

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

**α -MSH-induzierte anorexigene Signalwege
in murinen Hypothalamuszellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ellen Damm

aus Ahlen

München, 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuer: Priv. Doz. Dr. Dr. Harald Mückter

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2013

Für Shorty

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary	3
3 Einleitung	4
3.1 Adipositas	4
3.2 Energiehomöostase in der Peripherie.....	6
3.3 Energiehomöostase im Hypothalamus.....	9
3.3.1 Physiologische Bedeutung des MC4R.....	11
3.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	13
3.4.1 Signalwege von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	15
3.5 Die Familie der Melanocortin-Rezeptoren	17
3.6 Der Melanocortin-4-Rezeptor	20
3.6.1 Expressionsprofil des MC4R.....	20
3.6.2 Agonisten des MC4R.....	21
3.6.3 MC4R-induzierte Signalwege.....	22
3.6.3.1 MC4R-Effektoren <i>in vivo</i>	22
3.6.3.2 MC4R-Effektoren <i>in vitro</i>	23
3.7 MAPK-Kaskade	26
3.7.1 Allgemein.....	26
3.7.2 GPCR-vermittelte Aktivierung von ERK-1/2.....	28
3.8 AMPK	31
3.8.1 AMPK als Energiesensor	31
3.8.2 AMPK in der Peripherie	32
3.8.3 AMPK im Hypothalamus	33
3.8.4 Struktur der AMPK.....	35
3.8.5 Regulation der AMPK durch Phosphorylierung.....	36
3.8.6 Regulation der AMPK durch AMPK-Kinasen	37
3.9 ERK-1/2 und AMPK Interaktion	38
3.10 Zielsetzung der Arbeit.....	40
4 Material und Methoden	41
4.1 Material	41
4.1.1 Geräte.....	41
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	42
4.1.3 Reagenzien.....	42

Inhaltsverzeichnis

4.1.4	Antikörper.....	43
4.1.4.1	Primärantikörper.....	43
4.1.4.2	Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugiert).....	43
4.1.5	siRNAs.....	44
4.1.6	Zellen und Nährmedien.....	44
4.1.7	Bakterien.....	44
4.1.8	Plasmide.....	44
4.2	Methoden.....	45
4.2.1	Zellkultur.....	45
4.2.1.1	Kultivierung von GT1-7 Zellen.....	45
4.2.1.2	Transfektion.....	46
4.2.1.3	Konservierung in flüssigem Stickstoff.....	46
4.2.1.4	Auftauen von GT1-7 Zellen.....	47
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	47
4.2.2.1	Herstellung von kompetenten Bakterien.....	47
4.2.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien durch Hitzeschock.....	48
4.2.2.3	Quantitative Isolierung von Plasmid-DNA.....	49
4.2.3	Zellbiologische Methoden.....	49
4.2.3.1	Bestimmung intrazellulärer Calcium-Ionen-Konzentrationen mittels Fura-2.....	49
4.2.3.2	cAMP-Akkumulationsversuch.....	51
4.2.3.3	Vorbereitung der Proteinproben für die Gelelektrophorese.....	52
4.2.3.4	Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	54
4.2.3.5	Western Blot.....	55
4.2.3.6	Reportergen-Studien.....	59
4.2.3.7	Elektroporation von siRNAs.....	60
4.2.3.8	PepChip Kinase-Array.....	62
4.2.4	Statistische Methoden.....	66
5	Ergebnisse.....	67
5.1	Funktioneller Nachweis des MC4R in GT1-7 Zellen.....	67
5.2	Experimente mit Serumentzug.....	70
5.2.1	ERK-1/2-Regulation.....	70
5.2.1.1	α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung.....	70
5.2.1.2	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von Calcium-Ionen und PKC.....	74
5.2.1.3	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von PTX-sensitiven G-Proteinen.....	76
5.2.1.4	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von PKA.....	79
5.2.1.5	Reportergen-Studien in GT1-7 Zellen.....	83

Inhaltsverzeichnis

5.2.2	AMPK-Regulation	85
5.2.2.1	α -MSH-vermittelte AMPK-Regulation	85
5.2.2.2	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PKC	86
5.2.2.3	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PTX-sensitiven G-Proteinen.....	88
5.2.2.4	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PKA	89
5.2.2.5	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von MEK-1/2	91
5.2.2.6	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von AMPK-Kinasen	94
5.2.2.7	Regulation der LKB1 Expression durch siRNAs	99
5.2.3	Zusammenfassung	105
5.3	Experimente ohne Serumentzug	107
5.3.1	Regulation der AMPK durch α -MSH	108
5.3.2	Abhängigkeit der α -MSH-vermittelten AMPK-Regulation von ERK-1/2..	110
5.3.3	PKA-Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung .	113
5.3.4	Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von AMPK-Kinasen	115
5.3.5	Zusammenfassung	118
5.3.6	PepChip.....	119
6	Diskussion	126
6.1	α -MSH-induzierte Signalwege nach Serumentzug.....	126
6.1.1	PKA-Abhängigkeit der ERK-1/2-Regulation.....	128
6.1.2	PKA-Abhängigkeit der AMPK-Regulation.....	129
6.1.3	ERK-1/2-Abhängigkeit der AMPK-Regulation	130
6.1.4	Die LKB1 als AMPKK.....	131
6.1.5	Vergleich mit <i>in vivo</i> Befunden	134
6.2	α -MSH-induzierte Signalwege unter serumhaltigen Bedingungen	135
6.2.1	PepChip-Analyse	137
6.3	Vergleich der Signalwege unter beiden Bedingungen.....	144
6.4	Ausblick	147
7	Literaturverzeichnis.....	150

Inhaltsverzeichnis

8 Anhang	I
Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
Aminosäurenverzeichnis	X
PepChip	XI
Danksagung	XIII

1 Zusammenfassung

In der deutschen Bevölkerung leidet, bezogen auf den BMI (Body-Mass-Index), etwa jeder zweite an Übergewicht. Innerhalb dieser Gruppe müssen dabei über 25 % als krankhaft adipös eingestuft werden. Trotz der weiten Verbreitung, ist zurzeit weder eine erfolgreiche medikamentöse Therapie der Adipositas verfügbar, noch sind die grundlegenden Mechanismen der Gewichtsregulation vollständig verstanden. Der MC4R (Melanocortin-4-Rezeptor) und sein Ligand α -MSH (melanocyte-stimulating hormone) stellen einen entscheidenden Punkt bei der Energieregulation des Körpers dar und sind damit eine vielversprechende pharmakologische Zielstruktur zur Behandlung von Adipositas. Trotz der enormen Bedeutung dieses Rezeptors ist bemerkenswert wenig über die MC4R-induzierten Signalwege bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, α -MSH-induzierte anorexigene Signalwege in murinen hypothalamischen Zellen (GT1-7), die den MC4R endogen exprimieren, zu identifizieren und zu charakterisieren.

In dieser Arbeit konnte mit hochspezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass nach 20 h Serumentzug die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH die cAMP-abhängige PKA (Proteinkinase A) aktiviert und somit zu einer ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase-1/2) Phosphorylierung führt. Die aktivierte ERK-1/2 inhibiert anschließend die konstitutiv aktive AMPK-Kinase LKB1 (liver kinase B1), was in einer verminderten Phosphorylierung der nachgeschalteten AMPK (AMP-activated protein kinase) an Threonin 172 resultiert. Damit ergibt sich eine lineare α -MSH-induzierte Signalkaskade, bei der die AMPK Dephosphorylierung von PKA, ERK-1/2 und LKB1 abhängig ist.

Die Durchführung von Versuchen nach mehrstündigem Serumentzug ist zwar etabliert, führt aber zu Veränderungen in der Zelle, die sich unter anderem auf Proliferation und Morphologie auswirken. Da unklar ist, welche Versuchsbedingungen dem physiologischen Zustand eines Neurons entsprechen, wurde die α -MSH-induzierte Signalkaskade zusätzlich unter serumhaltigen Bedingungen untersucht. Dabei führt die Stimulation mit α -MSH immer noch zu einer Aktivierung der ERK-1/2 und auch zu einer Dephosphorylierung der AMPK, letzteres allerdings unabhängig von PKA und ERK-1/2. Des Weiteren wird die AMPK nicht mehr exklusiv durch LKB1 reguliert,

Zusammenfassung

sondern die AMPK-Kinase TAK1 (TGF- β -activated kinase-1) spielt ebenfalls eine Rolle. Erste Hinweise aus einem Kinase-Aktivitäts-Array deuten daraufhin, dass diese Unterschiede in einer distinkten ERK-1/2 Aktivierung, über Rap-1 unter serumfreien oder über K-Ras unter serumhaltigen Bedingungen, begründet sein könnten.

Diese Dissertation soll zu einem besseren Verständnis von anorexigenen Signalwegen im Hypothalamus beitragen und könnte bei der Generierung neuer Anti-Adipositas Medikamente hilfreich sein.

2 Summary

50 % of the German population is overweight, 25 % of them suffering from obesity. Although obesity is a spreading problem, so far no effective pharmacological therapy is available, nor are the basic mechanisms regulating energy homeostasis understood precisely. The MC4R (melanocortin-4-receptor) and its agonist α -MSH (melanocyte-stimulating hormone) play a crucial role in whole body energy balance and are a promising target in the treatment of obesity. Despite the enormous relevance little is known about the molecular pathways underlying α -MSH-induced effects. The aim of this work was to identify and characterize α -MSH-induced anorexigenic pathways in murine hypothalamic cells (GT1-7), which endogenously express the MC4R.

Using highly specific antibodies it has been shown that after 20 h of serum starvation stimulation of GT1-7 cells with α -MSH results in a cAMP-dependent PKA (protein kinase A) activation, leading to an ERK-1/2 (extracellular signal-regulated kinase-1/2) phosphorylation. Activated ERK-1/2 subsequently inhibits the constitutive active AMPK-kinase LKB1 (liver kinase B1), resulting in a dephosphorylation of AMPK (AMP-activated protein kinase) at threonine 172. Thus, α -MSH inhibits AMPK in a linear signal transduction pathway, in dependency of PKA, ERK-1/2 and LKB1.

Serum starvation is a commonly used procedure but changes cell activities like proliferation and morphology. Because it is not clear which conditions are experienced by hypothalamic neurons under physiological conditions, α -MSH-induced pathways were also investigated without prior serum starvation. In this case, stimulation with α -MSH also leads to an activation of ERK-1/2 and dephosphorylation of AMPK, the latter one independent of PKA and ERK-1/2. Furthermore, AMPK is not exclusively regulated by LKB1, but additionally by the AMPK-kinase TAK1 (TGF- β -activated kinase-1). First evidence from a kinase activity-array points to a distinct signaling pathway upstream of ERK-1/2 being responsible for these effects. Precisely, under serum free conditions ERK-1/2 activation is dependent on Rap-1, while under serum containing conditions K-Ras is involved.

This dissertation should assist to understand anorexigenic pathways in the hypothalamus and might help to develop new drugs for the treatment of obesity.

3 Einleitung

3.1 Adipositas

In Deutschland hat laut dem statistischen Bundesamt mehr als die Hälfte der Bevölkerung kein normales Körpergewicht [Statistisches Bundesamt, 2009]. Dieses ergab 2009 eine Studie, in der über 50000 Personen zu ihrer Körpergröße und ihrem Gewicht befragt wurden. Definiert wird dabei das Normalgewicht über den „Body-Mass-Index“ (BMI). Der BMI ist der Quotient aus der Körpermasse (kg) und dem Quadrat der Körperlänge (m). Nur 46,5 % der Befragten hatten einen BMI zwischen 18,5 und 25 kg/m², also nach Definition Normalgewicht. 14,7 % der Befragten wurden mit einem BMI von über 30 kg/m² als adipös eingestuft. Demnach gilt zum Beispiel ein Erwachsener mit einer Körpergröße von 1,80 m als adipös ab einem Gewicht von ca. 100 kg.

Tabelle 3.1: BMI-Klassifizierung

	BMI [kg/m ²]	Anteil der Befragten [%]	
Untergewicht	< 18,5	2,1	BMI = $\frac{\text{Körpermasse [kg]}}{\text{Körperlänge}^2 \text{ [m]}}$
Normalgewicht	18,5 - 25,0	46,5	
Übergewicht	25,0 - 30,0	36,7	
Adipositas	> 30,0	14,7	

Meist ist nicht nur die Adipositas das Problem, sondern das Auftreten von verschiedenen Begleiterkrankungen. Mittlerweile sind mehr als 20 Komorbiditäten im Zusammenhang mit Adipositas dokumentiert [Guh, 2009]. Dabei ist das relative Risiko unter anderem für Diabetes mellitus Typ II, Insulinresistenz und Schlafapnoe um mehr als das dreifache erhöht. Koronare Herzerkrankungen und arterielle Hypertonie treten doppelt bis dreimal so häufig auf und das relative Risiko für verschiedene Krebssubtypen und Nierenerkrankungen liegt zwischen eins und zwei [James, 1998; Khaodhiar, 1999; Must, 1999; Vazquez, 2007]. Zusätzlich leiden die Betroffenen neben den physischen auch an psychischen Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen. Daher muss bei einer medikamentösen Behandlung nicht nur die

Einleitung

Adipositas therapiert werden, sondern die Therapie darf keine negativen Auswirkungen auf die Komorbiditäten haben. Die Therapie von Adipositas besteht prinzipiell aus drei Optionen: Eine Umstellung der Lebensgewohnheiten, das heißt sportliche Aktivität und eine Ernährungsumstellung, die Behandlung mit Medikamenten und chirurgische Maßnahmen [Vetter, 2010]. Dabei gilt der chirurgische Eingriff als letzte Möglichkeit bei Personen mit einem BMI von über 40 kg/m^2 [Bult, 2008]. Bei der medikamentösen Behandlung werden oder wurden unter anderem drei Präparate eingesetzt: Sibutramin, Rimonabant und Orlistat [Vetter, 2010; Li, 2011; Kang, 2012].

Sibutramin ist ein indirektes Sympathomimetikum, das die Wiederaufnahme der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin hemmt und damit zu einer Gewichtsreduktion von ca. 4,4 kg pro Jahr führt [Ryan, 1995; Li, 2011]. Seit 2010 ist das Präparat aufgrund der gravierenden Nebenwirkungen auf das kardiovaskuläre System, wie Bluthochdruck und Herzrhythmusstörungen, nicht mehr zugelassen. Bei Patienten mit kardiovaskulärer Vorbelastung zeigte sich ein erhöhtes Herzinfarkt- und Schlaganfallrisiko [James, 2010]. Rimonabant ist ein selektiver „cannabinoid receptor type 1“ (CB1)-Blocker, vermindert über das Cannabinoid-System die Nahrungsaufnahme und reduziert in einem Jahr das Gewicht der Probanden um ca. 4,0 kg [Carai, 2005; Kang, 2012]. Allerdings führt die Einnahme zu Übelkeit und Schwindel [Li, 2011]. Schwerwiegender sind die psychischen Nebenwirkungen wie Depressionen und eine erhöhte Suizid-Gefahr, daher wurde es 2008 aus dem Handel genommen [Soyka, 2008; Burch, 2009]. Orlistat ist ein Lipase-Inhibitor, der die Fettresorption im Gastrointestinaltrakt (GIT) verhindert und somit über die Reduktion der Kalorienaufnahme im Durchschnitt zu einer Gewichtsreduktion von 2,9 kg pro Jahr führt [McNeely, 1998; Li, 2011]. Allerdings gibt es auch hier Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Steatorrhö und Vitaminmangel [Ballinger, 2000]. Mittlerweile gibt es mehrere Studien, die von einer Schädigungen der Leber im Zusammenhang mit Orlistat berichten [Kang, 2012].

Somit ist bisher kein Medikament auf dem Markt, das bei Adipositas gut wirkt und keine bedenklichen Nebenwirkungen hat. Wenn man die Ursachen für Adipositas besser versteht, besteht die Möglichkeit durch gezieltes Eingreifen die Wirkung zu maximieren, während Nebeneffekte minimiert werden.

3.2 Energiehomöostase in der Peripherie

Die Energiebilanz des Körpers ergibt sich aus dem Verhältnis von Energiezufuhr zu Energieverbrauch. Ist die Energieaufnahme über die Nahrungsaufnahme höher als der Verbrauch durch den Gesamtumsatz des Körpers, ist die Energiebilanz positiv und der Körper speichert Energie in Form von Kohlehydraten und Fett. Ist die Energiezufuhr dagegen geringer als der Energieverbrauch des Körpers ist die Energiebilanz negativ, der Körper baut Energiereserven ab und verliert somit an Gewicht. Der Energiehaushalt wird durch verschiedene Faktoren moduliert, die einen hochkomplexen Kreislauf bilden. Dabei sind unter anderem Signale aus dem GIT, der Leber und dem Fettgewebe wichtig, die im Gehirn über orexigene (Appetit-anregende) und anorexigene (Appetit-hemmende) Neurone verarbeitet und interpretiert werden.

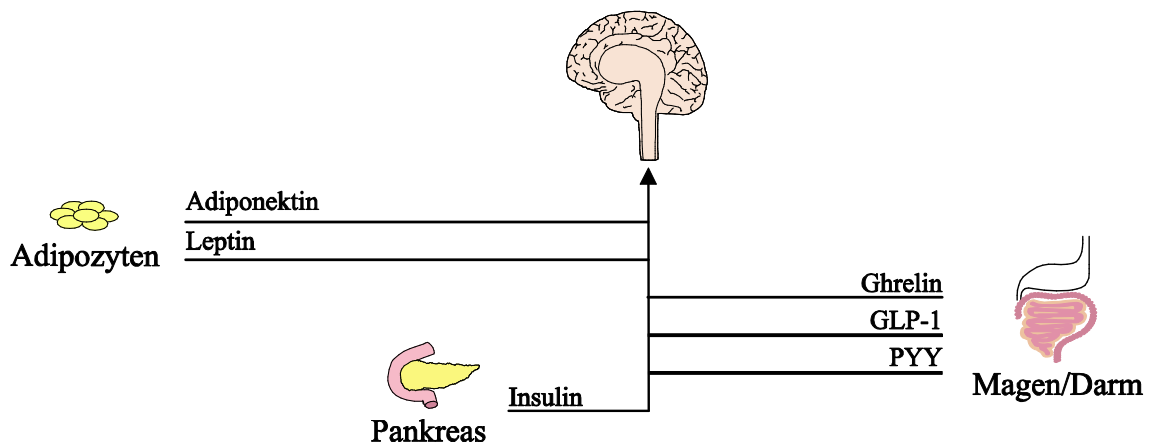


Abbildung 3.1: Periphere Energie-Regulation

Schematische Übersicht über eine Auswahl von Mediatoren aus der Peripherie, die die Energiehomöostase im Gehirn beeinflussen. Adiponektin und Leptin werden aus den Adipozyten freigesetzt. Das Schlüsselpeptid des Pankreas ist Insulin. Aus dem Magen/Darm-Trakt werden u.a. die Mediatoren Ghrelin, GLP-1 und PYY freigesetzt. Sie alle leiten Informationen über den Energiezustand des Körpers an das Gehirn weiter.

Aus dem Fettgewebe werden unter anderem zwei wichtige Peptide freigesetzt: Leptin und Adiponektin. Leptin (griechisch *leptos*: dünn) ist ein zirkulierendes Peptidhormon, das, wie der Name schon sagt, zu Gewichtsreduktion führt. Dabei ist die Menge an Leptin im Blutkreislauf proportional zu der Menge an Adipozyten. Der Leptinspiegel gibt damit Auskunft über den Bestand der Energiereserven des Körpers. Entdeckt wurde das Leptin über eine natürliche Mutation in der sogenannten *ob/ob*-Maus, die im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Tieren das vierfache Körpergewicht hat [Ingalls, 1950]. Das extreme Übergewicht kommt durch das Fehlen des Rezeptors im

Einleitung

Hypothalamus der Maus zu Stande, der für die Detektion des Leptinspiegels verantwortlich ist. Im Säugetier führt sowohl die zentrale (intracerebroventriculare (icv)), als auch die periphere Gabe von Leptin zu einer verminderten Nahrungsaufnahme [Friedman, 1998]. Ein weiteres Peptidhormon aus den Adipozyten ist das Adiponektin. Der Adiponektinspiegel im Blut korreliert invers mit der Menge an Fettgewebe. Bei einem hohen Adipozytenanteil wird wenig Adiponektin freigesetzt und umgekehrt. Die Gabe von Adiponektin steigert die Nahrungsaufnahme von Mäusen, um die internen Energiespeicher wieder zu füllen [Kubota, 2007].

Insulin ist ein Proteohormon, das ausschließlich in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird und an der Regulation des Blut Glucosespiegels beteiligt ist. Insulin ist das einzige Hormon, das die Glucose-Konzentration im Blutkreislauf senken kann. Bei einem erhöhten Glucosespiegel wird Insulin ausgeschüttet und fördert die Glucoseaufnahme in Adipozyten. In den Adipozyten wird die Lipogenese stimuliert und so die Glucose-Konzentration im Blutkreislauf gesenkt. Die Injektion von Insulin in den Hypothalamus, der eine hohe Insulin-Rezeptor Expression aufweist, führt zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme [Air, 2002].

Das „glucagon like peptide-1“ (GLP-1) wird von den neuroendokrinen L-Zellen der Darmschleimhaut in den Blutkreislauf freigesetzt. GLP-1 ist unter anderem für die Sekretion von Insulin verantwortlich und spielt daher bei der Regulation des Glucosespiegels ebenfalls eine wichtige Rolle. Die zentrale Gabe führt über Rezeptoren im Hypothalamus zu einer verminderten Nahrungsaufnahme in Ratten [Alvarez, 1996; Turton, 1996]. Ebenfalls aus den L-Zellen des Darms wird „Peptide YY“ (PYY) nach der Nahrungsaufnahme freigesetzt. PYY ist verwandt mit dem „Neuropeptide Y“ (NPY). Von diesem Peptidhormon existieren mehrere Spaltprodukte, von denen das PYY₃₋₃₆ die stärksten Effekte auf den Energiehaushalt hat. Die zentrale Gabe in den Hypothalamus führt zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme [Batterham, 2002]. Ghrelin ist das einzig bekannte orexigene Peptidhormon aus der Peripherie, das aus P/D1 Zellen der Magenschleimhaut in den Blutkreislauf freigesetzt wird. Sowohl die periphere als auch die zentrale Gabe von Ghrelin führt zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Damit stellt Ghrelin das Hungersignal des Magens dar [Wren, 2000].

Die Regulation der Energiehomöostase durch Mediatoren aus der Peripherie liefert verschiedene Ansatzpunkte für die Generierung gewichtsregulierender

Medikamente. Allerdings üben viele der hier vorgestellten Hormonsysteme zusätzliche Funktionen neben der Energiehomöostase aus, so dass immer wieder Nebeneffekte oder gegenregulatorische Maßnahmen des Körpers auftreten können, die die Effektivität der möglichen Therapeutika reduzieren. GLP-1 Agonisten, wie zum Beispiel Exenatid oder Liraglutid, werden bei Diabetes mellitus Typ II erfolgreich eingesetzt, da sie Glucose-abhängig den Insulinspiegel erhöhen [Craeto, 2011; Gallwitz, 2012]. Zusätzlich kommt es zu einem progressiven Gewichtsverlust, aber auch zu akuter Übelkeit [Kanoski, 2012]. PYY₃₋₃₆ ist ein vielversprechender Kandidat bei der Behandlung von Adipositas, da die Administration die Nahrungsaufnahme reduziert und keine Resistenz entwickelt wird [Batterham, 2003; Small, 2005]. Der Einsatz als Therapeutikum muss allerdings noch genauer analysiert und charakterisiert werden.

Die Regulation von Adiponektin-Rezeptoren kann die Nahrungsaufnahme beeinflussen. Aber aufgrund der ubiquitären Expression der Rezeptoren, unter anderem in Herz und Leber, wird eine gezielte Regulation der Mechanismen, die für die Gewichtsregulation zuständig sind, erschwert [Heiker, 2010; Gu, 2012]. Zudem interagiert Adiponektin mit dem Insulinsystem, was eine zielgerichtete Modulation ebenfalls beeinträchtigt [Kadowaki, 2005; Shehzad, 2012]. Die Applikation von Leptin hat ebenfalls nicht den gewünschten gewichtsreduzierenden Effekt, da es zum einen die Blut-Hirn-Schranke nur unzureichend passiert, zum anderen reagiert der Körper auf die Applikation mit einer Leptin Resistenz [Hamann, 1996; Salvador, 2001]. Der Nutzen von Ghrelin-Rezeptor Antagonisten wird kontrovers diskutiert, da zwar die Inhibition von Ghrelin zu einer Gewichtsreduktion in Mäusen führt, aber der Ghrelin *knock out* keinen Effekt auf die Nahrungsaufnahme zeigt [Nakazato, 2001; Wortley, 2004].

Die verschiedenen peripher ausgeschütteten Hormone werden über die zirkum-cerebroventrikulären Organe, die nur eine unvollständige Blut-Hirn-Schranke besitzen, im Gehirn detektiert. Von dort werden die Signale in wenige, für die Regulation des Körpergewichts entscheidende, Kerngebiete wie zum Beispiel den *nucleus arcuatus hypothalami* (ARC) weitergeleitet, wo schließlich alle Signale, die Aussagen über den Energiezustand des Körpers zulassen, nach stark konvergierender Reizleitung verarbeitet werden. Da die diversen Mediatoren, wie oben beschrieben, in der Peripherie durch ubiquitäre Expression ihrer Rezeptoren eine hohe Anzahl an Effekten haben oder deren Fehlen, beziehungsweise ihr Überschuß, durch andere Mechanismen

kompensiert werden können, ist es zweckmäßig, die zentralen Zielstrukturen im Gehirn zu modulieren, wo die Signale der verschiedenen Hormone verarbeitet werden. Durch ein gezieltes Eingreifen in einem späten Verlauf der Signalweiterleitung können somit die Effekte, die für die Energieregulation verantwortlich sind, gezielt manipuliert und Nebeneffekte reduziert werden.

3.3 Energiehomöostase im Hypothalamus

Der Hypothalamus stellt die zentrale Schaltstelle im Gehirn dar, in der Signale aus der Peripherie zusammenlaufen und integriert werden [Morton, 2006]. Eine wichtige Rolle spielen dabei zwei Populationen von Neuronen im ARC, die maßgeblich an der Regulation des Energiehaushaltes beteiligt sind. Zum einen orexigene Neurone, die sowohl NPY als auch „agouti-related protein“ (AgRP) freisetzen können und daher als NPY/AgRP-Neurone klassifiziert sind [Morton, 2001]. Zum anderen eine Population von anorexigenen Neuronen, die Pro-opiomelanocortin (POMC) und „cocaine and amphetamine regulated transcript“ (CART) produzieren [Vrang, 1999]. Dabei führen die unter 3.2 beschriebenen Signale aus der Peripherie zu einer Regulation der POMC/CART-Neurone oder der NPY/AgRP-Neurone und vermitteln somit ihre anorexigene beziehungsweise orexigene Wirkung. Unter anderem führt Leptin zu einer Stimulation von POMC/CART-Neuronen und einer Inhibition von NPY/AgRP-Neuronen und vermittelt so die verminderte Nahrungsaufnahme und den erhöhten Energieumsatz [Elias, 1998]. Ghrelin dagegen führt zu einer Aktivierung von NPY/AgRP-Neuronen und einer Inaktivierung von POMC/CART-Neuronen und vermittelt so den gegenteiligen Effekt von Leptin [Baskin, 1999; Flier, 2004]. Mutationen im POMC-Gen in Menschen und in Mäusen führen zu Adipositas, rotem Haar und Nebenniereninsuffizienz [Krude, 1998]. Interessanterweise führt in jungen Mäusen weder der AgRP *knock out* noch ein zusätzlicher NPY *knock out* zu einer Reduktion des Gewichts oder einer verringerten Nahrungsaufnahme [Qian, 2002]. Allerdings haben ältere AgRP-defiziente Mäuse sowohl eine verringerte Nahrungsaufnahme, als auch ein reduziertes Körpergewicht [Bewick, 2005]. Anscheinend sind die Tiere, abhängig von ihrem Alter, in der Lage den AgRP *knock out* teilweise zu kompensieren [Flier, 2006].

Einleitung

Die beiden unterschiedlichen Neuronenpopulationen bilden den ARC und ihre Axone ziehen in dasselbe Kerngebiet im Hypothalamus, den *nucleus paraventricularis hypothalami* (PVN). Die Stimulation von POMC/CART-Neuronen führt zu einer Freisetzung von Agonisten, die den „Melanocortin-4-Rezeptor“ (MC4R) der Neurone im PVN aktivieren und so ihre anorexigene Wirkung entfalten [Hahn, 1998; Cowley, 1999]. Die NPY/AgRP-Neuronen haben einen gegenteiligen Effekt, indem sie MC4R Antagonisten freisetzen und damit orexigen wirken [Wisse, 2001]. In POMC-defizienten Mäusen führt die Gabe von MC4R Agonisten zu einer Aufhebung des Phänotyps, die Mäuse fressen weniger und werden dünner [Yaswen, 1999]. Der MC4R ist also ein entscheidender Punkt, an dem die Signale zusammenlaufen.

Die Aktivierung des MC4R reguliert wahrscheinlich die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz langfristig über die Stimulation der „hypothalamic-pituitary-adrenal“ (HPA)-Achse, die zu einer Freisetzung von „thyrotropin-releasing hormone“ (TRH) führt [Kim, 2002; Martin, 2006]. Es konnte auch gezeigt werden, dass der MC4R die Expression des „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) im *nucleus ventromedialis hypothalami* (VMH) und *dorsal vagal complex* (DCV) im Hypothalamus kontrolliert und so seine anorexigenen Effekte vermittelt [Xu, 2003; Bariohay, 2009].

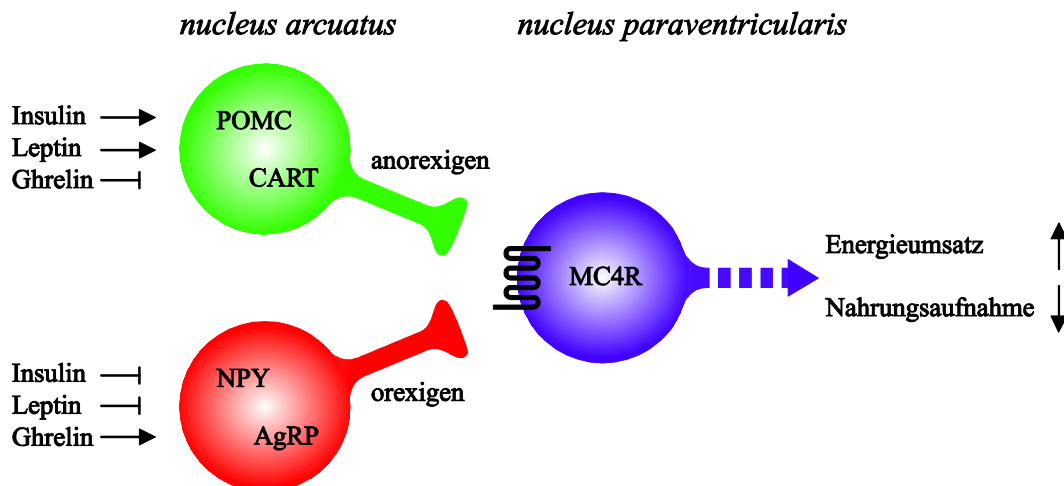


Abbildung 3.2: POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone

Regulation des MC4R über POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone aus dem ARC. Im ARC werden Signale aus der Peripherie, u.a. Leptin, Insulin und Ghrelin in orexigene bzw. anorexigene Signale umgewandelt. Die Aktivierung der POMC/CART-Neurone führt dabei zu der Freisetzung von MC4R-Agonisten und wirkt daher anorexigen. Die Stimulation von NPY/AgRP-Neuronen dagegen wirkt orexigen über die Freisetzung von MC4R Antagonisten. Die Integration der orexigenen und anorexigenen Signale erfolgt in den MC4R-exprimierenden Neuronen des PVN, die daraufhin die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz regulieren.

Daraus ergibt sich das oben beschriebene Bild, dass orexigene und anorexigene Neurone aus dem ARC zum PVN ziehen und dort über den MC4R die Nahrungsaufnahme und den Energieumsatz regulieren [Morton, 2006]. Seit 2005 gibt es eine erweiterte Theorie, nach der die POMC/CART-Neurone und NPY/AgRP-Neurone zu denselben Kerngebieten im Hypothalamus ziehen, aber zu zwei unterschiedlichen Populationen von MC4R-exprimierenden Neuronen [Balthasar, 2005]. Dabei ist eine Population in einem definierten Kerngebiet für die Regulation der Nahrungsaufnahme verantwortlich, während eine andere Gruppe in einem anderen Kerngebiet den Energieumsatz reguliert [Xu, 2006; Xu, 2011]. Um welche Kerngebiete es sich dabei handelt und wie der MC4R die entsprechenden Effekte vermittelt, ist noch unklar [Rossi, 2011].

3.3.1 Physiologische Bedeutung des MC4R

1997 konnte eine MC4R-defiziente Mauslinie generiert werden, in der sowohl männliche als auch weibliche *knock out* Tiere nach vier Wochen anfangen, einen ausgeprägten Phänotyp zu entwickeln [Huszar, 1997]. Nach 15 Wochen sind die Weibchen ungefähr doppelt so schwer wie die entsprechenden Wildtyp-Tiere, was teilweise durch eine um ca. 46 % erhöhte Nahrungsaufnahme zustande kommt. Zusätzlich sind die MC4R-defizienten Tiere im Durchschnitt 11 % länger und haben einen erhöhten Leptinspiegel. Ebenfalls sind in den *knock out* Tieren die Glucosespiegel im Blut verdoppelt und der Insulinspiegel ist um das 14-fache erhöht. Zusammengefasst sind die MC4R-defizienten Mäuse adipös, hyperphagisch, hyperinsulinämisch und hyperglycämisch [Huszar, 1997]. Die Überexpression des MC4R Antagonisten AgRP führt zu demselben Phänotyp [Graham, 1997]. Die Tiere sind ebenfalls adipös, haben einen erhöhten Insulin- und Glucosespiegel und haben eine gesteigerte Körperlänge im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Die Überexpression von Agouti, einem anderen MC4R Antagonisten, führt zusätzlich über das Blockieren eines weiteren Mitglieds der Melanocortin-Rezeptor (MCR)-Familie zu einer gelben Fellfärbung und wird daher als „*viable yellow agouti mouse*“ (A^{vy}) bezeichnet [Lu, 1994; Klebig, 1995]. Die A^{vy} -Maus hat neben der auffälligen Fellfärbung die gleichen Symptome wie die MC4R *knock out* Maus und die transgene AgRP-Maus. Die Inhibition des MC4R, entweder über Antagonisten oder den *knock out*, führt zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und simultan zu einem verminderten Energieumsatz, also zu einer positiven Energiebilanz.

Die Aktivierung des MC4R im PVN hat den gegenteiligen Effekt [Fan, 1997; Giraudo, 1998]. Die Injektion (icv) von Melanotan-II (MT-II), einem synthetischen MCR Agonisten, führt zeit- und konzentrationsabhängig zu einer signifikant verminderten Nahrungsaufnahme. Der Effekt lässt sich durch Gabe des synthetischen MC4R Antagonisten SHU9119 vollständig blockieren. Die Applikation von SHU9119 alleine führt dabei schon zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme [Giraudo, 1998]. Ebenfalls wird durch MCR Agonisten wie MT-II der Insulinspiegel um 58 % gesenkt [Fan, 1997]. Die Aktivierung des MC4R führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und einem gesteigerten Energieumsatz, also einer negativen Energiebilanz. Damit ist der MC4R im Nager eine zentrale Schaltstelle für die Regulation der Energiebilanz, wobei eine Aktivierung zu einer negativen Energiebilanz führt, während die Inhibition des Rezeptors in einer positiven Energiebilanz resultiert [Voisey, 2003].

1998 konnte gezeigt werden, dass die oben erwähnten Befunde auf den Menschen übertragbar sind. Zwei Arbeitsgruppen haben gleichzeitig festgestellt, dass eine Mutation im MC4R-Gen zu Adipositas im Menschen führt [Vaisse, 1998; Yeo, 1998]. Dabei zeigen Probanden mit einer MC4R Mutation dieselben Symptome wie die MC4R *knock out* Maus: schwere Adipositas, Hyperphagie, Hyperinsulinämie und eine erhöhte Körperlänge [Farooqi, 2003]. Seitdem konnte bei 4 - 6 % der Personen mit krankhaftem Übergewicht eine Mutation im MC4R nachgewiesen werden [Vaisse, 2000; MacKenzie, 2006]. Damit ist eine Mutation des MC4R-Gens die häufigste monogenetische Ursache für Adipositas [Farooqi, 2003]. Daher gilt der MC4R als potentiell pharmakologisches Ziel für die Behandlung von starkem Übergewicht [Proietto, 2000; Wilding, 2000; Tian, 2008; Jeon, 2009; Masuzaki, 2009; Vetter, 2010]. Mittlerweile gibt es mehrere MC4R Agonisten, die als Therapeutika in Frage kommen, da diese im Tiermodell zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und zur Gewichtsreduktion führen [He, 2010a; He, 2010b; Hong, 2011]. Allerdings hat bis heute, aufgrund von schwerwiegenden Nebenwirkungen in klinischen Studien kein Agonist den Weg in die Anwendung gefunden [Lam, 2007]. Von daher wäre es hilfreich die genauen Signaltransduktionskaskaden, die durch den MC4R aktiviert werden, zu ergründen, um potentielle Pharmaka gezielter generieren zu können und unerwünschte Nebenwirkungen zu minimieren.

3.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Umwandlung von Informationen extrazellulärer Mediatoren in intrazelluläre Signale der Zelle erfolgt über membranständige Rezeptoren. G-Protein gekoppelte Rezeptoren („G Protein coupled receptor“ (GPCR)) sind in der Plasmamembran der Zelle verankert und durchspannen die Lipiddoppelschicht. Das Binden eines Liganden im extrazellulären Raum führt über eine Konformationsänderung des Rezeptors zu einer Aktivierung von intrazellulär lokalisierten G-Proteinen, die das Signal weiterleiten. GPCRs sind hochkonserviert und haben einen charakteristischen Aufbau, bestehend aus sieben α -Helices, die sich durch die Zellmembran spannen [Schoeneberg, 2007]. Diese Transmembrandomänen (TMB) sind über drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Peptidketten miteinander verbunden. Der N-Terminus des Rezeptors befindet sich im extrazellulären Raum, während der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Zwischen der fünften und der sechsten TMB und an der zweiten intrazellulären Schleife befinden sich die Bindungsstellen für G-Proteine [Wettschureck, 2005].

Die Superfamilie der GPCR besteht aus über 1000 Mitgliedern und wird nach ihrer Sequenz-Homologie in drei Gruppen unterteilt [Jacoby, 2006]. Die Gruppe A stellt die größte Gruppe der GPCR dar und wird als rhodopsin-ähnliche Rezeptoren bezeichnet. Neben dem MC4R gehören unter anderem zu dieser Gruppe das namensgebende Rhodopsin, Adrenorezeptoren und verschiedene olfaktorische Subgruppen [Catania, 2008]. Die Gruppe A zeichnet sich dabei durch einen kurzen N-Terminus und zwei konservierte Motive aus. Zum einen das E/DRY-Motiv am Übergang der dritten TMB zu der zweiten intrazellulären Peptidkette und zum anderen das NPXXY-Motiv in der siebten TMB. Die Gruppe B besteht aus ca. 30 Mitgliedern und wird als Sekretin-ähnliche Rezeptoren bezeichnet. Dazu gehören unter anderem Rezeptoren für Sekretin und Glukagon, die meist an G_s -Proteine gekoppelt sind. Charakteristisch für diese Gruppe ist ein mittellanger N-Terminus. Die Gruppe C wird als metabotrope Glutamat-Rezeptor Familie bezeichnet und besteht nur aus wenigen Mitgliedern, die einen charakteristischen, langen N-Terminus besitzen [Pierce, 2002; Tuteja, 2009].

Einleitung

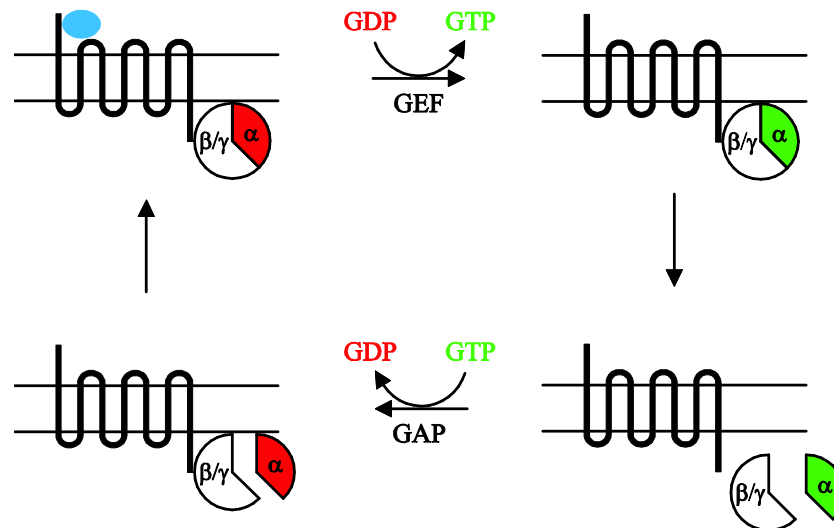


Abbildung 3.3: G-Proteinzyklus eines GPCR

Die α -Untereinheit des trimeren G-Proteins hat in der inaktiven Form GDP gebunden. Durch einen GEF wird der Austausch von GDP zu GTP katalysiert und das G-Protein aktiviert. Das aktivierte G-Protein dissoziiert und sowohl die α - als auch die β/γ -Untereinheit initiiert Signaltransduktionskaskaden in der Zelle. GAPs führen zu der Hydrolyse von GTP zu GDP in der α -Untereinheit und inaktivieren so das G-Protein. Die α -Untereinheit reassoziert mit dem β/γ -Komplex und der Zyklus kann von vorn beginnen.

G-Proteine sind eine Familie von Proteinen, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, Guanin-Nukleotide zu binden. Heterotrimeren G-Proteine sind an der Plasmamembran lokalisiert und bestehen aus einer α -Untereinheit und jeweils einer β - und γ -Untereinheit, die einen Komplex bilden [Pierce, 2002]. Sie durchlaufen nach der Aktivierung einen mehrstufigen Zyklus, nach dem sie wieder in den Grundzustand zurückkehren (siehe Abbildung 3.3) [Stryer, 1986]. In der inaktiven Form hat die α -Untereinheit des trimeren Komplexes Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Ein „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF), zum Beispiel ein GPCR, stimuliert die Freisetzung von GDP und die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) [Siderovski, 2005]. Das aktivierte G-Protein zerfällt in die α -Untereinheit und den β/γ -Komplex, die dann jeweils in der Zelle unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden initiieren. „GTPase activating proteins“ (GAP) führen dazu, dass die aktivierte α -Untereinheit GTP zu GDP hydrolysiert und sich wieder der trimere Komplex mit der β/γ -Untereinheit bildet [Bos, 2007]. Im Falle des G-Proteins besitzt die α -Untereinheit eine intrinsische Enzymaktivität, die zur Hydrolyse von GTP zu GDP führt [Berghuis, 1996]. Das G-Protein befindet sich damit wieder im Grundzustand und kann erneut durch den Rezeptor aktiviert werden.

Nach Aktivierung eines GPCR gibt es mehrere Möglichkeiten das Signal wieder abzuschalten. Zum einen die Phosphorylierung des Rezeptors durch verschiedene Kinasen wie zum Beispiel Proteinkinase A (PKA) oder Proteinkinase C (PKC), die zu einer Entkopplung des Rezeptors von dem G-Protein und somit zu einer Inaktivierung führen [Bouvier, 1988]. Zum anderen können „G Protein coupled receptor kinases“ (GRK) und Arrestine aktiviert werden, was zu der Endozytose des Rezeptors führt [Ferguson, 1996; Buenemann, 1999; Solinski, 2010]. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der lysosomalen Degradierung des GPCR oder die Inhibition der Translation des gesamten Rezeptors [Doss, 1981; Kallal, 1998]. Alle diese Mechanismen führen zu einer kurzfristigen oder langfristigen Verminderung der Übertragung des extrazellulären Signals.

3.4.1 Signalwege von G-Protein gekoppelten Rezeptoren

Die α -Untereinheiten von G-Proteinen werden nach ihren Effektoren in vier Klassen unterteilt: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$. Diese vier Klassen bestehen wiederum aus zwei bis vier Subfamilien [Hepler, 1992]. Eine Übersicht über die Signalwege der verschiedenen α -Untereinheiten ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

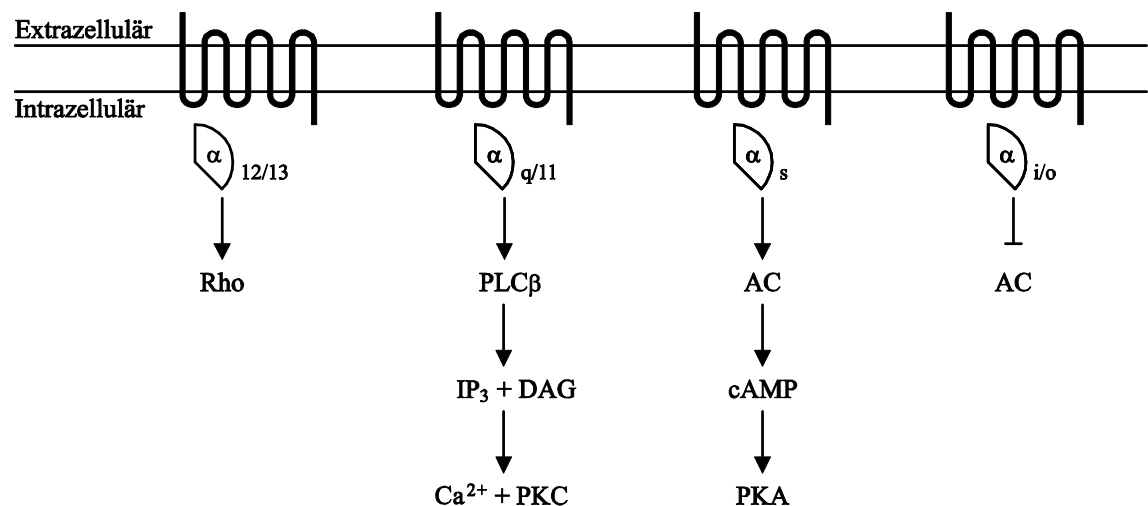


Abbildung 3.4: GPCR-vermittelte Signaltransduktionskaskaden

Die vier verschiedenen α -Untereinheiten der G-Proteine haben unterschiedliche Effektoren in der Zelle. $G_{12/13}$ -Proteine führen meist zu einer Aktivierung von Mitgliedern der Familie der Rho-Kinasen, die dann weitere Effektoren in der Zelle regulieren. Die Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen führt über die Aktivierung der PLC β zu einer Produktion von IP₃ und DAG. Diese beiden sekundären Botenstoffe aktivieren ihrerseits wiederum die PKC und führen zu der Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER. Die Aktivierung von G_s -Proteinen führt zu einer Aktivierung der AC, die dann cAMP generiert, das wiederum in der Lage ist die PKA zu aktivieren. Die Aktivierung von $G_{i/o}$ -Proteinen inhibiert dagegen die AC und inhibiert somit auch die nachgeschalteten Komponenten.

