Signaltransduktion des LEPRb als weitgehend abhängig von JAK2 gilt (Ghilardi und Skoda, 1997; Kloek *et al.*, 2002), wurde für den IL-6-Rezeptor und damit für gp130 eine JAK1-Abhängigkeit für intakte Signaltransduktion gezeigt (Guschin *et al.*, 1995; Heinrich *et al.*, 2003). Aufgrund der bestehenden Ähnlichkeiten dieser beiden Rezeptoren hinsichtlich der Signaltransduktion und der negativen Regulation, müsste daher eine spezifische Rolle der JAK-Isoformen in Frage gestellt werden.

Basierend auf dem LEPRb-WT habe ich Rezeptorchimären erzeugt, die für eine effektive Signaltransduktion die Anwesenheit von JAK1 bzw. JAK2 spezifisch voraussetzen. Diese Rezeptorchimären unterschieden sich voneinander und vom LEPRb-WT lediglich durch die Membran-proximale, Box1- und Box2-Motiv beinhaltenden Domäne aus dem strukturell verwandten IL-6- bzw. dem Prolaktin-Rezeptor, wodurch die differentielle JAK-Assoziation auf einen definierten Abschnitt im Rezeptor zurückgeführt werden konnte. Für die weitere Aufklärung der strukturellen Voraussetzungen für die spezifische Bindung einer JAK-Isoform könnten sich diese spezifischen Chimären als sehr hilfreich erweisen.

Die Konstruktion der JAK2-spezifischen Rezeptormutante LEPRb-Box-PrIR war nötig geworden, da Versuche zur Spezifität des LEPRb-WT ergeben hatten, dass dieser Rezeptor auch in Zellen ohne JAK2 eine deutliche Signaltransduktion vermitteln konnte (Abbildung 3.17). Dieser Befund wird durch den JAK2-*knockdown* gestützt, der die LEPRb-Box-PrIR-vermittelte Promotoraktivierung in signifikant stärkerem Maße verringert als die LEPRb-WT-vermittelte (Abbildung 3.18). Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von JAK1 an der LEPRb-vermittelten Signaltransduktion haben auch andere Gruppen bereits beschrieben (Bjorbaek *et al.*, 1997; Carpenter *et al.*,

1998; Muraoka *et al.*, 2003). Dies steht im Widerspruch zu einigen Berichten, die den LEPRb als JAK2-spezifisch beschreiben: Ghilardi und Skoda fanden in stabil transfizierten BaF3-Zellen lediglich eine JAK2- jedoch keine JAK1-, TYK2- oder JAK3-Phosphorylierung nach Leptin-Stimulation (Ghilardi und Skoda, 1997). In JAK-defizienten Fibrosarkom-Zelllinien wurde von einer anderen Gruppe (Kloek *et al.*, 2002) die Spezifität einer Chimäre aus extrazellulärem Epo-Rezeptor und intrazellulärem Teil des LEPRb für JAK2 gezeigt. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese divergenten Ergebnisse könnten Unterschiede in der Protein-Ausstattung der verwendeten Zelllinien und die Untersuchung einer Rezeptorchimäre durch Kloek *et al.* anstelle des wildtyp-Rezeptors darstellen.

Dieser Befund ist für einen homodimeren Zytokin-Rezeptor wie den LEPRb insofern überraschend, als diese Gruppe von Zytokin-Rezeptoren, der neben dem LEPRb auch der Prolaktin-, GH-, Epo- und G-CSF¹¹⁸-Rezeptor angehören, nach bisherigen Erkenntnissen die Signaltransduktion alle mittels JAK2 vermitteln (Carter-Su *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1995; Rui *et al.*, 1994; Witthuhn *et al.*, 1993).

Durch die Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren der JAKs wurden die JAK1- bzw. JAK2-spezifischen Chimären LEPRb-Box-gp130 und LEPRb-Box-PrIR hinsichtlich ihrer differentiellen Hemmbarkeit untersucht. Dabei gelten AG490 und PTP1B als JAK2-spezifische Inhibitoren (Miyamoto *et al.*, 2001; Myers *et al.*, 2001), während SOCS1 und SOCS3 hinsichtlich der JAK-Hemmung als unselektiv angesehen werden (Stoiber *et al.*, 1999; Yasukawa *et al.*, 1999).

Alle getesteten Inhibitoren hemmten jedoch gleichermaßen dosisabhängig die LEPRb-Rezeptoraktivierung, ungeachtet der mit der jeweiligen Rezeptorchimäre assoziierten JAK (Abbildung 3.19). Durch Untersuchung bei verschiedenen Konzentrationen der Hemmstoffe bzw. inhibierenden Proteine wurde sichergestellt, dass die eingesetzten Konzentrationen im submaximalen Bereich lagen.

Obwohl das Tyrphostin AG490 in der Literatur als selektiver Inhibitor der JAK2 gehandelt wird, gibt es hierfür kaum aussagekräftige Untersuchungen. Hingegen existieren durchaus Berichte über eine - zumindest partielle - Inhibition auch der JAK1 (De Vos *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass eine nur schwach ausgeprägte Spezifität des Tyrphostins die geringen Unterschiede in der Inhibition der JAK-spezifischen Chimären bedingt. Dem Befund der Selektivität von PTP1B für JAK2 wurde durch obiges Ergebnis ebenfalls

¹¹⁸ *Granulocyte colony stimulating factor*

widersprochen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte ein ungeeigneter Antikörper sein, der den Nachweis co-immungefällter JAK1 nicht erlaubte (Myers *et al.*, 2001). Auch eine unterschiedliche Proteinausstattung in den jeweils verwendeten Zelllinien könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein.

Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die Spezifität der JAK-Bindung keinen Einfluss auf die Inhibition durch die untersuchten Mediatoren ausübt. Damit erscheint auch ein Einfluss der Rezeptor-gebundenen JAK-Isoform auf die negative Regulation dieser Rezeptoren als wenig wahrscheinlich.