

5 Zusammenfassung

Das Fettgewebshormon Leptin ist ein wichtiger Mediator der Körpergewichtsregulation bei Säugetieren. Das Auftreten einer Resistenz gegenüber der Leptinwirkung bei Adipositas verhindert jedoch regelmäßig den Abbau von Energiereserven und damit die effektive Einstellung des Körpergewichts. Neben einem gestörten Transport des Leptins zu den hypothalamischen Rezeptoren kommt insbesondere ein Defekt der Signaltransduktion auf Rezeptorebene als Ursache hierfür in Frage. Die molekularen Mechanismen dieser Resistenzentwicklung näher zu charakterisieren war Ziel dieser Arbeit.

Die funktionelle Form des Leptin-Rezeptors (LEPRb) ist ein homodimeres Membranprotein, dessen Einzelketten hinsichtlich ihrer funktionellen Domänen mit Zytokin-Rezeptoren der Klasse-I verwandt sind. Wie diese aktiviert auch der LEPRb nach Ligandenbindung den Janus-Kinase/*Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT)-Signalweg, was zur transkriptionellen Regulation von spezifischen Zielgenen führt. Eines dieser Zielgene ist *suppressor of cytokine signaling 3 (socs3)*, dessen Proteinprodukt SOCS3 über eine Bindung an Tyrosin 985 des LEPRb die Abschaltung der Signaltransduktion vermitteln kann. Neben dieser relativ gut untersuchten *feedback*-Inhibition wird eine Rolle von Proteinphosphatasen wie *Protein Tyrosine Phosphatase 1B* (PTP1B) bei der Resistenzentwicklung diskutiert.

In dieser Arbeit wurde die negative Regulation des Leptin-Rezeptors mit Hilfe dreier Zelllinien untersucht, in denen der Leptin-Rezeptor stabil (RINm5F) bzw. transient (HepG2, HIT) exprimiert wurde. Alle Linien zeigten eine schnelle Abschaltung der Signaltransduktion nach zweistündiger Leptin-Stimulation sowie eine Desensitivierung nach 24-stündiger Leptin-Behandlung, weshalb sie als Modellsystem für die Leptin-Resistenz geeignet waren. Oberflächenbindungs-Untersuchungen mit markiertem Leptin zeigten eine geringe Verminderung der LEPR-Expression an der Plasmamembran nach zweistündiger Stimulation, die die Abschaltung partiell erklären könnte. In Reporter-Gen-Assays mit einem STAT3-responsivem Promotor habe ich die LEPRb-Signaltransduktion durch die Überexpression von SOCS1 oder von SOCS3 untersucht. Dabei wurde die Hemmung der LEPRb-Signaltransduktion durch SOCS3 bestätigt, darüber hinaus konnte erstmals auch SOCS1 als äquipotenter Inhibitor des LEPRb identifiziert

werden. Durch Einsatz der Proteinexpressions-Inhibitoren Actinomycin D und Cycloheximid wurde gezeigt, dass die Abschaltung der LEPRb-Signaltransduktion von aktiver Genexpression abhängig war. Neben Tyrosin 985 konnte mit Hilfe von Punktmutanten des LEPRb auch Tyrosin 1077 in Western-Blots eine Beteiligung bei der Abschaltung der Signaltransduktion nachgewiesen werden. Die inhibitorische Wirkung von SOCS3 zeigte sich in Reporter-Gen-Assays von der Anwesenheit der Tyrosine Y 985 oder Y 1077 abhängig. Diese Übereinstimmung im Muster der Tyrosin-Abhängigkeit könnte dadurch erklärt werden, dass die Hochregulation der SOCS3-Expression für die Abschaltung der Signaltransduktion des LEPRb verantwortlich ist.

SOCS1 hingegen konnte nur über Tyrosin 985 eine Hemmung des LEPRb vermitteln. Weiterhin zeigten *Northern*-Blot-Untersuchungen eine Leptin-abhängige Induktion der mRNA von SOCS3, wohingegen SOCS1 im untersuchten System keiner Induktion unterlag. Jedoch könnte SOCS1 auch durch Aktivierung anderer Rezeptoren induziert werden und infolge dessen die LEPRb-Signaltransduktion beeinflussen. Beispielsweise konnte in dieser Arbeit eine solche „Cross-Desensitivierung“ des LEPRb durch den Erythropoetin-Rezeptor und den Wachstumshormon-Rezeptor demonstriert werden.

Mit Hilfe von Kinase-Assays wurde der Beweis geführt, dass die LEPRb-assoziierten JAKs nach zweistündiger Stimulation in ihrer Aktivität deutlich vermindert sind, ohne jedoch dephosphoryliert worden zu sein. Die Interaktion von Phosphatasen mit den JAKs konnte daher für das betrachtete Modell ausgeschlossen werden.

In weiteren Experimenten wurde schließlich die Spezifität des LEPRb für die assoziierte JAK-Kinase untersucht. In Fibrosarkom-Zelllinien, die spezifisch defizient für JAK1 oder JAK2 sind, wurde nachgewiesen, dass der Leptin-Rezeptor alternativ JAK1 oder JAK2 zur Signaltransduktion rekrutieren konnte. Dieser Befund konnte durch *JAK2-knockdown* Experimente bestätigt werden. Dadurch werden die Ergebnisse anderer Untersuchungen relativiert, die die Signaltransduktion des LEPRb als JAK2-abhängig beschrieben hatten. Hohe Spezifität für die Assoziation von entweder JAK1 oder JAK2 zeigten jedoch Chimären des LEPRb, in denen die JAK-bindende Region durch die entsprechenden Sequenzen aus dem Interleukin-6- bzw. dem Prolaktin-Rezeptor ersetzt worden war. Der entscheidende Sequenzabschnitt für die Spezifität der JAK-Bindung konnte somit auf den umklonierten Bereich von 83 Aminosäuren eingegrenzt werden.