Einleitung

Die Aktivierung von $G_{12/13}$ -Proteinen führt unter anderem zu einer Aktivierung des monomeren G-Proteins Rho [Bhattacharya, 2004]. Nach dem Austausch von GDP zu GTP werden Rho-Kinasen aktiviert, die unter anderem die Regulation des Zytoskeletts kontrollieren [Etienne-Manneville, 2002].

Die Aktivierung von $G_{q/11}$ -Proteinen führt zu einer Aktivierung der Plasmamembran gebundenen Phospholipase C β (PLC β) [Berstein, 1992]. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) [Neves, 2002]. Während DAG an der Membran verbleibt, kann das hydrophile IP₃ im Zytosol frei diffundieren, somit an den IP₃-Rezeptor des endoplasmatischen Retikulums (ER) binden und diesen aktivieren. Der IP₃-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor, der nach Aktivierung Calcium-Ionen aus dem ER in das Zytoplasma leitet [Taylor, 2012]. Die freigesetzten Calcium-Ionen können dann weitere Proteine wie zum Beispiel Calmodulin aktivieren [Kretsinger, 1980]. Das lipophile DAG dagegen verbleibt an der Plasmamembran und aktiviert dort Mitglieder der PKC-Familie [Yang, 2003]. Die aktivierte PKC kann Serine und Threonine von Effektor-Proteinen phosphorylieren und diese somit regulieren.

Die Aktivierung von G_s -Proteinen führt zur Stimulation von membranständigen Adenylatzyklasen (AC). Die aktivierte AC katalysiert die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) [Neves, 2002]. cAMP wiederum führt zu einer Aktivierung der PKA. Die aktivierte Proteinkinase ist ebenfalls in der Lage, Serine und Threonine von nachgeschalteten Effektoren zu phosphorylieren und somit zu regulieren.

Die Stimulation von $G_{i/o}$ -Proteinen hat den gegenteiligen Effekt von G_s -Proteinen. Die Aktivierung von *pertussis* toxin (PTX)-sensitiven G_i -Proteinen führt zu einer Inhibition der membranständigen AC [Hepler, 1992]. Das Bakterium *Bordetella pertussis* sekretiert das Gift PTX und löst beim Menschen Keuchhusten aus. PTX führt selektiv zu einer Inhibition der α -Untereinheit von G_i -Proteinen. Es katalysiert die Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung in der α -Untereinheit und arretiert diese so im GDP-gebundenen Zustand, so dass die Interaktion mit dem Rezeptor verhindert wird [Bokoch, 1983]. Durch die Inhibition der AC werden auch die nachgeschaltete cAMP-Produktion und mit dieser die folgende Aktivierung der PKA inhibiert.

Der β/γ -Komplex von aktivierten G-Proteinen ist ebenfalls in der Lage verschiedene Kaskaden in der Zelle anzustoßen [Clapham, 1997; Downes, 1999]. Schon 1987 konnte gezeigt werden, dass β/γ -Untereinheiten in der Lage sind, Kalium-Kanäle und unterschiedliche AC-Isoformen zu aktivieren [Logothetis, 1987; Tang, 1991]. Die Aktivierung von GPCRs kann über die β/γ -Untereinheit zu der Rekrutierung von GRKs an die Membran führen, die dann den Rezeptor phosphorylieren und das Agonisten-induzierte Signal somit abschalten [Daaka, 1997]. Des Weiteren sind β/γ -Untereinheiten in der Lage die PLC β zu aktivieren und somit eine Calcium-Ionen-Freisetzung zu induzieren [Park, 1993]. Ebenfalls ist eine Aktivierung von „phosphatidylinositol-3-kinase“ (PI3K) bekannt und die Regulation des Golgi-Apparates über die Aktivierung der Proteinkinase D (PKD) beschrieben [Stephens, 1994; Jamora, 1999]. Zusätzlich sind die β/γ -Untereinheiten in der Lage die „extracellular signal-regulated kinases-1/2“ (ERK-1/2) zu aktivieren [Crespo, 1994].

Die Aktivierung des entsprechenden G-Proteins führt nicht ausschließlich zu einer linearen Aktivierung der Signaltransduktionskaskade, sondern die Wege einzelner Komponenten der Kaskaden können mit anderen Regulatoren in der Zelle interagieren [Ritter, 2009]. In PANC-1 Zellen werden die GPCR-vermittelten Effekte von Neurotensin auf die intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration durch Insulin potenziert [Young, 2010]. Im Makrophagen führt die Aktivierung von $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten durch zwei verschiedene Agonisten zu einer synergistischen Calcium-Ionen-Freisetzung [Flaherty, 2008]. Zusätzlich führt die Aktivierung eines GPCR nicht nur zu der Aktivierung einer G-Protein-Familie, sondern die Aktivierung von multiplen G-Proteinen ist ebenfalls möglich. Der β_2 -Adrenorezeptor im Herzen koppelt sowohl an G_s - als auch G_i -Proteine und vermittelt so seine Effekte [Xiao, 2001]. Welche Signalkaskaden in einer Zelle durch einen bestimmten Stimulus aktiviert werden, ist zusätzlich stark vom Zellsystem abhängig [Ritter, 2009].

3.5 Die Familie der Melanocortin-Rezeptoren

Die Familie der MCR besteht aus fünf Mitgliedern, die nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert wurden. Alle fünf Rezeptoren werden durch Spaltprodukte eines einzigen Vorläufer-Peptides, POMC, aktiviert [Pritchard, 2002; Mountjoy, 2010].

Einleitung

Durch gewebespezifische posttranslationale Modifikationen des Polypeptids entstehen dabei die vier MCR Agonisten (siehe Abbildung 3.5). Dabei wird neben den drei Melanocortinen α -, β - und γ - „melanocyte-stimulating hormone“ (MSH), das „Adrenocorticotrop hormone“ (ACTH) und der ebenfalls namensgebende Opioid-Rezeptor (OR) Agonist β -Endorphin generiert [Millington, 2006]. Dass aus einem Polypeptid gleich vier Agonisten für die MCR gebildet werden, unterstreicht die Bedeutung des Melanocortin-Systems, da auch bei einem Fehler in der Spaltsequenz immer noch mindestens ein weiterer Agonist gebildet werden kann. Eine weitere Besonderheit der MCR-Familie ist die Tatsache, dass sie als einzige Gruppe der GPCR endogene Antagonisten haben: Agouti und AgRP [Lu, 1994; Fong, 1997].

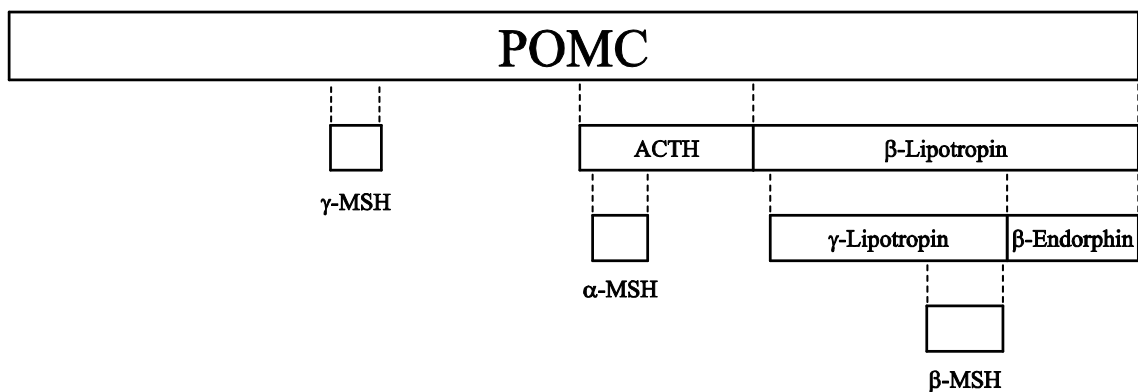


Abbildung 3.5: POMC-Spaltprodukte

Das Vorläufer-Polypeptid POMC enthält alle MCR Agonisten und zusätzlich den Opioid-Rezeptor Agonist β -Endorphin. Gewebespezifische posttranslationelle Spaltung führt zu den verschiedenen Endprodukten.

Der erste Vertreter der Familie der MCR, der Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R), wurde 1992 entdeckt [Chhajlani, 1992; Mountjoy, 1992]. Der MC1R wird in der Haut und in Haarfollikeln exprimiert und ist dort für die Pigmentierung verantwortlich. Die Stimulation des MC1R mit α -MSH führt zu der Synthese von Eumelanin, einem Pigment, das für die schwarz/braun Färbung der Haut und der Haare verantwortlich ist. Bindet dagegen der endogene Antagonist Agouti an den MC1R, dominiert die Synthese des Pigments Phäomelanin, was zu einer gelb/rot Färbung der Haare und der Haut führt [Voisey, 2002]. Die Blockade des Rezeptors durch den Antagonisten Agouti ist für die gelbe Fellfärbung im A^{vy} -Phänotyp verantwortlich [Bultman, 1992; Miller, 1993].

Der Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) wurde ebenfalls 1992 entdeckt und ist mit 297 Aminosäuren der kleinste bekannte GPCR [Mountjoy, 1992]. Zusätzlich nimmt der MC2R eine Sonderstellung in der Familie ein, da er exklusiv über ACTH aktiviert wird, daher wird er auch als ACTH-Rezeptor bezeichnet. Der MC2R wird in der Nebennierenrinde exprimiert und reguliert dort unter anderem die Cortisol-Synthese [Webb, 2010].

Ein Jahr später wurde das dritte Mitglied der Familie entdeckt, der Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R) [Gantz, 1993a]. Der MC3R wird vornehmlich im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert und ist an der Energiehomöostase beteiligt. Allerdings ist die genaue Funktion noch weitgehend unklar, da MC3R *knock out* Mäuse keine signifikante Veränderung der Nahrungsaufnahme oder des Energieumsatzes aufweisen [Chen, 2000; Renquist, 2011]. Wahrscheinlich regelt der MC3R die Energiehomöostase über seine Effekte auf POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone [Bagnol, 1999; Cowley, 2001].

Im selben Jahr wurde der MC4R entdeckt, der aus 332 Aminosäuren aufgebaut ist und an G_s-Proteine koppelt [Gantz, 1993b]. Strukturelle Besonderheiten des MC4R sind eine kurze Peptidschleife zwischen der vierten und fünften TMB und ein längeres Segment zwischen der fünften und sechsten TMB [Ho, 1999]. Der MC4R wird hauptsächlich im Hypothalamus exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Energiehomöostase des Körpers [Mountjoy, 1994; Tao, 2010]. Dabei scheint es jedoch keine redundanten Funktionen des MC3R und des MC4R zu geben [Butler, 2006].

Als letztes Mitglied der Familie wurde der Melanocortin-5-Rezeptor (MC5R) entdeckt [Chhajlani, 1993]. Der MC5R ist in vielen Geweben exprimiert, allerdings nicht im ZNS. Er reguliert eine Vielzahl von exokrinen Drüsen, unter anderem die Regulation von Talgdrüsen, was dazu führt, dass MC5R *knock out* Mäuse beim Schwimmen mehr Wasser in das Fell aufnehmen, da der natürliche hydrophobe Schutzeffekt fehlt [Chen, 1997].

Die verschiedenen MCR haben verschiedene Effekte und werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert [MacNeil, 2002]. Ein Überblick über die fünf MCR, ihre Agonisten mit den entsprechenden Affinitäten, und ihre primären physiologischen Funktionen wurden aus verschiedenen Studien zusammengefasst und in Tabelle 3.2 dargestellt [Schioth, 2005; Cone, 2006; Breit, 2011].

Einleitung

Tabelle 3.2: Übersicht über die MCR-Familie

Subtyp	Agonist	Effekt
MC1R	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	Pigmentierung
MC2R	ACTH	Steroid-Synthese
MC3R	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	Energiehaushalt
MC4R	α -MSH = β -MSH = ACTH > γ -MSH	Energiehaushalt, Appetit
MC5R	α -MSH > β -MSH = ACTH > γ -MSH	Regulation Exokriner Drüsen

Aufgrund der Bandbreite von Funktionen gelten MCR Agonisten als potentielle Arzneimittel. Daher befinden sich verschiedene synthetische Agonisten in klinischen Studien, aber bisher wurde noch kein Präparat zugelassen [Hadley, 2006]. Aufgrund ihrer vielversprechenden Effekte gibt es allerdings einen illegalen Handel mit MCR Liganden. Dabei ist vor allem der synthetische MCR Agonist MT-II weit verbreitet, der auch als „Barbie-Droge“ bekannt ist [Evans-Brown, 2009; Langan, 2010]. MT-II wird mit den Schlagworten beworben: „Es macht braun, schlank und sexy“. Die einzelnen Effekte können durch die Aktivierung der verschiedenen MCR Subtypen erklärt werden. Durch die agonistische Wirkung des MT-II am MC1R wird die Eumelanin Synthese angeregt, was zu einer Bräunung der Haut führt. Die Aktivierung des MC4R führt zu einer negativen Energiebilanz des Körpers und somit zu einer Gewichtsreduktion. Über den MC3R und den MC4R kann MT-II das Sexualverhalten beeinflussen und zu einer Erektion führen [Hadley, 2005]. Allerdings hat die Injektion von MT-II nicht nur vermeintlich positive Effekte, aus bisher noch nicht geklärten Gründen führt MT-II zusätzlich zu gesteigertem Gähnen und Strecken des Probanden und zu akuter Übelkeit [Wessells, 2000].

3.6 Der Melanocortin-4-Rezeptor

3.6.1 Expressionsprofil des MC4R

Schon bei der Klonierung des MC4R konnte eine hohe Expression des Rezeptors im Gehirn gezeigt werden [Gantz, 1993b]. MC4R mRNA wird dabei hauptsächlich im ZNS translatiert, vor allem im Cortex, Thalamus, Hirnstamm und Hypothalamus [Tao, 2010]. Dabei haben genauere Untersuchungen im Hypothalamus gezeigt, dass eine

deutlich erhöhte MC4R Expression im PVN vorliegt [Mountjoy, 1994; Kishi, 2003]. In Tierversuchen konnte bestätigt werden, dass diese Region im Hypothalamus besonders entscheidend für die MC4R-vermittelten Effekte auf die Energiebilanz ist. Die Effekte auf das Fressverhalten von Ratten waren bei Injektion von MCR Agonisten und Antagonisten in den PVN am stärksten ausgeprägt [Kim, 2000]. Des Weiteren wird der MC4R unter anderem auch in Herz, Niere und Leber exprimiert, allerdings sind die Effekte und Funktionen dort unklar [Mountjoy, 2003].

3.6.2 Agonisten des MC4R

MC4R Agonisten sind wie schon oben erwähnt Spaltprodukte des POMC und werden aus dem ARC freigesetzt. Dabei binden die drei Agonisten mit unterschiedlichen Affinitäten an den MC4R und aktivieren diesen (siehe Tabelle 3.2). Für α -MSH ist eine Rolle bei der Energiehomöostase etabliert und auch für β -MSH konnte eine Funktion bei der Energieregulation aufgezeigt werden [Biebermann, 2006]. Das Zusammenspiel von γ -MSH und dem MC4R im Hypothalamus ist dagegen noch nicht untersucht.

Tabelle 3.3: Übersicht über die verschiedenen Melanocortine

α -MSH	Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val
β -MSH	Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp
γ -MSH	Tyr-Val-Met-Gly-His-Phe-Arg-Trp-Asp-Arg-Phe
NDP-MSH	Ac-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-D-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val
MT-II	Ac-Nle-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys

Auch wenn endogen dem MC4R gleich drei Agonisten zu Verfügung stehen, werden in Studien hauptsächlich zwei synthetische Analoge von α -MSH eingesetzt. 1980 wurde der erste künstliche MCR Agonist synthetisiert, das NDP-MSH, auch bekannt als Melanotan-I (MT-I) [Sawyer, 1980]. Dabei wurde im Vergleich zu α -MSH das Methionin an Position vier durch ein Norleucin ausgetauscht und das Phenylalanin an Position sieben durch sein D-Enantiomer ersetzt. So ergeben sich mehrere Vorteile: Zum einen ist die NDP-MSH Variante stabiler und führt zu einer längeren Aktivierung des Rezeptors. Zum anderen sind die induzierten Signale gegenüber den endogenen Agonisten deutlich stärker. Des Weiteren ist das Molekül durch das D-Enantiomer für

den proteolytischen Abbau im Körper weniger zugänglich. Ein weiterer synthetischer Agonist ist das MT-II [Al-Obeidi, 1989]. Es ist eine verkürzte Variante des NDP-MSH und wurde über die Asparaginsäure an Position drei und das Lysin an Position sieben über eine Amidbindung zyklisiert. Es hat zum einen den Vorteil, dass es durch die Verkürzung günstiger zu produzieren ist, und zum anderen, dass es wegen der geringeren Größe besser in den Körper aufgenommen wird [Hadley, 2005]. Beide synthetischen Agonisten werden aufgrund ihrer Vorteile gegenüber ihren endogenen Verwandten bevorzugt und finden vor allem in klinischen Studien Anwendung [Hadley, 2006].

3.6.3 MC4R-induzierte Signalwege

Die enorme physiologische Bedeutung des MC4R im Hypothalamus bei der Regulation der Energiebilanz ist unbestritten. Allerdings sind auf molekularer Ebene die Signalkaskaden, die zu diesen Effekten führen, kaum untersucht.

3.6.3.1 MC4R-Effektoren *in vivo*

Im Nager führt die Injektion von MT-II in den PVN, MC4R vermittelt, zu einer verminderten Nahrungsaufnahme [Fan, 1997; Giraud, 1998; Kim, 2000]. 2003 konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Injektion von MT-II zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 im PVN der Ratte führt [Daniels, 2003]. Eine weitere Arbeit zeigt eine MT-II-induzierte Phosphorylierung der ERK-1/2 im *nucleus tractus solitarii* (NTS). Diese ERK-1/2 Phosphorylierung ist mit dem PKA-Inhibitor Rp-cAMPs vollständig blockierbar. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese ERK-1/2 Phosphorylierung für das Fressverhalten der Tiere entscheidend ist. Die Inhibition der ERK-1/2 Phosphorylierung mit dem Inhibitor U0126 wirkt der durch MT-II-induzierten verminderten Nahrungsaufnahme vollständig entgegen [Sutton, 2005]. 2004 konnte die Arbeitsgruppe um Minokoshi zeigen, dass die Injektion von MT-II (icv) zu einer verminderten „AMP-activated protein kinase“ (AMPK)-Aktivität im PVN führt [Minokoshi, 2004].

Allerdings konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die ERK-1/2 Aktivierung oder die Verminderung der AMPK-Aktivität durch direkte Signalwege des MC4R reguliert werden, oder ob die Freisetzung von parakrinen Faktoren für diese Effekte verantwortlich sind.

3.6.3.2 MC4R-Effektoren *in vitro*

Nach der Klonierung des MC4R 1993 ist die Agonisten-stimulierte cAMP-Akkumulation und damit eine Aktivierung von G_s-Proteinen etabliert worden [Gantz, 1993b]. 2001 gab es die ersten Befunde von Mountjoy, die Calcium-Ionen als MC4R-Effektor vorschlugen [Mountjoy, 2001]. In HEK-293 Zellen, die den MC4R stabil exprimieren, führt die Stimulation mit α -MSH zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen aus dem ER, während die Konzentration von IP₃ in der Zelle nicht beeinflusst wird. Erstaunlicherweise ist die Calcium-Ionen-Freisetzung sensitiv für *Cholera* Toxin, einen selektiven G_s-Protein-Inhibitor. Da der spezifische PKA-Inhibitor Rp-cAMPs keinen Effekt auf die Calcium-Ionen-Freisetzung zeigt, wurde postuliert, dass die Aktivierung von G_s-Proteinen zu der Calcium-Ionen-Freisetzung aus dem ER führt, aber dass cAMP dabei keine Rolle spielt. In einer weiteren Arbeit in HEK-293 Zellen führt die Stimulation mit verschiedenen Melanocortinen ebenfalls zu einer Calcium-Ionen-Freisetzung, die PTX-insensitiv ist [Nickolls, 2005]. Die Ergebnisse aus den Überexpressions-Modellen konnten auch in einer Zelllinie, die den MC4R endogen exprimiert, reproduziert werden. GT1-1 Zellen sind immortalisierte Hypothalamuszellen aus der Maus, die neuronale Eigenschaften besitzen und den MC4R exprimieren. Die Stimulation der GT1-1 Zellen mit NDP-MSH führt zu einer Calcium-Ionen-Freisetzung aus internen Speichern. Diese konnte allerdings sowohl durch den PLC-Inhibitor U73122, als auch durch den IP₃-Rezeptor-Inhibitor 2APB blockiert werden. Die Arbeitsgruppe postulierte daher neben G_s-Proteinen eine Beteiligung von G_q-Proteinen an der MC4R-vermittelten Calcium-Ionen-Freisetzung [Newman, 2006]. Es konnte gezeigt werden, dass α -MSH, zusätzlich zu G_s- und G_q-Proteinen, in MC4R überexprimierenden HEK-293 Zellen zu einer Aktivierung von PTX-sensitiven G-Proteinen führt. In einer Studie erniedrigt α -MSH, PTX-sensitiv, die Akkumulation von cAMP sowohl in HEK-293 Zellen als auch in GT1-7 Zellen [Buch, 2009].

Somit ergibt die Literatur für den MC4R das Bild eines Multi-G-Protein kopplers, der Signalwege über die Aktivierung von G_s-, G_i- und G_q-Proteinen anstoßen kann.

Seit 2003 wird ERK-1/2, ein Mitglied der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Familie, als MC4R-Effektor beschrieben. So führt die Stimulation von, mit dem MC4R transfizierten, COS-1 Zellen mit MT-II zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2. Welche Signalkomponenten daran beteiligt sind und ob es zwischen der Erhöhung der cAMP-Konzentration und der ERK-1/2 Aktivierung einen funktionellen Zusammenhang gibt, wurde allerdings nicht weiter untersucht [Daniels, 2003]. Eine weitere Studie in überexprimierenden HEK-293 Zellen postuliert eine Beteiligung von AC und cAMP bei der NDP-MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung. Allerdings hat auch hier der PKA-Inhibitor Rp-cAMPs keine Auswirkung auf die Phosphorylierung [Patten, 2007]. Die Stimulation von überexprimierenden CHO-K1 Zellen mit NDP-MSH führt sowohl zu einer ERK-1/2 Aktivierung, als auch zu einer Aktivierung des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors „E twenty-six-like transcription factor-1“ (ELK-1). Dabei nimmt der PKA-Inhibitor Rp-cAMPs keinen Einfluss auf die ELK-1 Aktivierung, aber die beiden PI3K-Inhibitoren LY294002 und Wortmannin. Die Arbeitsgruppe geht daher von einer PI3K-abhängigen ERK-1/2 Phosphorylierung aus [Vongs, 2004]. PI3K werden oftmals von β/γ -Untereinheiten *PTX*-sensitiver G-Proteine aktiviert. Das stimmt mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein, die gezeigt hat, dass die NDP-MSH-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung in überexprimierenden HEK-293 Zellen *PTX*-abhängig ist [Chai, 2006]. Schließlich wurde eine MC4R-vermittelte ERK-1/2-Aktivierung auch auf G_q -abhängige Signaltransduktionskaskaden zurückgeführt. In GT1-1 Zellen führt die Stimulation mit NDP-MSH zeit- und konzentrations-abhängig zu einer Aktivierung der ERK-1/2, die weder vom PI3K-Inhibitor LY294002, vom PKA-Inhibitor Rp-cAMPs noch von *PTX* beeinflusst wird. Aber sowohl der Calciumchelator BAPTA, als auch die beiden PKC-Inhibitoren Myr-PKS und Safingol sind in der Lage die NDP-MSH-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung zu blockieren [Chai, 2006].

Zusätzlich zu einer G_s -, G_i - oder G_q -vermittelten Aktivierung der ERK-1/2 gibt es Arbeiten, die zeigen, dass NDP-MSH weniger selbst spezifische Signalwege in der Zelle induziert, sondern vielmehr dazu dient, Insulin-vermittelte Effekte zu potenzieren. In HEK-293 Zellen, die sowohl den MC4R als auch „c-Jun N-terminal kinase“ (JNK) überexprimieren, führt die Stimulation mit NDP-MSH zu einer verringerten JNK Phosphorylierung und damit zu einer Dephosphorylierung des nachgeschalteten „insulin

Einleitung

receptor substrate-1“ (IRS-1) an Serin 307. Die Phosphorylierung von IRS-1 an Serin 307 stellt dabei einen negativen Rückkopplungsmechanismus nach der Aktivierung des Insulin-Rezeptors dar [Aguirre, 2000]. Der Effekt von NDP-MSH ist also die Inhibition der negativen Rückkopplung des Insulin-Rezeptors und verstärkt somit die Effekte von Insulin in der Zelle. Des Weiteren potenziert NDP-MSH die Insulin-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B (PKB) und die Glucoseaufnahme in GT1-1 Zellen, während NDP-MSH alleine keinen Effekt hat [Chai, 2009]. Ebenfalls potenziert NDP-MSH die Insulin-induzierten Effekte auf das „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) in überexprimierenden HEK-293 und GT1-1 Zellen. Diese Effekte sind weder durch den PKA-Inhibitor Rp-cAMPs, noch durch den ERK-1/2-Inhibitor U0126 blockierbar. Die Stimulation der Zellen mit NDP-MSH alleine hat dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Phosphorylierung von mTOR an Serin 2448. Von daher kann die NDP-MSH-vermittelte Verstärkung der Insulin Effekte auf mTOR durch die oben beschriebene fehlende Rückkopplung erklärt werden. Interessanterweise ist der einzige Effektor in GT1-1 Zellen, der nur durch NDP-MSH auch in Abwesenheit von Insulin reguliert wird, die AMPK, die an Threonin 172 dephosphoryliert wird [Chai, 2010].

Tabelle 3.4: Signalwege des MC4R in diversen Zellsystemen chronologisch geordnet

Ligand	Zellsystem	Effektor	Signalkomponenten
α -MSH	HEK-293	Calcium-Ionen	G _s , nicht cAMP
MT-II	COS-1	ERK-1/2	
NDP-MSH	CHO-K1	ERK-1/2	PI3K
α -MSH	HEK-293	Calcium-Ionen	
NDP-MSH	GT1-1	Calcium-Ionen	G _q -Proteine
NDP-MSH	GT1-1	ERK-1/2	Calcium und PKC
NDP-MSH	HEK-293	ERK-1/2	PTX-sensitiv
NDP-MSH	HEK-293	ERK-1/2	G _s und AC, nicht PKA
NDP-MSH	HEK-293	JNK	
α -MSH	HEK-293	cAMP	PTX-sensitiv
α -MSH	GT1-7	cAMP	PTX-sensitiv
NDP-MSH	GT1-1	AMPK	

Der MC4R ist demnach in der Lage sowohl an G_s -, G_q - als auch G_i -Proteine zu koppeln. Dies ist zumindest teilweise abhängig vom verwendeten Zellsystem und potentiell auch von den eingesetzten Agonisten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beiden synthetischen MC4R Agonisten in den Zellen nicht die gleichen Kaskaden auslösen wie ihre endogenen Vorbilder. Eine vereinfachte Übersicht über die MC4R-induzierten Effekte der verschiedenen Studien ist in chronologischer Reihenfolge in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

3.7 MAPK-Kaskade

3.7.1 Allgemein

Einer der etabliertesten Effektoren des MC4R aus *in vivo* und *in vitro* Experimenten ist die MAPK ERK-1/2. MAPK stellen eine Klasse von Serin/Threonin-Kinasen dar, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen und hoch konserviert sind. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Umwandlung von Signalen extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Effekte [Houslay, 2000]. Es gibt eine Vielzahl von Stimuli, die zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade führen, unter anderem Hormone, Neurotransmitter, Zytokine und Stress. Diese aktivieren unter anderem über GPCR, „Receptor tyrosine kinases“ (RTK) und Ionenkanäle die MAPK-Kaskade [Kyriakis, 2001]. Dabei führt die Aktivierung der MAPK-Kaskade zu fast ebenso vielen Effekten wie es Stimuli gibt, wie zum Beispiel Differenzierung, Proliferation, Migration und Apoptose. Allen Vorgängen liegt dabei immer das gleiche Prinzip zugrunde. Die MAPK-Kaskade besteht aus einem charakteristischen etagenförmigen Aufbau, bei dem sich das Signal über die sequenzielle Phosphorylierung in einer Dreier Sequenz fortsetzt [Rubinfeld, 2005]. Ein externer Stimulus führt zur Aktivierung einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), die eine MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert, die wiederum eine MAPK aktiviert. MAPK sind Prolin-dirigierte Kinasen, die durch Phosphorylierung an einem Threonin und einem Tyrosin, die durch eine Aminosäure getrennt sind, aktiviert werden (TEY-Motiv). Das System der sequentiellen Phosphorylierung von drei Kinasen bietet den Vorteil einer Signalamplifikation und einen großen Bereich für Schnittstellen mit anderen Signalwegen.

Einleitung

Die MAPK-Kaskaden werden in vier Gruppen unterteilt, benannt nach ihrer MAPK: ERK-1/2, p38, JNK und ERK-5. Diese unterscheiden sich zum einen in den Faktoren, durch die sie aktiviert werden. Zum anderen weisen sie Unterschiede in ihrer subzellulären Lokalisation nach der Aktivierung auf und variieren damit verbunden in den Zielsequenzen, die sie phosphorylieren und den Effekten, die damit einhergehen [Rubinfeld, 2005].

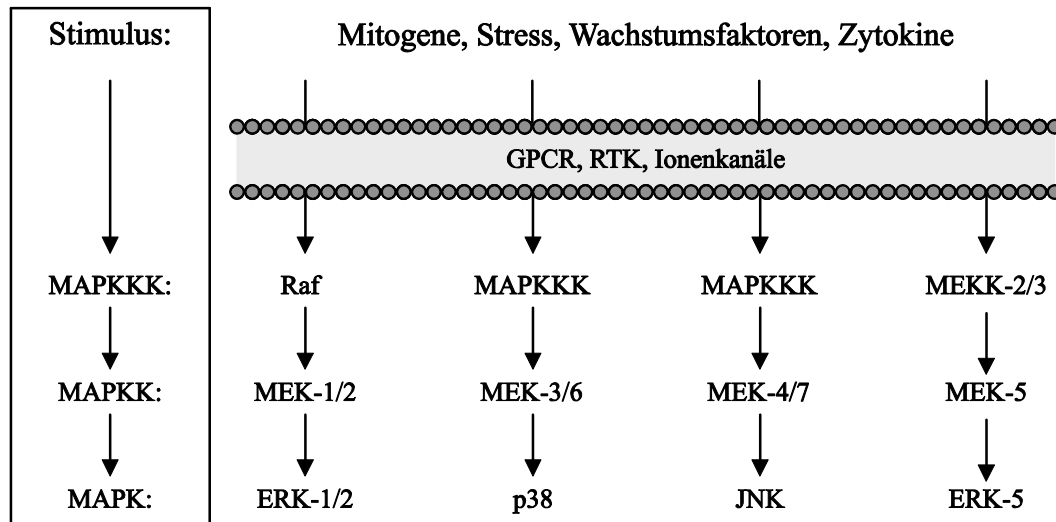


Abbildung 3.6: MAPK-Kaskade

Die verschiedenen Kaskaden sind nach ihren MAPK klassifiziert und zeichnen sich durch einen gleichen Aufbau auf. Ein extrazellulärer Stimulus aktiviert z.B. über GPCR, Ionenkanäle oder RTK eine MAPK-Kaskade. Das führt zu der Aktivierung der Kaskade, die über einen linearen, dreistufigen Phosphorylierungsmechanismus die MAPK aktiviert.

Vor über 20 Jahren wurden ERK-1 und ERK-2 entdeckt, die am besten untersuchten Mitglieder der MAPK-Kaskade [Seger, 1995]. ERK-1 und ERK-2 sind zwei Proteine mit einer Größe von 42 kDa und 44 kDa, die ubiquitär exprimiert werden [Boulton, 1991]. Die Aktivierung der ERK-1/2-Kaskade erfolgt meist über Mitogene, Wachstumsfaktoren, Hormone und Neurotransmitter und führt vornehmlich zu Proliferation und Differenzierung der Zellen. Die MAPKKK sind dabei Mitglieder der Raf-Familie (A-Raf bis C-Raf). Diese phosphorylieren an zwei Serinen die nachgeschaltete MAPKK MEK-1/2 und aktivieren diese [Alessi, 1994]. Die aktivierte MEK-1/2 phosphoryliert dann im Zytoplasma die ERK-1/2 an dem TEY-Motiv. Im Zytoplasma sind über 100 Substrate, die nachfolgend phosphoryliert werden können, beschrieben [Rubinfeld, 2005]. Nach der Aktivierung kann die ERK-1/2 zusätzlich in verschiedene Zellorganelle translokalisieren, vor allem in den Nukleus [Seger, 1995].

Die JNK-Kaskade wird durch Stress aktiviert. Es gibt zehn Isoformen der JNK mit einer Größe von 46-55 kDa. Die Kaskade wird aktiviert durch Entzündungsmediatoren, Hitze, Schock und oxidativen Stress [Kyriakis, 2001]. Als MAPKKK kommen eine Vielzahl von Kinasen in der Zelle in Frage, die dann zu einer Aktivierung von MEK-4 und MEK-7 führen [Rubinfeld, 2005]. JNK phosphoryliert größtenteils Transkriptionsfaktoren, ist daher vielfach im Nukleus lokalisiert und reguliert somit Proliferations- und Apoptose-Prozesse in der Zelle.

Die p38-Kaskade wird ebenfalls durch Stress und zusätzlich durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert. Es gibt vier verschiedene Varianten (α - δ), die alle ungefähr 38 kDa groß sind, was die Namensgebung erklärt. Als MAPKK agieren hauptsächlich MEK-3 und MEK-6. Nach der Aktivierung reguliert p38 Apoptose und Entzündungsreaktionen in der Zelle [Ono, 2000]. p38 ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert, wobei zwischen den beiden Kompartimenten ein dynamischer Austausch stattfindet [Raman, 2007].

Die Kaskade mit der 110 kDa großen ERK-5 als MAPK ist bis jetzt am wenigsten charakterisiert. Sie reagiert auf Mitogene und wird ebenfalls durch Stress aktiviert. Dabei ist sie sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus lokalisiert, wo sie zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt [Kyriakis, 2001; Rubinfeld, 2005].

Bei den einzelnen Kaskaden handelt es sich um definierte lineare Abläufe, allerdings gibt es an jedem Punkt der Kaskade Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Komponenten. MAPK-Kaskaden werden dabei dynamisch durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So erfolgt die Feinregulation des Systems in Abhängigkeit von der Stärke des Signals, der Interaktion mit Gerüstproteinen, der Lokalisation der MAPK in verschiedenen Organellen oder der Interaktion mit anderen Kaskaden [Shaul, 2007].

3.7.2 GPCR-vermittelte Aktivierung von ERK-1/2

Die Agonisten-induzierte Stimulation von GPCR führt zu einer Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen, die in der Lage sind die ERK-1/2-Kaskade zu induzieren (siehe Abbildung 3.7).

Die Aktivierung von G_q -Proteinen führt wie unter 3.4.1 beschrieben zu einer Aktivierung der PLC, die wiederum über die Spaltprodukte IP_3 und DAG zu einer Calcium-Ionen-Freisetzung und Aktivierung der PKC führt. Die aktivierte PKC ist in

der Lage, über C-Raf MEK-1/2 und anschließend die ERK-1/2 zu aktivieren [van Biesen, 1996; Gudermann, 2000]. Die G_q -Protein-vermittelte Aktivierung der PKD kann ebenfalls zu einer Initiierung der ERK-1/2-Kaskade über C-Raf führen [Sinnott-Smith, 2004; Rozengurt, 2007]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die, nach der Aktivierung von G_q -Proteinen, freigesetzten β/γ -Untereinheiten zu einer Ras Aktivierung führen. Ras ist ein kleines monomeres G-Protein der Ras-Familie, das durch den Austausch von GDP zu GTP aktiviert wird und dann unter anderem C-Raf aktivieren und so das Signal amplifizieren kann [Gudermann, 2000; New, 2007].

Die Aktivierung von GPCRs, die an G_i -Proteine gekoppelt sind, führt ebenfalls zu einer Aktivierung der ERK-1/2-Kaskade. Dabei kann zum einen über die Aktivierung von *PTX*-sensitiven β/γ -Untereinheiten die PLC aktiviert werden, die dann über PKC oder PKD zu einer ERK-1/2 Aktivierung führt [Camps, 1992]. Zum anderen können die β/γ -Untereinheiten zusätzlich zu einer direkten Ras-Aktivierung und anschließend, C-Raf vermittelt, zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führen [Crespo, 1994; Ito, 1995]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer direkten Ras-unabhängigen C-Raf, Aktivierung der ERK-1/2-Kaskade [Pumiglia, 1995].

Die GPCR-vermittelte Aktivierung von G_s -Proteinen stellt in Bezug auf die Regulation der AC den Gegenspieler von G_i -Proteinen dar (siehe 3.4.1). Da eine Aktivierung von G_i -Proteinen zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 führt, sollte die Aktivierung von G_s -Proteinen zu einer Inhibition der ERK-1/2-Kaskade führen. Tatsächlich führt die Aktivierung von G_s -Proteinen zu einer Inhibition von C-Raf und damit zu einer verminderten ERK-1/2 Phosphorylierung [Cook, 1993; Wu, 1993]. Die Aktivierung der PKA kann zusätzlich durch die Inhibition von B-Raf zu einer Inhibition der ERK-1/2 führen [Erhardt, 1995]. Allerdings kann die Aktivierung von G_s -Proteinen ebenfalls zu einer Aktivierung der ERK-1/2 führen. Dabei führt die Aktivierung der PKA zu einer direkten Rap-1 Aktivierung. Rap-1, ebenfalls ein Mitglied der Ras-Familie, führt anschließend über B-Raf zu einer MEK-1/2 Phosphorylierung [Vossler, 1997]. Die Aktivierung von G_s -Protein kann die Phosphorylierung der ERK-1/2 also bidirektional beeinflussen. Dabei sind mehrere Faktoren entscheidend, wie zum Beispiel die subzelluläre Lokalisation einzelner Komponenten, das Expressionsprofil von C-Raf und Rap-1 und das Vorhandensein von Gerüstproteinen, wie zum Beispiel das Bindeprotein 14-3-3 [Houslay, 2000; Qiu, 2000].

Einleitung

$G_{12/13}$ -Proteine können ebenfalls ERK-1/2 über kleine GTPasen der Rho-Familie aktivieren, aber der Mechanismus, der zu dieser Aktivierung führt, konnte noch nicht aufgeklärt werden [Mariggio, 2006]. Meist induziert allerdings die Aktivierung von $G_{12/13}$ -Proteinen eine Aktivierung der p38- oder der JNK-Kaskade [Sugden, 1997].

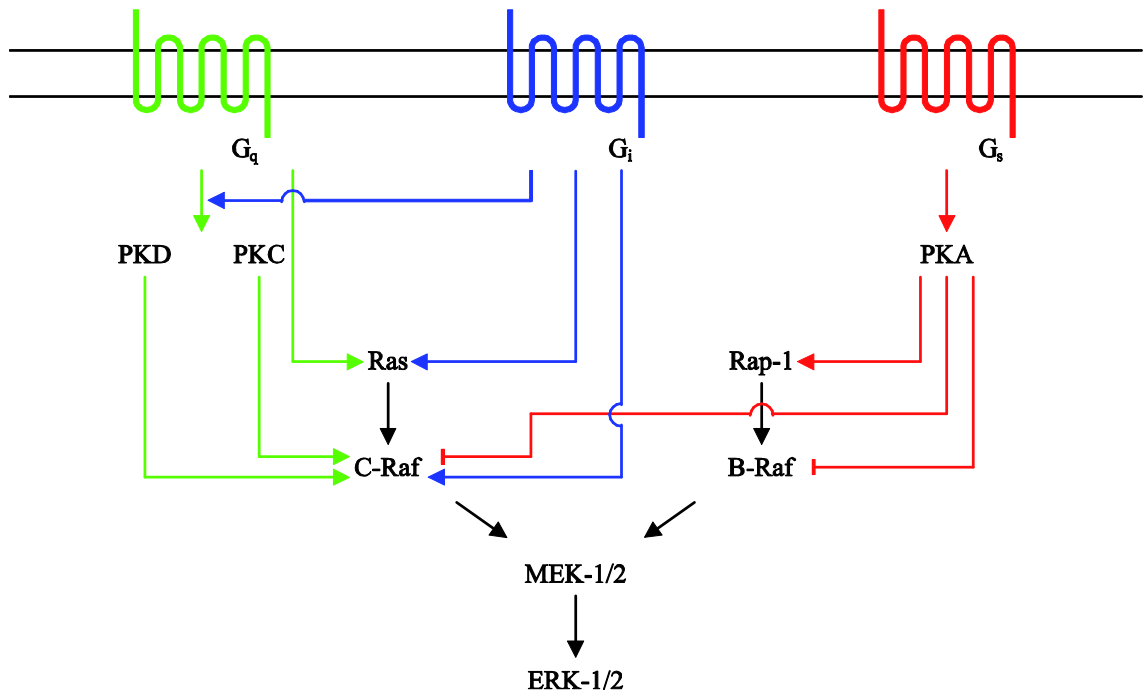


Abbildung 3.7: GPCR-vermittelte Regulation von ERK-1/2

Schematische Darstellung der Signalwege von GPCRs, die zu einer ERK-1/2 Aktivierung führen. G_q -Proteine haben die Möglichkeit über Ras C-Raf zu aktivieren, was dann die ERK-1/2-Kaskade initiiert. Zusätzlich können sie über PKC und PKD direkt C-Raf aktivieren. Die Aktivierung von G_i -Proteinen führt ebenfalls über die Aktivierung von PKC und PKD zu einer ERK-1/2 Aktivierung, oder über Ras oder eine direkte C-Raf Phosphorylierung. Die G_s -Proteine können sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Inaktivierung der ERK-1/2 führen. Über die Inhibition von C-Raf und B-Raf wird ERK-1/2 inaktiviert, während es über die Aktivierung von Rap-1 zu einer B-Raf-vermittelten Induktion der ERK-1/2-Kaskade kommt.

Es gibt noch eine Vielzahl von weiteren Möglichkeiten der GPCR-vermittelten ERK-1/2 Aktivierung. Unter anderem besteht noch die Option der Agonisten-induzierten Endozytose assoziierten ERK-1/2 Aktivierung, an der Arrestine beteiligt sind [Daaka, 1998]. Des Weiteren spielt die Transaktivierung über RTK eine wichtige Rolle oder die Src-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung [Schlessinger, 1993; Luttrell, 1996; New, 2007]. Prinzipiell kann die Aktivierung jedes GPCR zu einer Aktivierung der ERK-1/2-Kaskade führen. Dabei wird das Aufschlüsseln des Signalweges durch eine mögliche multimere G-Protein Kopplung zusätzlich erschwert [Gudermann, 2000].

3.8 AMPK

3.8.1 AMPK als Energiesensor

Seit kurzer Zeit ist die AMPK als ein wichtiger Faktor bei der Energieregulation, sowohl der Zelle, als auch des ganzen Organismus bekannt. 1973 wurde die AMPK erstmalig beschrieben, als Kinase der „acetyl-CoA carboxylase“ (ACC) in der Leber [Carlson, 1973]. Relativ zeitnah wurden sowohl die cAMP-unabhängige „acetyl-CoA carboxylase kinase-3“ (ACK-3), als auch die „3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA“ (HMG-CoA)-Reduktase Kinase aus der Leber isoliert und charakterisiert [Brown, 1975; Munday, 1986]. Erst später wurde klar, dass es sich bei den Kinasen um ein und dasselbe Protein handelt und der Name der Kinase wurde aufgrund der Abhängigkeit von AMP in AMPK geändert [Yeh, 1980; Munday, 1988]. Nachdem die AMPK in verschiedenen Geweben identifiziert wurde, kam 1992 das Modell der AMPK als Energiesensor der Zelle auf [Hardie, 1992]. Wird in der Zelle mehr ATP verbraucht als neu gebildet werden kann, läuft die Zelle Gefahr, wichtige Funktionen nicht mehr aufrecht erhalten zu können und nekrotisch zu werden. Dabei sinkt der ATP-Spiegel, während die AMP-Konzentration in der Zelle steigt. Der Anstieg des AMP/ATP-Ratios führt dann zu einer Aktivierung der AMPK. Diese schaltet katabolische Prozesse, also ATP-generierende Prozesse, an und inaktiviert anabolische, ATP verbrauchende Prozesse in der Zelle [Hardie, 2008]. Relativ schnell wurde bei der weiteren Charakterisierung der Kinase sowohl die Bedeutung für die Zelle, als auch die zentrale Rolle der Phosphorylierung an Threonin 172 deutlich [Hawley, 1996]. Dabei ist die Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 entscheidend für die Kinase-Aktivität. Die AMPK wird ubiquitär exprimiert, mit hohen Anteilen in der Leber, im Muskel, im Fettgewebe, dem Herzen und im Gehirn [Stapleton, 1996; Turnley, 1999]. Nachdem die Rolle der AMPK als Energiesensor der Zelle etabliert war, wurde 2004 erstmals die Hypothese, dass die AMPK als Regulator der kompletten Energiebilanz des Körpers dient postuliert [Carling, 2004]. Bestätigt wurde diese Theorie durch eine Arbeit, die zeigen konnte, dass die Aktivierung der AMPK im Hypothalamus durch den indirekten synthetischen Aktivator „5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside“ (AICAR) in Ratten zu einer vermehrten Nahrungsaufnahme führt [Andersson, 2004]. Seitdem wurden mehrere Arbeiten publiziert, die die Regulation der AMPK im

Hypothalamus durch verschiedene Mediatoren mit der Regulation der Nahrungsaufnahme in Verbindung bringen [Andersson, 2004; Kim, 2004; Minokoshi, 2004; Hardie, 2008]. Dabei erfüllt die AMPK im Gehirn eine duale Funktion. Zum einen dient sie als Energiesensor für die einzelnen Zellen, zum anderen bildet sie einen Integrationspunkt für den Metabolismus des ganzen Körpers [Ramamurthy, 2006].

