

Untersuchungen zu molekularen Mechanismen der Leptin-Rezeptor-Desensitivierung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Holger Knobelspies
aus Friedrichshafen

Mai, 2007

1. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. W. Becker

2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. B. Kleuser

Datum der Disputation: 12. Dezember 2007

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der RWTH Aachen unter Anleitung von Prof. Dr. Walter Becker angefertigt.

Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Anleitung meiner Promotion, die Möglichkeit der eigenverantwortlichen Durchführung der Arbeit sowie für die ständige Bereitschaft zur konstruktiven Diskussion.

Großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Burkhard Kleuser für die freundliche und spontane Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats.

Die Einführung in molekularbiologische und zellbiologische Techniken verdanke ich Dr. Paul Hekerman, Frau Simone Bamberg-Lemper und Frau Hanna Czajkowska, die auch durch ihre beständige Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Für die kompetente Anleitung in die 2D-Gelelektrophorese und die Arbeit mit dem Fluoreszenzscanner danke ich Herrn Dr. René Krieg.

Allen Mitgliedern des SFB 542 gilt meine Dankbarkeit für viele überlassene Materialien und diesbezügliche Hilfestellungen.

Für die kritische Durchsicht meiner Dissertation und konstruktive Diskussionen danke ich Herrn Jan Abrell, Frau Sabine Dunzendorfer und Herrn Thomas Eisele.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitgliedern des Instituts für Pharmakologie an der RWTH Aachen für die freundliche und offene Atmosphäre, die die Durchführung der Arbeit sehr gefördert hat.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leptin und seine physiologische Wirkungen	1
1.2	Der Leptin-Rezeptor	4
1.3	Signaltransduktion des Leptin-Rezeptors	5
1.3.1	Die Janus-Kinasen	7
1.3.2	Die STAT-Proteine	9
1.4	Die negative Regulation	9
1.4.1	Die Familie der SOCS-Proteine	10
1.4.2	Die Phosphatasen PTP1B und SHP2	12
1.5	Zielsetzung	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Bakterienstämme	14
2.1.1.1	<i>E. coli</i> DH5 α	14
2.1.1.2	<i>E. coli</i> DH10 β F' DOT	14
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	14
2.1.3	Medien und Puffer	15
2.1.4	Plasmide und Klonierungen	16
2.1.4.1	Klonierung der pWZLneo-LEPRb-Y/F-Punktmutanten	18
2.1.4.2	pWZLblasti-LEPRb-WT	18
2.1.4.3	Klonierung der LEPRb-Box1/2-Chimären	19
2.1.5	Oligonukleotide	21
2.2	Molekularbiologische Techniken	22
2.2.1	DNA-Präparation aus <i>E. coli</i>	22
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.2.4	Hybridisierungen von Northern-Blots	24
2.2.5	Mutagenese	25
2.2.6	Sequenzierung	26
2.3	Mikrobiologische Methoden	26
2.3.1	Kultivierung	26
2.3.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i> DH5 α	26
2.3.1.2	Anzucht von <i>E. coli</i> DH10 β F' DOT-Zellen	26
2.3.2	Transformation	27
2.4	Zellkultur	27
2.4.1	Kultivierung von Säugerzelllinien	27
2.4.2	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	28
2.4.3	Transfektion eukaryontischer Zellen	29
2.4.3.1	Transiente Transfektion mit FuGENE [®] 6	29
2.4.3.2	Transiente Transfektion mit JetPEI [®]	29

2.4.3.3	Stabile retrovirale Transfektion	29
2.4.4	Inkubation mit Zytokinen	31
2.5	Proteinchemische Methoden	32
2.5.1	Präparation von Gesamtzelllysaten	32
2.5.1.1	Denaturierende Lyse für Western-Blot Analysen	32
2.5.1.2	Native Lyse für Immunfällungen	32
2.5.2	Western-Blot Analysen	33
2.5.2.1	SDS-PAGE und Western-Blot	33
2.5.2.2	Proteindetektion	34
2.5.2.3	Entfernen von primärem Antikörper	36
2.5.3	Immunfällungen	37
2.5.3.1	Immunfällung von Proteinen	37
2.5.3.2	Co-Immunfällung für Kinase-Assays	37
2.5.4	Kinase-Assay	38
2.6	Internalisierungs-Assay	39
2.6.1	Leptin-SEAP Bindungs-Assay	39
2.6.2	Quantitative Proteinbestimmung	40
2.7	Reportergen-Assays	41
2.7.1	Luziferase-Assay	41
2.7.2	β -Galactosidase-Assay	42
2.8	RNA- <i>interference</i>	42
2.9	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Negative Regulation des LEPRb-WT	44
3.1.1	Abschaltung und Desensitivierung	44
3.1.2	Internalisierung	45
3.1.3	Rezeptor- <i>crosstalk</i>	47
3.1.3.1	Leptin-Rezeptor und gp130	47
3.1.3.2	Leptin-Rezeptor und Wachstumshormon-Rezeptor	49
3.1.4	Aktive Genexpression	50
3.2	Einfluss der Tyrosinreste	52
3.2.1	Abschaltung und Desensitivierung der Y/F-Punktmutanten	53
3.2.2	Die Rolle der SOCS-Proteine bei der Desensitivierung	56
3.2.2.1	Induktion der SOCS-Expression	56
3.2.2.2	Die Wirkung von SOCS3	57
3.2.2.3	Die Wirkung von SOCS1	62
3.3	Aktivität der Janus-Kinase im Rezeptorkomplex	64
3.4	Implikationen der Spezifität der JAK-Bindung auf die Signaltransduktion	68
3.4.1	Spezifität der LEPRb-Box1/2-Rezeptorchimären	69
3.4.1.1	Rezeptoraktivierung in JAK-defizienten Zelllinien	69
3.4.1.2	Auswirkungen eines JAK2- <i>knockdown</i>	71
3.4.2	Differentielle Inhibition der LEPRb-Rezeptorchimären	72
4	Diskussion	74
4.1	Kinetik der Signalwegabschaltung	74

4.2	Rezeptor-Oberflächenexpression	76
4.3	Rezeptor- <i>crosstalk</i> und Proteinexpression	77
4.4	Inhibition durch SOCS1 oder SOCS3	78
4.5	Induktion der SOCS1-und SOCS3-Expression	80
4.6	Negative Regulation durch JAK-Inhibition.....	81
4.7	Die Spezifität der JAK-Bindung.....	82
5	Zusammenfassung.....	86
6	Summary	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Anhang.....	109
8.1	Verzeichnis der Abkürzungen	109
8.2	Verzeichnis der Abbildungen	112
8.3	Verzeichnis der Tabellen	113
8.4	Firmenverzeichnis.....	113