3.8.2 AMPK in der Peripherie

Die AMPK wurde zuerst, wie oben beschrieben, aus der Leber isoliert und charakterisiert. Mittlerweile wurden verschiedene Isoformen auch im Herzen, im Muskel, im Pankreas und im Fettgewebe lokalisiert. Interessanterweise spielen in den verschiedenen Geweben, die unter 3.2 beschriebenen Mediatoren der Energiehomöostase wie Adiponektin und Leptin eine Rolle bei der Regulation der AMPK.

Im Skelettmuskel führt sportliche Aktivität zu einer Aktivierung der AMPK, um die Versorgung des Muskels mit ausreichend ATP zu gewährleisten [Winder, 1996]. Die Aktivierung der AMPK durch AICAR erhöht die Glucoseaufnahme über die Translokation des „glucose transporter type 4“ (Glut4)-Rezeptors an die Plasmamembran [Kurth-Kraczek, 1999]. Gleichzeitig wird die Proteinbiosynthese in den Zellen über die Aktivierung von mTOR inhibiert [Bolster, 2002]. Leptin führt zu einer Aktivierung der AMPK und inhibiert so die nachgeschaltete ACC, was zu einer gesteigerten Oxidation von Fettsäuren führt und somit ebenfalls ATP generiert [Minokoshi, 2002]. Die Aktivierung der AMPK über Adiponektin führt zu einer erhöhten Proteinbiosynthese von mitochondrialen Proteinen und liefert somit einen langfristigen Beitrag zur Erhöhung der ATP-Konzentration [Iwabu, 2010]. Insulin alleine dagegen hat keinen Effekt auf die Phosphorylierung der AMPK im Muskel, aber die Aktivierung der AMPK führt zu einer Erhöhung der Insulin Sensitivität [Breen, 2008; Treebak, 2008].

Die Aktivierung der AMPK im Herzen steigert die Glycolyse und führt, wie im Skelettmuskel, über die Regulation des Glut4-Rezeptors zu einer gesteigerten Glucoseaufnahme [Russell, 1999; Marsin, 2000]. Insulin inhibiert im Herzen die AMPK, was über die Aktivierung der ACC zu einer Inhibition der Oxidation von Fettsäuren führt [Gamble, 1997]. Leptinämie führt zu einer erhöhten AMPK Phosphorylierung, während Hyperleptinämie zu einer Reduktion der Fettsäure-Synthese führt [Lee, 2004]. Ghrelin,

Adiponektin und GLP-1 aktivieren die AMPK und regulieren somit Glycolyse und Apoptose im Herzen [Kola, 2005; Shibata, 2005; Huisamen, 2008].

Im Fettgewebe führt die Stimulation der AMPK zu einer Inhibition der Triglycerid-Synthese und beeinflusst sowohl die Lipolyse als auch die Lipogenese [Sullivan, 1994; Daval, 2006]. Leptin und Adiponektin aktivieren die AMPK in Adipozyten, wobei Adiponektin die Glucoseaufnahme steigert [Yamauchi, 2002; Wu, 2003; Wang, 2005]. Die Stimulation von 3T3-L1 Zellen mit Insulin führt ebenfalls zu einer AMPK Aktivierung [Liu, 2010]. Im Gegensatz dazu führt die Stimulation von Adipozyten mit Ghrelin und GLP-1 zu einer Inaktivierung der AMPK, wobei letzteres PI3K- und PKB-abhängig zu einer gesteigerten Lipogenese führt [Kola, 2005; Kim, 2007].

Die Stimulation der AMPK in der Leber führt zu Inhibition der Fettsäure- und der Cholesterol-Synthese [Henin, 1995]. Leptin defiziente und Leptin-Rezeptor defiziente Mäuse haben eine reduzierte AMPK-Aktivität in der Leber [Yu, 2004]. Adiponektin und GLP-1 aktivieren die AMPK und verringern somit die Gluconeogenese, beziehungsweise die Lipogenese [Yamauchi, 2002; Ben-Shlomo, 2011]. Insulin und Ghrelin dagegen inhibieren die AMPK, was im Falle von Insulin zu einer Triglycerid-Akkumulation führt [Kola, 2005; Barazzoni, 2011]. Die Effekte der verschiedenen Mediatoren auf die Aktivierung der AMPK in den jeweiligen Geweben sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

3.8.3 AMPK im Hypothalamus

Es konnte schon früh gezeigt werden, dass die AMPK in verschiedenen Kerngebieten des Gehirns exprimiert wird [Stapleton, 1996; Turnley, 1999]. Im Gehirn konnte auch das Konzept der AMPK als Energiesensor der Zelle etabliert werden, da in Neuronen die Aktivierung der AMPK durch AICAR der, durch Glucoseentzug induzierten, Apoptose entgegenwirkt [Culmsee, 2001].

2004 wurde erstmalig gezeigt, dass die AMPK im Hypothalamus bei der Regulation der Nahrungsaufnahme eine entscheidende Rolle spielt [Andersson, 2004]. Die Injektion von AICAR, und damit eine Aktivierung der AMPK, in den dritten Ventrikel oder direkt in den PVN führt zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme bei Ratten. Die Inhibition der AMPK mit dem Inhibitor Compound C (CC) dagegen führt

Einleitung

zu einer verminderten Nahrungsaufnahme [Kim, 2004]. Die Expression einer dominant negativen AMPK-Mutante im medialen Hypothalamus führt ebenfalls zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und Gewichtsreduktion in Mäusen, während eine konstitutiv aktive AMPK-Variante den gegenteiligen Effekt hat [Minokoshi, 2004].

Adiponektin aktiviert die AMPK im ARC, stimuliert die Nahrungsaufnahme und führt zu einem verringerten Energieumsatz [Kubota, 2007]. Die intraperitoneale (ip) Injektion von Ghrelin führt ebenfalls zu einer Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 und damit zu einer erhöhten AMPK-Aktivität im Hypothalamus [Andersson, 2004]. Die Injektion (ip) von Leptin dagegen hat den gegenteiligen Effekt von Ghrelin auf die AMPK Phosphorylierung im Hypothalamus [Andersson, 2004]. Die Gabe von Leptin und Insulin führt zu einer Reduktion der AMPK-Aktivität in verschiedenen Hypothalamusregionen, unter anderem dem ARC und dem PVN [Minokoshi, 2004]. GLP-1 inhibiert ebenfalls die Nahrungsaufnahme und dephosphoryliert die, durch Nahrungsentzug aktivierte, AMPK in Ratten [Seo, 2008].

Tabelle 3.5: Regulation der AMPK-Aktivität durch verschiedene Mediatoren

	Gehirn	Leber	Fettgewebe	Herz	Muskel
Leptin	↓	↑	↑	↓	↑
Adiponektin	↑	↑	↑	↑	↑
Insulin	↓	↓	↑	↓	[-]
Ghrelin	↑	↓	↓	↑	[-]
GLP-1	↓	↑	↓	↑	

Der Effekt der verschiedenen Mediatoren auf die AMPK ist stark vom Zielgewebe abhängig, wobei kein einheitliches Muster erkennbar ist. Während in der Leber sowohl Leptin als auch Adiponektin zu einer Aktivierung der AMPK führen, führt im Gehirn nur Adiponektin zu einer AMPK Aktivierung, während Leptin hier zu einer Inaktivierung der AMPK führt. Es existiert ein relativ kompliziertes Geflecht aus Faktoren, die die Regulation der AMPK steuern. Interessanterweise scheint es bei den Hormonen aus der Peripherie einen Zusammenhang zwischen ihrer Wirkung auf die Energiebilanz und ihrem Effekt auf die AMPK im Gehirn zu geben. Die Administration von Leptin führt zu einer Dephosphorylierung der AMPK und parallel zu einer Gewichtsreduktion, während Ghrelin den jeweils gegenteiligen Effekt hat. Demnach

scheinen alle Mediatoren, die die AMPK im Gehirn phosphorylieren, zu einer positiven Energiebilanz zu führen, während Hormone, die zu einer AMPK Dephosphorylierung führen, eine negative Energiebilanz fördern. Die AMPK stellt also ebenso wie der MC4R eine zentrale Schaltstelle bei der Regulation der Energiebilanz dar.

3.8.4 Struktur der AMPK

Die AMPK ist ein heterotrimerer Komplex, bestehend aus drei Untereinheiten [Mitchellhill, 1994; Stapleton, 1994]. Sie besteht aus einer katalytischen α -Untereinheit ($\alpha 1$ oder $\alpha 2$) und zwei regulatorischen Untereinheiten β ($\beta 1$ oder $\beta 2$) und γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ oder $\gamma 3$). Dabei sind die verschiedenen Untereinheiten beliebig miteinander kombinierbar, so dass 12 verschiedene Isoformen der AMPK existieren.

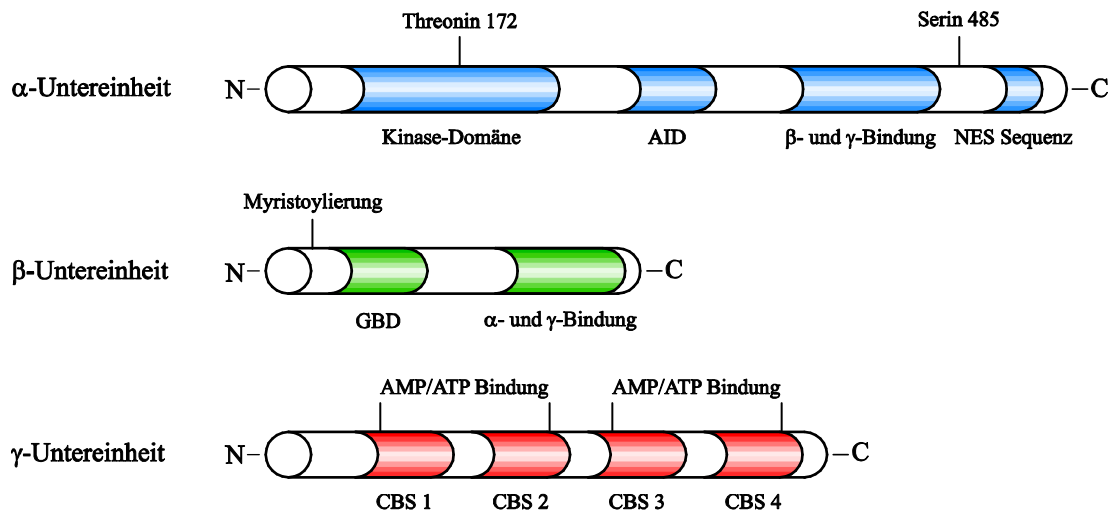


Abbildung 3.8: Struktur der AMPK

Schematische Darstellung der drei Untereinheiten der AMPK. Die α -Untereinheit besteht aus einer Kinase-Domäne, in der sich das Threonin 172, die entscheidende Phosphorylierungsstelle, die für die Kinase-Aktivität verantwortlich ist, befindet. Des Weiteren hat die α -Untereinheit eine AID, eine Bindungsstelle für die β - und γ -Untereinheit und eine NES-Sequenz am C-Terminus. Die β -Untereinheit ist deutlich kürzer als die α -Untereinheit und zeichnet sich durch eine Myristoylierungsstelle und eine Domäne für die Glycogen-Bindung aus. Am C-Terminus befindet sich eine Bindungsstelle für die anderen beiden Untereinheiten. Die γ -Untereinheit besteht aus vier CBS-Domänen, die durch die Bindung von AMP bzw. ATP den Energiestatus der Zelle detektieren und dementsprechend die AMPK-Aktivität regulieren.

Die α -Untereinheit besteht aus einer Kinase-Domäne, in der sich das Threonin 172 befindet, das durch AMPK-Kinasen (AMPKK) phosphoryliert wird und somit die Kinase-Aktivität steuert (siehe 3.8.6). Des Weiteren beinhaltet die α -Untereinheit eine autoinhibitorische-Domäne (AID), eine „nuclear export sequence“ (NES) am

C-Terminus als auch einen Bereich, der für die Komplexbildung mit der β/γ -Untereinheit verantwortlich ist [Crute, 1998; Kazgan, 2010]. In der β -Untereinheit befinden sich eine „glycogen binding domain“ (GBD) und eine Myristoylierungsstelle [Warden, 2001; Hudson, 2003]. Der C-Terminus ist für die Verknüpfung der α - und der γ -Untereinheit verantwortlich [Iseli, 2005]. Die γ -Untereinheit kann insgesamt drei AMP-Moleküle binden, wovon eines nicht ausgetauscht werden kann [Chen, 2009]. Die anderen beiden AMP-Moleküle sind in den vier „cystathionine beta synthase“ (CBS)-Domänen gebunden, wobei jeweils zwei CBS-Domänen zusammen ein AMP-Molekül binden [Scott, 2004]. Dabei konkurriert AMP mit ATP um die Bindungsstelle und reguliert somit die AMPK-Aktivität bei steigender AMP/ATP-Ratio.

3.8.5 Regulation der AMPK durch Phosphorylierung

Das Threonin 172 in der α -Untereinheit ist die zentrale Regulationsstelle für die AMPK-Aktivität [Hawley, 1996]. Die Phosphorylierung an dieser Position durch AMPKK führt zu einer Steigerung der Kinase-Aktivität, während eine Dephosphorylierung die Kinase-Aktivität vermindert [Hardie, 2003; Woods, 2003b; Carling, 2004]. Mittlerweile sind noch zwei weitere Phosphorylierungsstellen beschrieben, die die AMPK-Aktivität beeinflussen können. Zum einen das benachbarte Serin 173, das in primären Adipozyten durch PKA phosphoryliert wird und damit die Phosphorylierung an Threonin 172 durch eine AMPKK unterbindet [Djouder, 2010]. Zum anderen das Serin 485, das ebenfalls in der α -Untereinheit lokalisiert ist [Woods, 2003b]. Im Herzen phosphoryliert PKB das Serin 485, wodurch die Phosphorylierung an Threonin 172 durch eine AMPKK verschlechtert und somit die AMPK-Aktivität vermindert wird [Horman, 2006; Soltys, 2006]. Die Stimulation von verschiedenen Zellen mit AC-Aktivatoren, zum Beispiel Forskolin (FSK), führt zu einer Phosphorylierung der AMPK an Serin 485 und verringert die AMPK-Aktivität [Hurley, 2006]. Demnach scheint ein inverser Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung der AMPK an Serin 485 und der Phosphorylierung an Threonin 172 zu bestehen. In anderen Modellsystemen hat die Phosphorylierung an Serin 485 hingegen keine Auswirkung auf die AMPK-Aktivität, sondern moduliert möglicherweise eher die subzelluläre Lokalisation der AMPK [Woods, 2003b]. Die Stimulation von frisch isolierten Kardiomyozyten mit Endothelin-1 (ET-1) resultiert in einer Phosphorylierung

der AMPK an Serin 485, allerdings ohne Auswirkung auf das Threonin 172 und die AMPK-Aktivität zu haben [Javadov, 2009]. Im Gegensatz dazu führt in BV-2 Zellen die Stimulation der Zellen mit AICAR zu einer Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 und simultan zu einer Phosphorylierung an Serin 485 [Lu, 2010]. Von daher werden die genauen Zusammenhänge zwischen dem Serin 485 und dem Threonin 172 der AMPK kontrovers diskutiert und müssen noch genauer untersucht und etabliert werden. Unbestritten dagegen ist, dass das Threonin 172 die entscheidende Phosphorylierungsstelle für die Aktivität der AMPK ist.

3.8.6 Regulation der AMPK durch AMPK-Kinasen

Die „liver kinase B1“ (LKB1) ist die erste AMPKK, die identifiziert werden konnte. In Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) wird das AMPK ortholog Snf1 durch Tos3p, ein naher Verwandter der LKB1, phosphoryliert. Des Weiteren phosphoryliert aufgereinigte LKB1 aus Säugerzellen die AMPK an Threonin 172 und steigert somit die AMPK-Aktivität [Hong, 2003]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Inkubation von COS7 Zellen mit dem indirekten LKB1-Inhibitor Radicol die Aktivierung der AMPK durch Sorbitol fast vollständig inhibiert [Woods, 2003a]. Insgesamt wurden nahezu zeitgleich fünf Arbeiten publiziert, die die LKB1 als Kinase der AMPK identifizieren [Hawley, 2003; Hong, 2003; Sutherland, 2003; Woods, 2003a; Shaw, 2004]. LKB1 bildet mit STRAD und MO25 einen trimeren Komplex und ist eine etablierte „tumor suppressor kinase“ [Hawley, 2003]. Eine Mutation des LKB1-Gens führt zum Peutz-Jeghers-Syndrom, einer Bildung von Polypen im GIT [Hemminki, 1998].

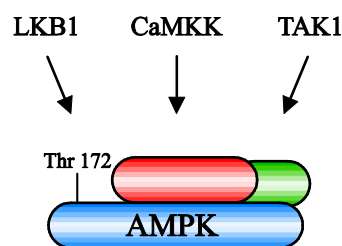


Abbildung 3.9: Regulation der AMPK an Threonin 172

Schematische Darstellung der AMPK bestehend aus einer α - (blau), β - (grün) und γ -Untereinheit (rot). In der α -Untereinheit befindet sich ein Serin an Position 172, dessen Phosphorylierungsstatus für die AMPK-Aktivität entscheidend ist. Die AMPKK LKB1, CaMKK und TAK1 phosphorylieren die AMPK an Threonin 172 und aktivieren diese somit.

Die „Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase“ (CaMKK) wurde von der gleichen Arbeitsgruppe, die auch schon die LKB1 als AMPKK identifiziert hat, ebenfalls zuerst in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), identifiziert [Hong, 2005]. In HeLa Zellen, die keine LKB1 exprimieren, führt die Aktivierung der CaMKK- β zu einer Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Zusätzlich führt in Gehirnschnitten der Ratte eine Depolarisation und damit einhergehend ein Calcium-Ionen-Einstrom zu einer Aktivierung der AMPK, die mit dem CaMKK-Inhibitor STO609 vollständig blockierbar ist [Hawley, 2005]. Zwei weitere Gruppen haben im gleichen Zeitraum die CaMKK als weitere AMPKK identifiziert [Hurley, 2005; Woods, 2005]. Die CaMKK ist wie ihr Substrat, die CaMK, ebenfalls von Calcium-Ionen und Calmodulin abhängig [Means, 2008]. Sie kommt in zwei Isoformen vor (α und β), von denen die CaMKK- β die dominantere Rolle in der AMPK-Regulation zu haben scheint [Hawley, 2005; Woods, 2005].

Auch bei der dritten AMPKK, der „TGF- β -activated kinase-1“ (TAK1) war die Arbeitsgruppe um Hong wieder maßgeblich an der Entdeckung beteiligt. Wie schon bei der LKB1 und der CaMKK wurden dabei die ersten Untersuchungen in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) durchgeführt. Die TAK1 phosphoryliert die AMPK an Threonin 172 *in vitro* und die Überexpression von TAK1 in HeLa Zellen führt zu einer Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 [Momcilovic, 2006]. In MCF10 Zellen führt die Stimulation der Zellen mit „TNF-related apoptosis-inducing ligand“ (TRAIL) zu einer AMPK Aktivierung. Diese ist durch eine spezifische „small interfering RNA“ (siRNA) gegen TAK1 vollständig inhibierbar, während siRNAs gegen LKB1 und CaMKK keinen Effekt auf die AMPK Phosphorylierung haben [Herrero-Martin, 2009]. TAK1 ist ein Mitglied der MAPKKK-Familie und spielt über die Aktivierung von JNK eine Rolle bei Entzündungsreaktionen [Shim, 2005].

3.9 ERK-1/2 und AMPK Interaktion

Sowohl die ERK-1/2, als auch die AMPK sind als potentielle MC4R-Effektoren vorgeschlagen worden. Es konnten diverse Signalwege aufgezeigt werden, bei denen beide Kinasen sowohl abhängig als auch unabhängig voneinander beteiligt waren.

Einleitung

Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Skelettmuskeln der Ratte mit AICAR, zu einer Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 und einer nachgeschalteten Phosphorylierung von ERK-1/2 führt [Chen, 2002]. Auf der anderen Seite konnte in GT1-7 Zellen gezeigt werden, dass die Stimulation mit Adiponektin zu einer Aktivierung der AMPK führt, die dann zu einer ERK-1/2 Inhibition führt, die durch den AMPK-Inhibitor CC vollständig blockierbar ist [Cheng, 2011]. In Melanom Zellen führt die Aktivierung der AMPK durch Berberin ebenfalls zu einer Dephosphorylierung der ERK-1/2 [Kim, 2012]. Demnach ist die AMPK eine vorgeschaltete Kinase vor ERK-1/2 und reguliert diese entweder aktivierend oder inhibierend.

Weitere Arbeiten belegen ebenfalls eine gleichsinnige oder inverse Korrelation der AMPK und der ERK-1/2, allerdings in umgekehrter Reihenfolge, wonach die ERK-1/2 die vorgeschaltete Komponente der AMPK ist. In Hepatozyten führt die Inkubation der Zellen mit Taurocholsäure zu einer Aktivierung der ERK-1/2 und einer anschließenden AMPK Phosphorylierung [Fu, 2011]. In Lungen Epithelgewebe führt die Aktivierung von ERK-1/2 durch CO₂ ebenfalls zu einer Aktivierung der AMPK, die durch den MEK-Inhibitor U0126 blockierbar ist [Welch, 2010]. Im Gegensatz dazu führt in SK-Mel-28 Melanom Zellen eine konstitutiv aktive B-Raf zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und einer nachgeschalteten AMPK Dephosphorylierung [Zheng, 2009]. In Herzfibroblasten führt die Stimulation mit Serum zu einer Aktivierung der ERK-1/2 und einer anschließenden Dephosphorylierung der AMPK, die durch den Inhibitor U0126 blockierbar ist [Du, 2008].

Eine Interaktion der AMPK und der ERK-1/2 ist in der Literatur etabliert. Allerdings ist die Anordnung der beiden Kinasen zueinander sowohl vom Zellsystem als auch vom Stimulus abhängig. Wie die beiden Kinasen in einer potentiellen MC4R-induzierten Signalkaskade zueinander stehen und ob es überhaupt einen funktionellen Zusammenhang gibt, ist bisher noch nicht untersucht.

3.10 Zielsetzung der Arbeit

Der MC4R spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes im Hypothalamus. Die Aktivierung des MC4R führt zu einem gesteigerten Energieumsatz und gleichzeitig zu einer verringerten Nahrungsaufnahme. Trotz dieser zentralen Rolle des MC4R, sind die molekularen Grundlagen, die diesem Effekt zugrunde liegen, weitgehend unbekannt. Dabei bietet ein detailliertes Verständnis der MC4R-induzierten Signalwege die Möglichkeit, gezielt Medikamente für die Behandlung von Adipositas zu generieren. Sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* Daten geben Hinweise auf eine Beteiligung der ERK-1/2 und der AMPK bei der MC4R-vermittelten Signalkaskade.

Ziel dieser Arbeit war es, Signalwege des MC4R im Hypothalamus zu identifizieren. Daher wurde mit GT1-7 Zellen ein endogenes Zellsystem gewählt, das ein etabliertes Modell für die Untersuchung von Signalwegen im Hypothalamus darstellt. Da bisherige Studien nur synthetische MC4R Agonisten verwenden, sollte in dieser Arbeit gezielt der Agonist α -MSH verwendet werden, um so nah wie möglich den physiologischen Gegebenheiten zu entsprechen. Anknüpfend an erste Daten aus Überexpressionssystemen sollte zunächst analysiert werden, ob die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH MC4R vermittelt zu einer ERK-1/2 Aktivierung führt und wie das potentielle Signal vom Rezeptor weitergeleitet wird. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die AMPK ebenfalls in α -MSH-induzierte Signalwege integriert ist und auf welchem Weg es genau zu einer möglichen Regulation kommt. Falls eine Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH die beiden Kinasen beeinflusst, stellt sich zusätzlich die Frage, ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Effektoren gibt, und auf welche Weise sich dieser auf molekularer Ebene gestaltet. Zusätzlich sollten mit Hilfe eines Kinase-Aktivitäts-Array (PepChip) weitere potentielle Zielstrukturen des MC4R identifiziert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Bakterien-Inkubator	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttler MaxQ 6000	Thermo, Dreieich
Chemi-Smart 5000	Peqlab, Erlangen
Cyclone Plus Phosphorimager	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Feinwaage HR-202	Bachofer, Reutlingen
FLUOstar Omega	BMG Labtech, Offenburg
Gelelektrophorese Zubehör	Bio-Rad, München
Kühlzentrifuge Fresco 21	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop CKX41SF	Olympus, Hamburg
Magnetrührer Barnstead Thermolyne	Thermo, Dreieich
Mikroskopkamera SC 20	Olympus, Hamburg
Neon [®] -Transfektionssystem	Invitrogen, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter FE20	Mettler Toledo, Giessen
Photometer Bio Photometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Peqlab, Erlangen
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Spannungsquelle EV 231	Peqlab, Erlangen
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo, Dreieich
Szintillationszähler WS1414	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermoshaker TS-100	Peqlab, Erlangen
Ultraschallstab	Werkstatt Walther-Straub-Institut, München
Vortexer MS3 basic	Ika, Staufen
Waage EG-N	Kern, Balingen

Material und Methoden

Wasserbad HI 1210	Memmert, Schwabach
Western Blot-Apparatur	Werkstatt Walther-Straub-Institut, München
Zellkultur-Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Pico 17	Heraeus, Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Elektroden Papier Novablot	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Mikroschraubröhre	Sarstedt, Nürmbrecht
Nitrozellulose-Membran 0,45 µm	Whatman GmbH, Dassel
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt, Nürmbrecht
Szintillations-Gefäße 20 mL	Packard, Groningen, Niederlande
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkultur 6-Loch-Platten	Sarstedt, Nürmbrecht
Zellkultur 12-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur-Schalen 100 mm	Sarstedt, Nürmbrecht
96-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
175 cm ² Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürmbrecht

4.1.3 Reagenzien

AgRP	Peptides, Louisville (KY), USA
BIM-X	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bradykinin	BioTrend, Zürich, Schweiz
Fura-2/AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gallein	Calbiochem, Darmstadt
Gö-6983	Enzo, Lörrach
KT5720	Enzo, Lörrach
Luziferase-Substrat	Promega, Mannheim
LY294002	Biomol, Hamburg
NDP-MSH	Bachem, Bubendorf

Material und Methoden

Oxozeaenol	Tocris, Bristol, UK
PD184352	Selleck Chemicals, Houston (TX), USA
PD98059	Biomol, Hamburg
PepChip Kinase-Array	Pepscan Systems, Lelystad, Niederlande
<i>pertussis</i> toxin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Radicicol	Tocris, Bristol, UK
Rp-cAMPs	Enzo, Lörrach
STO609	Tocris, Bristol, UK
TurboFect	Fermentas, Leon-Rot
U0126	Calbiochem, Darmstadt
α -MSH	BioTrend, Zürich, Schweiz
β -MSH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
γ -MSH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
γ - ³³ P-ATP	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
³ H-Adenin	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, bezogen.

4.1.4 Antikörper

4.1.4.1 Primärantikörper

Antigen	Donorspezies	Verdünnung	Hersteller
p-ERK-1/2	Maus	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg
ERK-2	Kaninchen	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg
p-AMPK (Thr172)	Kaninchen	1:10000	Cell Signaling, Danvers (MA)
LKB1	Kaninchen	1:2000	Cell Signaling, Danvers (MA)

4.1.4.2 Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase konjugiert)

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG	1:10000	Bio-Rad, München
Anti-Maus IgG	1:10000	Bio-Rad, München

4.1.5 siRNAs

ID	Sequenz	Abk.	Ziel
s74497	5'-GUAUGACUGUAGUGCCCUAtt-3' 3'-gtCAUACUGACAUCACGGGAU-5'	#97	LKB1
s74498	5'-CACCAAGCCCAGACACUAAAtt-3' 3'-ggGUGGUUCGGGUCUGUGAUU-5'	#98	LKB1
s74499	5'-AGGGCAUUGUUCACAAGGAtt-3' 3'-ggUCCCGUAACAAGUGUCCU-5'	#99	LKB1
#4390843	negativ Kontrolle	#00	[-]

Alle siRNAs sind Silencer[®] Select Pre-designed siRNAs von Invitrogen, Darmstadt.

4.1.6 Zellen und Nährmedien

GT1-7 Zellen sind neuronale Zellen aus dem Hypothalamus der Maus. Sie wurden 1990 von Mellon et al. generiert und der Arbeitsgruppe Breit von Dr. Hubertus Jarry, Georg-August-Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt [Mellon, 1990]. Als Nährmedium wurde DMEM (25 mM Glucose) mit 10 % Serum (fötales Kälberserum, 10270-106) verwendet. Als Antibiotika wurden Penicillin (5000 U/mL) und Streptomycin (5000 µg/mL) zugesetzt. Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden von Invitrogen, Darmstadt, bezogen.

4.1.7 Bakterien

Es wurde der, in der Molekularbiologie etablierte, *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstamm DH5 α verwendet.

4.1.8 Plasmide

Das SRE-Reportergenkonstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Susanne Mühlich, Walther-Straub-Institut in München, zur Verfügung gestellt [Muehlich, 2008]. Das CRE-Reportergenkonstrukt wurde freundlicherweise von Dr. Andreas Breit zur Verfügung gestellt [Himmler, 1993; Breit, 2006]. Das Plasmid des μ -OR wurde von Dr. Thomas Koch, Universität Magdeburg, bereitgestellt [Koch, 2003].

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kultivierung von GT1-7 Zellen

GT1-7 Zellen sind immortalisierte, murine, Hypothalamuszellen, die 1990 von Mellon et al. etabliert wurden [Mellon, 1990]. Das Ziel der Arbeitsgruppe war es, spezielle neurosekretorische Hypothalamusneurone durch Einbringen eines DNA-Fragmentes, bestehend aus dem SV40-Onkogen unter der Kontrolle des „gonadotropin-releasing hormone“ (GnRH) Promoters, zu gewinnen. Hypothalamische Zellen, die GnRH transkribieren konnten, wurden durch das SV40-Onkogen zur Proliferation angeregt. Der so entstandene Tumor konnte aus einer Maus entnommen und drei stabile Klone (GT1-1, GT1-3 und GT1-7) isoliert werden. Alle drei Klone zeigten neuronale Eigenschaften, unter anderem Differenzierung, Ausbilden von Axonen und die Expression typischer neuronaler Markerproteine wie zum Beispiel die Neuronenspezifische Enolase (NSE) oder das „vesicle-associated-membrane protein-2“ (VAMP-2). Elf Jahre nachdem die Zellen generiert und als Modellsystem für hypothalamische Neurone, die GnRH freisetzen können, etabliert wurden, konnte eine andere Arbeitsgruppe den MC4R funktionell in GT1-1 und GT1-7 Zellen nachweisen [Khong, 2001]. Seitdem sind GT Zellen ein etabliertes Modellsystem zur Untersuchung von Signalwegen in Hypothalamusneuronen [Zamani, 1996; Morte, 1997; Anderson, 1999; Chen, 1999; Shah, 2003; Shinyama, 2003; Zhang, 2003; Lee, 2005; Chai, 2006; Kim, 2006; Li, 2006; Newman, 2006; Shah, 2006; Morrison, 2007; Yamanaka, 2007; Coyral-Castel, 2008; Park, 2008; Wen, 2008; Chai, 2009; Nordstrom, 2009; Chai, 2010; Wen, 2010; Cheng, 2011; Dalvi, 2011; Hayes, 2011; Watterson, 2012].

Die immortalisierten Hypothalamuszellen haben mehrere Vorteile: Sie sind im Vergleich zu primären Zellen relativ einfach zu kultivieren und somit für eine größere Anzahl von Experimenten zugänglich. Die Rahmenbedingungen sind durch eine Zellpopulation mit konstanten Eigenschaften sehr stabil. Die endogene Rezeptorexpression stellt zwar im Vergleich mit einer Rezeptorüberexpression erhöhte Anforderungen an die Empfindlichkeit bei dem Nachweis Rezeptor-abhängiger Signalwege, dafür befindet sich der MC4R in seiner natürlichen Umgebung und Artefakte durch die Transfektion, beziehungsweise Überexpression sind nicht gegeben.

Bis zu einer Konfluenz von 70 - 80 % wurden die GT1-7 Zellen als adhärenente Monolayer bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle drei bis vier Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dafür wurden die Zellen mit 5 mL PBS gewaschen und für 5 min bei 37 °C mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 mL Medium aufgenommen und die Zellen bei 1100 × g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 - 10 mL Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde in die Flaschen zurückgegeben und für spätere Versuche weiter kultiviert. Die für den jeweiligen Versuch optimale Zellzahl wurde auf Schalen, beziehungsweise Platten ausgesät und die Zellen standen nach einer Inkubation von 24 h für weitere Versuche zur Verfügung.

4.2.1.2 Transfektion

GT1-7 Zellen wurden mit dem lipophilen Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas) nach Herstellerangaben transfiziert. Dieses Reagenz bildet mit der Plasmid-DNA einen stabilen Komplex, der mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und in die Endosomen transportiert wird. Durch das Binden von Protonen an das Reagenz wird die spontane Hydrolyse der Plasmid-DNA und somit ihr Abbau verhindert. Zusätzlich führt die Änderung der Protonenkonzentration osmotisch bedingt zum Anschwellen der Endosomen, so dass die Membran rupturiert und die Plasmid-DNA in das Zytoplasma freigesetzt wird. Über einen noch nicht bekannten Mechanismus wird diese dann in den Nukleus transportiert. Danach wird die Plasmid-DNA für einen limitierten Zeitraum transkribiert und die resultierende mRNA translatiert.

Pro 100 mm Schale wurden 1 - 5 µg Plasmid-DNA mit der doppelten Menge TurboFect (in µL) in 500 µL serumfreiem DMEM angesetzt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf die Schalen getropft und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

4.2.1.3 Konservierung in flüssigem Stickstoff

Um eukaryotische Zellen dauerhaft zu konservieren wurden die Zellen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Um das Bilden von Eiskristallen zu verhindern wurden die Zellen in Serum mit DMSO eingefroren. Für einen schonenden Gefrierprozess wurden die Zellen zunächst in einem Einfrierkarussell, gefüllt mit Isopropanol,

schrittweise auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen in den Stickstofftank zur dauerhaften Lagerung überführt.

Die Zellen wurden wie unter 4.2.1.1 beschrieben aus einer Zellkulturflasche abgelöst, in eiskaltem Serum mit 10 % DMSO resuspendiert und in 1 mL Aliquots in einem Einfrierkarussell bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 72 h gelagert. Danach wurden die Zellen in den Stickstofftank für die Langzeitlagerung überführt.

4.2.1.4 Auftauen von GT1-7 Zellen

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Reaktionsgefäß kurz im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und die, noch gefrorenen, Zellen in 25 mL Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. 24 h nach diesem Vorgang wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, um das DMSO zu entfernen, und die Zellen bis zur gewünschten Konfluenz kultiviert.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

E. coli-Bakterien besitzen natürlicherweise keine Kompetenz, die für die Aufnahme von Plasmid-DNA und damit die Transformation notwendig ist. Durch die im Folgenden beschriebene Methode kann allerdings eine künstliche Kompetenz der Bakterien hergestellt werden. Die *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5 α werden nach einem Protokoll von Hanahan kompetent für die Aufnahme von Plasmid-DNA gemacht [Hanahan, 1983].

Nicht kompetente Bakterien wurden in 100 mL LB/K-Medium angeimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,4 - 0,5 im Bakterienschüttler bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend für 10 min bei $2000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sedimentiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in 20 mL eiskaltem FSP-Puffer resuspendiert. Die Bakterien wurden erneut zentrifugiert und in 4 mL FSP-Puffer mit 150 μL DMSO aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zugabe von 150 μL DMSO wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Material und Methoden

FSP-Puffer:

10 mM CaCl₂
3 mM Co(NH₃)₆Cl₃
10 mM KAc
100 mM KCl
45 mM MnCl₂
10 % Glycerin
pH 6,4

LB/K-Medium:

110 mM Glucose
20 mM MgSO₄
85,5 mM NaCl
0,5 % Hefeextrakt (w/v)
1 % Trypton/Pepton (w/v)

4.2.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Bakterien durch Hitzeschock

Die Transformation durch Hitzeschock wird dazu genutzt Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien einzubringen und anschließend zu amplifizieren. Durch den kurzen Hitzeschock wird die Membran der Bakterien kurzzeitig durchlässig für geladene Makromoleküle, so dass die Plasmid-DNA in die Zelle aufgenommen werden kann. Die Plasmid-DNA enthält zusätzlich ein Resistenzgen für ein Antibiotikum. Durch das Ausstreichen der transformierten Bakterien auf Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikumzusatz lassen sich die Bakterien selektieren, die erfolgreich transformiert wurden. Die ausgewählte Bakterienpopulation und mit ihr die zu amplifizierende Plasmid-DNA kann anschließend im Bakterieninkubator vermehrt werden.

Das zu transformierende Plasmid und 200 µL kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden mit ca. 5 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden für 90 s bei 42 °C und anschließend nochmals 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (50 µg/mL) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Ein Bakterienklon wurde von der Agarplatte isoliert und in 2 mL LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C und 1,25 × g im Bakterienschüttler inkubiert. Von dieser sogenannten Vorkultur wurden 250 µL abgenommen, in 250 mL LB-Medium überführt und erneut über Nacht bei 37 °C und 1,25 × g im Bakterienschüttler inkubiert.

LB-Medium:

85,5 mM NaCl
0,5 mM NaOH
1 % Trypton/Pepton (w/v)
0,5 % Hefeextrakt (w/v)

Agarplatten:

LB-Medium
1,5 % Agar-Agar (w/v)

4.2.2.3 Quantitative Isolierung von Plasmid-DNA

Die quantitative Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt durch Säulenchromatographie nach Angaben des Herstellers („Plasmid DNA purification-Kit“, Macherey-Nagel). Zunächst werden die Bakterien durch eine basische Lyse aufgeschlossen, filtriert und auf eine Anionenaustauschersäule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet an die Säulenmatrix über die Interaktion der negativ geladenen Plasmid-DNA mit der positiv geladenen Säule. Die Säule wird mit Puffern mit steigenden Salzkonzentrationen gewaschen um Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wird die Plasmid-DNA über eine pH-Veränderung eluiert und mit Isopropanol gefällt.

Die, wie unter 4.2.2.2 beschrieben, transformierten Bakterien wurden bei 4 °C durch Zentrifugation bei $6000 \times g$ für 10 min sedimentiert. Sie wurden in 8 mL RES-Puffer resuspendiert, durch Zugabe von 8 mL LYS-Puffer aufgeschlossen und anschließend mit 8 mL NEU-Puffer neutralisiert. Die Suspension wurde auf eine Säule mit Filter gegeben, die vorher mit 12 mL EQU-Puffer gewaschen wurde. Nach einer weiteren Spülung des Filtrats mit 5 mL EQU-Puffer wurde der Filter von der Säule entfernt. Anschließend wurde die Säule mit 8 mL WASH-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 5 mL ELU-Puffer eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 3,5 mL Isopropanol präzipitiert und bei $17000 \times g$ für 30 min bei RT zentrifugiert. Der Niederschlag wurde durch einmaliges Zentrifugieren bei $12000 \times g$ für 5 min erneut präzipitiert, mit 70 %-igem EtOH gewaschen und anschließend wurden Lösungsmittelrückstände bei 37 °C abgedampft. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen und sowohl die Reinheit als auch die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch bestimmt.

4.2.3 Zellbiologische Methoden

4.2.3.1 Bestimmung intrazellulärer Calcium-Ionen-Konzentrationen mittels Fura-2

Fura-2/AM ist ein Calciumchelator und ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Fluoreszenzeigenschaften sich durch die Bindung von Calcium-Ionen verändern. Er eignet sich daher für die Bestimmung semiquantitativer Veränderungen der Calcium-Ionen-Konzentration [Gryniewicz, 1985]. Fura-2/AM ist ein lipophiler Ester und leicht membrangängig. Durch das Verwenden von Pluronic-F127 wird die Zellmembran leicht

Material und Methoden

perforiert und die Aufnahme des Esters zusätzlich gesteigert. Im Zytosol der Zelle wird der Ester von endogenen Esterasen gespalten und das Fura-2 somit an der Rückdiffusion in den extrazellulären Raum gehindert. Damit ist man in der Lage, Agonisten-induzierte Veränderungen der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration zu bestimmen.

Bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm hat Fura-2 in Calcium-Ionen freier Umgebung bei 510 nm die maximale Emissionsintensität. Durch die Bindung von Calcium-Ionen verschiebt sich das Maximum zu einer Anregungswellenlänge von 340 nm. Bei steigenden Calcium-Ionen-Konzentrationen nimmt also die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm zu, während sie simultan bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm abnimmt. Durch Auftragen des Quotienten der Fluoreszenz von 340 nm zu 380 nm erhält man unabhängig von Mess- und Zelleigenschaften eine semiquantitative Messgröße für die Veränderung der zytoplasmatischen Calcium-Ionen-Konzentration.

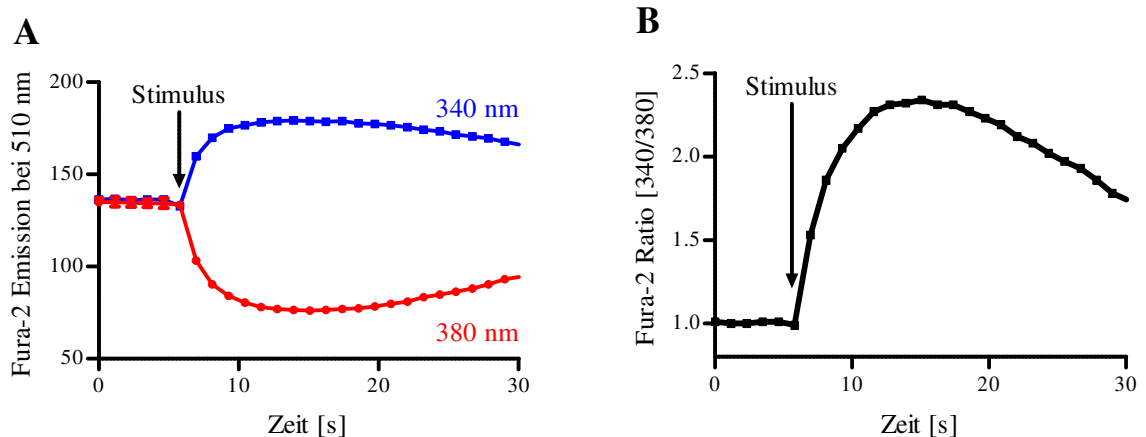


Abbildung 4.1: Exemplarische Fura-2 Graphen

A: Zunahme der Anregungseffizienz von Fura-2 bei 340 nm und Abnahme bei 380 nm durch Injektion eines Calcium-Ionen freisetzenden Stimulus nach 5 s. B: Darstellung der Daten aus A als Ratio von 340 nm zu 380 nm.

24 h vor der Messung wurden ca. 2 Mio. Zellen auf einer 100 mm Schale ausgesät und kultiviert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 mL der Fura-2/AM-Lösung beladen. Nach 30 min bei 37 °C wurde der Überstand wieder entfernt und die Zellen mit EDTA-haltigem PBS abgelöst. Nach Überführung der Suspension in 10 mL HBS-Puffer wurden die Zellen 5 min bei 850 × g zentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. Die Zellen wurden je nach Anzahl der Bedingungen in

Material und Methoden

1 - 2 mL HBS-Puffer resuspendiert. Vor jeder Messreihe wurden 80 μ L in eine 96-Loch-Platte pipettiert und die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors bei 340 nm und 380 nm für einen optimalen linearen Messbereich kalibriert. Durch das Gerät wurden automatisch 5 s nach Start der Messung 20 μ L der 5-fach konzentrierten Ligandenlösung injiziert.

Die Proben wurden über einen Gesamtzeitraum von 30 s, alle 1,14 s alternierend bei 340 nm und 380 nm angeregt und die Emission bei 510 nm in einem FLUOstar Omega gemessen. Aus den hieraus resultierenden Daten wurde der Quotient von 340 nm zu 380 nm gebildet. Der Mittelwert der ersten 5 s der Messung wurde als 100 % definiert und die so normierten Quotienten als Funktion der Zeit aufgetragen.

<u>HBS-Puffer:</u>	<u>Fura-2/AM-Lösung:</u>	<u>PBS-EDTA:</u>
2 mM CaCl ₂	10 μ M Fura-2/AM	2 mM EDTA
5,5 mM Glucose	0,02 % Pluronic F-127	2,5 mM KCl
10 mM HEPES	0,1 mg/mL BSA	1,5 mM KH ₂ PO ₄
5 mM KCl	in HBS-Puffer	140 mM NaCl
140 mM NaCl		8 mM Na ₂ HPO ₄
1 mM MgCl ₂		pH 7,4
pH 7,4		

4.2.3.2 cAMP-Akkumulationsversuch

Bei einem cAMP-Akkumulationsversuch lässt sich die Akkumulation von intrazellulärem cAMP über die Verstoffwechselung von tritium-markiertem Adenin nach einer Methode von Salomon bestimmen [Salomon, 1974]. Dazu werden die Zellen mit ³H-Adenin inkubiert, welches diese aufnehmen und zu ³H-ATP metabolisieren. AC in der Zelle katalysieren die Bildung von cAMP aus ATP und bauen somit das Tritium in den zu messenden Metaboliten ein. Um den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen zu verhindern, wird während der Stimulation dem Medium 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) zugesetzt, welches Phosphodiesterasen hemmt. Das akkumulierte ³H-cAMP wird anschließend doppelt säulenchromatographisch aufgereinigt. Dowex-Resin-Säulen separieren das cAMP von nicht metabolisiertem ATP und über Aluminiumoxidsäulen werden unerwünschte Nebenprodukte chromatographisch abgetrennt. Die Emission der Betastrahlung des tritium-markierten cAMPs der einzelnen Proben wird anschließend bestimmt.

Die GT1-7 Zellen wurden auf 12-Loch-Platten ausgesät und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen für 4 h mit der ^3H -Adenin-Lösung (1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit den entsprechenden Agonisten in IBMX-haltigem (1 mM), serumfreien DMEM für 30 min stimuliert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Reaktion mit 1 mL Trichloressigsäure (5 %) abgestoppt und die zytoplasmatische Zellfraktion extrahiert. Zum Isolieren des ^3H -cAMP wurde der Überstand auf Dowexsäulen, die zuvor mit 10 mL HCl (1 M) und 10 mL H_2O gewaschen wurden, gegeben. Die Säulen wurden dann erneut mit 4 mL H_2O gewaschen und das ^3H -cAMP mit 10 mL H_2O auf Aluminiumoxidsäulen, die mit 10 mL Imidazol (0,1 M) aktiviert wurden, eluiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 mL Imidazol (0,1 M) wurde das tritium-markierte cAMP mit Hilfe von 5 mL Imidazol (0,1 M) von den Säulen eluiert. Zur Detektion der Aktivität der einzelnen Proben wurden diese mit 12 mL Szintillationsflüssigkeit gemischt und die Betastrahlung mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers detektiert.

Das Gerät gibt die ^3H -cAMP-Aktivität in Zerfällen pro Minute an. Diese wurden in mBq umgerechnet und unter anderem logarithmisch gegen die Konzentration des jeweiligen Agonisten aufgetragen.

4.2.3.3 Vorbereitung der Proteinproben für die Gelelektrophorese

Um für die folgenden Versuche immer vergleichbare Proben zu generieren, wurden ca. 400000 GT1-7 Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät. Nur Proben von der gleichen Loch-Platte, und damit nahezu identische Proteinmengen, wurden in den weiteren Versuchen direkt miteinander verglichen. So konnten unspezifische Artefakte durch unterschiedliche Proteinmengen oder andere Faktoren minimiert werden.

Serumentzug für 20 h

24 h nach dem Aussäen wurden die Zellen mit 2 mL serumfreiem DMEM gewaschen und anschließend für weitere 20 h in serumfreiem DMEM kultiviert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden mit 900 μL frischem, serumfreiem DMEM mit oder ohne Inhibitor für die angegebene Zeit vorinkubiert (siehe Tabelle 4.1). Danach wurden 100 μL der Agonistenlösung mit dem 10-fachen der gewünschten finalen Konzentration für die angegebene Zeit zugegeben.

Material und Methoden

Ohne Serumentzug

24 h nach dem Aussäen wurde pro Kavität 1 mL des Mediums abgenommen und in dieser Lösung der entsprechende Inhibitor angesetzt. Das verbleibende Medium wurde abgesaugt und der Inhibitor in dem zuvor abgenommenen Medium für die angegebene Zeit (siehe Tabelle 4.1) auf die Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mit 2 mL Medium ohne Serum gewaschen und der Agonist in An- oder Abwesenheit des entsprechenden Inhibitors für die angegebene Zeit in Medium ohne Serum auf die Zellen gegeben.

Unabhängig von der Vorbehandlung der Zellen, wurde zum Abstoppen der Reaktion die Platte auf Eis gestellt, der Überstand abgesaugt, die Zellen mit 1 mL eiskaltem PBS gewaschen und in 100 μ L Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden für ca. 15 s sonifiziert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Inhibitoren. Die GT1-7 Zellen wurden für die angegebene Zeit und mit der entsprechenden Konzentration des Inhibitors vorinkubiert und anschließend mit α -MSH in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors stimuliert.

Tabelle 4.1: Überblick über die verwendeten Inhibitoren

Inhibitor	Zielstruktur	Konzentration	Inkubation	LM	Abk.	Farbcode
PD98059	MEK	50 μ M	20 min	DMSO	PD98	gelb
U0126	MEK	10 μ M	20 min	DMSO	-	orange
PD184352	MEK	10 μ M	20 min	DMSO	PD18	rot
BIM-X	PKC	1 μ M	30 min	DMSO	BIM	braun
Gö-6983	PKC	1 μ M	30 min	DMSO	Gö	grau
PTX	G _i	1 μ g/mL	20 h	-	-	grün
Gallein	β/γ	10 μ M	30 min	DMSO	-	dunkelgrün
LY294002	PI3K	20 μ M	30 min	DMSO	LY	mint
Rp-cAMPs	PKA	50 μ M	10 min	H ₂ O	-	lila
KT5720	PKA	5 μ M	10 min	DMSO	-	blau
Oxozaenol	TAK1	250 nM	30 min	DMSO	Oxo	rosa
STO609	CaMKK	5 μ M	30 min	DMSO	STO	bordeaux
Radicol	LKB1	10 μ M	20 h	EtOH	Radi	hellblau

Laemmli-Puffer:

0,025 % Bromphenolblau (w/v)

5 % Glycerin

1 % SDS (w/v)

15 mM TRIS

1,25 % β -Mercaptoethanol (w/v)

pH 6,8

4.2.3.4 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese lassen sich Proteine in einem Polyacrylamidgel durch Anlegen eines elektrischen Feldes nach ihrer Größe auftrennen. Bei einer „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ (SDS-Page) werden die Proben nach der Methode von Laemmli aufbereitet und anschließend auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen [Laemmli, 1970]. Die Proben werden mit dem anionischen Detergenz SDS im Überschuss versetzt, welches die Eigenladung der Proteine vollständig überdeckt, so dass diese anschließend negativ geladen sind. Zusätzlich werden die Proteine durch SDS und das reduzierende β -Mercaptoethanol denaturiert, so dass Polypeptide mit konstanten Ladungsdichten entstehen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der anionischen Proteine ist dann nur noch von ihrem Molekulargewicht abhängig. Nachdem die Proben auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wurden, werden sie durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Bei einem diskontinuierlichen Gel besteht das Gel aus zwei Komponenten. Im Sammelgel werden durch eine Kombination von erhöhter Porengröße, Puffer-Konzentration und pH im Vergleich zum Trenngel die Proteine in einem kleinen Volumen konzentriert, bevor sie im Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch die Variation des Polyacrylamidanteils im Trenngel lässt sich die Porengröße des Gels und somit die Trenneffizienz variieren.

Die vorbereiteten Proben (siehe 4.2.3.3) wurden bei 95 °C für 5 min aufgeköcht und bei 17000 \times g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 25 μ L der jeweiligen Probe auf ein Polyacrylamidgel (8 - 10 %) aufgetragen und getrennt.

Material und Methoden

<u>Sammelgel-Lösung:</u>	<u>Trenngel-Lösung:</u>	<u>SDS-Laufpuffer:</u>
125 mM TRIS	375 mM TRIS	2,5 mM TRIS
0,1 % SDS (w/v)	0,1 % SDS	0,01 % SDS (w/v)
4 % Rotiphorese Gel 30	8 - 10 % Rotiphorese Gel 30	19 mM Glycin
100 µL APS (10 %)	100 µL APS (10 %)	
20 µL TEMED	20 µL TEMED	
pH 6,8	pH 8,8	

4.2.3.5 Western Blot

Bei einem Western Blot werden die vorher im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran nach einer Methode von Towbin transferiert [Towbin, 1979]. Dabei wird senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld angelegt, und die negativ geladenen Proteine wandern auf eine Nitrozellulose-Membran. Die Proteine sind anschließend fest an die Membranmatrix gebunden und in einer SDS-freien Umgebung für weitere Nachweismethoden gut zugänglich. Durch ein reversibles Anfärben der Membran mit Ponceau-S werden unspezifisch Proteine angefärbt, um die Effizienz des Transfers zu überprüfen. Nach dem Entfärben werden freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran mit Milchpulver blockiert. Anschließend wird die Membran mit einem Protein- oder Phosphorylierungs-spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper inkubiert, um die einzelnen Proteine und ihr Phosphorylierungsstatus durch die Antigen-Antikörper-Reaktion zu detektieren. Dieser wird dann mit einem Sekundärantikörper nachgewiesen, der an die Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von Luminol zu seiner oxidierten Form unter H_2O_2 -Verbrauch, wobei Lumineszenz entsteht und nachgewiesen werden kann. Über die Intensität der Lumineszenz kann dann die Expression, beziehungsweise der Phosphorylierungsstatus eines Proteins quantifiziert werden.

Das Polyacrylamidgel der Gelelektrophorese wurde wie folgt zwischen verschiedenen getränkte Filterpapiere gelegt: Auf die Anode wurden zunächst sechs Filterpapiere (Anode I-Puffer) gelegt, dann drei weitere Filterpapiere (Anode II-Puffer) und darauf die Nitrozellulose-Membran. Auf die Membran wurde das Polyacrylamidgel gelegt, gefolgt von neun Filterpapieren (Kathoden-Puffer) und als Abschluss die Kathode. Anschließend wurde für 3 h eine Stromstärke von $0,8 \text{ mA pro cm}^2$ angelegt und nach dem Transfer die Membran mit Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt.

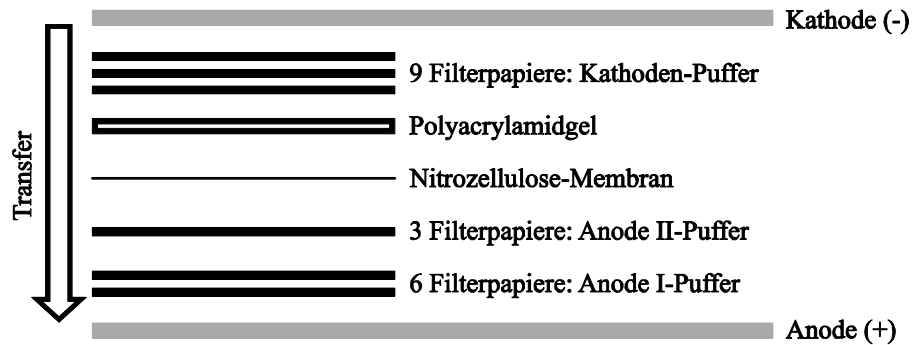


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Transfersystems

Bei dem angewendeten Transfervorgang wird ein spezielles, diskontinuierliches Blot System verwendet. Dabei werden das Polyacrylamidgel und die Nitrozellulose-Membran wie dargestellt zwischen puffergetränkte Filterpapiere gelegt und so eine leitende Schicht zwischen den Elektroden hergestellt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose-Membran.

Teilweise wurde die Membran horizontal zerteilt, um simultan mehrere Proteine mit verschiedenem Molekulargewicht zu detektieren. Nach Entfärben des Gels durch Waschen mit TBST wurden unspezifische Bindungsstellen mit 5 % Milchpulver blockiert und nach einem erneuten Waschschriff mit dem entsprechenden Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für 10 min wurde der entsprechende Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert und nach erneutem Waschen das konjugierte Enzym mittels Chemilumineszenz-Detektion nachgewiesen. Als Substrat wurden die Lösungen S1 und S2 in einem Verhältnis von 1:1 angesetzt, auf die Membran gegeben und kurz inkubiert. Durch eine drastische pH-Veränderung mit Stripp-Puffer wurden die Antikörper in einigen Fällen wieder von der Membran abgelöst, diese mit einem anderen Primärantikörper erneut behandelt und die Chemilumineszenz-Detektiert. Der Chemilumineszenz-Nachweis erfolgte mit einem Chemi-Smart 5000. Dieser misst die erzeugten Lichtsignale über eine hochauflösende Kamera. Die Chemilumineszenz-Intensität wird linear in elektrische Signale umwandelt und das Ergebnis als digitale Graustufenabbildung dargestellt.

Um die Aktivierung der ERK-1/2 in GT1-7 Zellen zu messen wurden zwei spezifische Antikörper im Immunblot verwendet. Zum einen der ERK-2 Antikörper, der gegen den C-Terminus von ERK-2 gerichtet ist. Dieser erkannte auch den C-Terminus der eng verwandten ERK-1, allerdings weniger sensitiv, wodurch ein schwaches Doppelbandenmuster entstand. Zum anderen wurde ein phosphospezifischer Antikörper verwendet, der sowohl ERK-1 als auch ERK-2 erkennt, wenn diese an Tyrosin 204 beziehungsweise Tyrosin 187 phosphoryliert sind. Daher ergab sich auch für diesen

Antikörper das spezifische Doppelbandenmuster mit einer höheren Bande bei 44 kDa für ERK-1 und einer niedrigeren bei 42 kDa für ERK-2. Eine Phosphorylierung an den Positionen Threonin 202 und Tyrosin 204 beziehungsweise Threonin 185 und Tyrosin 187 führen zu einer gesteigerten Aktivität der Kinase, die dann ihrerseits Serine und Threonine nachgeschalteter Zielstrukturen phosphorylieren kann [Anderson, 1990]. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sind für eine bessere Verständlichkeit Immunoblots nur mit „p-ERK“ für die phosphorylierte Form der ERK-1, beziehungsweise ERK-2 an Tyrosin 204 beziehungsweise Tyrosin 187 gekennzeichnet, oder mit „ERK“ für die totale Expression der beiden Proteine ERK-1 und ERK-2. Bei der densitometrischen Auswertung der Immunoblots wurde jeweils nur die untere 42 kDa Bande der phosphorylierten Form der ERK-2 an Tyrosin 187 quantifiziert. Um die Regulation der AMPK in GT1-7 Zellen genauer zu untersuchen wurde ein Antikörper eingesetzt, der die α -Untereinheit des heterotrimeren Proteins nur dann erkennt, wenn dieses an Threonin 172 phosphoryliert ist. Diese Phosphorylierungsstelle ist entscheidend für die Aktivität der AMPK und die Phosphorylierung an dieser Position ist ein Maß für die Kinase-Aktivität [Hawley, 1996]. Der phosphospezifische Antikörper produzierte im Immunoblot eine einzelne immunreaktive Bande bei ca. 60 - 70 kDa, was der, anhand der Aminosäurefolge, berechneten Größe der α -Untereinheit der AMPK entsprach. Des Weiteren wurde ein Antikörper gegen die LKB1 verwendet, der das totale Protein unabhängig von seinem Phosphorylierungsstatus erkannte. Auf dem Immunoblot war eine einzelne Bande bei ca. 62 kDa detektierbar, was der Größe der LKB1 entsprach.

Die Immunoblots wurden wie folgt densitometrisch ausgewertet. Das Graustufenbild aus dem Chemi-Smart 5000 wurde mit dem Programm Image J geöffnet, das Bild invertiert und der Hintergrund automatisch subtrahiert. Die einzelnen Proteinspuren wurden mit Rechtecken markiert, die horizontal arretiert sind. Das Programm stellte dann die Schwarzfärbung der einzelnen Bande gegen die definierte Strecke (Höhe des roten Rechtecks) graphisch dar. Durch Integrieren erhielt man die kumulative Intensität der immunreaktiven Banden bei einer bestimmten Größe (siehe Abbildung 4.3). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde das rote Rechteck auf 79×40 Pixel normiert, um für alle immunreaktiven Banden eine standardisierte Auswertung zu generieren. Damit wird nur die Fläche zwischen den blauen Balken quantifiziert und anschließend auf den Basalwert normiert.

Material und Methoden

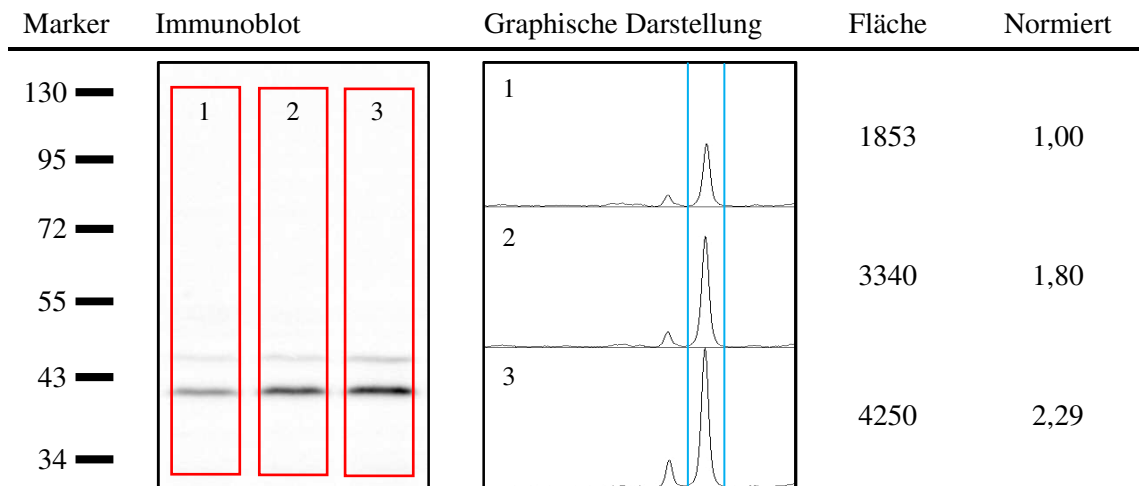


Abbildung 4.3: Densitometrische Auswertung eines Immunoblots

Theoretische Auswertung eines Immunoblots mit dem p-ERK Antikörper. Die einzelnen Proteinspuren werden markiert und die Schwarzfärbung der Banden gegen die vorgegebene Strecke (Höhe des roten Rechtecks) graphisch dargestellt. Die Fläche unter der Kurve ergibt die kumulative Intensität der immunreaktiven Banden bei einer bestimmten Größe. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde nur die 42 kDa p-ERK Bande densitometrisch ausgewertet und das rote Rechteck auf 79×40 Pixel reduziert und somit nur die Fläche zwischen den blauen Balken quantifiziert.

Die Rohdaten der densitometrischen Auswertung wurden auf den jeweiligen Basalwert, der als 1 gesetzt wurde, normiert (X-fach von basal). Bei der Liganden-induzierten Regulation wurde der Basalwert der jeweiligen Bedingung als 100 % definiert und die α -MSH-induzierten Effekte in Relation zum korrespondierenden Basalwert bestimmt (siehe Abbildung 4.4). Dabei spiegeln positive Werte eine Phosphorylierung des entsprechenden Proteins wieder, während negative Werte einer Dephosphorylierung entsprechen.

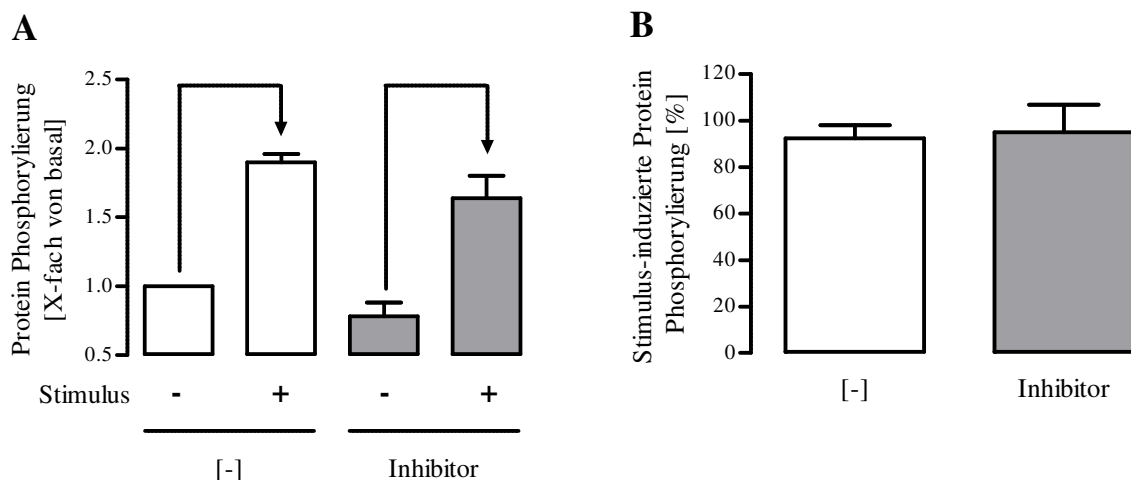


Abbildung 4.4: Graphische Auswertung von Immunoblots

Material und Methoden

Die Proteinbanden von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet. A: Der Basalwert des jeweiligen Experimentes wurde als 1 definiert und alle anderen Werte darauf bezogen. B: Die jeweilige Bedingung ohne Stimulus wurde als 100 % definiert und die Stimulus-induzierten Effekte auf den korrespondierenden Basalwert bestimmt. Positive Werte zeigen eine Phosphorylierung des entsprechenden Proteins an, negative eine Dephosphorylierung.

<u>Ponceau-S-Lösung:</u>	<u>Anode I-Puffer:</u>	<u>Anode II-Puffer:</u>	<u>Kathoden-Puffer:</u>
0,1 % Ponceau-S	0,3 M TRIS	25 mM TRIS	40 mM 6-Aminohexansäure
5 % Essigsäure	20 % MeOH	20 % MeOH	20 % MeOH
pH 10,4	pH 10,4	pH 10,4	pH 7,6
<u>TBST:</u>	<u>Stripp-Puffer:</u>	<u>S1-Lösung:</u>	<u>S2-Lösung:</u>
10 mM TRIS	100 mM Glycin	0,1 M TRIS	0,1 M TRIS
150 mM NaCl	pH 2,0	0,02 % H ₂ O ₂	250 µM Luminol
0,05 % Tween		pH 8,5	400 µM 4-hydroxy-Zimtsäure
pH 7,4			pH 8,5

4.2.3.6 Reporter-gen-Studien

Bei Reporter-gen-Studien kann man die Aktivität eines Gens über die Expression der Firefly (*Photinus pyralis*) Luziferase bestimmen [Bronstein, 1994]. Dabei wird ein Promoter, ein DNA-Abschnitt, der die Binderegion für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren beinhaltet, mit dem Gen der Firefly Luziferase kombiniert und in die Zelle transfiziert. Bindet ein Transkriptionsfaktor an die spezifische DNA-Sequenz („response-element“) des Promoters, wird die Transkription der nachgeschalteten Firefly Luziferase initiiert. Somit lassen sich die Aktivierung des „response-element“ und damit die Genregulation anhand der Aktivität der Firefly Luziferase nachweisen. Die Luziferase katalysiert die Oxidation ihres Substrats Luziferin mit gleichzeitiger Photonenfreisetzung. Diese können in einem Luminometer quantitativ nachgewiesen werden. Bei dem „cAMP-response element“ (CRE)-Konstrukt liegt das CRE-Element in sechs Repetitionen vor und das Luziferase-Gen ist somit unter Kontrolle eines Promoters, der die Transkription induziert, wenn er durch das „cAMP-response element binding protein“ (CREB) gebunden wird [Himmler, 1993]. Bei dem in 5-facher Ausführung vorliegenden SRE-Konstrukt wird der Promoter durch die Bindung des Heterodimers aus dem „serum response factor“ (SRF) und einem „ternary complex factor“ (TCF) aktiviert [Muehlich, 2008; Knoll, 2009].

GT1-7 Zellen wurden auf 100 mm Schalen ausgesät und nach 24 h mit 2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen auf 12-Loch-Platten passagiert und nach weiteren 6 h für 20 h gehungert. Danach wurden die Zellen mit den angegebenen Agonisten in serumfreiem DMEM für 6 h stimuliert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL Lysis-Puffer gestoppt und jeweils 80 µL der Suspension in eine 96-Loch-Platte überführt. Die Lumineszenzreaktion der Firefly Luziferase wurde durch Injektion von 20 µL Luziferase-Substrat (Promega, Mannheim) initiiert.

Die Lumineszenz wurde über einen Zeitraum von 10 s in einem FLUOstar Omega detektiert. Der Scheitelpunkt der Lumineszenzintensität wurde für die Quantifizierung der Signalstärke genutzt. Der Basalwert wurde als 100 % definiert und alle anderen Werte in Relation dazu angegeben.

Lysis-Puffer:

1 mM DTT

4 mM EGTA

8 mM MgCl₂

25 mM TRIS

1 % Triton X-100

pH 7,4

4.2.3.7 Elektroporation von siRNAs

Mit Hilfe von siRNAs ist es möglich, gezielt die Translation von Proteinen über die Zerstörung der entsprechenden „messenger RNA“ (mRNA) in einer Zelle zu unterbinden [Fire, 1998]. siRNAs sind kurze doppelsträngige RNA-Segmente mit einer Länge von 21 - 23 Nukleotiden mit je zwei ungepaarten Basen am 3'-Ende. Nach Transfektion in die Zelle bindet die doppelsträngige siRNA im Zytoplasma an den „RNA induced silencing complex“ (RISC), indem es mit Argonautenproteinen interagiert. Diese spalten die siRNA in einen Einzelstrang, der somit den Komplementärstrang zu der mRNA des Zielproteins darstellt. Die mRNA bindet über Basenpaarung an den siRNA Einzelstrang und induziert somit die Ribonuklease-Aktivität des RISC. Die mRNA wird zerschnitten und das zu codierende Protein kann nicht mehr translatiert werden. Somit kann gezielt die Expression einzelner Proteine in der Zelle vermindert werden, mit einem minimalen Risiko von unspezifischen Neben-

effekten. Als Negativkontrolle dient eine siRNA, deren Sequenz natürlicherweise nicht im Genom vorkommt und daher keine Effekte auf die mRNA der Zelle haben sollte.

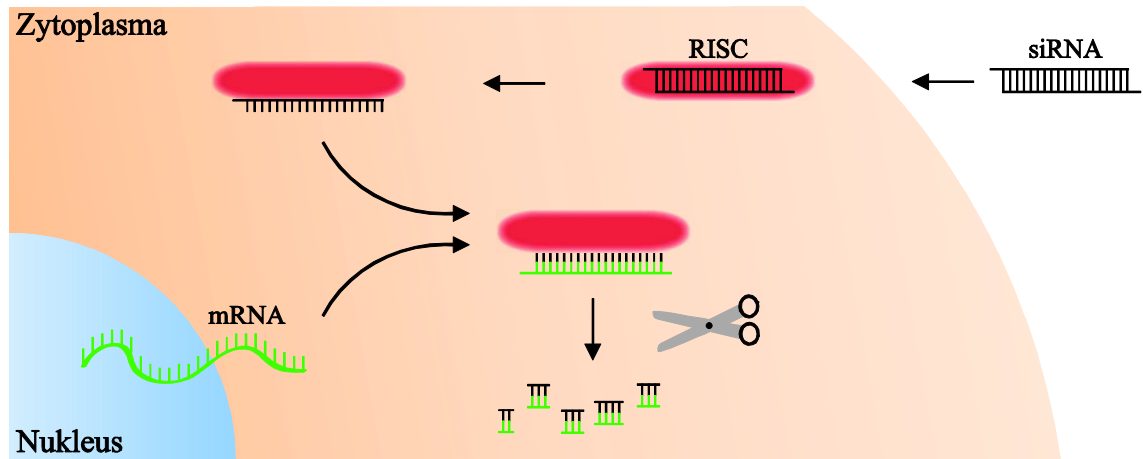


Abbildung 4.5: Funktionsweise einer siRNA

Schematische Darstellung der Funktionsweise einer siRNA in einer Säugerzelle. Die siRNA (schwarz) wird in die Zelle aufgenommen und bindet an den RISC (rot). Dieser spaltet die siRNA in einen Einzelstrang, der so dann den Komplementärstrang zu der Ziel-mRNA (grün) darstellt. Die so gebundene mRNA induziert die Ribonukleaseaktivität des RISC und wird zerschnitten, so dass das entsprechende Protein nicht mehr translatiert werden kann.

Entscheidend für die Wirksamkeit der siRNA ist die Transfektionseffizienz, mit der diese in die Zelle gebracht wird. Nur wenn ausreichend siRNA in die Zelle gelangt, kann die Proteinexpression signifikant vermindert werden. Lipophile Transfektionsreagenzien wie zum Beispiel TurboFect (siehe 4.2.1.2) sind schonende Methoden, um siRNA in die Zelle zu bringen, allerdings ist die Transfektionseffizienz eher gering. Eine andere Möglichkeit der Transfektion bietet die Elektroporation, bei der durch Anlegen eines externen elektrischen Feldes kurzzeitig die Zellmembran permeabilisiert und somit die Diffusion von siRNA in das Zellinnere ermöglicht wird [Neumann, 1982]. Das Neon[®]-Elektroporationssystem der Firma Invitrogen bietet die Möglichkeit, auch schwer transfizierbare Zellen mit hoher Effizienz und hoher Zellvitalität zu transfizieren [Kim, 2008]. Dabei wird das elektrische Feld direkt in einer goldummantelten Pipettenspitze angelegt, die gleichzeitig als Pipette und Elektrode fungiert. Nachdem die Zellen mit der zu transfizierenden siRNA in die Pipette aufgezogen wurden, wird diese in eine Reaktionskammer mit Elektrolyt-Puffer eingespannt und über eine Steuereinheit die gewünschten Parameter (elektrische Spannung, Anzahl und Dauer des Pulses) eingestellt. Nach erfolgter Elektroporation können die transfizierten Zellen auf die gewünschten Kavitäten einer Loch-Platte für

den folgenden Versuch ausgesät werden. Die Elektroporation ist deutlich kostenintensiver, hat aber dafür den Vorteil einer hohen Transfektionseffizienz mit hoher Zellvitalität. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die siRNA unterbindet die Proteinbiosynthese vor der Translation der mRNA, so dass das Protein nicht mehr gebildet werden kann. Es muss daher der optimale Zeitpunkt gefunden werden, an dem die siRNA ihre maximale Effizienz hat, aber noch vorhandenes Protein in der Zelle bereits abgebaut ist. Beide Faktoren hängen stark vom Zelltyp und dem zu untersuchenden Zielprotein ab. In HEK-293 hat die LKB1 zum Beispiel eine Halbwertszeit von 12 h, in HeLa Zellen dagegen nur von 2 h [Boudeau, 2003].

GT1-7 Zellen wurden, wie unter 4.2.1.1 beschrieben, von der Zellkulturflasche gelöst und nach dem Zentrifugieren mittels einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Die für den Versuchsansatz benötigte Zellzahl wurde in dem Resuspensionspuffer R aufgenommen und die entsprechende Konzentration an siRNA zugegeben. 100 µL der Zellsuspension (500000 Zellen) wurden dann bei 1450 V für 30 ms mit einem Puls elektroporiert und auf jeweils eine Kavität einer 6-Loch-Platte gegeben. Die Zellen wurden für verschiedene Zeitspannen im Medium ohne Antibiotika kultiviert und anschließend für 20 h auf Serumentzug gesetzt. Danach wurden die Zellen, wie unter 4.2.3.3 beschrieben, für die Gelelektrophorese vorbereitet und die Effektivität der siRNA auf Proteinebene bestimmt.

4.2.3.8 PepChip Kinase-Array

Der PepChip Kinase-Aktivitäts-Array der Firma Pepscan Systems bietet die Möglichkeit den Aktivitätszustand verschiedener Kinasen über den Phosphorylierungsstatus ihrer Zielsequenzen nachzuweisen.

Aus stimulierten oder nicht stimulierten Ganzzelllysaten können über eine native Proteinextraktion alle, im verwendeten Puffer aktiven, Kinasen solubilisiert werden. Durch die Extraktion bei 4 °C bleiben die Kinasen bis zum Kontakt mit dem Array in ihrem jeweiligen Aktivitätszustand arretiert, so dass veränderte Kinaseaktivitäten auf den vorhergehenden Stimulus zurückgeführt werden können. Bei der anschließenden Inkubation bei 37 °C haben die meisten Kinasen ein Aktivitätsoptimum, das heißt eine maximale Phosphorylierungsrate. Die solubilisierten Kinasen werden anschließend mit

Material und Methoden

radioaktivem ATP vereint und auf einem speziellen Objektträger inkubiert. Auf dem Objektträger sind verschiedene Peptidsequenzen angebracht, die Konsensussequenzen verschiedener Kinasen entsprechen. Die Phosphorylierung dieser Peptidsequenzen durch die vorher extrahierten Kinasen wird mittels ATP bestimmt an dem der terminale Phosphatrest mit ^{33}P markiert ist. Bietet man den Kinasen dieses ATP an, phosphorylieren sie Peptidsequenzen auf dem Objektträger mit dem Isotop, bei denen adäquate Akzeptoraminosäuren, Serine, Threonine oder Tyrosine, innerhalb einer, für die jeweilige Kinase, spezifischen Kennsequenz vorliegen. Somit können sowohl die durch Agonisten aktivierten Kinasen, als auch deren Substrate, über die spezifischen Peptidsequenzen auf dem Objektträger, identifiziert werden. Die Beta-Strahlung der einzelnen Spots kann anschließend semiquantitativ bestimmt werden.

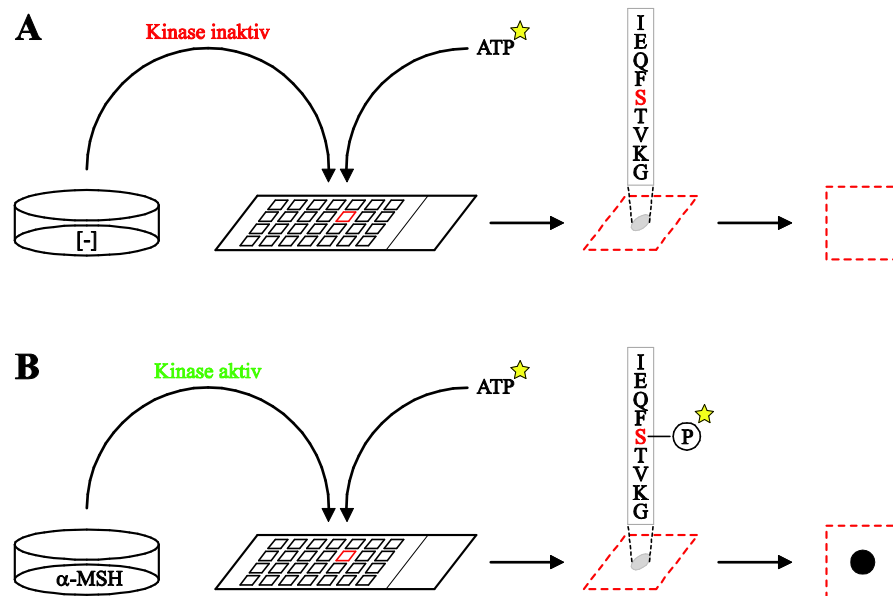


Abbildung 4.6: Kinase-Aktivitäts-Array

Aus A: unstimulierten oder B: stimulierten Ganzzelllysaten werden verschiedene Kinasen extrahiert und zusammen mit ^{33}P markiertem ATP auf einem Objektträger inkubiert. Auf dem Objektträger befinden sich verschiedene Peptidsequenzen, die Konsensussequenzen unterschiedlicher Kinasen entsprechen. Die Agonisten-aktivierte Kinase überträgt den terminalen Phosphatrest des ATP auf die immobilisierte Peptidsequenz. Der Phosphorylierungsstatus der einzelnen Peptidsequenzen kann anschließend über die Beta-Strahlung des ^{33}P -Phosphatrestes quantifiziert werden.

Auf einem Objektträger der Firma Pepsan Systems sind 1176 Peptide, bestehend aus 4 - 12 Aminosäuren, immobilisiert. Diese sind in Duplikaten in 4×6 Subquadranten mit je 7×7 Spots auf dem Objektträger verteilt (siehe Abbildung 4.7). Die unterschiedlichen Peptidsequenzen wurden von der Firma aus einer Datenbank (PhosphoBase) für Phosphorylierungsstellen ausgewählt [Kreegipuu, 1999]. Mit den

Objektträgern liefert der Hersteller eine Liste mit den folgenden Informationen: Die Position der Peptidsequenz auf dem Objektträger, die Aminosäureabfolge, das Zielprotein, aus dem die Sequenz stammt, und die Kinase, die das Peptid phosphoryliert. Zusätzlich wird die Position der Phosphorylierungsstelle im Zielprotein angegeben und eine eventuelle Abwandlungen der Sequenz im Vergleich zum Originalprotein. Theoretisch ist es also möglich, komplette Signaltransduktionskaskaden mit Hilfe von PepChips zu identifizieren. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

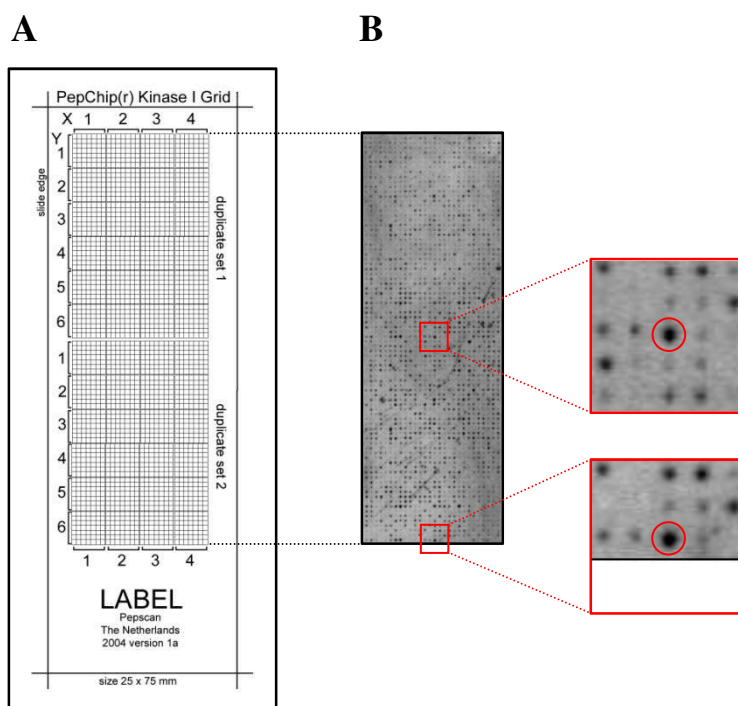


Abbildung 4.7: PepChip

A: Theoretische Anordnung der 1176 Peptide in Duplikaten auf einem PepChip in Originalgröße. B: Originalbild eines PepChip und Vergrößerung von Punkt 15/42, der als Referenzpunkt als 100 % definiert wurde.

GT1-7 Zellen wurden auf 100 mm Schalen ausgesät und das Experiment bei einer Konfluenz von 90 % durchgeführt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 3 mL Stimulationslösung für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 mL eiskaltem PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden durch Zugabe von 400 µL Lysis-Puffer (M-PER, Pierce) lysiert und mit einem Zellschaber vollständig abgelöst. Das Lysat wurde resuspendiert, durch Vibration durchmischt und 5 min auf Eis inkubiert, bevor es erneut

Material und Methoden

durch Vibration homogenisiert wurde. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei $21000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. $70\text{ }\mu\text{L}$ des Überstandes wurden mit $10\text{ }\mu\text{L}$ Aktivierungslösung durch Invertieren gemischt und erneut bei RT für 10 min und $17000 \times g$ zentrifugiert. Danach wurden $70\text{ }\mu\text{L}$ der Lösung auf den PepChip Kinase-Array gegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Der Objektträger wurde für 2 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas durch Eintauchen des Objektträgers in Wasch-Puffer 1 entfernt. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min mit Wasch-Puffer 1 und 2 wurde der Objektträger dreimal mit H_2O abgespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Anschließend wurde der Objektträger auf einen Phosphor-Screen gelegt und für 24 - 72 h exponiert.

Die Entwicklung erfolgte in einem PhosphorImager mit einer Auflösung von $50\text{ }\mu\text{m}$ pro Pixel. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ScanAlyze. Dabei wurden die Intensitäten der einzelnen Punkte bestimmt und der jeweilige Hintergrund in einem Radius von fünf Pixeln subtrahiert. Die so ermittelten Punktintensitäten aller PepChips wurden anschließend auf Punkt 15/42 des jeweiligen Duplikates normiert. Bei allen drei Ansätzen ist der Punkt stark ausgeprägt und die Rohdaten liefern nahezu identische Werte. Daher wurde der Punkt als 100 % definiert und die restlichen Werte wurden in Relation dazu gesetzt. Die Peptidsequenz KKRFSFKKS an diesem Punkt ist eine Sequenz aus dem „myristoylated alanine-rich C kinase substrate“ (MARCKS), einem spezifischem PKC Substrat, das bei der α -MSH-induzierten Signalkaskade keine entscheidende Rolle spielen sollte [Aderem, 1992]. Nach der densitometrischen Auswertung mit ScanAlyze wurden die Daten in Prism 5.0 graphisch dargestellt.

Aktivierungs-Lösung:

5 mM DTT
50 % Glycerin
50 mM MgCl_2
50 mM MnCl_2
250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PEG 8000
250 mg/mL BSA
20 μCi γ - ^{33}ATP

Wasch-Puffer 1:

PBS
1 % Triton X-100

Wasch-Puffer 2:

2 M NaCl
1 % Triton X-100

4.2.4 Statistische Methoden

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel 2007 (Microsoft) und Prism 5.0 (GraphPad). Die Auswertung der PepChips erfolgte mit dem Programm ScanAlyze (Stanford University). Die densitometrische Quantifizierung der Immunoblots wurde mit dem Programm Image J (National Institutes of Health) vorgenommen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M) angegeben. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden als signifikant angesehen, wenn sie im ungepaarten, zweiseitigen „student´s t-test“ einen p -Wert von weniger als 0,05 erhielten. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde zuerst eine einfaktorielle Varianzanalyse („analysis of variance“ (ANOVA)) durchgeführt und anschließend ein Post-Hoc Signifikanztest nach Tukey durchgeführt. Unterschiede mit einem p -Wert kleiner als 0,05 wurden mit * gekennzeichnet, mit einem p -Wert kleiner als 0,01 mit ** und Unterschiede mit einem p -Wert kleiner als 0,001 mit ***.

5 Ergebnisse

5.1 Funktioneller Nachweis des MC4R in GT1-7 Zellen

GT1-7 Zellen sind immortalisierte, murine, hypothalamische Zellen, in denen verschiedenen Arbeitsgruppen die MC4R Expression bereits nachgewiesen haben [Mellon, 1990; Khong, 2001; Chai, 2006]. In einem ersten Schritt sollten die hier verwendeten GT1-7 Zellen in Bezug auf ihre MC4R Expression genauer charakterisiert werden. Eine Aktivierung des MC4R führt über G_s -Proteine zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration und kann daher über einen cAMP-Akkumulationsversuch nachgewiesen werden [Gantz, 1993b]. Dafür wurden die GT1-7 Zellen sowohl mit dem MC4R Agonisten α -MSH als auch mit dem MC4R Antagonisten AgRP stimuliert [Gantz, 1993b; Fong, 1997]. Zusätzlich wurden die Zellen mit FSK stimuliert, einem G-Protein-unabhängigen AC-Aktivator, der als Positivkontrolle für den Versuchsaufbau diente.

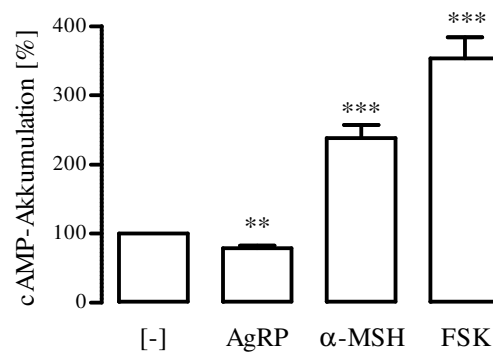


Abbildung 5.1: cAMP-Akkumulation in GT1-7 Zellen durch verschiedene Stimuli

GT1-7 Zellen wurden für vier Stunden mit tritium-markierten Adenin inkubiert, anschließend für 30 min mit AgRP (100 nM), α -MSH (1 μ M) oder FSK (1 μ M) stimuliert und das metabolisierte cAMP nach säulenchromatographischer Aufreinigung bestimmt. Der Basalwert des jeweiligen Experimentes wurde als 100 % definiert und die restlichen Werte in Relation dazu dargestellt.

Zwei unterschiedliche MC4R-Liganden waren in der Lage die cAMP-Akkumulation in GT1-7 Zellen zu beeinflussen. AgRP verringerte die basale cAMP-Produktion auf 78 %, während α -MSH zu einer Erhöhung der cAMP-Akkumulation auf 238 % führte. Die Positivkontrolle FSK führte ebenfalls zu einer Steigerung der cAMP-Akkumulation auf 353 %.

Ergebnisse

In GT1-7 Zellen konnte von Khong et al. nicht nur der MC4R, sondern auch der MC3R auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden [Khong, 2001]. Um zu untersuchen, ob die α -MSH-vermittelte cAMP-Akkumulation durch die Aktivierung des MC3R oder des MC4R verursacht wurde, wurden mit den drei bekannten Melanocortinen Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Da der MC3R ein anderes Bindungsprofil der drei Agonisten als der MC4R besitzt, sollte sich bei simultaner Expression dieses in den Konzentrations-Wirkungs-Kurve widerspiegeln (siehe Tabelle 3.2). Am stärksten ausgeprägt ist der Unterschied für γ -MSH, der einen 50-fach höheren EC_{50} -Wert für den MC4R als für den MC3R aufweist [MacNeil, 2002].

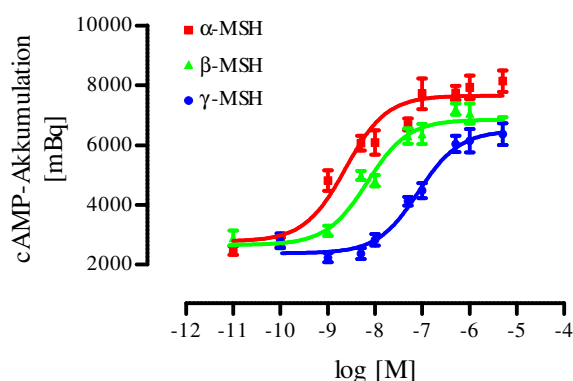


Abbildung 5.2: Konzentrations-Wirkungs-Kurven verschiedener Melanocortine

GT1-7 Zellen wurden für vier Stunden mit tritium-markierten Adenin inkubiert, anschließend für 30 min mit den angegebenen Konzentration von α -, β - oder γ -MSH stimuliert und das metabolisierte cAMP nach säulenchromatographischer Aufreinigung bestimmt.

Alle drei Melanocortine führten konzentrationsabhängig zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Produktion. Durch das logarithmische Auftragen der Konzentration ergaben sich für alle drei Liganden sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Aus den Kurven ergab sich die folgende Potenzrelation der drei Melanocortine: $\alpha \approx \beta > \gamma$. Die pharmakologischen Parameter (siehe Tabelle 5.1) der einzelnen Agonisten stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Werten für den MC4R überein [Schiøth, 2005; Cone, 2006].

Tabelle 5.1: Pharmakologische Parameter der verschiedenen Agonisten

	α -MSH	β -MSH	γ -MSH
E_{\min} [mBq]	2778 ± 338	2660 ± 203	2379 ± 151
E_{\max} [mBq]	7659 ± 180	6855 ± 140	6488 ± 200
EC_{50} [nm]	$2,3 \pm 1,3$	$6,8 \pm 1,2$	$83,2 \pm 1,2$

Ergebnisse

Wäre der MC3R auch funktionell in den GT1-7 Zellen exprimiert, würde dies zu biphasischen Kurvenverläufen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der einzelnen Agonisten führen. Für γ -MSH ergäbe sich ein doppelt sigmoidaler Verlauf mit zwei Plateauphasen. Die erste Phase würde die Bindung des Agonisten an den MC3R widerspiegeln, die zweite die Bindung des Agonisten an den MC4R. Da es sich allerdings bei allen drei Konzentrations-Wirkungs-Kurven um monophasische Kurven handelt, konnte daraus geschlossen werden, dass zum einen der MC4R endogen in GT1-7 Zellen exprimiert wurde, und zum anderen der MC3R in den Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

Der MC4R konnte somit funktionell in GT1-7 Zellen nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde α -MSH als potentester Agonist als Standard für die MC4R Aktivierung eingesetzt, um optimale Bedingungen für die Untersuchung der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade zu haben.

5.2 Experimente mit Serumentzug

Um bei der Kultivierung von eukaryotischen Zellen möglichst physiologische Bedingungen zu generieren, werden Zellen in der Regel in Medium kultiviert, dem Serum zugesetzt ist. Das Serum enthält über 1000 Faktoren wie zum Beispiel Hormone, Vitamine und Aminosäuren, die für den Metabolismus und den Zellzyklus unerlässlich sind [Honn, 1975]. Für die Kultivierung von Zellen ist das Serum eine notwendige Komponente, die allerdings bei Experimenten hinderlich sein kann. Daher ist es üblich, die Zellen vor Experimenten für einen definierten Zeitraum von mehreren Stunden auf Serumentzug zu setzen, was mehrere Vorteile bietet [Pirkmajer, 2011]. Zum einen werden die Zellen synchronisiert, das heißt alle Zellen befinden sich in der gleichen Phase des Zellzyklus (G_0/G_1) und bilden somit eine homogenere Zellpopulation. Zum anderen werden unbekannte Komponenten im Serum, die potentielle Störfaktoren darstellen, eliminiert und die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen wird somit erhöht. Des Weiteren wird die basale Aktivität der Zellen, durch das Fehlen der Dauerstimulation durch Komponenten im Serum, wie zum Beispiel „nerve growth factor“ (NGF), reduziert [Yoon, 2006; Codeluppi, 2011]. Zusätzlich ist für GT1-7 Zellen beschrieben, dass diese unter Serumentzug eine deutliche Differenzierung vollziehen und somit der neuronale Phänotyp verstärkt wird [Mellon, 1990]. In den folgenden Versuchen wurde daher den GT1-7 Zellen 20 h vor Versuchsbeginn das Serum durch einen Mediumwechsel auf DMEM (0 % Serum) komplett entzogen. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Begrifflichkeiten „nach Serumentzug“ und „unter serumfreien Bedingungen“ synonym verwendet.

5.2.1 ERK-1/2-Regulation

5.2.1.1 α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass MC4R Agonisten in verschiedenen Zellsystemen zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung und damit Aktivierung führen können (siehe 3.6.3) [Daniels, 2003; Vongs, 2004; Chai, 2006; Patten, 2007]. Allerdings konnte bisher eine ERK-1/2 Phosphorylierung nur mit dem synthetischen Agonist NDP-MSH gezeigt werden, nicht aber mit dem endogenen Agonisten α -MSH. Für eine möglichst physiologische Regulation des MC4R wurde in dieser Arbeit der natürliche Agonist

Ergebnisse

α -MSH eingesetzt, auch wenn dieser weniger potent ist [Schiøth, 1996]. Um das optimale Zeitfenster für eine potentielle ERK-1/2 Phosphorylierung zu bestimmen und mögliche Unterschiede zwischen den beiden Agonisten aufzuzeigen, wurden die GT1-7 Zellen sowohl mit α -MSH als auch mit NDP-MSH für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert.

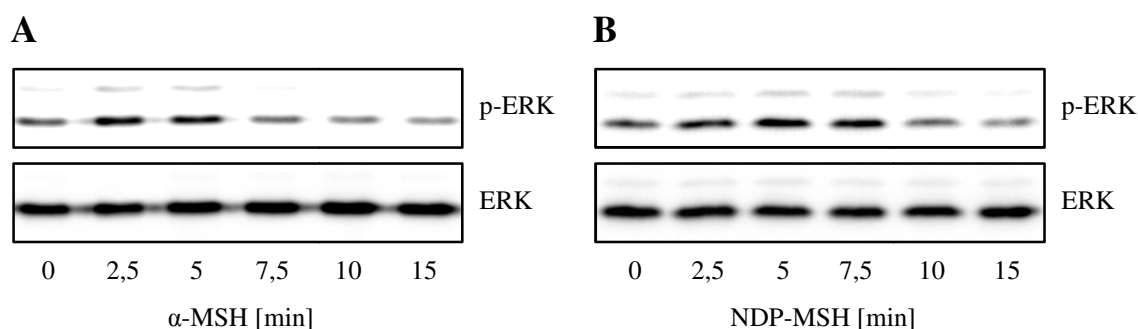


Abbildung 5.3: α -MSH und NDP-MSH-induzierte ERK Phosphorylierung

A: GT1-7 Zellen wurden mit α -MSH (1 μ M) für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert. B: GT1-7 Zellen wurden mit NDP-MSH (1 μ M) wie angegeben behandelt. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Sowohl die Stimulation der GT1-7 Zellen mit α -MSH als auch mit NDP-MSH führte zeitabhängig zu einem Anstieg der Phosphorylierung von ERK-1/2, während der Expressionsnachweis der ERK-2 über den Antikörper gegen das totale Protein keine Veränderung der Intensitäten der einzelnen Banden zeigte. Beide MC4R Agonisten führten zu einer schnellen transienten Phosphorylierung, wobei die NDP-MSH-induzierten Effekte zeitlich versetzt, im Vergleich zu α -MSH, auftraten und stärker ausgeprägt waren. Die densitometrische Auswertung der einzelnen 42 kDa Banden des phosphospezifischen ERK-1/2 Antikörpers führte zur folgenden Quantifizierung der Signalstärken.

Ergebnisse

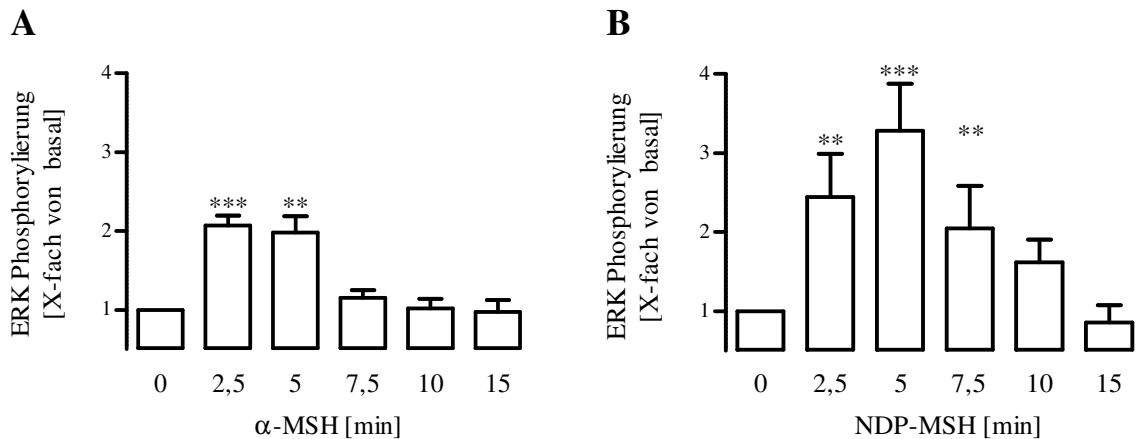


Abbildung 5.4: Quantifizierung der MC4R-Liganden-induzierten ERK Phosphorylierung

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.3. A: α -MSH-vermittelte ERK Phosphorylierung. B: NDP-MSH-vermittelte ERK Phosphorylierung. Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Phosphorylierung von ERK-1/2 durch α -MSH hatte ein Maximum nach ca. 2,5 - 5 min (2,07-fach). Nach 5 min nahm die Phosphorylierung minimal ab, um nach 7,5 min wieder auf den Basalwert zurückzukehren. Die Stimulation mit NDP-MSH führte nach 2,5 min zu einer deutlichen Phosphorylierung, die nach 5 min ihr Maximum hatte, um dann wieder langsam abzunehmen und nach 15 min wieder dem basalen Phosphorylierungsstatus zu entsprechen. Die NDP-MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung war deutlich stärker ausgeprägt (3,28-fach) als das α -MSH-induzierte Signal (2,07-fach). Im Folgenden wurden die GT1-7 Zellen mit α -MSH für 3 min stimuliert, um die induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung bei maximaler Signalstärke zu untersuchen und die beteiligten Signalkomponenten zu identifizieren.

Da direkte ERK-1/2-Inhibitoren kommerziell nicht erhältlich sind, diese aber für das Untersuchen von nachgeschalteten Signalwegen unerlässlich sind, wurde die Signaltransduktionskaskade eine Ebene höher bei der MEK unterbrochen (siehe 3.7). Es wurden drei spezifische MEK-Inhibitoren (P98059, U0126 und PD184352) getestet, die sich zum einen in ihrer Selektivität für die verschiedenen MEK-Isoformen unterscheiden, zum anderen inhibieren sie die MEK bei unterschiedlichen Konzentrationen [Davies, 2000].

Ergebnisse

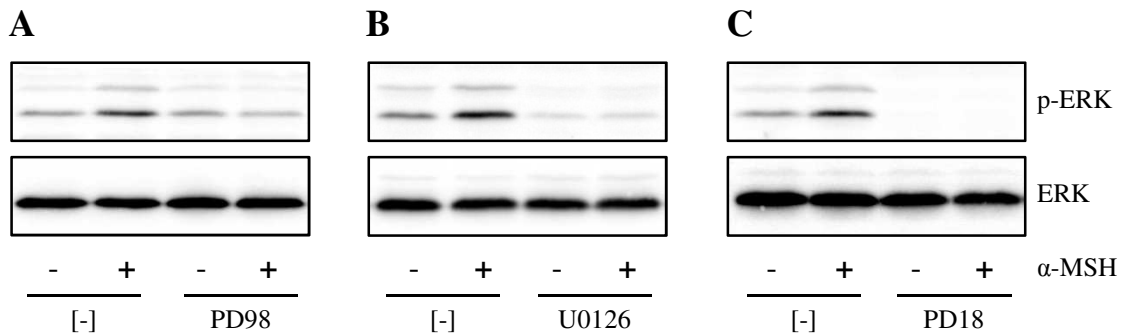


Abbildung 5.5: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren
 GT1-7 Zellen wurden für 20 min mit A: PD98 (50 μ M), B: U0126 (10 μ M) und C: PD18 (10 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Vorinkubation der Zellen mit den MEK-Inhibitoren führte zu einer Verringerung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung. Dabei zeigte sich ein Unterschied in der Fähigkeit der einzelnen Inhibitoren den Basalwert zu erniedrigen. Unter allen drei Bedingungen war α -MSH nicht mehr in der Lage, die ERK-1/2 in Anwesenheit des Inhibitors zu phosphorylieren (siehe Tabelle 5.2, Seite 105).

Um die α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors besser miteinander vergleichen zu können, wurde der Basalwert in Anwesenheit des entsprechenden Inhibitors als 100 % definiert und die α -MSH-induzierten Effekte auf den korrespondierenden Basalwert bezogen. Dadurch ergaben sich die in Abbildung 5.6-B dargestellten Werte. Die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren war signifikant verringert im Vergleich zu nativen Bedingungen und nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

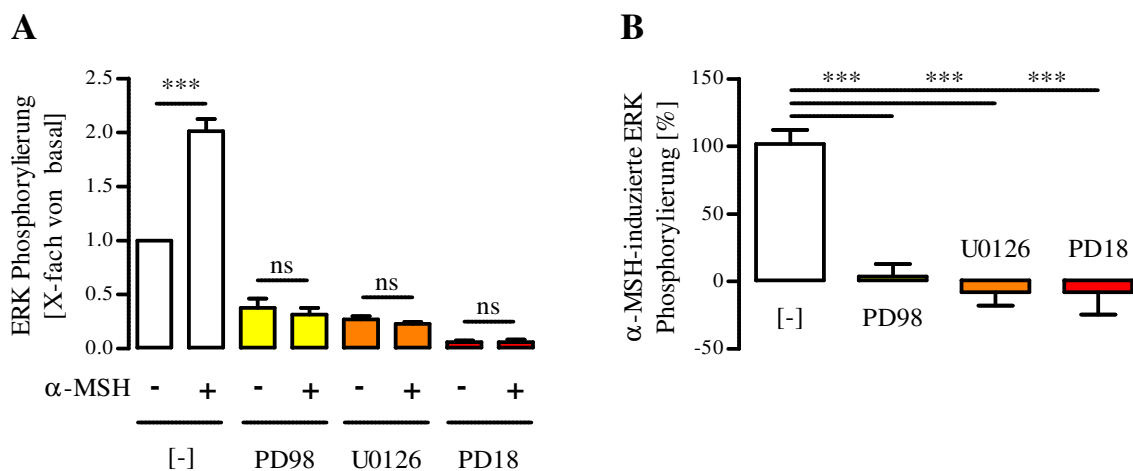


Abbildung 5.6: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.5. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen MEK-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit der spezifischen MEK-Inhibitoren PD98 (gelb), U0126 (orange) und PD18 (rot) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Inhibition von MEK führte zu einer Reduktion der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung, zum anderen wurde die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung vollständig inhibiert. Des Weiteren boten die MEK-Inhibitoren im Folgenden die Möglichkeit, indirekt die ERK-1/2-Abhängigkeit von nachfolgenden Signalkomponenten durch die Inhibition von MEK zu untersuchen.

5.2.1.2 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von Calcium-Ionen und PKC

Die schon erwähnte Arbeit von Chai hat gezeigt, dass die NDP-MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung in GT1-1 Zellen sowohl Calcium-Ionen benötigt als auch PKC-abhängig ist [Chai, 2006]. Um zu verifizieren, ob auch in GT1-7 Zellen diese Signalkomponenten zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führten, wurde zuerst die Agonisten-induzierte Erhöhung von intrazellulären Calcium-Ionen untersucht. Die Zellen wurden sowohl mit α -MSH, als auch zum direkten Vergleich mit dem, in der oben genannten Arbeit, verwendeten NDP-MSH stimuliert. Als Positivkontrolle diente Bradykinin (Bk), das über die Aktivierung von G_q -Proteinen in GT1-7 Zellen zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen führt [Zamani, 1996].

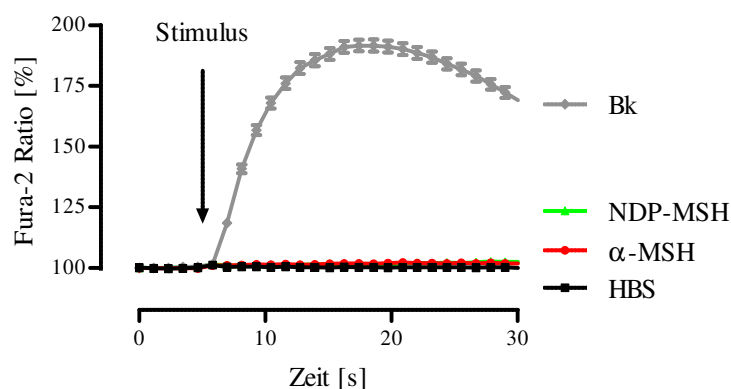


Abbildung 5.7: Calcium-Ionen-Mobilisation in GT1-7 Zellen durch verschiedene Stimuli

GT1-7 Zellen wurden mit α -MSH (1 μ M), NDP-MSH (1 μ M) oder Bk (1 μ M) nach 5 s stimuliert. Die Emission bei 510 nm wurde nach alternierender Anregung bei 340 nm und 380 nm gemessen. Der normierte Quotient der Emission der beiden Wellenlängen wurde gegen die Zeit aufgetragen.

Ergebnisse

Die Injektion von HBS-Puffer als Negativkontrolle zeigte keine Veränderung der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration. Die beiden MC4R-Agonisten α -MSH (rot) und NDP-MSH (grün) führten ebenfalls nicht zu einer Calcium-Ionen-Freisetzung in GT1-7 Zellen. Die Positivkontrolle mit Bk (grau) führte zu einer steigenden Calcium-Ionen-Konzentration.

Für die Untersuchung der Beteiligung der PKC an MC4R-vermittelten Signalwegen wurden die Inhibitoren BIM-X und Gö-6983 verwendet. Beides sind PKC-Inhibitoren, die sich in ihrer Spezifität verschiedene PKC-Isoformen zu inhibieren unterscheiden [Gschwendt, 1996; Brehmer, 2004].

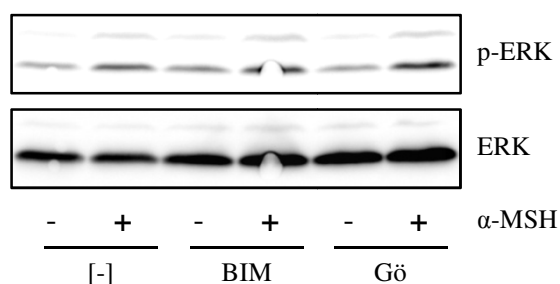


Abbildung 5.8: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren
GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor BIM (1 μ M) bzw. Gö (1 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die ERK-1/2 Phosphorylierung sowohl in Ab- oder Anwesenheit von α -MSH wurde weder durch BIM-X noch durch Gö-6983 signifikant beeinflusst (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierte Phosphorylierung war mit $101,4 \% \pm 13,2$ in Anwesenheit von BIM-X und $101,4 \% \pm 7,8$ in Anwesenheit von Gö-6983 nicht signifikant unterschiedlich zum nativen Wert von $100,4 \% \pm 3,8$.

Ergebnisse

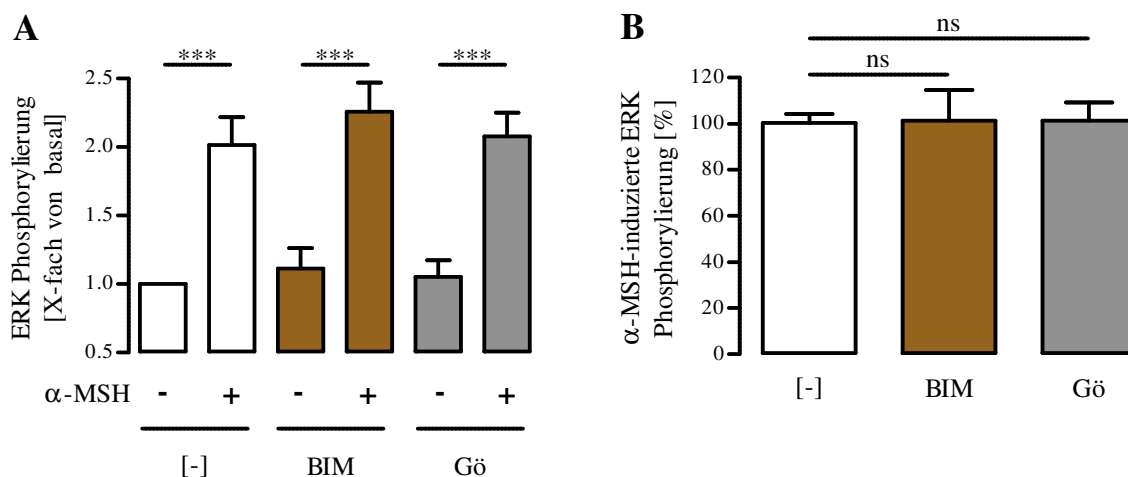


Abbildung 5.9: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren
 Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.8. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKC-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit der spezifischen PKC-Inhibitoren BIM (braun) und Gö (grau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Diese Ergebnisse zeigten, dass weder eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration noch die PKC eine Rolle bei der α -MSH-vermittelten ERK-1/2 Aktivierung in GT1-7 Zellen spielten. Es mussten daher andere Signalwege in den Zellen angestoßen werden, um die Effekte von α -MSH auf ERK-1/2 zu erklären.

5.2.1.3 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von PTX-sensitiven G-Proteinen

2009 konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des MC4R zu einer Aktivierung von PTX-sensitiven G-Proteinen führt [Buch, 2009]. PTX inhibiert selektiv die α -Untereinheit von G_i -Proteinen. Es katalysiert die ADP-Ribosylierung in der α -Untereinheit, arretiert diese somit im GDP-gebundenen Zustand und verhindert so die Interaktion mit dem Rezeptor [Bokoch, 1983]. Als Positivkontrolle für das Toxin wurden die GT1-7 Zellen mit dem G_i -gekoppelten μ -OR transfiziert. Die Aktivierung dieses Rezeptors durch DAMGO, ein synthetisches Opioidpeptid, führt zu einer Phosphorylierung von ERK-1/2 [Korz, 2008].

Ergebnisse

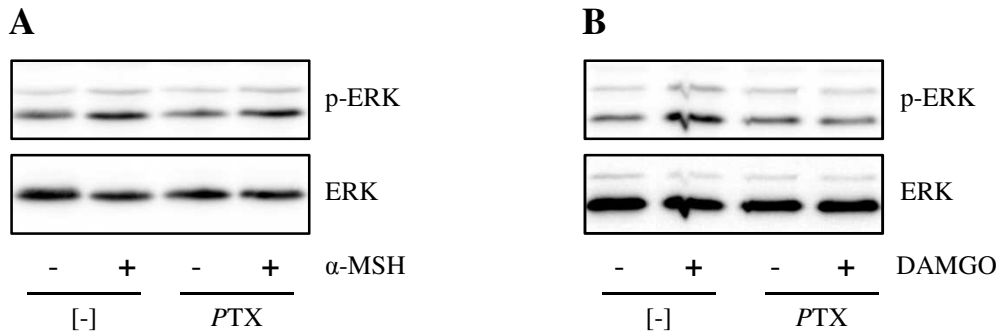


Abbildung 5.10: α -MSH- und DAMGO-induzierte ERK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden mit μ -OR (3 μ g) transfiziert und für 20 h mit oder ohne *PTX* (1 μ g/mL) inkubiert. Die Zellen wurden A: für 3 min mit α -MSH (1 μ M) bzw. B: für 5 min mit DAMGO (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung der nativen GT1-7 Zellen mit dem Toxin hatte weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung einen Einfluss (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung war in Anwesenheit von *PTX* mit $94,7\% \pm 15,0$ nicht signifikant unterschiedlich zu der α -MSH-induzierten Phosphorylierung unter nativen Bedingungen mit $99,4\% \pm 17,4$. Die Positivkontrolle, die Stimulation der μ -OR transfizierten Zellen mit DAMGO führte *PTX*-abhängig zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung.

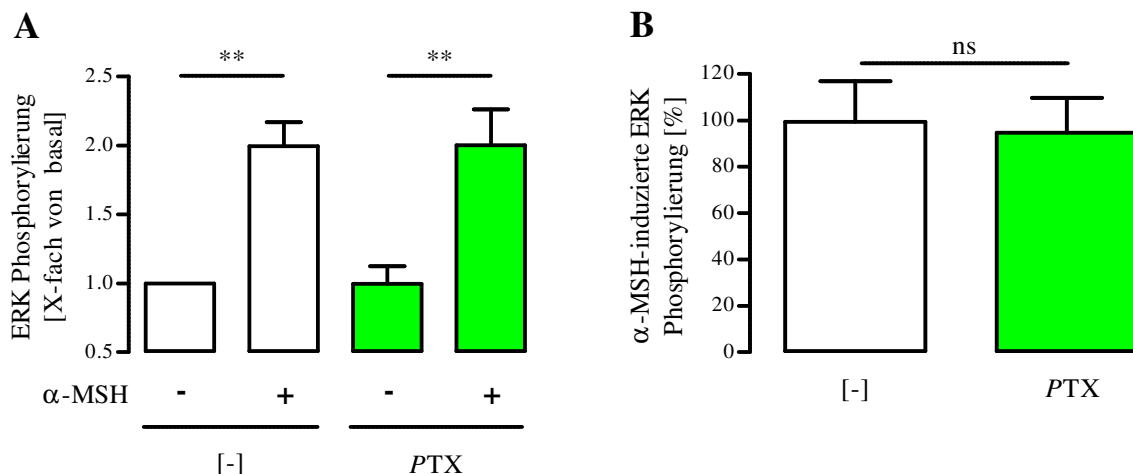


Abbildung 5.11: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von *PTX*

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.10-A. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von *PTX*. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Abwesenheit (weiß) oder Anwesenheit (grün) von *PTX*. Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Arbeitsgruppe um Vongs hat gezeigt, dass in CHO-K1 Zellen die NDP-MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung PI3K-abhängig ist [Vongs, 2004]. PI3K werden

Ergebnisse

vornehmlich über die β/γ -Untereinheit von *PTX*-sensitiven G-Proteinen aktiviert und können zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führen [Lopez-Illasaca, 1998; Gudermann, 2000]. Um diesen Signalweg in GT1-7 zu untersuchen, wurde daher der β/γ -Inhibitor Gallein und der PI3K-Inhibitor LY294002 eingesetzt.

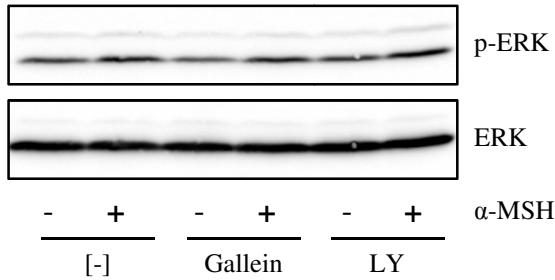


Abbildung 5.12: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von β/γ - und PI3K-Inhibitoren

GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Gallein (10 μ M) bzw. LY (20 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung der Zellen mit den beiden Inhibitoren führte weder zu einer signifikanten Veränderung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung noch zu einer signifikanten Veränderung der Effekte in Anwesenheit von α -MSH (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierten Effekte waren mit $95,0 \% \pm 11,8$ für Gallein und $93,2 \% \pm 13,4$ für LY294002 nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zum nativen Wert von $92,4 \% \pm 5,7$.

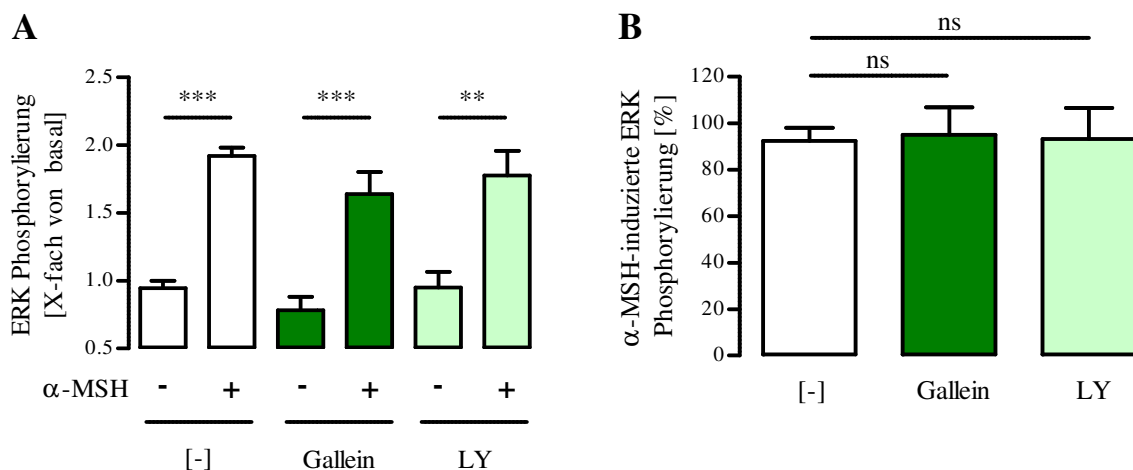


Abbildung 5.13: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von β/γ - und PI3K-Inhibitoren

Ergebnisse

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.12. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit des spezifischen β/γ -Inhibitors Gallein (dunkelgrün) und des PI3K Inhibitors LY (mint) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Keiner der drei oben eingesetzten Inhibitoren führte zu einer signifikanten Reduktion der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung. Es müssen daher andere Signal-komponenten als β/γ -Untereinheiten, PTX-sensitive G-Proteine oder der PI3K an den α -MSH-vermittelten Effekten beteiligt sein.

5.2.1.4 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung von PKA

Die Aktivierung von G_s -Proteinen kann wie unter 3.7.2 beschrieben über PKA sowohl zu einer Aktivierung als auch zu einer Inhibierung der ERK-1/2 führen (siehe Abbildung 3.7). Eine α -MSH-induzierte PKA-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung ist auf zellulärer Ebene bisher nicht beschrieben.

Um prinzipiell Effekte einer PKA Aktivierung auf die ERK-1/2 Phosphorylierung in GT1-7 Zellen zu untersuchen, wurden diese mit FSK stimuliert. FSK führt über eine G-Protein-unabhängige Aktivierung der AC zu einer gesteigerten intrazellulären cAMP-Konzentration, die ihrerseits die PKA aktivieren kann.

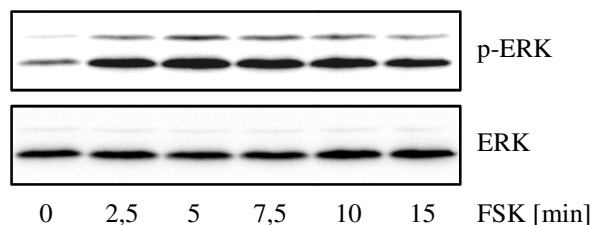


Abbildung 5.14: FSK-induzierte ERK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden mit FSK (1 μ M) für verschiedene Zeitintervalle stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

FSK führte zeitabhängig zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2. Das Maximum war nach ca. 5 min erreicht und nahm über die Zeit langsam wieder ab, nach 15 min war immer noch eine deutliche Phosphorylierung erkennbar. Das Signal war weniger transient im Vergleich zu der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung und deutlich intensiver. FSK führte also wahrscheinlich über die Aktivierung der PKA zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung.

Ergebnisse

Um die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Aktivierung auf ihre PKA-Abhängigkeit hin zu untersuchen, wurden die beiden PKA-Inhibitoren Rp-cAMPs und KT5720 getestet. Die beiden Inhibitoren unterscheiden sich zum einen in ihrem Lösungsmittel, Rp-cAMPs ist in H₂O gelöst, während KT5720 in DMSO löslich ist. Zum anderen inhibieren sie die PKA durch zwei unterschiedliche Mechanismen. Während KT5720 die ATP-Bindungs-Domäne der PKA blockiert, ist Rp-cAMPs ein kompetitiver Antagonist für die cAMP-Bindungsstelle der PKA [Murray, 2008].

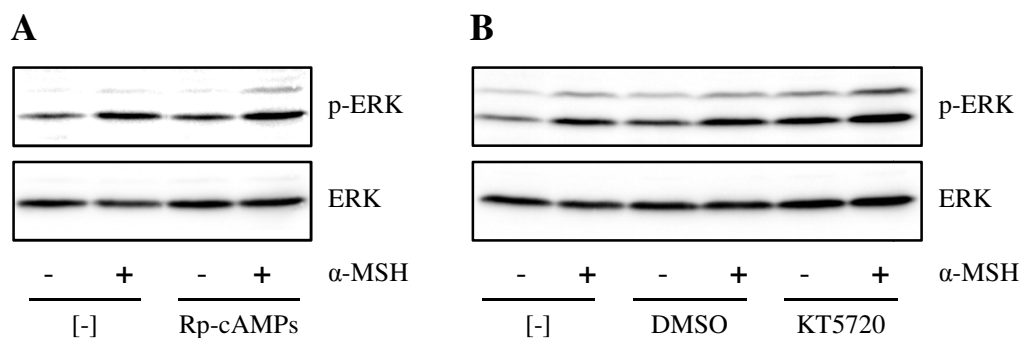


Abbildung 5.15: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 30 min

GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor A: Rp-cAMPs (50 μ M) bzw. B: KT5720 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Inkubation der GT1-7 Zellen mit Rp-cAMPs für 30 min führte zu einer signifikanten Erhöhung des Basalwertes, während die α -MSH-induzierte Phosphorylierung auf einem ähnlichem Niveau wie unter nativen Bedingungen blieb. Die zu KT5720 äquivalente DMSO-Konzentration hatte weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung eine Auswirkung. Die Inkubation der Zellen mit KT5720 führte zu einer signifikanten Erhöhung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung, die durch die Stimulation mit α -MSH noch gesteigert werden konnte. Quantifizierte man die α -MSH-induzierte Phosphorylierung auf den entsprechenden Basalwert, ergab sich für beide PKA-Inhibitoren eine signifikante Verringerung der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung. Für Rp-cAMPs sank der Wert auf $31,7 \% \pm 10,4$ und für KT5720 auf $37,3 \% \pm 19,3$ im Vergleich zum nativen Wert von $105,9 \% \pm 10,3$. Die induzierte Phosphorylierung in Anwesenheit der beiden PKA-Inhibitoren war nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

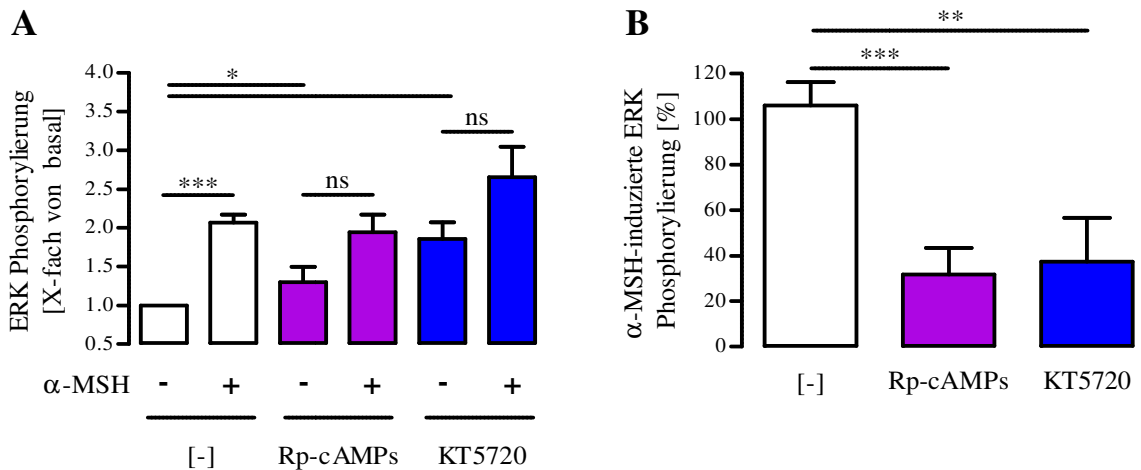


Abbildung 5.16: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 30 min

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.15. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKA-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit des Inhibitors Rp-cAMPs (lila) und KT5720 (blau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung war durch die beiden PKA-Inhibitoren signifikant erniedrigt, was ausschließlich durch die gesteigerte basale Phosphorylierung zustande kam. Dass α -MSH immer noch zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 in Anwesenheit der beiden PKA-Inhibitoren führte, erschwerte eine eindeutige Interpretation der Daten. Um den Effekt der PKA-Inhibitor-vermittelten basalen ERK-1/2 Phosphorylierung genauer zu untersuchen, wurden daher die Zellen mit KT5720, da es die stärkeren Effekte als Rp-cAMPs zeigte, für verschiedenen Zeitintervalle inkubiert und die Veränderung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung gemessen.

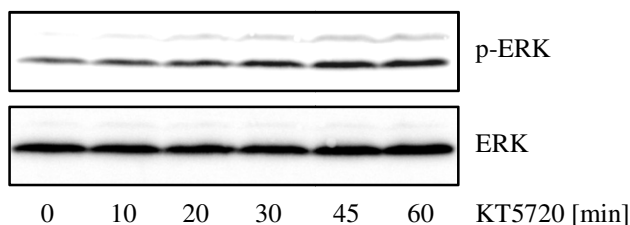


Abbildung 5.17: KT5720-induzierte ERK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden mit KT5720 (5 μ M) für verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Inkubation der Zellen mit dem spezifischen PKA-Inhibitor KT5720 führte zeitabhängig zu einer Erhöhung der ERK-1/2 Phosphorylierung. Um die α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit eines PKA-Inhibitors allerdings ohne die Beeinflussung des Basalwertes zu untersuchen, wurden die Zellen nur für 10 min mit KT5720, beziehungsweise Rp-cAMPs, vorinkubiert und anschließend mit α -MSH stimuliert.

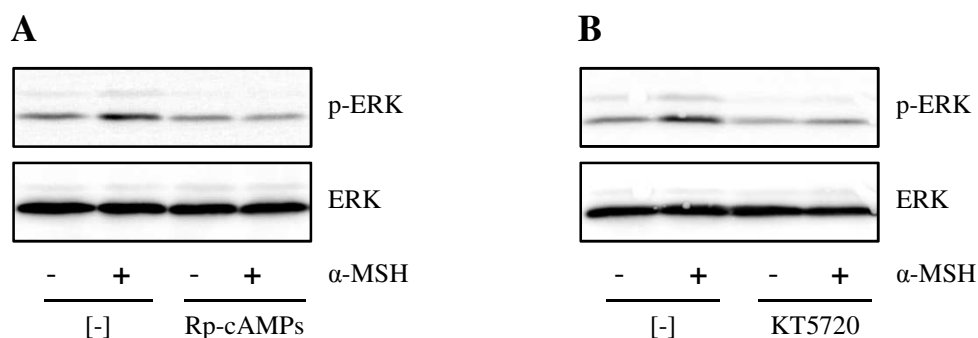


Abbildung 5.18: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 10 min

GT1-7 Zellen wurden für 10 min mit dem Inhibitor A: Rp-cAMPs (50 μ M) bzw. B: KT5720 (5 μ M) vorinkubiert und anschließend für 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Durch das Verkürzen der Inkubationszeit der beiden PKA-Inhibitoren Rp-cAMPs und KT5720 auf 10 min wurde die basale ERK-1/2 Phosphorylierung nicht mehr erhöht, im Gegenteil, die Intensität der Proteinbanden wurde reduziert. Sowohl in Anwesenheit von Rp-cAMPs als auch von KT5720 war α -MSH nicht mehr in der Lage ERK-1/2 zu phosphorylieren (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierten Effekte waren mit $26,6 \% \pm 19,3$ für Rp-cAMPs und $34,6 \% \pm 8,9$ für KT5720 signifikant reduziert gegenüber dem nativen Wert von $101,6 \% \pm 13,7$ und nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

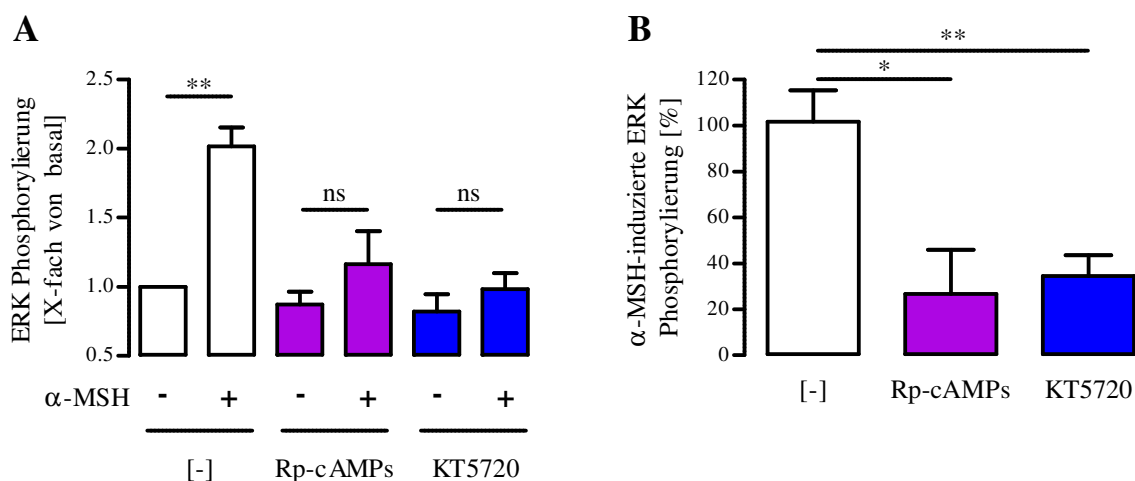


Abbildung 5.19: Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 10 min

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.18. A: ERK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKA-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit des Inhibitors Rp-cAMPs (lila) und KT5720 (blau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 42 kDa p-ERK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Vorinkubation der GT1-7 Zellen mit zwei spezifischen PKA-Inhibitoren für 10 min beziehungsweise 30 min führte zu einer signifikanten Inhibition der α -MSH-induzierten Effekte. Zu beiden Zeitpunkten ergab sich somit eine PKA-Abhängigkeit der ERK-1/2 Phosphorylierung.

5.2.1.5 Reporter-gen-Studien in GT1-7 Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die α -MSH-vermittelte Aktivierung des MC4R über PKA zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 führte, stellte sich die Frage, welche Funktion die so aktivierte ERK-1/2 in der Zelle erfüllte. Prinzipiell boten sich der aktivierten ERK-1/2 zwei Möglichkeiten: Zum einen das Verweilen im Zytoplasma, um dort residente Zielstrukturen zu phosphorylieren, zum anderen die Translokalisierung in den Zellkern, um unter anderem dort befindliche Transkriptionsfaktoren zu regulieren [Rubinfeld, 2005; Yao, 2009]. Um die zweite Möglichkeit näher zu untersuchen und eventuell auszuschließen, wurden Reporter-gen-Studien mit einem SRE-Promoter durchgeführt. Dabei wird experimentell ausgenutzt, dass die ERK-1/2 erst nach der Aktivierung in den Kern translokalisieren kann und dass der Transkriptionsfaktor SRE, nur im Kern aktiviert werden kann [Buchwalter, 2004]. Um das Verhalten der ERK-1/2 in GT1-7 Zellen zu untersuchen, wurden diese mit einem Reporter-genkonstrukt

Ergebnisse

transfiziert, das durch SRE-Aktivierung zu der Expression der Firefly Luziferase führt. Als Positivkontrolle diente Serum, das zu einer SRE-Aktivierung führt [Norman, 1988].

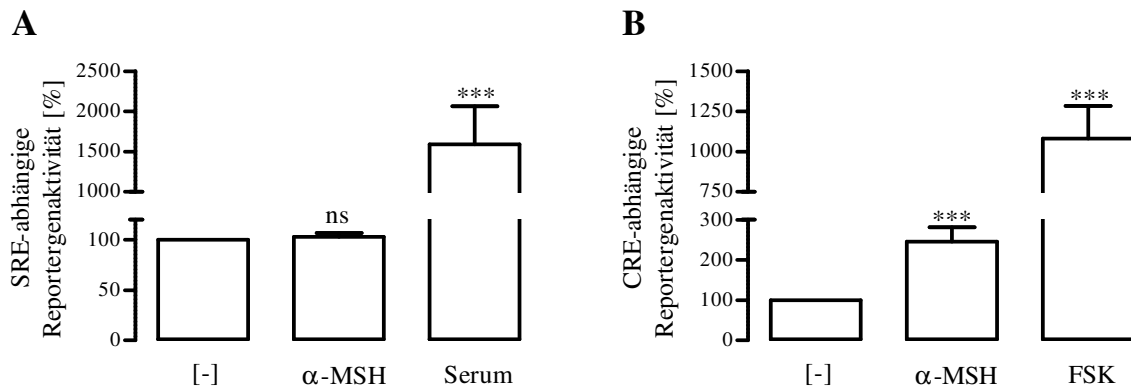


Abbildung 5.20: Reportergenaktivität in GT1-7 nach verschiedenen Stimuli

A: GT1-7 Zellen wurden mit SRE-Plasmid (2 µg) transfiziert und 6 h mit α-MSH (1 µM) bzw. Serum (50 %) stimuliert. B: GT1-7 Zellen wurden mit CRE-Plasmid (2 µg) transfiziert und 6 h mit α-MSH (1 µM) bzw. FSK (1 µM) stimuliert. Der Basalwert des jeweiligen Experimentes wurde als 100 % definiert und die restlichen Werte in Relation dazu dargestellt.

Die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α-MSH führte nicht zu einer Aktivierung des SRE-Promoters. Die Aktivierung des MC4R führte daher anscheinend nicht zu einer Translokation der ERK-1/2 in den Kern. Die Positivkontrolle des Versuchsaufbaus, die Stimulation der Zellen mit Serum führte zu einer gesteigerten Reportergenaktivität, so dass in GT1-7 Zellen aktivierte ERK-1/2 prinzipiell zu einer Translokation in den Kern und einer SRE-Aktivierung in der Lage war (Abbildung 5.20-A).

Um zu überprüfen, ob α-MSH allgemein Reportergenaktivität in GT1-7 Zellen induzieren kann, wurde ein weiteres Konstrukt getestet, das über die Aktivierung von CRE zu einer Expression der Firefly Luziferase führt. Dabei wird der CRE aktivierende Transkriptionsfaktor CREB, im Gegensatz zu SRE, schon im Zytoplasma unter anderem durch PKA aktiviert [Johannessen, 2004]. Als Positivkontrolle diente abermals FSK, das über das Erhöhen der intrazellulären cAMP-Konzentration ebenfalls zu einer CREB-vermittelten CRE-Aktivierung führt [Himmler, 1993].

Sowohl α-MSH als auch FSK erhöhten in GT1-7 die CRE-Reportergenaktivität. α-MSH steigerte die induzierte Genaktivierung signifikant auf 245,4 %, während FSK zu einer Erhöhung auf 1081,0 % führte (Abbildung 5.20-B).

Die Aktivierung des MC4R mit α-MSH führte in GT1-7 Zellen zu einer CRE- aber nicht SRE-abhängigen Reportergenaktivität. Prinzipiell war α-MSH also in der

Lage Reportergenaktivität zu induzieren, allerdings schien die Aktivierung von ERK-1/2 nicht zu einer Translokalisierung der selbigen in den Kern zu führen. Daher wurde im Weiteren nach zytoplasmatischen Komponenten der α -MSH-induzierten Signaltransduktionskaskade gesucht.

5.2.2 AMPK-Regulation

5.2.2.1 α -MSH-vermittelte AMPK-Regulation

Als potentielle zytoplasmatische Zielstruktur des MC4R kam die AMPK in Frage (siehe 3.8). Um die bisherigen Ergebnisse über die ERK-1/2 mit den Daten einer potentiellen AMPK Phosphorylierung vergleichen zu können, wurden die gleichen Versuchsbedingungen gewählt. Für einen zeitlichen Überblick über eine putative α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung an Threonin 172, wurden die Zellen für verschiedene Zeitintervalle mit α -MSH stimuliert und anschließend analysiert.

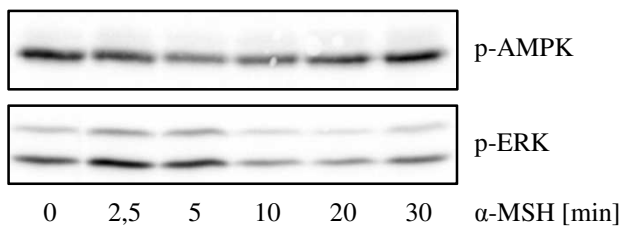


Abbildung 5.21: α -MSH-induzierte AMPK und ERK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden mit α -MSH (1 μ M) für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) bzw. p-ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Nitrozellulose-Membran wurde in der Horizontalen zerschnitten, um simultan sowohl die ERK-1/2 Phosphorylierung als auch die AMPK Phosphorylierung an Threonin 172 zu bestimmen. Die Stimulation der Zellen mit α -MSH führte, wie schon vorher gezeigt, zu einer transienten Stimulation der ERK-1/2, die auch zu späteren Zeitpunkten keine signifikante Veränderung aufwies (siehe Abbildung 5.22-B). Gleichzeitig führte die Stimulation mit α -MSH zeitabhängig zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Die Phosphorylierung nahm langsam ab und hatte nach ca. 10 min ihr Minimum (0,74-fach) und stieg danach langsam wieder an (siehe Abbildung 5.22-A).

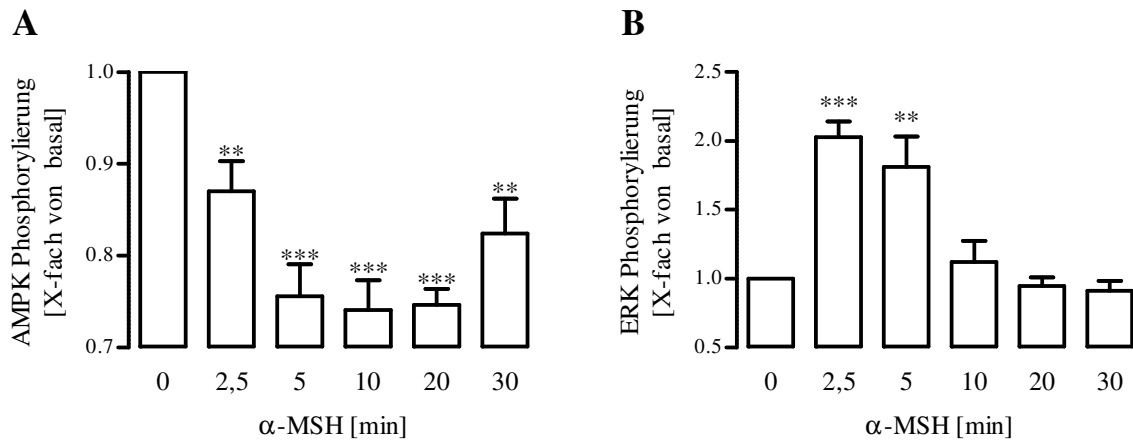


Abbildung 5.22: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK und ERK Phosphorylierung
 Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.21. A: α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung. B: α -MSH-vermittelte ERK Phosphorylierung. Die 42 kDa p-ERK und die 62 kDa p-AMPK Proteinbanden von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Um die Regulation der AMPK in GT1-7 Zellen genauer zu charakterisieren, wurden in den folgenden Versuchen die Zellen für 10 min mit α -MSH stimuliert und der Phosphorylierungsstatus der AMPK an Threonin 172 bestimmt.

5.2.2.2 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PKC

Die erste Regulation der AMPK durch GPCRs wurde für G_q -Proteine gezeigt [Kishi, 2000]. Dass in GT1-7 Zellen bei der α -MSH induzierten Signalkaskade die Calcium-Ionen-Konzentration eine Rolle bei der AMPK-Regulation spielt, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, ist aber aufgrund der nicht messbaren α -MSH-induzierten Signale bei der Fura-2-Messung eher unwahrscheinlich (siehe Abbildung 5.7). Um die Regulation der AMPK durch PKC auszuschließen, wurde der Einfluss von zwei verschiedenen PKC-Inhibitoren, BIM-X und Gö-6983, auf die α -MSH-vermittelte AMPK Dephosphorylierung untersucht.

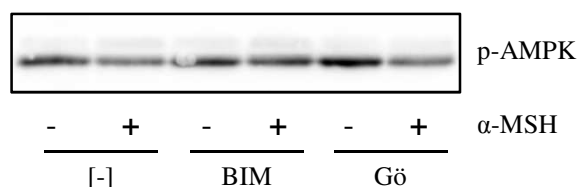


Abbildung 5.23: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren
 GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor BIM (1 μ M) bzw. Gö (1 μ M) vorinkubiert und anschließend für 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Behandlung der Zellen mit den beiden Inhibitoren führte weder zu einer signifikanten Veränderung der basalen AMPK Phosphorylierung noch zu einer signifikanten Veränderung der Effekte von α -MSH (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Stellte man wie schon bei der Auswertung der ERK-1/2 Immunoblots die Daten als α -MSH-induzierte Effekte in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren dar, erhielt man negative Werte (siehe Abbildung 5.24-B). Dabei entsprach ein negativer Wert bei der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Die Werte lagen für BIM-X bei $-17,8 \% \pm 4,2$ und für Gö-6983 bei $-18,4 \% \pm 8,1$ und waren nicht signifikant unterschiedlich zu dem nativen Wert von $-20,3 \% \pm 4,6$.

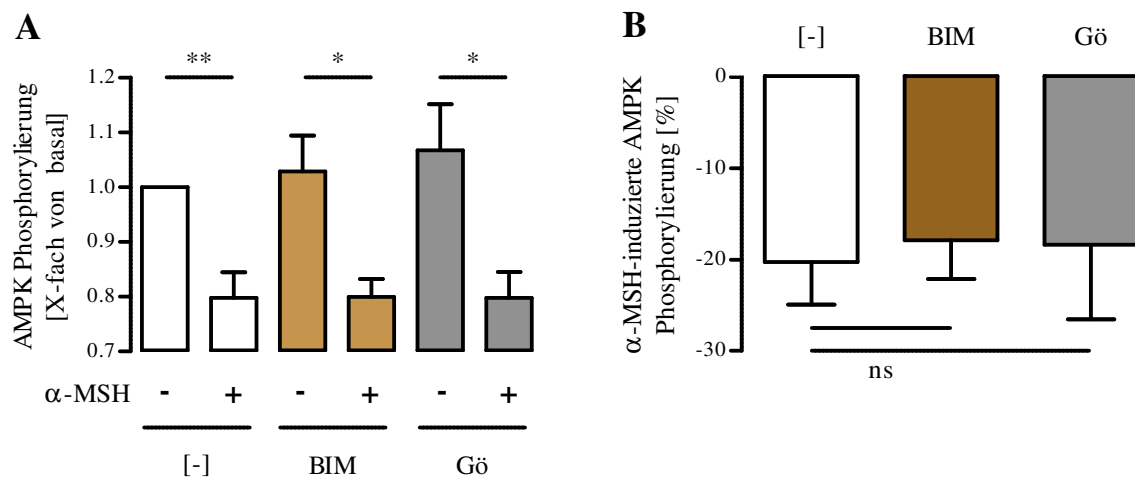


Abbildung 5.24: Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.23. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKC-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit der spezifischen PKC-Inhibitoren BIM (braun) und Gö (grau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die PKC keine Rolle bei der α -MSH-vermittelten AMPK-Regulation in GT1-7 Zellen spielte. Es mussten daher andere Signalwege in den Zellen angestoßen werden, um die Effekte von α -MSH auf die AMPK zu erklären.

5.2.2.3 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PTX-sensitiven G-Proteinen

Da in einer Arbeitsgruppe der MC4R mit PTX-sensitiven Signalwegen in Verbindung gebracht werden konnte, wurden die, unter 5.2.1.3 bei der Regulation der ERK-1/2 beschriebenen, Inhibitoren auch für die Untersuchung der AMPK-Regulation eingesetzt [Buch, 2009].

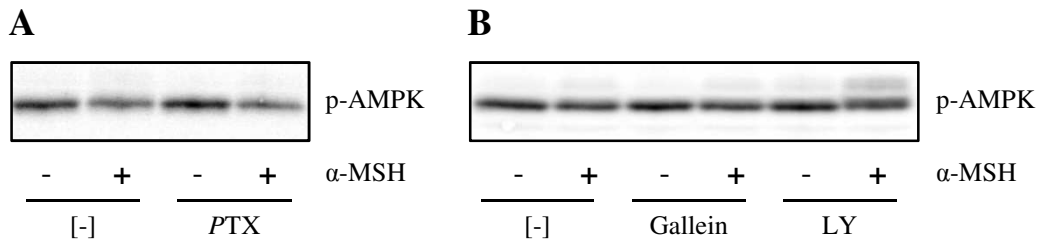


Abbildung 5.25: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX, β/γ - und PI3K-Inhibitoren

A: GT1-7 Zellen wurden für 20 h mit PTX (1 μ g/mL) behandelt und anschließend für 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. B: Die Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor Gallein (10 μ M) bzw. LY (20 μ M) vorinkubiert und anschließend für 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Weder PTX noch Gallein oder LY294002 beeinflussten den Basalwert der AMPK Phosphorylierung signifikant (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die Inhibitoren hatten ebenfalls keine Auswirkung auf die Effekte von α -MSH. Es ergab sich eine α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung mit $-24,2 \% \pm 4,0$ für PTX, $-20,2 \% \pm 5,0$ für Gallein und $-24,5 \% \pm 2,8$ für LY294002 im Vergleich zu den nativen Bedingungen mit $-22,9 \% \pm 2,5$. Die Werte der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Ergebnisse

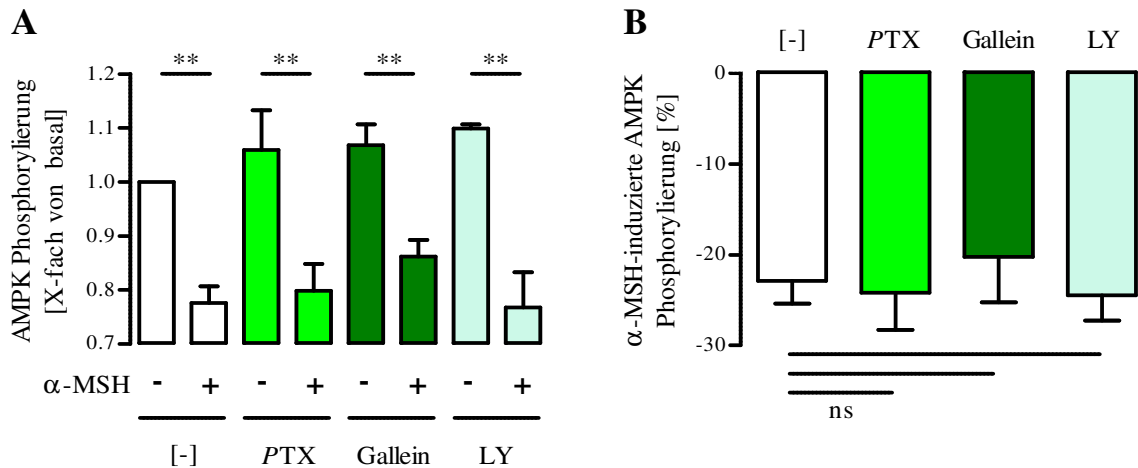


Abbildung 5.26: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX, β/γ - und PI3K-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.25. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX (grün), Gallein (dunkelgrün) und LY (mint) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Keiner der drei oben eingesetzten Inhibitoren führte zu einer signifikanten Reduktion der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung. Es mussten daher andere Signalkomponenten als PTX-sensitive G-Proteine, β/γ -Untereinheiten oder PI3K an den α -MSH-vermittelten Effekten beteiligt sein.

5.2.2.4 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von PKA

Um eine putative PKA-Abhängigkeit der α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK zu untersuchen wurden die GT1-7 Zellen mit FSK stimuliert. FSK diente wie schon bei der Untersuchung der ERK-1/2 als Positivkontrolle für eine PKA-Aktivierung.

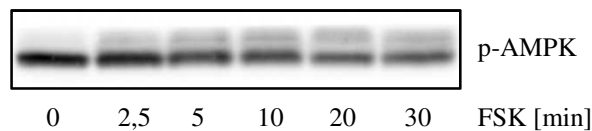


Abbildung 5.27: FSK-induzierte AMPK Dephosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden mit FSK (1 μ M) für unterschiedliche Zeitintervalle stimuliert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Stimulation der Zellen mit FSK führte zeitabhängig zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Damit spiegelte auch hier FSK das Verhalten von α -MSH in potenziertes Form wider.

Ergebnisse

Um den möglichen Einfluss der PKA auf die α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt die beiden PKA-Inhibitoren Rp-cAMPs und KT5720 unter den gleichen optimierten Bedingungen wie schon bei der ERK-1/2-Regulation eingesetzt (siehe 5.2.1.4).

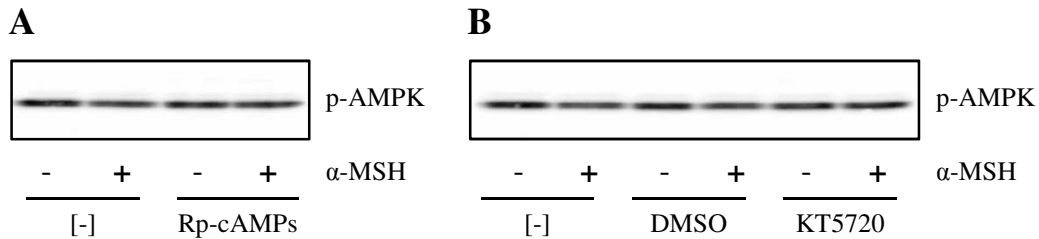


Abbildung 5.28: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren
GT1-7 Zellen wurden für 10 min mit dem Inhibitor A: Rp-cAMPs (50 μ M) bzw. B: KT5720 (5 μ M) oder der äquivalenten Menge DMSO (0,5 %) vorinkubiert und anschließend 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Lösungsmittelkontrolle mit DMSO für KT5720 hatte weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung eine Auswirkung. Die beiden spezifischen PKA-Inhibitoren nahmen kaum Einfluss auf den basalen Status der AMPK Phosphorylierung, führten aber zu einer verminderten Dephosphorylierung durch α -MSH (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Trug man die Werte als α -MSH-induzierte Effekte in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors auf, erhielt man einen signifikant verringerten Wert mit $-5,7 \% \pm 3,8$ für Rp-cAMPs und $-5,5 \% \pm 1,9$ für KT5720 im direkten Vergleich zu $-22,4 \% \pm 2,3$ unter nativen Bedingungen.

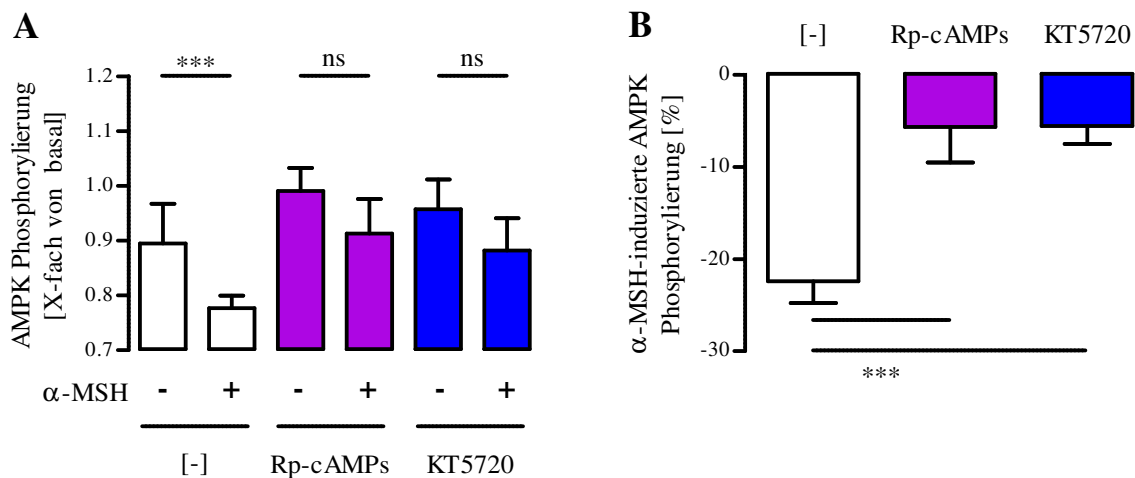


Abbildung 5.29: Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren

Ergebnisse

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.28. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKA-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von Rp-cAMPs (lila) und KT5720 (blau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Vorinkubation der GT1-7 Zellen mit zwei spezifischen PKA-Inhibitoren führte zu einer signifikanten Inhibition der α -MSH-induzierten Effekte. Wie schon bei der ERK-1/2-Regulation ergab sich somit eine PKA-Abhängigkeit der AMPK Dephosphorylierung.

5.2.2.5 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von MEK-1/2

Die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung und die AMPK Dephosphorylierung in GT1-7 Zellen waren PKA-abhängig. Da beide Komponenten durch die gleiche Kinase reguliert wurden, wurde im Weiteren untersucht, ob ein linearer Zusammenhang zwischen den einzelnen Signalkomponenten bestand, oder ob die α -MSH-induzierten Effekte auf die ERK-1/2 und die AMPK unabhängig voneinander stattfanden.

Um eine Verbindung zwischen der Aktivierung der ERK-1/2 und der Inhibition der AMPK zu untersuchen, wurde ein mögliches Zusammenspiel zuerst unter basalen Bedingungen untersucht. Dazu wurden die GT1-7 Zellen nach 20 h Serumentzug mit den schon für die ERK-1/2-Regulation etablierten MEK-Inhibitoren für 25 min inkubiert und anschließend analysiert. Der Phosphorylierungsstatus der ERK-1/2 und der AMPK an Threonin 172 wurde dabei parallel bestimmt.

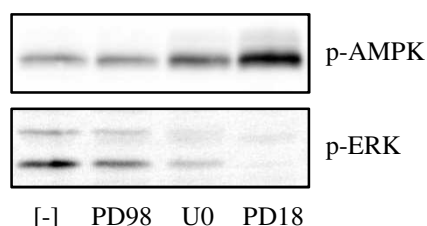


Abbildung 5.30: Basale-Regulation der ERK und AMPK in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren

GT1-7 Zellen wurden mit PD98 (50 μ M), U0126 (10 μ M) und PD18 (10 μ M) für 25 min inkubiert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) bzw. p-ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Es ergab sich sowohl für ERK-1/2 als auch für die AMPK eine Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus von den verschiedenen MEK-Inhibitoren. Dabei war der Einfluss der Inhibitoren auf die beiden Kinasen reziprok. Je schwächer die

Ergebnisse

Phosphorylierung der ERK-1/2 nach Behandlung mit dem Inhibitor war, desto stärker wurde die AMPK an Threonin 172 phosphoryliert. Dabei hatte PD184352 den stärksten Einfluss, sowohl auf die basale Phosphorylierung von ERK-1/2 (0,05-fach), als auch auf die Phosphorylierung der AMPK (3,99-fach). Die Effekte von U0126 und PD98059 hatten jeweils einen geringeren Einfluss auf den basalen Phosphorylierungsstatus der beiden Kinasen.

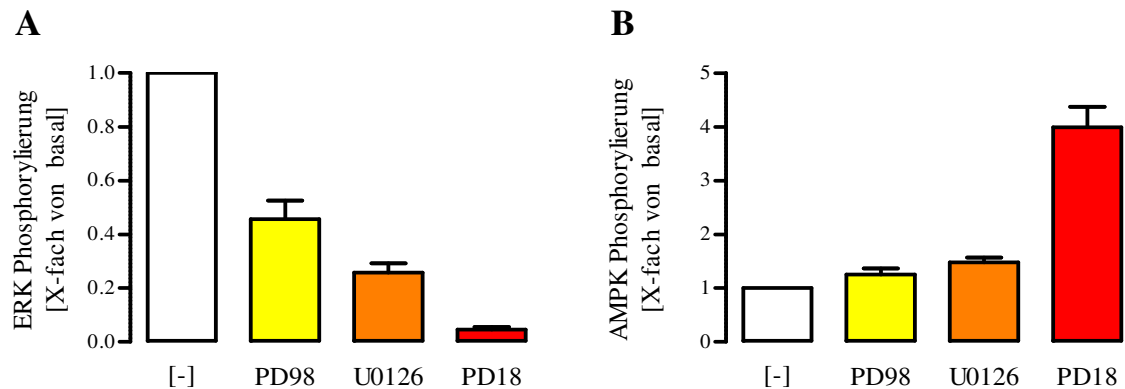


Abbildung 5.31: Quantifizierung der basalen ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.30. A: ERK Phosphorylierung nach Inkubation mit verschiedene MEK-Inhibitoren. B: AMPK Phosphorylierung nach Inkubation mit verschiedene MEK-Inhibitoren. Die 42 kDa p-ERK und die 62 kDa p-AMPK Proteinbanden von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Die reziproke Regulation der ERK-1/2 und der AMPK durch MEK-Inhibitoren sprach für einen funktionellen Zusammenhang der beiden Kinasen. Nachfolgend sollte nun die Frage geklärt werden, ob auch die α -MSH-vermittelten Effekte auf die AMPK ERK-1/2-abhängig sind.

Für die Untersuchung der α -MSH-vermittelten Effekte wurden die Zellen mit den beiden MEK-Inhibitoren U0126 und PD184352 inkubiert, da diese sowohl auf die ERK-1/2, als auch auf die AMPK Phosphorylierung die dominantesten Effekte zeigten.

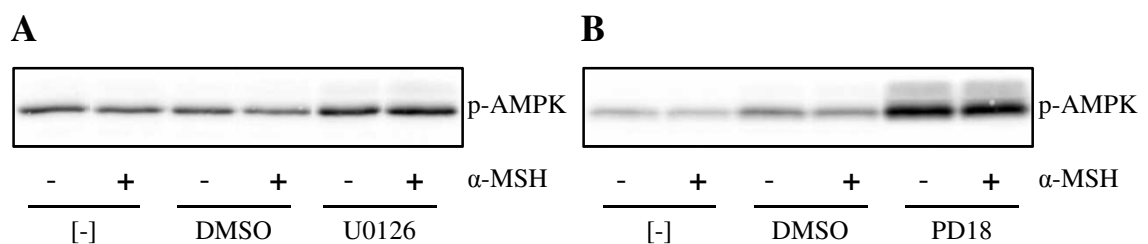


Abbildung 5.32: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren

Ergebnisse

GT1-7 Zellen wurden für 20 min mit dem Inhibitor A: U0126 (10 μ M) bzw. B: PD18 (10 μ M) oder der äquivalenten Menge DMSO (1 % bzw. 0,1 %) vorinkubiert und anschließend 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Lösungsmittelkontrolle DMSO hatte weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung einen Effekt. Beide Inhibitoren hatten den, wie oben beschriebenen, Effekt auf den Basalwert, während α -MSH nicht mehr in der Lage war, die AMPK zu dephosphorylieren (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierten Effekte waren mit $2,0 \% \pm 5,0$ für U0126 und $1,8 \% \pm 2,9$ für PD184352 signifikant unterschiedlich zum nativen Wert von $-24,9 \% \pm 3,2$ und nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

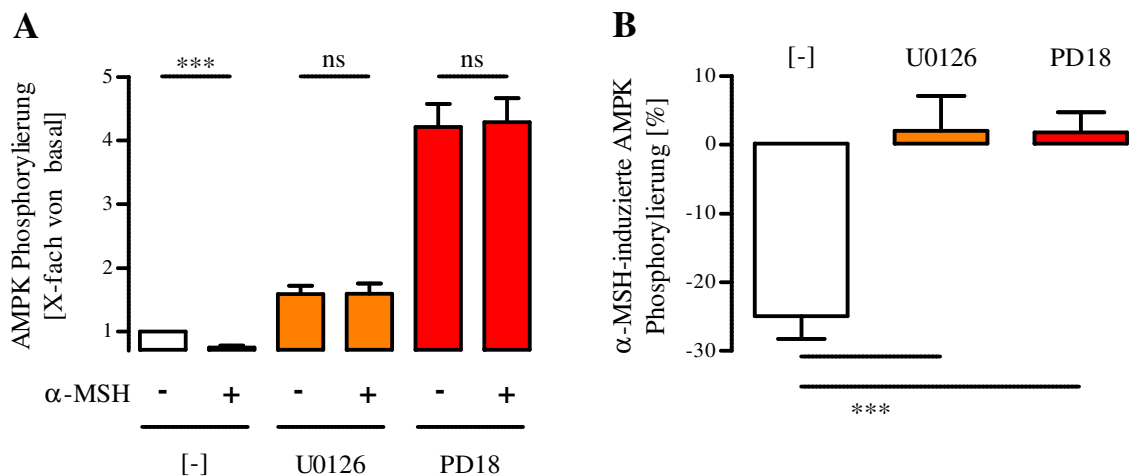


Abbildung 5.33: Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.32. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen MEK-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von U0126 (orange) und PD18 (rot) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Es bestand nicht nur unter basalen Bedingungen ein funktionaler Zusammenhang zwischen der ERK-1/2 und der AMPK, sondern auch zwischen der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung und der ERK-1/2 Aktivierung.

5.2.2.6 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von AMPK-Kinasen

Die ERK-1/2 ist eine Serin/Threonin-Kinase, die nachgeschaltete Zielstrukturen phosphoryliert und dadurch deren Aktivitätszustand beeinflusst. Von daher schien es ungewöhnlich, dass eine ERK-1/2-Aktivierung zu einer direkten Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172 führte. Prinzipiell war der lineare Zusammenhang nur möglich, wenn sich eine weitere Komponente zwischen der ERK-1/2 und der AMPK befand. Die Regulation der AMPK an Threonin 172 erfolgt exklusiv durch die Phosphorylierung durch AMPKK. Die Inhibition einer dieser eventuell konstitutiv aktiven AMPKK durch ERK-1/2 würde in einer Dephosphorylierung der AMPK resultieren. Wie unter 3.8.6 beschrieben sind drei AMPKK bekannt: CaMKK, TAK1 und LKB1. Für alle drei Kinasen gibt es direkte, beziehungsweise indirekte Inhibitoren, mit denen ein putatives Zusammenspiel mit der AMPK in GT1-7 Zellen untersucht werden kann. Zuerst wurde, wie schon im Fall der ERK-1/2, die AMPK-Regulation in Anwesenheit der verschiedenen AMPKK-Inhibitoren unter basalen Bedingungen untersucht.

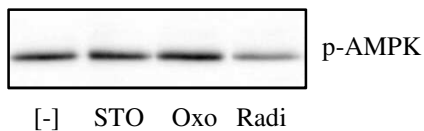


Abbildung 5.34: Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von AMPKK-Inhibitoren

GT1-7 Zellen wurden 30 min mit STO (5 μ M) oder Oxo (250 nM) inkubiert oder für 20 h mit Radi (10 μ M). Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die beiden Inhibitoren STO609 gegen die CaMKK und Oxozeanol gegen die TAK1 nahmen keinen signifikanten Einfluss auf die basale AMPK Phosphorylierung. Nur der indirekte LKB1-Inhibitor Radicicol führte in GT1-7 Zellen zu einer verringerten AMPK Phosphorylierung an Threonin 172 (0,56-fach).

Ergebnisse

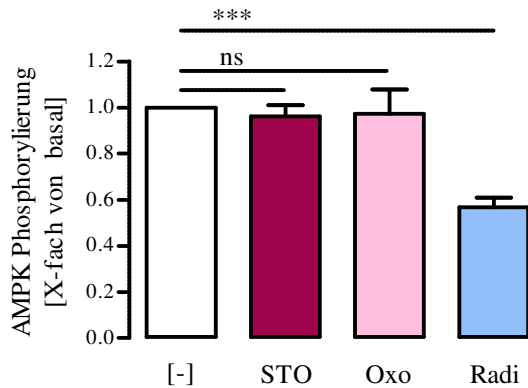


Abbildung 5.35: Quantifizierung der basalen AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von AMPKK-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.34. AMPK Phosphorylierung nach Stimulation mit verschiedene AMPKK-Inhibitoren. Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Auch wenn die basale AMPK Phosphorylierung nicht durch STO609 oder Oxozeanol beeinflusst werden konnte, bestand immer noch die Möglichkeit, dass die α -MSH-vermittelten Effekte trotzdem CaMKK- oder TAK1-abhängig waren. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden wie schon in den vorigen Experimenten, die Effekte der Inhibitoren auf die α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung untersucht.

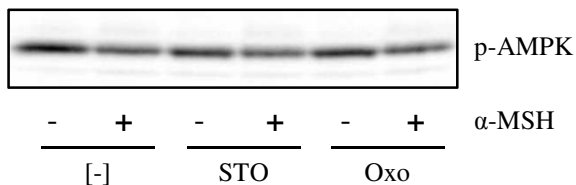


Abbildung 5.36: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von CaMKK- und TAK1-Inhibitoren

GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor STO (5 μ M) oder Oxo (250 nM) vorinkubiert und anschließend 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

STO609 und Oxozeanol hatten weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung einen Einfluss (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Stellte man die Daten als α -MSH-induzierte Effekte in Anwesenheit des jeweiligen Inhibitors dar, unterschieden sich die Werte für STO609 mit $-23,7 \% \pm 2,7$ und für Oxozeanol mit $-24,1 \% \pm 2,8$ nicht signifikant von dem nativen Wert von $-24,1 \% \pm 3,1$.

Ergebnisse

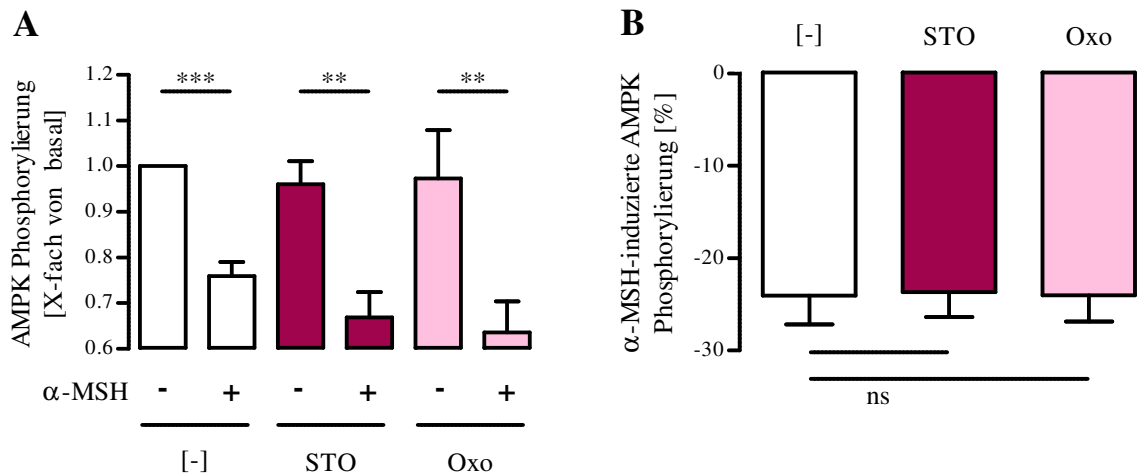


Abbildung 5.37: Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von CaMKK- und TAK1-Inhibitoren

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.36. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit der Inhibitoren STO (bordeaux) und Oxo (rosa) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass weder die CaMKK noch die TAK1 an der α -MSH-vermittelten Regulation der AMPK beteiligt waren.

Ein direkter LKB1-Inhibitor ist nicht erhältlich, daher wurde die LKB1 indirekt durch den Inhibitor Radicicol beeinflusst. Radicicol besitzt die Fähigkeit das „Heat-shock protein 90“ (Hsp90) zu inhibieren. Hsp90 ist ein Chaperon und essentiell für die Stabilisierung von Proteinen, unter anderem auch für die LKB1. Durch den Inhibitor Radicicol ist es daher möglich über die Inhibierung des Hsp90 die LKB1 Stabilität zu verringern und somit die Expression in der Zelle zu reduzieren [Boudeau, 2003].

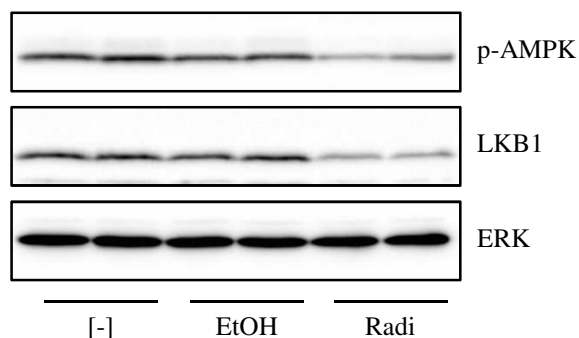


Abbildung 5.38: Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung und der LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor

GT1-7 Zellen wurden mit EtOH (1 %) oder Radi (10 μ M) für 20 h inkubiert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben), das totale Protein LKB1 (mitte) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Lösungsmittelkontrolle EtOH hatte weder eine Auswirkung auf die ERK-2 und LKB1 Expression, noch auf die AMPK Phosphorylierung. Radicol führte zu einer verminderten LKB1 Expression und parallel zu einer verminderten AMPK Phosphorylierung an Threonin 172. Die Kontrolle mit dem ERK-2-Antikörper zeigte, dass die verminderte Phosphorylierung nicht durch eine universelle Verringerung der Proteinkonzentration zu Stande kam. Die verminderte LKB1 Expression (0,47-fach) (Abbildung 5.39-A) korrelierte mit der AMPK Dephosphorylierung (0,52-fach) (Abbildung 5.39-B).

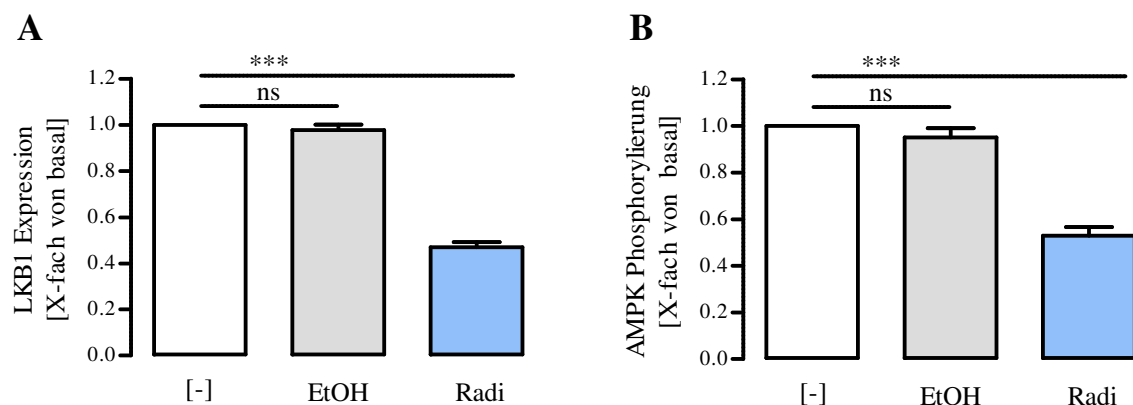


Abbildung 5.39: Quantifizierung der basalen LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung
Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.38. Inkubation der GT1-7 Zellen mit Radi (hellblau) oder der äquivalenten Konzentration EtOH (grau). A: LKB1 Expression und B: AMPK Phosphorylierung. Die 60 kDa LKB1 und die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Da Radicol nur indirekt zu einer verminderten LKB1 Expression führte, wurde ein weiteres Kontrollexperiment durchgeführt, um unspezifische Effekte zu einem früheren Zeitpunkt der Signaltransduktionskaskade auszuschließen. Daher wurde die α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung in Anwesenheit von Radicol kontrolliert. Es wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie oben gewählt, aber die Stimulationszeit mit α -MSH auf 3 min verkürzt.

Ergebnisse

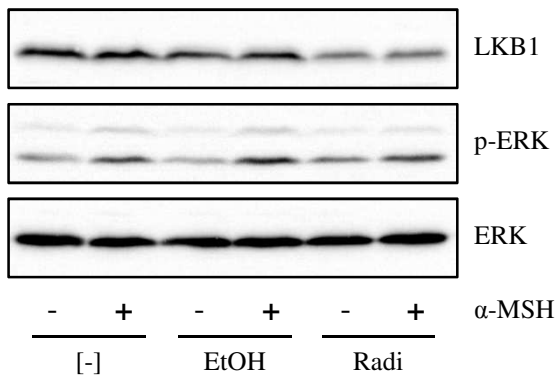


Abbildung 5.40: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung und LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor

GT1-7 Zellen wurden für 20 h mit Radi (10 μ M) bzw. der äquivalenten Konzentration EtOH (1 %) behandelt und anschließend 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das totale Protein LKB1 (oben), das phosphorylierte Protein p-ERK (mitte) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Behandlung der GT1-7 Zellen mit Radicol führte, wie schon oben gezeigt, zu einer Verringerung der LKB1 Expression. Die ERK-1/2 konnte in Anwesenheit von Radicol immer noch durch α -MSH phosphoryliert und damit aktiviert werden. Die Expression des totalen ERK-2 Proteins wurde weder durch EtOH noch durch Radicol beeinflusst.

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von der LKB1 untersucht. Der Versuchsaufbau blieb dabei unverändert, nur die Stimulationszeit mit α -MSH wurde erneut auf 10 min erhöht.

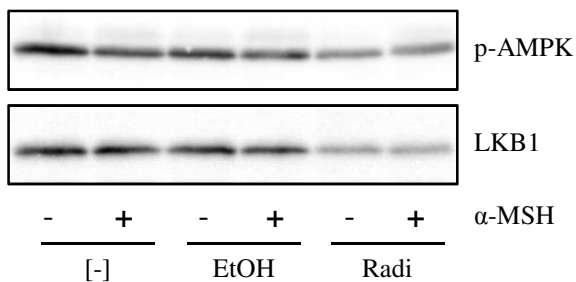


Abbildung 5.41: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor

GT1-7 Zellen wurden für 20 h mit Radi (10 μ M) bzw. der äquivalenten Konzentration EtOH (1 %) behandelt und anschließend 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) und das totale Protein LKB1 (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

EtOH hatte weder auf die LKB1 Expression noch auf die AMPK Phosphorylierung einen signifikanten Einfluss. Die Behandlung der Zellen mit Radicol führte zu einer

signifikanten Verringerung der basalen AMPK Phosphorylierung und der LKB1 Expression. α -MSH war nicht mehr in der Lage, die AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von Radicolol zu reduzieren (siehe Tabelle 5.2, Seite 105). Die α -MSH-induzierten Effekte waren in Anwesenheit von EtOH mit $-23,2 \% \pm 4,2$ nicht signifikant verändert zu den nativen Bedingungen mit $-22,9 \% \pm 5,5$. Die Effekte in Anwesenheit von Radicolol waren mit $2,5 \% \pm 7,3$ signifikant unterschiedlich zu den nativen Bedingungen und nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

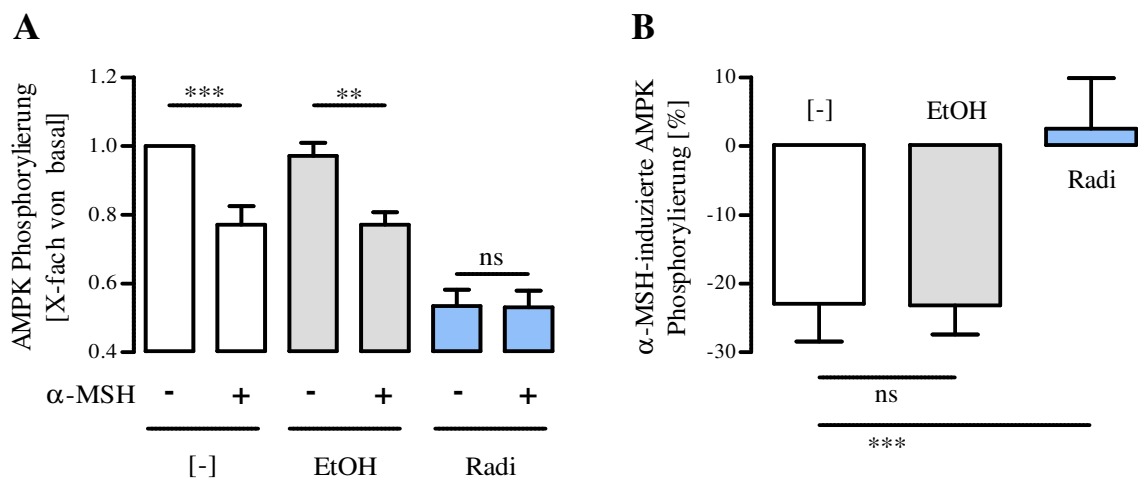


Abbildung 5.42: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.41. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von EtOH und Radi. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit des Inhibitors Radi (hellblau) bzw. der äquivalenten Konzentration EtOH (grau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

5.2.2.7 Regulation der LKB1 Expression durch siRNAs

Auch wenn die ersten Experimente mit Radicolol für eine spezifische Inhibition der LKB1 sprachen, wurde ein weiterer Ansatz gewählt, um die Beteiligung der LKB1 an der α -MSH-induzierten AMPK-Regulation zu festigen. Dabei wurden drei spezifische siRNAs eingesetzt, um die Proteinbiosynthese der LKB1 gezielt zu unterbinden.

In einem ersten Versuch wurden die GT1-7 Zellen mit den drei verschiedenen siRNAs gegen die LKB1 (#97-#99) und einer Kontroll-siRNA (#00) transfiziert und die Expression der LKB1 nach verschiedenen Zeitintervallen auf Proteinebene untersucht. Hierzu wurden die Zellen für den direkten Vergleich in einem Ansatz elektroporiert, für 12 h, 24 h beziehungsweise 36 h kultiviert und anschließend für weitere 20 h auf Serumentzug gesetzt. Daraus ergab sich eine Nettozeit von 32 h, 44 h beziehungsweise

Ergebnisse

56 h von der Elektroporation bis zu der Bestimmung der Proteinlevel. Damit war ein relativ breites Zeitfenster für die Untersuchung der Proteinexpression abgedeckt, dies beinhaltete auch die Empfehlung des Herstellers (48 h).

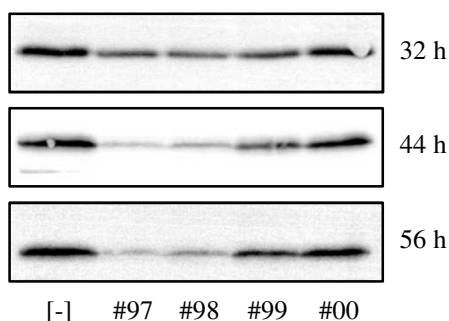


Abbildung 5.43: LKB1 Expression nach Elektroporation von verschiedenen siRNAs

GT1-7 Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA (50 nM) elektroporiert, kultiviert und anschließend für 20 h auf Serumentzug gesetzt. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das totale Protein LKB1 nach 32 h (oben), 44 h (mitte) und 56 h (unten).

Die Kontroll-siRNA #00 nahm keinen Einfluss auf die LKB1 Expression. Die drei siRNAs gegen die LKB1 (#97-#99) führten zu jedem Zeitpunkt im gleichen Verhältnis zueinander zu einer verminderten Expression des Zielproteins, unterschieden sich aber in ihrer absoluten Fähigkeit, die LKB1 Expression zu unterdrücken. Die ausgeprägteste Inhibition der LKB1 Expression konnte 44 h nach der Elektroporation detektiert werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Zellen keine morphologischen Auffälligkeiten im Gegensatz zum Zeitpunkt 56 h, an dem die Zellen bereits anfangen sich abzurunden. Im weiteren Verlauf wurden daher die GT1-7 Zellen mit der entsprechenden siRNA elektroporiert, 24 h kultiviert und nach weiteren 20 h Serumentzug mittels Immunoblot analysiert.

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der verminderten LKB1 Expression auf das Threonin 172 der AMPK untersucht. Als zusätzliche Kontrolle wurde das Expressionsprofil der ERK-2 untersucht, um eine unspezifische Inhibierung verschiedener Proteine durch die Elektroporation oder die siRNA auszuschließen.

Ergebnisse

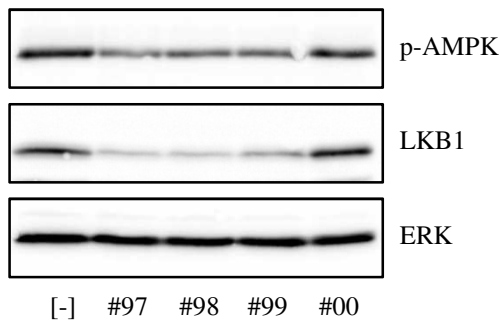


Abbildung 5.44: Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung und der LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von verschiedenen siRNAs

GT1-7 Zellen wurden mit der angegebenen siRNA (50 nM) elektroporiert und die Zellen nach 24 h für 20 h auf Serumentzug gesetzt. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben), das totale Protein LKB1 (mitte) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Das Elektroporieren der siRNAs nahm auf die Expression der ERK-2 keinen Einfluss. Die Negativkontrolle #00 hatte keine Auswirkungen auf die LKB1 Expression oder die Phosphorylierung der AMPK. Alle drei siRNAs führten zu einer unterschiedlich starken Verminderung der LKB1 Expression und gleichzeitig zu einer Dephosphorylierung der AMPK, allerdings im gleichen Verhältnis zueinander.

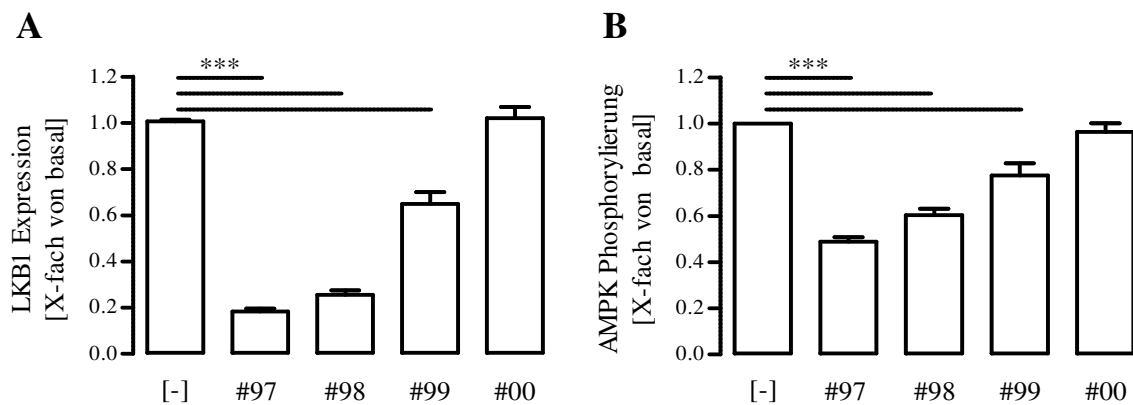


Abbildung 5.45: Quantifizierung der LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit verschiedener siRNAs

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.43 und Abbildung 5.44. A: LKB1 Expression und B: AMPK Phosphorylierung nach der Behandlung der GT1-7 Zellen mit verschiedenen siRNAs nach 44 h. Die 60 kDa LKB1 und die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Um den Zusammenhang zwischen der AMPK Dephosphorylierung und der LKB1 Inhibition genauer zu charakterisieren, wurde auf der Abszisse die Abnahme der LKB1 Expression gegen die relative Phosphorylierung der AMPK aufgetragen. Dabei wurden

die Daten aller drei siRNAs (#97-#99) verwendet und die Negativkontrolle (#00) als Bezugspunkt mit 100 % definiert.

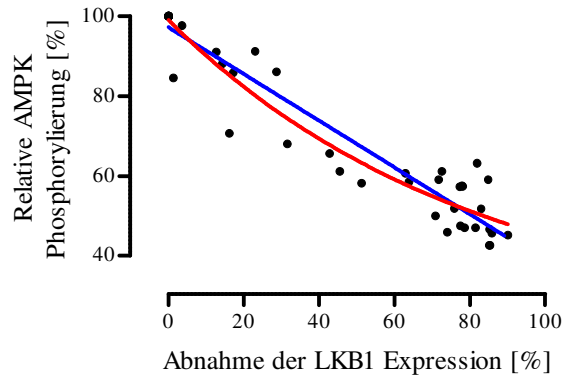


Abbildung 5.46: Zusammenhang zwischen der Abnahme der LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.44. Lineare Regression (blau) bzw. Exponentielle Korrelation (rot) der relativen Abnahme der LKB1 Expression gegen die relative AMPK Phosphorylierung. Die 60 kDa LKB1 und die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Um den Zusammenhang zwischen den beiden Größen genauer zu verifizieren wurden potentielle Gesetzmäßigkeiten graphisch dargestellt. Dabei ergaben sich zwei mögliche mathematische Zusammenhänge mit einem Regressionskoeffizienten nahe 1. Zum einen eine lineare Abhängigkeit (blau) mit einer negativen Steigung der Geraden von 0,59 und einem Regressionskoeffizienten von 0,92. Zum anderen ein exponentieller Verlauf (rot) mit einem Regressionskoeffizienten von 0,93 und einem Plateau bei 23 % der relativen AMPK Phosphorylierung. Beide Analysen hatten eine hohen Regressionskoeffizienten und stellten damit eine Abhängigkeit der beiden Variablen voneinander dar, es gab folglich einen funktionellen Zusammenhang zwischen den beiden Größen. Unabhängig von dem genauen mathematischen Zusammenhang zwischen den beiden Kinasen ermöglichte der Einsatz von siRNAs eine Reduktion der LKB1 Expression in GT1-7 Zellen, die zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172 führte.

Um auch hier eine Beeinflussung der vorgeschalteten ERK-1/2 Phosphorylierung durch die siRNAs oder die Elektroporation auszuschließen, wurde die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung in Anwesenheit von der siRNA mit den stärksten Effekten (#97) kontrolliert.

Ergebnisse

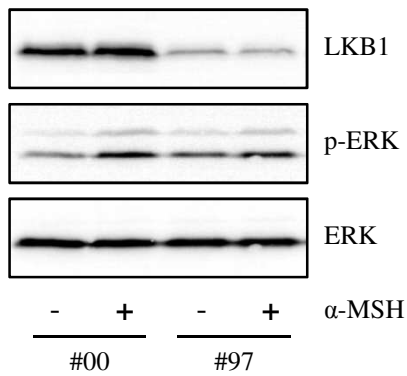


Abbildung 5.47: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung und LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von siRNAs

GT1-7 Zellen wurden mit der angegebenen siRNA elektroporiert, nach 24 h für 20 h auf Serumentzug gesetzt und anschließend 3 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das totale Protein LKB1 (oben), das phosphorylierte Protein p-ERK (mitte) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Auch hier ergab sich ein gleiches Bild, wie schon bei der Verwendung von Radicol. Die Phosphorylierung der ERK-1/2 durch α -MSH war immer noch induzierbar trotz Elektroporation der siRNA.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob mit den siRNAs, genau wie mit Radicol, die α -MSH-induzierbaren Effekte auf die AMPK inhibiert werden können. Als Referenz diente die Negativkontroll siRNA #00, die bisher keinen Unterschied zu den native Bedingungen zeigte, und für die maximale Inhibition der LKB1 die siRNA #97.

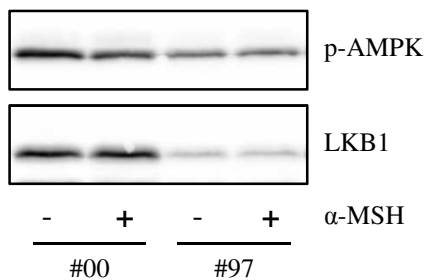


Abbildung 5.48: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung und LKB1 Expression in Anwesenheit von siRNAs

GT1-7 Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs elektroporiert, nach 24 h für 20 h auf Serumentzug gesetzt und anschließend 10 min mit α -MSH (1 μ M) stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) und das totale Protein LKB1 (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Negativkontroll siRNA #00 hatte keine Auswirkung auf die basale AMPK Phosphorylierung und die α -MSH-induzierte Dephosphorylierung. Die basale AMPK

Ergebnisse

Phosphorylierung war durch die Anwesenheit der siRNA #97 verringert und konnte durch α -MSH nicht weiter vermindert werden. Die α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit von der #97 siRNA waren mit $-5,0 \% \pm 2,1$ stark erniedrigt im Vergleich zu der Negativkontroll-siRNA #00 mit $-23,4 \% \pm 5,3$ und nicht mehr signifikant unterschiedlich zu Null.

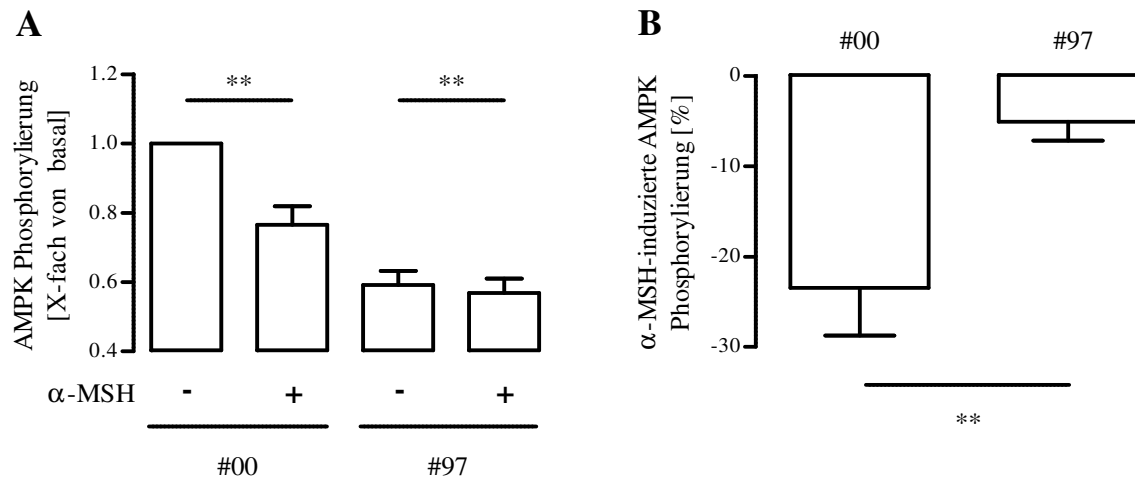


Abbildung 5.49: Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von siRNAs

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.48. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH nach der Elektroporation der angegebenen siRNAs. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung nach der Elektroporation mit der Kontroll-siRNA #00 oder der siRNA #97. Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Die Ergebnisse mit der siRNA spiegelten das Bild wider, das schon mit Radicol aufgezeigt werden konnte. Sowohl die basale als auch die α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung war LKB1-abhängig. Dieser Zusammenhang konnte somit über zwei unabhängige Versuchsansätze gezeigt werden.

5.2.3 Zusammenfassung

Die Stimulation von GT1-7 Zellen nach 20 h Serumentzug mit dem MC4R Agonisten α -MSH führte zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Des Weiteren führte die Stimulation mit α -MSH sowohl zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung als auch zu einer AMPK Dephosphorylierung. Beide Effekte waren mit den PKA-Inhibitoren Rp-cAMPS und KT5720 blockierbar. Die Inhibition der ERK-1/2 durch drei verschiedene MEK-1/2 Inhibitoren führte zu einem Anstieg der AMPK Phosphorylierung und verhinderte vollständig die Effekte von α -MSH auf die AMPK. Die Reduktion der LKB1 Expression mit siRNAs oder dem indirekten Inhibitor Radicol führte zu einer verminderten AMPK Phosphorylierung und verhinderte die Dephosphorylierung durch α -MSH. Die Daten der ERK-1/2 beziehungsweise AMPK Phosphorylierung sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Die α -MSH-induzierten Effekte auf ERK-1/2 und AMPK sind in Abbildung 5.50 graphisch dargestellt.

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der ERK-1/2 beziehungsweise AMPK Phosphorylierung [X-fach von basal]

		p-ERK-1/2		p-AMPK		
		Inhibitor	[-]	α -MSH	[-]	α -MSH
		[-]	1,00 \pm 0,00	2,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,00	0,78 \pm 0,02
MEK		PD98	0,38 \pm 0,09	0,35 \pm 0,06	1,43 \pm 0,14	1,44 \pm 0,15
		U0126	0,27 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	1,59 \pm 0,13	1,60 \pm 0,16
		PD18	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	4,21 \pm 0,36	4,29 \pm 0,38
PKC		BIM	1,11 \pm 0,16	2,26 \pm 0,21	1,03 \pm 0,07	0,80 \pm 0,03
		Gö	1,05 \pm 0,12	2,08 \pm 0,17	1,07 \pm 0,08	0,80 \pm 0,05
G _i β/γ		PTX	1,00 \pm 0,13	2,00 \pm 0,26	1,06 \pm 0,07	0,80 \pm 0,05
		Gallein	0,87 \pm 0,10	1,64 \pm 0,16	1,07 \pm 0,04	0,86 \pm 0,03
		LY	0,95 \pm 0,12	1,78 \pm 0,18	1,10 \pm 0,01	0,77 \pm 0,07
PKA		Rp-cAMPS	0,87 \pm 0,09	1,16 \pm 0,24	0,99 \pm 0,04	0,91 \pm 0,06
		KT5720	0,82 \pm 0,13	0,98 \pm 0,11	0,96 \pm 0,05	0,88 \pm 0,06
AMPK-Kinasen		STO			0,96 \pm 0,05	0,67 \pm 0,06
		Oxo			0,97 \pm 0,11	0,64 \pm 0,07
		Radi			0,53 \pm 0,05	0,53 \pm 0,05

Ergebnisse

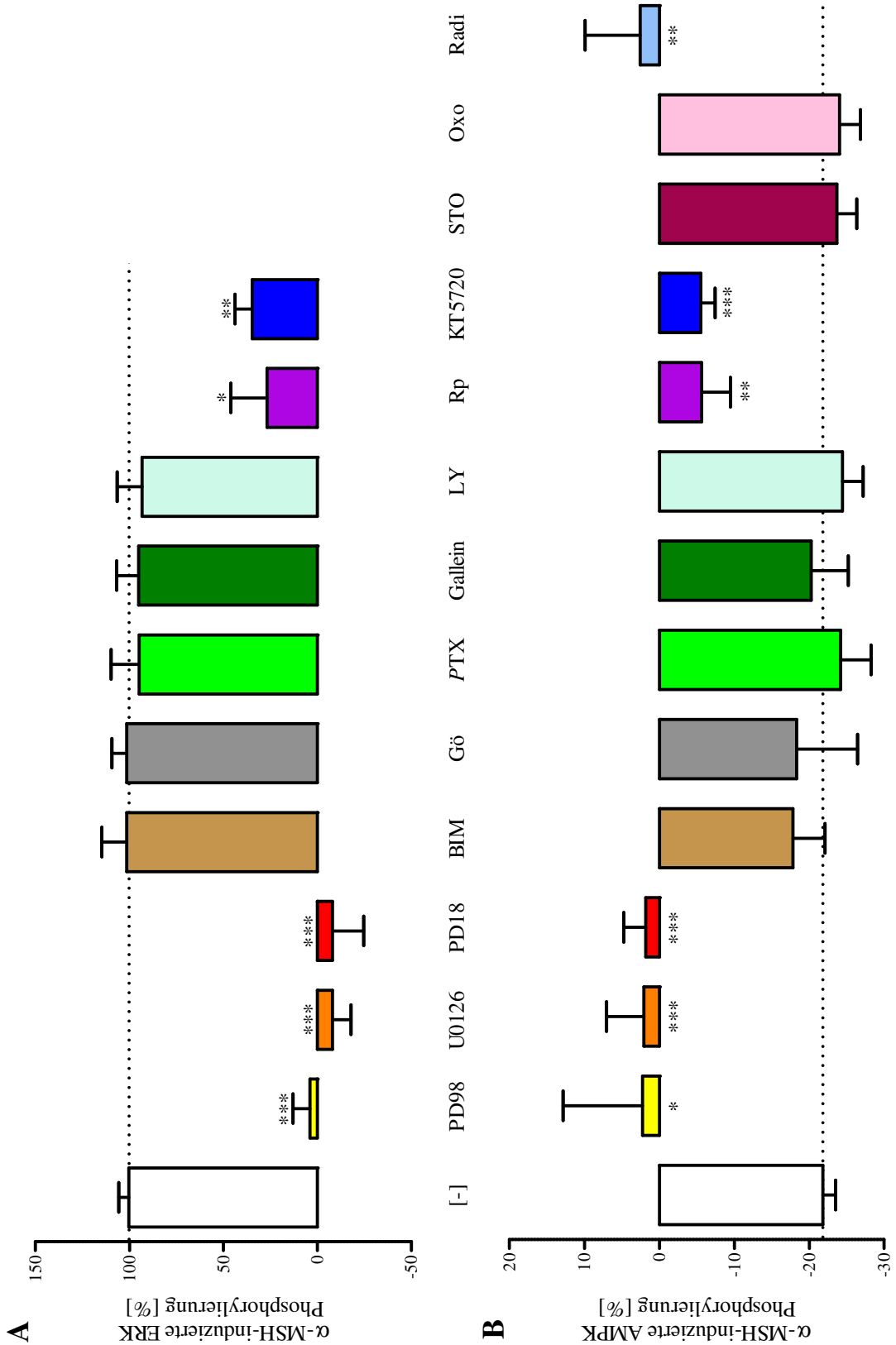


Abbildung 5.50: Zusammenfassung der α -MSH-induzierten ERK bzw. AMPK Phosphorylierung in GT1-7 Zellen nach Serumentzug

Quantifizierung der α -MSH-induzierten Effekte auf A: die ERK Phosphorylierung und B: die AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit verschiedener Inhibitoren nach Serumentzug.

5.3 Experimente ohne Serumentzug

Wie unter 5.2 beschrieben ist es bei der Untersuchung von Signaltransduktionskaskaden üblich die Zellen vor dem Experiment auf Serumentzug zu setzen. Das bietet einige Vorteile, hat aber auch Nachteile [Pirkmajer, 2011]. Zum einen werden durch den Nährstoffentzug unter anderem Prozesse wie Apoptose oder Autophagie induziert und die, dadurch ausgelösten, Signaltransduktionskaskaden können mit den Agonisten-induzierten Effekten interferieren. Zum anderen führt der Serumentzug zwangsläufig zu einer Beeinflussung der Zelle und damit zu anderen Ergebnissen als unter serumhaltigen Bedingungen.

Daher wurden die Auswirkungen des Serumentzugs auf die verschiedenen hier untersuchten Komponenten analysiert. Die schon von Mellon et al. beschriebene Differenzierung der GT1-7 Zellen durch Serumentzug konnte auch an den hier verwendeten Zellen beobachtet werden [Mellon, 1990].

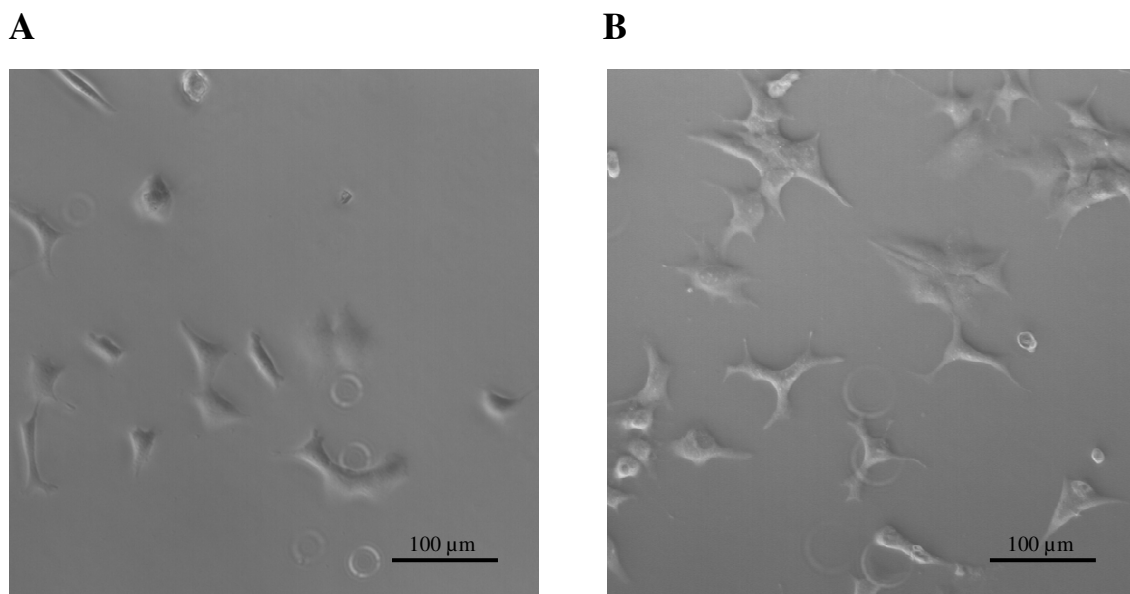


Abbildung 5.51: Morphologische Veränderung der GT1-7 Zellen nach Serumentzug

A: GT1-7 unter Standardbedingungen mit 10 % Serum im Medium. B: GT1-7 Zellen nach 20 h Serumentzug. Durchlichtaufnahmen mit 10 x Vergrößerung.

Allerdings führte der Serumentzug nicht nur zu einer morphologischen Veränderung der GT1-7 Zellen, sondern auch zu einer Beeinflussung des basalen Phosphorylierungsmuster, sowohl der ERK-1/2 als auch der AMPK.

Ergebnisse

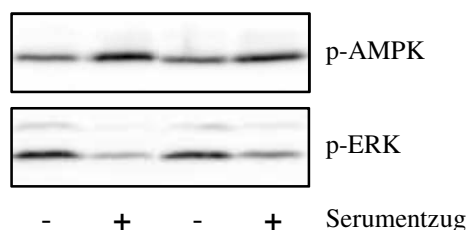


Abbildung 5.52: Auswirkungen des Serumentzugs auf die basale AMPK und ERK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden unter Standardbedingungen oder für 20 h ohne Serum kultiviert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) bzw. p-ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Durch den Serumentzug nahm die Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 zu, während reziprok die Phosphorylierung der ERK-1/2 abnahm. Das waren optimale Bedingungen für die vorhergehenden Experimente. Eine α -MSH-induzierte Phosphorylierung der ERK-1/2 ließ sich besser bei einem niedrigen Basalwert zeigen, und andersherum war es einfacher einen hohen Basalwert der AMPK Phosphorylierung durch α -MSH zu erniedrigen.

Allerdings könnten diese optimierten Bedingungen die Ergebnisse in Bezug auf die α -MSH-induzierten Effekte in GT1-7 Zellen beeinflussen. Von daher wurden die GT1-7 Zellen nun nicht mehr durch den Serumentzug beeinflusst, sondern bis zum Zeitpunkt $t = 0$ unter Standardbedingungen gehalten und nur die Stimulation mit dem Agonisten α -MSH in Medium ohne Serum durchgeführt.

5.3.1 Regulation der AMPK durch α -MSH

Als erstes wurde der Einfluss der geänderten Bedingungen auf die Regulation der AMPK untersucht. Der Basalwert unter serumhaltigen Bedingungen war im Vergleich zu serumfreien Bedingungen verringert (siehe Abbildung 5.52), was es prinzipiell erschweren könnte, eine potentielle Dephosphorylierung der AMPK durch α -MSH nachzuweisen.

Die Versuchsdurchführung unter diesen Bedingungen stellte sich etwas diffiziler dar, als unter serumfreien Bedingungen. Der Agonist α -MSH wurde, nach einem Waschschrift, in Medium ohne Serum zugegeben, um potentielle Störeffekte zu minimieren. Um einen möglichst breiten Überblick über die α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK zu bekommen wurde eine Kinetik aufgenommen. Dabei reichte ein Basalwert als Referenzwert nicht mehr aus. Zu jedem Zeitpunkt, der für α -MSH

Ergebnisse

festgelegt wurde, musste ein korrespondierender Basalwert bestimmt werden, der unter identischen Bedingungen, nur ohne α -MSH, durchgeführt wurde. So konnte man Effekte, die nur durch den kurzzeitigen Serumangel entstehen, von α -MSH-induzierten Effekten unterscheiden.

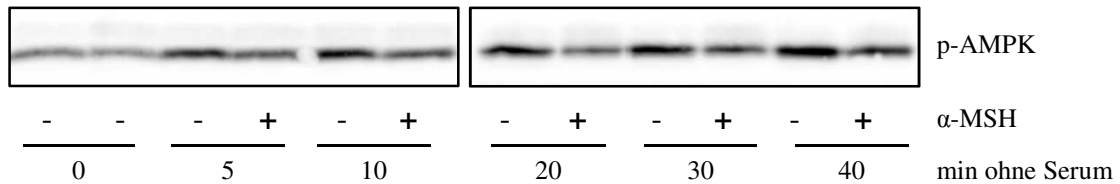


Abbildung 5.53: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung

GT1-7 Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zum Zeitpunkt $t = 0$ kultiviert. Nach einem Waschschritt wurden in An- oder Abwesenheit von α -MSH ($1 \mu\text{M}$) mit Medium ohne Serum für die angegebene Zeit stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Durch den kurzzeitigen Serumangel ergab sich für die AMPK ein Anstieg der Phosphorylierung an Threonin 172, der nach 20 min bei 1,36-fach von basal lag. α -MSH konnte den Anstieg der AMPK Phosphorylierung vollständig verhindern und darüber hinaus die AMPK zusätzlich dephosphorylieren. Nach 20 min betrug die AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von α -MSH 0,85-fach von basal. Zu diesem Zeitpunkt war die Differenz zwischen dem basalen Anstieg der AMPK Phosphorylierung durch den kurzzeitigen Serumangel und dem α -MSH-vermittelten Effekt am größten.

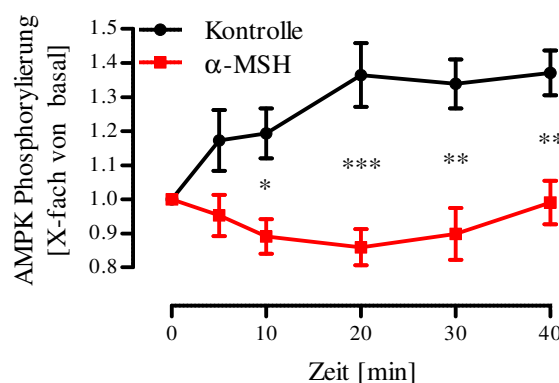


Abbildung 5.54: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.53. Phosphorylierung der AMPK nach kurzzeitigem Serumangel in Ab- (schwarz) oder Anwesenheit von α -MSH (rot). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Unter serumhaltigen Bedingungen konnte somit, wie schon unter serumfreien Bedingungen, eine α -MSH-induzierte Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172 gezeigt werden. Allerdings war die Kinetik zeitlich nach rechts verschoben, so dass der maximalen Effekt nach 20 min eintrat. Im weiteren Verlauf wurden daher die GT1-7 Zellen für 20 min mit α -MSH in Medium ohne Serum stimuliert. Der Basalwert entsprach dabei dem korrespondierenden Wert nach 20 min.

5.3.2 Abhängigkeit der α -MSH-vermittelten AMPK-Regulation von ERK-1/2

Da unter serumhaltigen Bedingungen die AMPK, wie unter serumfreien Bedingungen, durch α -MSH dephosphoryliert wurde, wurde die ERK-1/2-Abhängigkeit der AMPK-Regulation untersucht. Für das Behandeln der Zellen mit einem Inhibitor ergab sich dabei eine weitere Besonderheit beim Versuchsablauf. Der Inhibitor konnte nicht in neuem Medium angesetzt und nach dem Waschen zugegeben werden, da die abweichende Zusammensetzung des neuen Mediums schon einen Einfluss auf die kurzzeitige Regulation der AMPK nehmen kann und den Basalwert erneut beeinflussen würde. Um das zu umgehen, wurde von den Zellen ein Teil des Mediums abgenommen und der jeweilige Inhibitor in dem Kulturmedium angesetzt. Durch die Zugabe dieser Lösung ergab sich damit nur eine Änderung der Inhibitor-Konzentration, nicht aber eine Änderung des restlichen Milieus. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit serumfreien Medium für 20 min mit oder ohne α -MSH stimuliert.

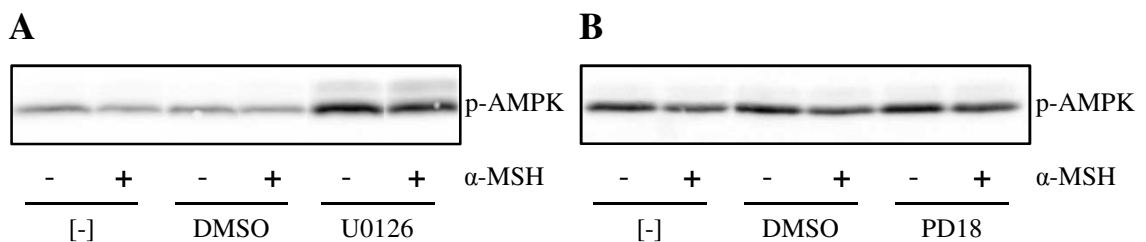


Abbildung 5.55: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

GT1-7 Zellen wurden für 20 min mit dem Inhibitor A: U0126 (10 μ M) bzw. B: PD18 (10 μ M) oder der äquivalenten Konzentration DMSO (1 % bzw. 0,1 %) vorinkubiert und anschließend 20 min mit oder ohne α -MSH (1 μ M) mit Medium ohne Serum stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Die Lösungsmittelkontrolle DMSO hatte weder auf die basale noch auf die α -MSH-vermittelte AMPK Phosphorylierung einen Effekt. Der MEK-Inhibitor U0126 führte zu einer erhöhten basalen AMPK Phosphorylierung, während PD184352 keinen Einfluss auf den Basalwert nahm. Unter serumhaltigen Bedingungen war α -MSH weiterhin in der Lage, die AMPK an Threonin 172 in Anwesenheit der beiden MEK-Inhibitoren zu dephosphorylieren (siehe Tabelle 5.3). Die α -MSH-induzierten Effekte waren mit $-22,7\% \pm 5,7$ in Anwesenheit von U0126 und mit $-24,2\% \pm 4,3$ für PD184352 nicht signifikant unterschiedlich zu dem Effekt unter nativen Bedingungen mit $-21,9\% \pm 4,2$.

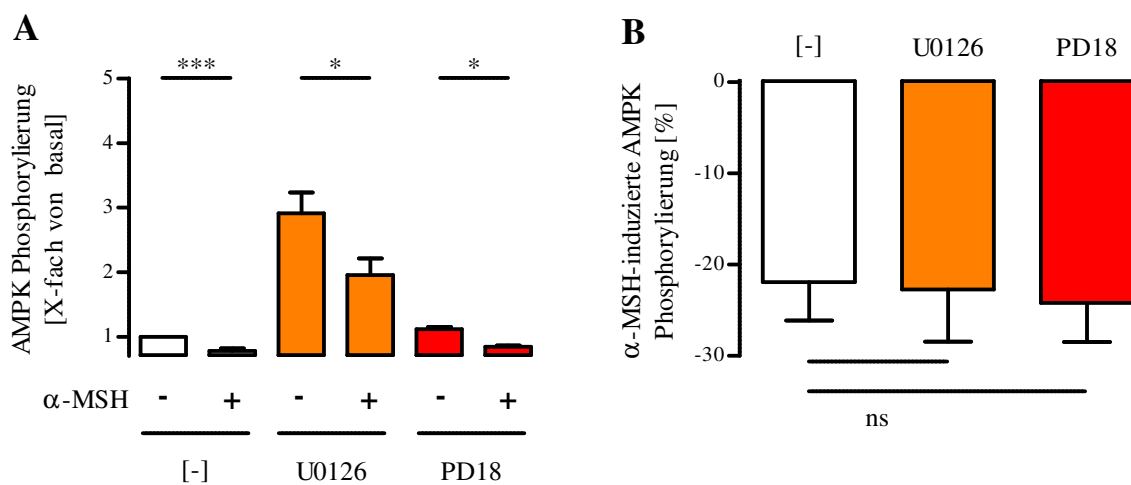


Abbildung 5.56: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.55. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von U0126 (orange) und PD18 (rot) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Im Gegensatz zu den unter 5.2.2.5 gezeigten Ergebnissen war die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung unter serumhaltigen Bedingungen nicht mehr MEK-abhängig. Um zu kontrollieren, ob das veränderte Verhalten der MEK-Inhibitoren durch das Fehlen der α -MSH-induzierten ERK-1/2 Phosphorylierung zustande kam, wurden die GT1-7 Zellen, wie schon bei der Untersuchung der AMPK, bis zum Zeitpunkt $t = 0$ kultiviert, kurz gewaschen und für 5 min mit α -MSH stimuliert.

Ergebnisse

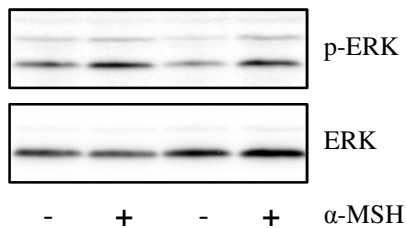


Abbildung 5.57: α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung unter serumhaltigen Bedingungen

GT1-7 Zellen wurden unter Standardbedingungen bis zum Zeitpunkt $t = 0$ kultiviert. Danach wurden sie gewaschen und in An- oder Abwesenheit von α -MSH ($1 \mu\text{M}$) mit Medium ohne Serum für 5 min stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für das phosphorylierte Protein p-ERK (oben) und das totale Protein ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Trotz einem höheren Basalwert war α -MSH in der Lage die ERK-1/2 zu phosphorylieren. Die Stimulation der Zellen mit α -MSH führte auch unter serumhaltigen Bedingungen zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und zu einer Dephosphorylierung der AMPK, aber die α -MSH-vermittelte AMPK Dephosphorylierung war nicht durch MEK-Inhibitoren blockierbar. Um zu untersuchen, ob trotzdem noch ein funktioneller Zusammenhang zwischen den beiden Kinasen bestand und ob die MEK-Inhibitoren in Anwesenheit von Serum noch aktiv waren, wurde der Phosphorylierungsstatus der beiden Kinasen unter basalen Bedingungen in Anwesenheit der verschiedenen Inhibitoren untersucht.

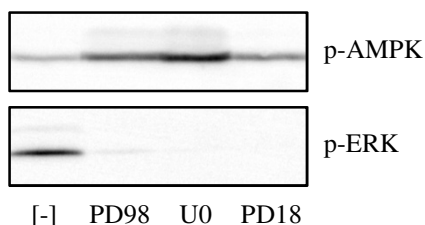


Abbildung 5.58: Basale ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

GT1-7 Zellen wurden mit PD98 ($50 \mu\text{M}$), U0 ($10 \mu\text{M}$) und PD18 ($10 \mu\text{M}$) für 25 min inkubiert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) bzw. p-ERK (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die ERK-1/2 inhibition durch MEK-Inhibitoren war stärker ausgeprägt als unter serumfreien Bedingungen (siehe Abbildung 5.31-A), die Inhibitoren erfüllten also weiterhin ihre Funktionen ohne Einschränkung. Für die Phosphorylierung der AMPK dagegen ergab sich ein verändertes Bild. Die basale Phosphorylierung stieg mit PD98059 und U0126 weniger stark an, als unter serumfreien Bedingungen. PD184352 führte zu einer

Ergebnisse

stark verminderten ERK-1/2 Phosphorylierung (0,01-fach), die Phosphorylierung der AMPK (1,18-fach) allerdings war nicht signifikant unterschiedlich zum nativen Wert.

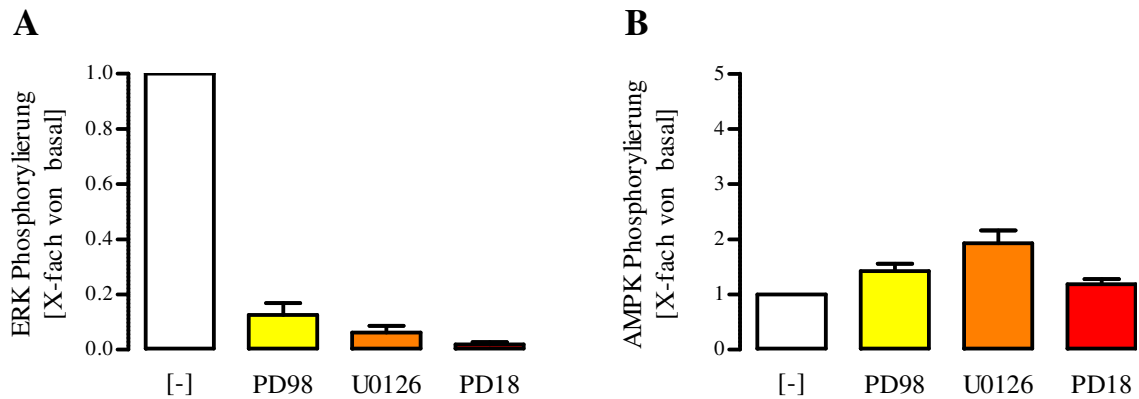


Abbildung 5.59: Quantifizierung der basalen ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.58. A: ERK Phosphorylierung nach Stimulation mit verschiedene MEK-Inhibitoren. B: AMPK Phosphorylierung nach Stimulation mit verschiedene MEK-Inhibitoren. Die 42 kDa p-ERK und die 62 kDa p-AMPK Proteinbanden von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Unter serumhaltigen Bedingungen war die reziproke Korrelation zwischen der ERK-1/2 und der AMPK Phosphorylierung, wie unter serumfreien Bedingungen nicht mehr gegeben. Trotzdem führte unter beiden Bedingungen eine Stimulation der GT1-7 Zellen mit α -MSH zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung und einer AMPK Dephosphorylierung.

5.3.3 PKA-Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung

Auch wenn kein Zusammenhang zwischen der ERK-1/2 Aktivierung und der AMPK Dephosphorylierung gegeben war, könnten die AMPK-Effekte immer noch PKA-abhängig gewesen sein. Daher wurden die beiden PKA-Inhibitoren Rp-cAMPs und KT5720 unter serumhaltigen Bedingungen getestet.

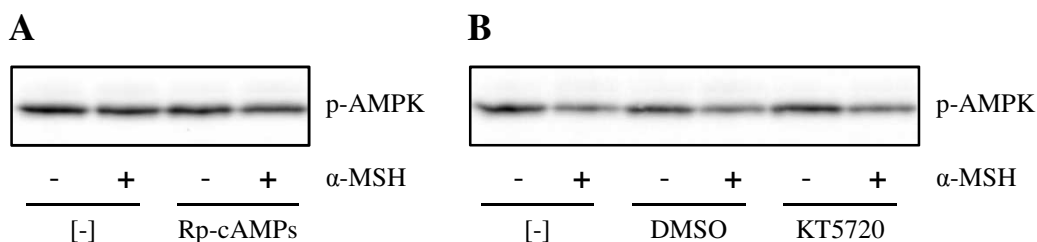


Abbildung 5.60: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

Ergebnisse

GT1-7 Zellen wurden für 30 min mit dem Inhibitor A: Rp-cAMPs (50 μ M) bzw. B: KT5720 (5 μ M) oder der äquivalenten Konzentration DMSO (0,5 %) vorinkubiert und anschließend in An- oder Abwesenheit von α -MSH (1 μ M) mit Medium ohne Serum für 20 min stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Beide Inhibitoren hatten weder auf die basale noch auf die Dephosphorylierung durch α -MSH einen signifikanten Effekt (siehe Tabelle 5.3, Seite 118). Die α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit der beiden PKA-Inhibitoren waren mit $-22,4 \% \pm 7,7$ für Rp-cAMPs und $-29,1 \% \pm 4,8$ für KT5720 nicht signifikant unterschiedlich zu den nativen Bedingungen mit $-24,2 \% \pm 4,4$.

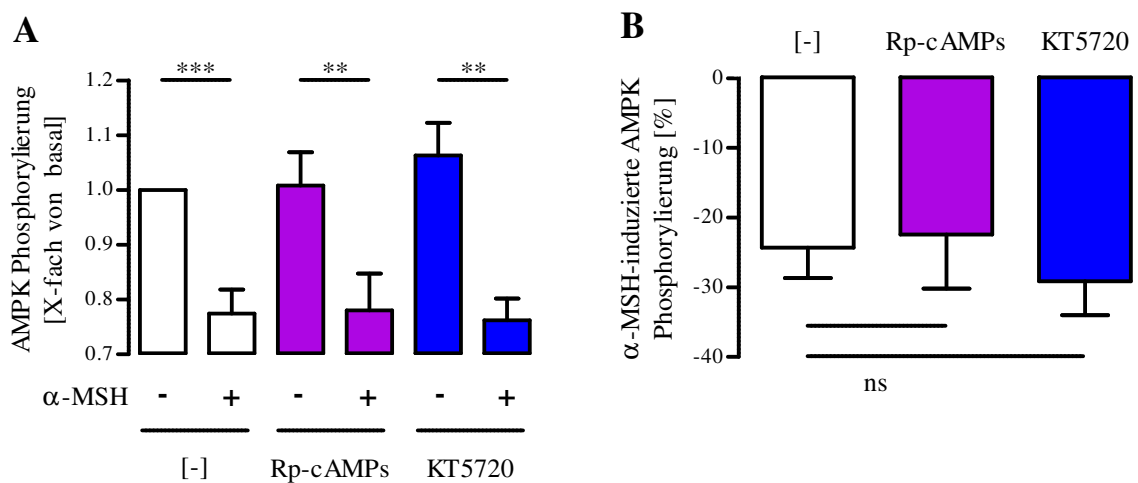


Abbildung 5.61: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.60. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen PKA-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von Rp-cAMPs (lila) und KT5720 (blau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Im Gegensatz zu den unter 5.2.2.4 gezeigten Ergebnissen war die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung unter serumhaltigen Bedingungen nicht mehr PKA-abhängig.

5.3.4 Abhängigkeit der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung von AMPK-Kinasen

Unter serumhaltigen Bedingungen war weder die ERK-1/2 noch die PKA eine vorgeschaltete Kinase in der α -MSH-vermittelten AMPK Dephosphorylierung. Um zu überprüfen, ob die AMPKK unter diesen Bedingungen noch die gleiche war wie unter serumfreien Bedingungen, wurden die drei AMPKK-Inhibitoren auf ihre Auswirkungen auf die basale AMPK Phosphorylierung getestet. Als erstes wurde der Einfluss des LKB1-Inhibitors Radicicol auf die Threonin 172 Phosphorylierung und die LKB1 Expression untersucht.

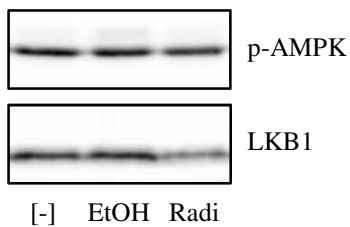


Abbildung 5.62: LKB1 Expression und basale Regulation der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor unter serumhaltigen Bedingungen

GT1-7 Zellen wurden mit EtOH (1 %) oder Radi (10 μ M) für 20 h inkubiert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 (oben) und das totale Protein LKB1 (unten) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

EtOH hatte weder auf die LKB1 Expression noch auf die AMPK Phosphorylierung eine signifikante Auswirkung. Die LKB1 Expression durch Radicicol nahm auf 0,56-fach von basal ab, während die Phosphorylierung der AMPK durch Radicicol auf 0,80-fach von basal reduziert wurde.

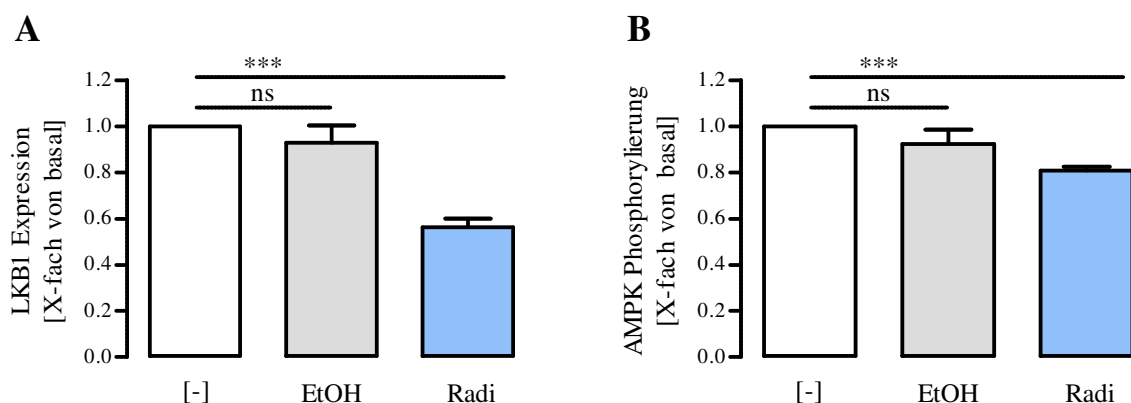


Abbildung 5.63: Quantifizierung der LKB1 Expression und der basalen AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor unter serumhaltigen Bedingungen

Ergebnisse

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.62. Inkubation der GT1-7 Zellen mit Radi (hellblau) oder der äquivalenten Konzentration EtOH (grau). A: AMPK Phosphorylierung und B: LKB1 Expression. Die 60 kDa LKB1 und die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet.

Damit korrelierte die AMPK Dephosphorylierung nicht mehr so stark mit der Abnahme der LKB1 Expression wie unter serumfreien Bedingungen (siehe Abbildung 5.39).

Um eine potentielle Beteiligung der anderen beiden AMPKK bei der α -MSH-induzierten AMPK Dephosphorylierung zu untersuchen, wurden die GT1-7 Zellen mit den entsprechenden Inhibitoren vorinkubiert und anschließend mit α -MSH stimuliert.

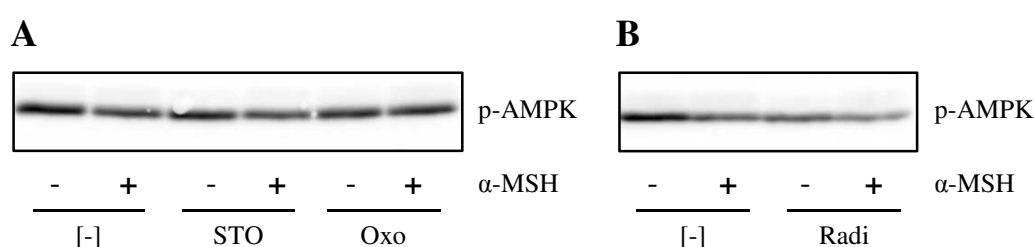


Abbildung 5.64: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

GT1-7 Zellen wurden A: für 30 min mit STO (5 μ M) oder Oxo (250 nM) vorinkubiert bzw. B: für 20 h mit dem Inhibitor Radicolol inkubiert und anschließend 20 min in An- oder Abwesenheit von α -MSH (1 μ M) mit Medium ohne Serum stimuliert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Immunoblot für die phosphorylierte AMPK an Threonin 172 aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Alle drei AMPKK-Inhibitoren führten zu einer verringerten basalen AMPK Phosphorylierung (siehe Tabelle 5.3, Seite 118). Die α -MSH-induzierten Effekte waren sowohl für Oxozeanol mit $-5,6 \% \pm 3,5$ als auch für Radicolol mit $-7,2 \% \pm 3,2$ signifikant unterschiedlich zu dem Wert unter nativen Bedingungen mit $-21,5 \% \pm 1,7$. Die α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von STO609 mit $-16,6 \% \pm 2,0$ war nicht signifikant unterschiedlich zu dem nativen Wert.

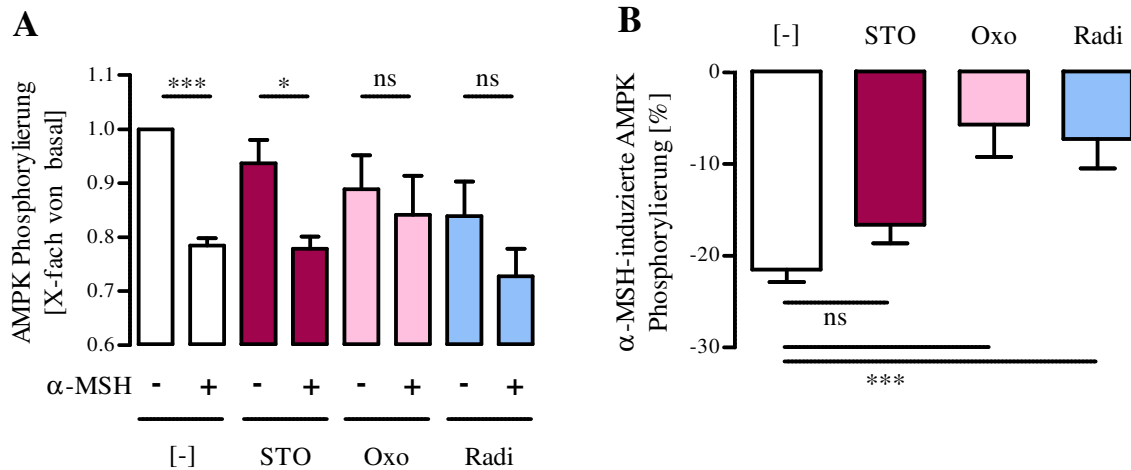


Abbildung 5.65: Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen

Quantifizierung der Immunoblots aus Abbildung 5.64. A: AMPK Phosphorylierung mit und ohne α -MSH in Ab- oder Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren. B: α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von STO (bordeaux), Oxo (rosa) und Radi (hellblau) im Vergleich zu nativen Zellen (weiß). Die 62 kDa p-AMPK Proteinbande von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurde densitometrisch ausgewertet.

Auch bei der direkten Regulation der AMPK durch die drei vorgeschalteten Kinasen hatte sich im Vergleich zu serumfreien Bedingungen das Bild verändert. Die LKB1 war noch an der Dephosphorylierung an Threonin 172 beteiligt, allerdings wurde auch ein Teil der α -MSH-vermittelten Dephosphorylierung über die TAK1 reguliert.

5.3.5 Zusammenfassung

Die Stimulation von GT1-7 Zellen mit dem MC4R Agonisten α -MSH führte sowohl zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung als auch zu einer AMPK Dephosphorylierung. Die Inhibition der ERK-1/2 durch drei verschiedene MEK-1/2 Inhibitoren, führte zu einer geringen Veränderung des basalen AMPK Phosphorylierungsstatus, hatte aber keinen Einfluss auf die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter serumfreien Bedingungen waren die α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK ebenfalls nicht durch PKA-Inhibitoren blockierbar. Sowohl die Inhibition der LKB1 als auch der TAK1 mit dem indirekten Inhibitor Radicol, beziehungsweise Oxozaenol führten zu einer verminderten basalen AMPK Phosphorylierung. Beide Inhibitoren verminderten gleichzeitig auch die α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK Phosphorylierung. Der Einfluss der einzelnen Inhibitoren sowohl auf den Basalwert als auch auf die Effekte von α -MSH, sowohl unter serumfreien als auch serumhaltigen Bedingungen, sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die α -MSH-induzierten Effekte unter den jeweiligen Bedingungen sind in Abbildung 5.66 gegenübergestellt.

Tabelle 5.3: Zusammenfassung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von Inhibitoren [X-fach von basal]

		serumfrei		serumhaltig	
Inhibitor		[-]	α -MSH	[-]	α -MSH
[-]		1,00 \pm 0,00	0,78 \pm 0,02	1,00 \pm 0,00	0,78 \pm 0,02
MEK	U0126	1,59 \pm 0,13	1,60 \pm 0,16	2,91 \pm 0,32	1,95 \pm 0,26
	PD18	4,21 \pm 0,36	4,29 \pm 0,38	1,12 \pm 0,04	0,85 \pm 0,02
PKA	Rp-cAMPs	0,99 \pm 0,04	0,91 \pm 0,06	1,01 \pm 0,06	0,78 \pm 0,07
	KT5720	0,96 \pm 0,05	0,88 \pm 0,06	1,06 \pm 0,06	0,76 \pm 0,04
AMPK-Kinasen	STO	0,96 \pm 0,05	0,67 \pm 0,06	0,94 \pm 0,04	0,78 \pm 0,02
	Oxo	0,97 \pm 0,11	0,64 \pm 0,07	0,89 \pm 0,06	0,84 \pm 0,07
	Radi	0,53 \pm 0,05	0,53 \pm 0,05	0,84 \pm 0,06	0,73 \pm 0,05

Ergebnisse

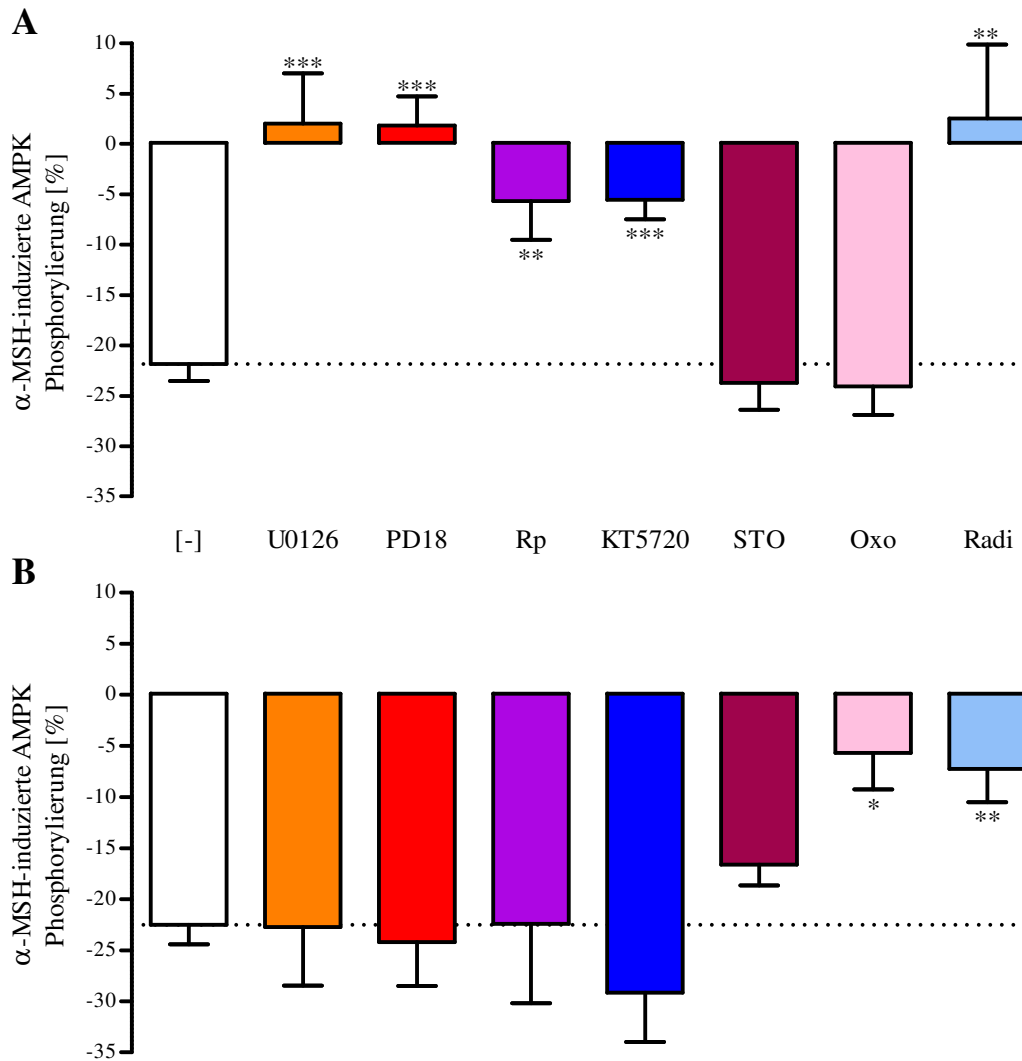


Abbildung 5.66: Zusammenfassung der α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit von Inhibitoren
 α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung unter A: serumfreien Bedingungen für 20 h und B: serumhaltigen Bedingungen bis zum Zeitpunkt $t = 0$ der α -MSH Stimulation.

5.3.6 PepChip

Der PepChip Kinase-Array bietet die Möglichkeit simultan den Aktivitätszustand verschiedener Kinasen in der Zelle nachzuweisen und wurde eingesetzt um weitere Effektoren des MC4R unter serumhaltigen Bedingungen zu identifizieren, die für α -MSH-vermittelte anorexigene Wirkungen verantwortlich sind. Für den Versuchsaufbau wurden drei Objektträger verwendet, die mit unterschiedlich vorbehandelten Zelllysaten inkubiert wurden. Um den basalen Phosphorylierungsstatus der Zelle zu detektieren, wurde der erste Objektträger mit unstimuliertem Zelllysate inkubiert. Er fungierte als Referenzwert zu den mit Agonist stimulierten Zellen. Ein weiterer PepChip wurde mit α -MSH stimuliertem Zelllysate inkubiert und ein dritter mit FSK.

Ergebnisse

FSK diente als Positivkontrolle für den PepChip, da mit FSK alle PKA-Substrate phosphoryliert werden müssten und so ein Anhaltspunkt für die Sensitivität des Versuchs geliefert wird.

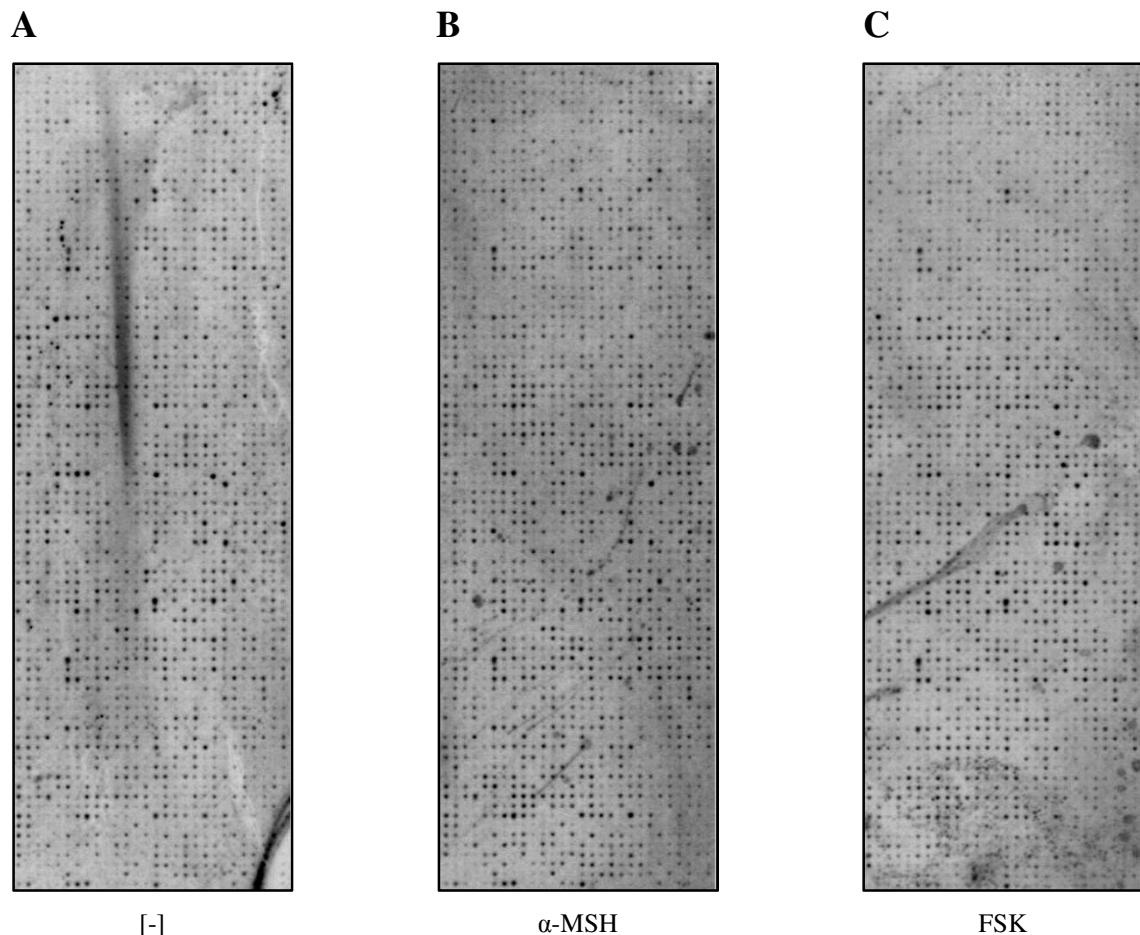


Abbildung 5.67: PepChip Phosphorylierungsmuster nach verschiedenen Stimuli

Darstellung der einzelnen PepChips in doppelter Größe. GT1-7 Zellen wurden für 10 min mit A: Medium ohne Serum, B: α -MSH (1 μ M) oder C: FSK (10 μ M) stimuliert. Die PepChips wurden für 48 h exponiert und die Betastrahlung mit Hilfe eines PhosphorImagers detektiert.

Alle drei Objektträger zeigten nach 48 h Exposition ein deutliches Phosphorylierungsmuster. Diese waren allerdings nicht homogen über den jeweiligen Objektträger verteilt, sondern die Phosphorylierungsintensität nahm von oben nach unten zu. Zudem waren auf den einzelnen Objektträgern unterschiedliche unspezifische Markierungen und der Hintergrund variierte ungleichmäßig über den gesamten Bereich. Prinzipiell waren die Duplikate am aussagekräftigsten, die zentriert lagen und keine Verbindung zum Rand hatten. Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen den einzelnen

Ergebnisse

Objektträgern waren nur schwach ausgeprägt und daher wegen der oben beschriebenen Störungen nicht leicht zu identifizieren.

Bei der Auswertung (siehe 4.2.3.8) ergab sich eine Anzahl von Punkten (Spalte: X, Reihe: Y), von denen sich der Mittelwert der α -MSH beziehungsweise FSK stimulierten Proben vom Basalwert unterschied. Diese Vorauswahl von über 100 Punkten wurde auf den unterschiedlichen Objektträgern optisch erneut verglichen und falsch positive Signale aussortiert. Dabei wurden unter anderem Punkte im Bereich des basalen PepScan in Reihe 75, Spalte 28 bis Reihe 84, Spalte 25-28 nicht berücksichtigt (Bereich rechts unten). Daraus ergab sich eine Liste von 55 Punkten, die sich in ihrer Intensität für α -MSH oder FSK vom Basalwert unterschieden (siehe Anhang, Seite XI).

Von diesen 55 Punkten (X/Y) wurden wiederum zehn ausgewählt, die potentiell bei der α -MSH-induzierten Signalkaskade eine Rolle spielen könnten. Bei den zurückgestellten Zielstrukturen handelt es sich unter anderem um Casein-Zielstrukturen (28/2, 21/7 und 15/22) und eine Reihe von Proteinen, die mit der Muskelkontraktion in Verbindung gebracht werden (zum Beispiel 25/3, 9/32 und 8/37). Des Weiteren wurden Zielproteine, die an der Stabilität und Plastizität der Zellen beteiligt sind, zurückgestellt (unter anderem 14/13, 22/23, 7/24 und 6/30) oder die sehr exklusiv in Hefen (13/2, 15/21 und 9/34) oder Spermien (14/4) vorkommen. Somit blieb eine vorerst getroffene Auswahl von Proteinen, die an der α -MSH-vermittelten Signaltransduktionskaskade beteiligt sein könnten. Anhand der komprimierten Liste wurden erneut die zehn putativen Ziele auf den Objektträgern zum direkten Vergleich gegenübergestellt.

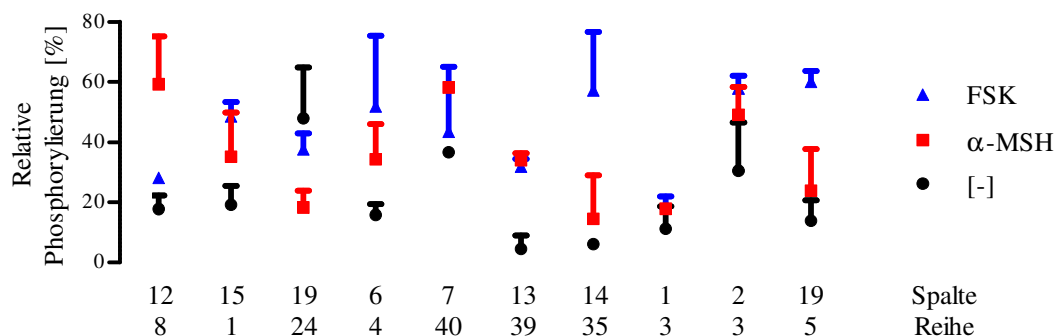


Abbildung 5.68: Quantifizierung einzelner Punkte der PepChips

Graphische Darstellung der Ergebnisse der PepChips nach Auswertung mit dem Programm ScanAlyze. Auswahl von zehn Punkten der PepChips, die sich unter den einzelnen Bedingungen unterscheiden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Fehlerbalken nur in eine Richtung dargestellt.

Ergebnisse

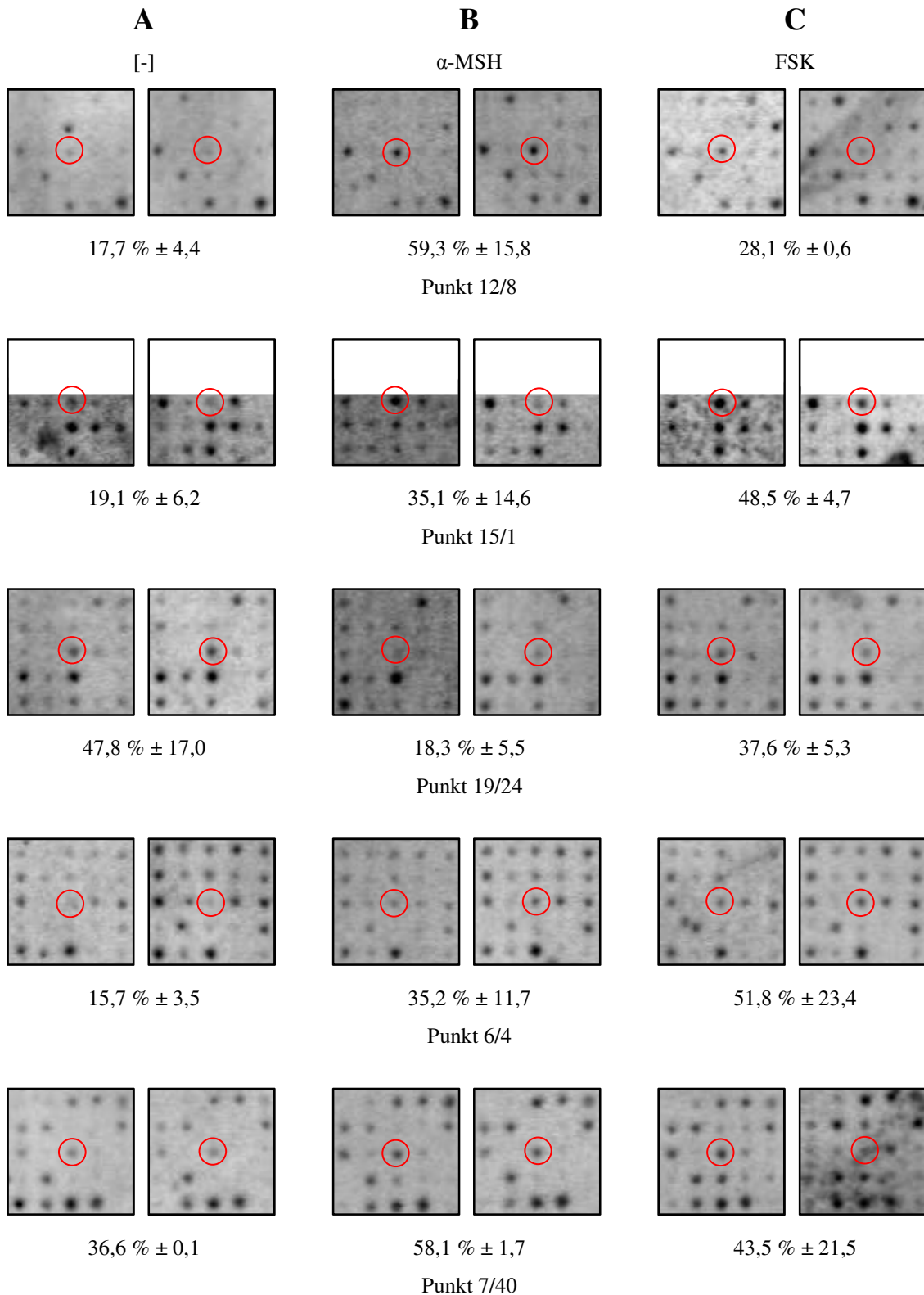


Abbildung 5.69: PepChip Teil I

Vergrößerung der jeweiligen Umgebung um den angegebenen Punkt (X/Y) auf dem PepChip. Das entsprechende Peptid ist rot markiert und die jeweiligen Duplikate sind direkt gegenübergestellt. Phosphorylierungsmuster des PepChips unter A: basalen Bedingungen, B: nach α -MSH und C: nach FSK Stimulation. Die Zahl gibt den Mittelwert der Intensitäten der jeweiligen normierten Duplikate an.

Ergebnisse

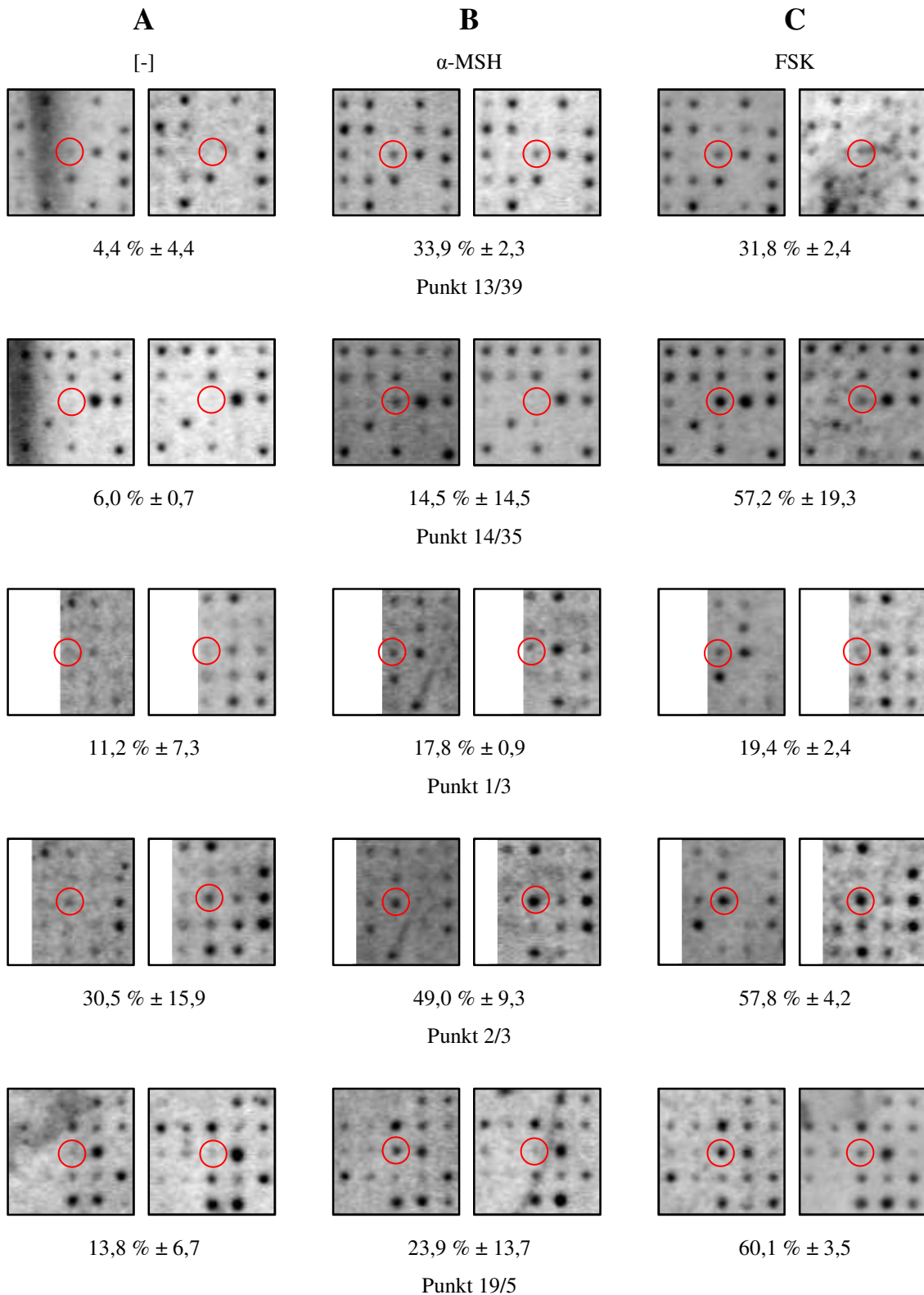


Abbildung 5.70: PepChip Teil II

Vergrößerung der jeweiligen Umgebung um den angegebenen Punkt (X/Y) auf dem PepChip. Das entsprechende Peptid ist rot markiert und die jeweiligen Duplikate sind direkt gegenübergestellt. Phosphorylierungsmuster des PepChips unter A: basalen Bedingungen, B: nach α -MSH und C: nach FSK Stimulation. Die Zahl gibt den Mittelwert der Intensitäten der jeweiligen normierten Duplikate an.

Ergebnisse

Die Peptidsequenz ist im Einbuchstabencode angegeben und die Position der Phosphorylierung im Zielprotein rot markiert. Des Weiteren ist sowohl die Kinase, die diese Position phosphoryliert, angegeben, als auch der Name der Zielstruktur, aus dem die Peptidsequenz stammt.

Tabelle 5.4: Positive Ziele der PepChip-Analyse

Spalte	Reihe	Sequenz	Position	Kinase	Zielstruktur
12	8	IEQF S TVKG	S-484	GRK5	G protein coupled receptor kinase
15	1	ILD T TGQEE	T-59		K-Ras
19	24	AR K SSAQL	S-179	PKA	Rap-1
6	4	R T P PPSG			Myelin basic protein
7	40	VGFM T EYVA	T-183		Kinase supressor of Sst2
13	39	PAS P SPQRQ	S-553	CDK5	Synapsin-1
14	35	PAAP S PGSS	S-67	ERK-1/2	Synapsin-1
1	3	RRA V SEQDA	S-19	CaMKII	Tyrosinhydroxylase
2	3	SE D N S EDEI	S-29	CKII	Acetyl-CoA carboxylase-1
19	5	PEE T QTQD	T-5	ds-DNA	Heat-shock protein 90

Schaute man sich anhand dieser Ergebnisse nochmal die 1176 Peptidsequenzen auf dem PepChip an, fand man weitere Peptide, die nach den vorher beschriebenen Ergebnissen unter serumhaltigen Bedingungen phosphoryliert sein sollten. Zum einen sind an Position 11/37 und an 22/12 Peptidsequenzen der ERK-2 angebracht, zum anderen befindet sich die Sequenz um das Threonin 172 der AMPK an Position 17/1.

Tabelle 5.5: PepChip Peptidsequenzen von ERK-1/2 und AMPK

Spalte	Reihe	Sequenz	Position	Kinase	Zielstruktur
11	37	FLTE Y VATR	Y-190		ERK-2
22	12	TGFL T EYVA	T-183		ERK-2
17	1	EFLR T SAGS	T-172	AMPKK	AMPK

Das Peptid an Position 11/37 entspricht mit der Sequenz FLTEYVATR genau der Konsensussequenz von MEK-1/2. Unter basalen Bedingungen zeigte sich keine Phosphorylierung der Peptidsequenz. Bei jeweils einem Duplikat, sowohl für α -MSH als auch für FSK, war eine leichte Phosphorylierung der Peptidsequenz erkennbar. Im

Ergebnisse

Gegensatz dazu wies die Peptidsequenz an Position 22/12 unter basalen Bedingungen eine starke Phosphorylierung auf, aber weder α -MSH noch FSK waren in der Lage diese Phosphorylierung zu steigern. Die Peptidsequenz an Position 17/1 ist aus der AMPK um das Threonin 172 abgeleitet, wobei das Serin an Position sieben (Serin 174 im Protein) durch ein Alanin ausgetauscht wurde. Weder unter basalen noch unter stimulierten Bedingungen war eine Phosphorylierung des Peptides zu erkennen.

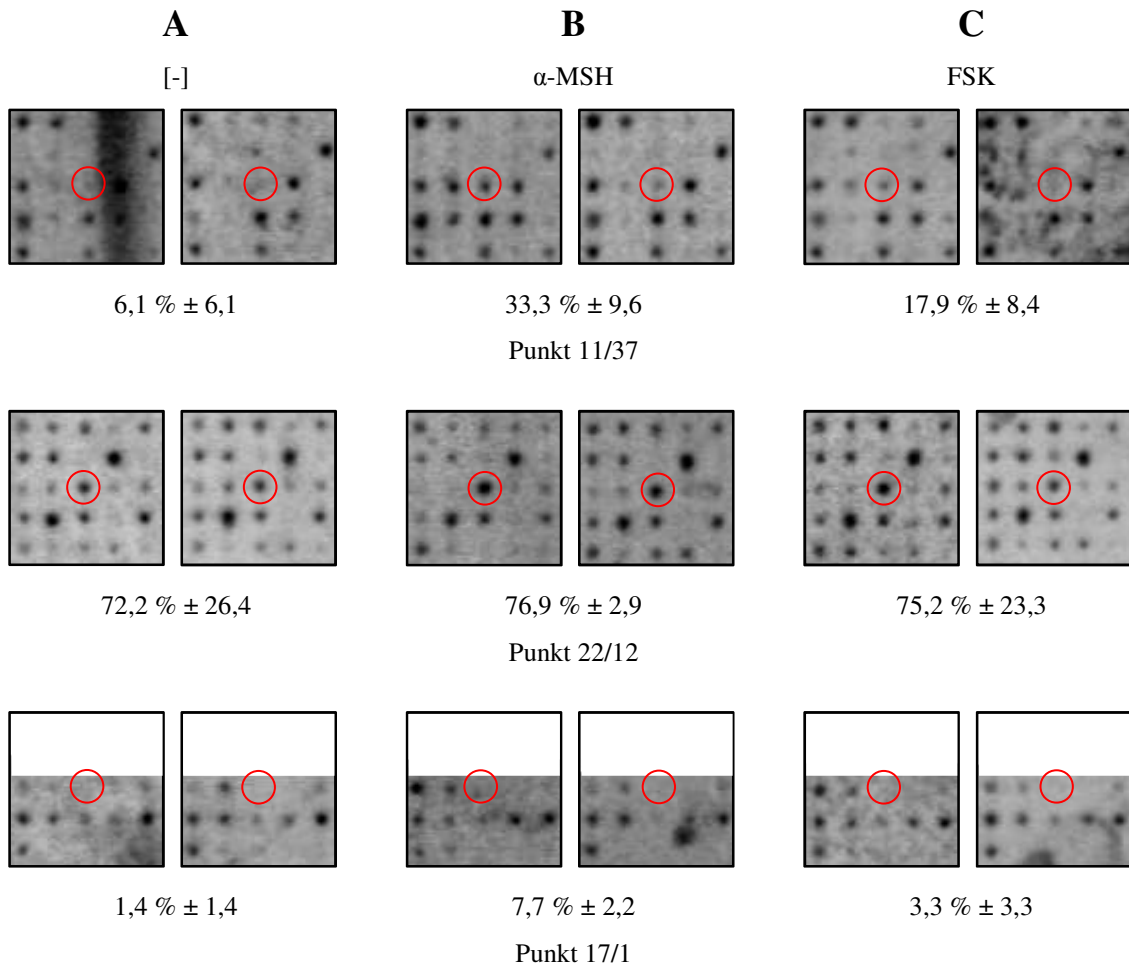


Abbildung 5.71: PepChip Teil III

Vergößerung der jeweiligen Umgebung um den angegebenen Punkt (X/Y) auf dem PepChip. Das entsprechende Peptid ist rot markiert und die jeweiligen Duplikate sind direkt gegenübergestellt. Phosphorylierungsmuster des PepChips unter A: basalen Bedingungen, B: nach α -MSH und C: nach FSK Stimulation. Die Zahl gibt den Mittelwert der Intensitäten der jeweiligen normierten Duplikate an.

6 Diskussion

6.1 α -MSH-induzierte Signalwege nach Serumentzug

Der MC4R im Hypothalamus stellt einen entscheidenden Punkt bei der Energie-regulation des Körpers dar und ist damit eine vielversprechende pharmakologische Zielstruktur zur Behandlung von Adipositas. Trotz der enormen Bedeutung dieses Rezeptors ist bemerkenswert wenig über die MC4R-induzierten Signalwege bekannt.

In dieser Arbeit konnten erstmalig in immortalisierten hypothalamischen Zellen, die endogen den MC4R exprimieren, mit dem natürlichen MC4R Agonisten α -MSH-induzierte Signalwege charakterisiert werden. Dabei kommt der MC4R-vermittelten Regulation der AMPK eine besondere Bedeutung zu, da der AMPK bereits eine entscheidende Rolle im Hypothalamus zugeordnet werden konnte. Wie unter 3.8.3 beschrieben, wird die AMPK durch diverse Stimuli, die an der Energiehomöostase beteiligt sind, reguliert. Dabei führen Faktoren wie Leptin, Insulin und GLP-1 zu einer verminderten AMPK Phosphorylierung und damit zu einer Gewichtsabnahme, während Stimuli wie Adiponektin und Ghrelin den gegenteiligen Effekt haben. Bisher war kein direkter Zusammenhang zwischen einer MC4R-vermittelten Stimulation mit α -MSH und einer AMPK Dephosphorylierung bekannt. Eine Arbeitsgruppe konnte zwar eine Melanocortin-vermittelte AMPK Dephosphorylierung in nah verwandten immortalisierten hypothalamischen GT1-1 Zellen zeigen, allerdings wurde zum einen der synthetische Agonist NDP-MSH verwendet, und zum anderen wurde keine Beteiligung des MC4R nachgewiesen. Zusätzlich konnte kein Signalweg, der zu diesem Effekt führt, aufgezeigt werden [Chai, 2010].

Unabhängig vom MC4R wurde bisher für verschiedene GPCR, zum Beispiel Adrenorezeptoren, eine Regulation der AMPK beschrieben [Hutchinson, 2008]. Allerdings wurde die Aufklärung des molekularen Mechanismus der zugrunde liegenden Signaltransduktionskaskade trotz der schon beschriebenen Komplexität bislang kaum Aufmerksamkeit gewidmet. Dabei ist eine Aktivierung der CaMKK über eine Erhöhung der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration, die anschließend in einer AMPK Aktivierung resultiert, am besten etabliert [Kishi, 2000; Hsu, 2011]. Daher

stellt diese Arbeit die erste Beschreibung einer Signalkaskade von der Stimulation eines GPCR bis zu der Dephosphorylierung der AMPK über LKB1 dar. Damit konnten zwei bedeutende Faktoren der Energieregulation funktionell miteinander verknüpft werden und durch die detaillierten Kenntnisse des Signalwegs bieten sich neue Ansatzpunkte für die medikamentöse Behandlung von Adipositas.

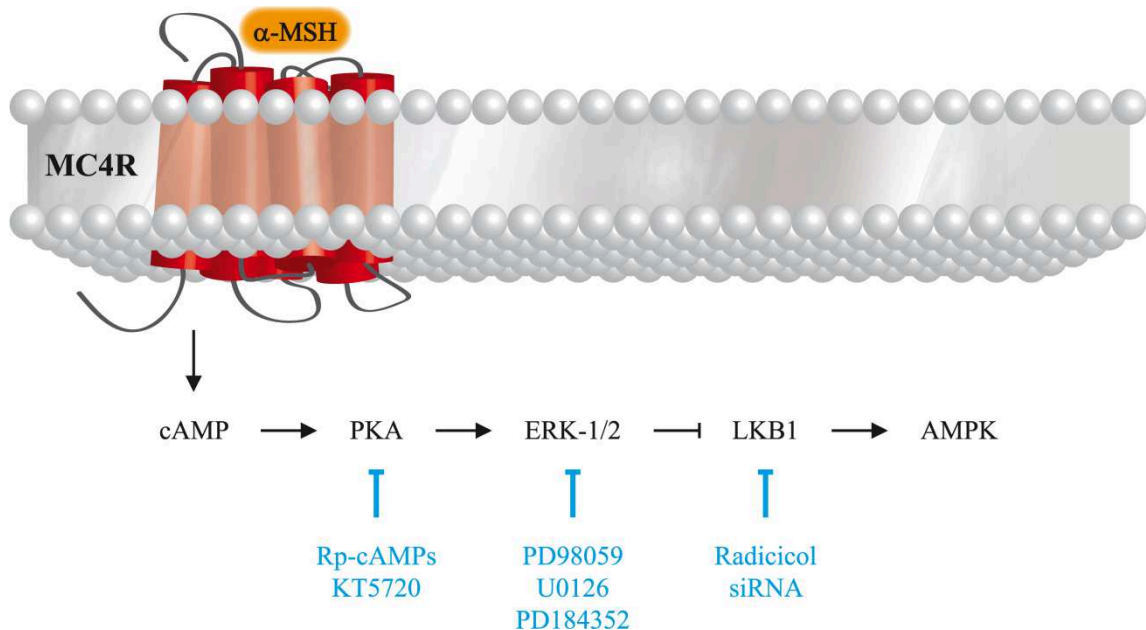


Abbildung 6.1: α -MSH-induzierter Signalweg unter serumfreien Bedingungen

Die Aktivierung des MC4R mit α -MSH führt über G_s -Proteine zu einem Anstieg des cAMP-Spiegels und einer Aktivierung der PKA. Dieses führt dann zu einer Phosphorylierung und Aktivierung von ERK-1/2. ERK-1/2 wiederum ist in der Lage die konstitutiv aktive LKB1 zu inhibieren, was zu einer Inhibition der nachgeschalteten AMPK führt. Der α -MSH-induzierte Signalweg ist in schwarz dargestellt, die Inhibitoren die zu dessen Identifizierung beigetragen haben in blau.

Die Ergebnisse der Untersuchung des α -MSH-induzierten Signalweges in GT1-7 Zellen sind in Abbildung 6.1 graphisch dargestellt und im Folgenden kurz zusammengefasst. Die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH führt über die Aktivierung von G_s -Proteinen zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Anschließend kommt es zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Sowohl die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung, als auch die AMPK Dephosphorylierung sind abhängig von einer Aktivierung der PKA. Die Hemmung der ERK-1/2-Aktivität mit MEK-Inhibitoren führt zu einem Anstieg der AMPK Phosphorylierung an Threonin 172, es besteht also ein inverser Zusammenhang zwischen den beiden Kinasen. Des Weiteren können die α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK durch die Blockade der ERK-1/2 vollständig aufgehoben werden. Die

Inhibition der AMPKK LKB1 resultiert in einer verminderten basalen AMPK Phosphorylierung, während die Inhibition der CaMKK und der TAK1 keinen Effekt zeigt. Zusätzlich führt die Inhibition der LKB1 zum Verlust der α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK. Damit ergibt sich die in Abbildung 6.1 dargestellte α -MSH-induzierte lineare Signaltransduktionskaskade.

6.1.1 PKA-Abhängigkeit der ERK-1/2-Regulation

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung in GT1-7 Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich ist dies die erste Studie, die auf zellulärer Ebene zeigt, dass die Stimulation des MC4R über die Aktivierung der PKA diese Effekte vermittelt. In verschiedenen Zellsystemen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung des MC4R in einer ERK-1/2 Phosphorylierung resultiert, allerdings nur mit synthetischen Agonisten (siehe 3.6.3). In den MC4R überexprimierenden, COS-1, CHO-K1, und HEK-293 Zellen führt eine Stimulation mit NDP-MSH, beziehungsweise MT-II, zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung [Daniels, 2003; Vongs, 2004; Chai, 2006; Patten, 2007]. Dabei zeigt sich unter anderem eine Abhängigkeit von der PI3K oder von PTX-sensitiven G-Proteinen, aber keine PKA-Abhängigkeit der ERK-1/2-Regulation. In GT1-1 Zellen dagegen ist die NDP-MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung abhängig von Calcium-Ionen und PKC [Chai, 2006]. Daher zeigt sich zum einen, dass das gewählte Zellsystem ein entscheidender Faktor bei der Untersuchung von Signalwegen darstellt, und zum anderen, dass in Überexpressionssystemen substantielle Änderungen von MC4R-vermittelten Signaltransduktionskaskaden auftreten können. Ein Indiz für eine PKA-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung liefern Ergebnisse aus *in vivo* Experimenten in Ratten. Im NTS, einem Kerngebiet im Hirnstamm, in dem auch der MC4R exprimiert wird, ist die MT-II-vermittelte Phosphorylierung der ERK-1/2 ebenfalls durch Rp-cAMPs blockierbar und damit PKA-abhängig [Sutton, 2005].

Die beiden PKA-Inhibitoren Rp-cAMPs und KT5720 führen nach 30 min in GT1-7 Zellen zu einer Erhöhung der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung. Nach der in Abbildung 6.1 dargestellten Signalkaskade sollte die Aktivierung der PKA zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 führen und in folge dessen eine Inhibition der PKA mit Rp-cAMPs und KT5720 nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einer verringerten

Phosphorylierung der ERK-1/2. Da zwei spezifische PKA-Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen denselben Effekt auf die basale ERK-1/2 Phosphorylierung haben, scheint es sich nicht um einen vollständig unspezifischen Effekt zu handeln. Rp-cAMPs agiert als kompetitiver Antagonist an der cAMP-Bindungsstelle, während KT5720 die ATP-Bindungs-Domäne der PKA blockiert [Murray, 2008]. Die gesteigerte Phosphorylierung der ERK-1/2 kann nicht durch Lösungsmittelleffekte der Inhibitoren erklärt werden, da zum einen Rp-cAMPs in H₂O gelöst ist, zum anderen hat die zu KT5720 äquivalente Konzentration DMSO keinen Einfluss auf die ERK-1/2 Phosphorylierung. Warum eine längere Inkubation der GT1-7 Zellen mit PKA-Inhibitoren zu einem Anstieg der basalen ERK-1/2 Phosphorylierung führt, konnte nicht endgültig geklärt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Aktivierung der PKA über die Aktivierung von Rap-1 zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führen kann. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass die PKA über die direkte Inhibition von B-Raf und C-Raf zu einer ERK-1/2 Inhibition beiträgt (siehe Abbildung 3.7). In Abhängigkeit von der potentiell unterschiedlichen Aktivität von Rap-1 beziehungsweise Raf-spezifischen Phosphatasen ist durchaus vorstellbar, dass bei einer längeren Inhibition der PKA der ERK-1/2-stimulierende Signalweg über die beiden Raf-Isoformen dominiert. Die Reduktion der Inkubationszeit der beiden Inhibitoren auf 10 min hingegen führt zu einer verminderten basalen ERK-1/2 Phosphorylierung was zu diesem Zeitpunkt auf eine Rap-1-Dominanz hindeutet.

Unabhängig von der Zeit, die den beiden PKA-Inhibitoren für ihre Wirkung zur Verfügung steht, verhindern sie die α -MSH-induzierte ERK-1/2 Phosphorylierung, so dass die PKA vollständig für die MC4R-vermittelte ERK-1/2 Phosphorylierung verantwortlich ist.

6.1.2 PKA-Abhängigkeit der AMPK-Regulation

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine PKA-Abhängigkeit der Inhibition der AMPK gezeigt werden. Ein Zusammenspiel von PKA und AMPK ist in der Literatur vor allem für verschiedene Zelllinien des Fettgewebes beschrieben. Im Vergleich mit dieser Arbeit führt eine Aktivierung der PKA in vielen Studien allerdings zu einer Aktivierung der AMPK und nicht, wie hier gezeigt, zu einer Inhibition. FSK führt über die Erhöhung des cAMP-Spiegels in 3T3-L1 Adipozyten zu einer Aktivierung der

AMPK [Yin, 2003]. Allerdings scheint diese Aktivierung nicht durch eine direkte Interaktion stattzufinden, sondern die Stimulation mit FSK führt PKA-abhängig zur Lipolyse, die dann wiederum in einer Aktivierung der AMPK resultiert [Gauthier, 2008]. Die Stimulation von Adipozyten mit Noradrenalin führt über β -Adrenorezeptoren zu einer Erhöhung der PKA-Aktivität und einer Aktivierung der AMPK [Hutchinson, 2005]. In der Leber führt die Stimulation mit Glucagon sowohl zu einer Aktivierung der PKA, der LKB1 und der AMPK, allerdings wurde kein funktioneller Zusammenhang zwischen den einzelnen Komponenten gezeigt [Kimball, 2004].

Eine direkte PKA-vermittelte Inhibition der AMPK ist, ausgehend von einer mechanistischen Betrachtungsweise, auf zwei Arten möglich. Zum einen konnte gezeigt werden, dass in Adipozyten die PKA das Serin 173 der AMPK phosphoryliert und somit die Phosphorylierung an Threonin 172 durch die LKB1 verhindert [Djouder, 2010]. Der in dieser Studie genutzte Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 173 ist nicht kommerziell erhältlich, so dass diesem Ansatz nicht nachgegangen werden konnte. Zum anderen ist die PKA in der Lage das Serin 485 zu phosphorylieren und damit die AMPK-Aktivität zu beeinflussen (siehe 3.8.5). In INS-1 Zellen, β -Zellen aus der Ratte, führt die Stimulation mit FSK über die Phosphorylierung der AMPK an Serin 485 und gleichzeitiger Inhibition der CaMKK zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172 [Hurley, 2006]. In MG63 Zellen führt die Stimulation mit Prostaglandin E₂ (PGE₂) über die beiden GPCRs EP2 und EP4 zu einer PKA-vermittelte Phosphorylierung an Serin 485 und damit Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172 [Funahashi, 2009].

Es sprechen allerdings zwei Befunde gegen eine direkte Interaktion der PKA mit der AMPK. Zum einen führt in GT1-7 Zellen die Stimulation mit α -MSH nicht zu einer PKA-abhängigen Phosphorylierung an Serin 485 [Damm, 2012]. Zum anderen resultiert die Stimulation mit α -MSH in einer Aktivierung der ERK-1/2, die ebenfalls an der AMPK-Regulation beteiligt ist.

6.1.3 ERK-1/2-Abhängigkeit der AMPK-Regulation

Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der MEK und damit gleichzeitig eine Inhibition der positiv nachgeschalteten ERK-1/2 durch drei unterschiedliche Inhibitoren zu einer deutlich erhöhten AMPK Phosphorylierung an Threonin 172 führt. Da die

indirekte Inhibierung von ERK-1/2 Auswirkungen auf die AMPK hat, muss ERK-1/2 eine vorgeschaltete Komponente in der Signalkaskade sein. Wäre die ERK-1/2 ein nachgeschaltetes Signalprotein in der Kaskade, hätte ihre Inhibition keine Auswirkung auf die AMPK Phosphorylierung. Das heißt in GT1-7 Zellen gibt es eine inverse Korrelation zwischen ERK-1/2 und der nachgeschalteten AMPK. Demnach führt schließlich eine Aktivierung der ERK-1/2 zu einer Inhibierung der AMPK.

Zusätzlich kann die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung vollständig durch alle drei MEK-Inhibitoren blockiert werden. Nicht nur auf basaler Ebene besteht also ein Zusammenhang zwischen der ERK-1/2 und der AMPK, sondern auch die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig.

Wie schon in 3.9 beschrieben, sind in der Literatur verschiedene Verknüpfungen zwischen der ERK-1/2 und der AMPK aufgezeigt. Eine direkte Interaktion zwischen den beiden Kinasen ist allerdings nicht bekannt, daher muss noch eine weitere Komponente in der Kaskade involviert sein. Dabei muss es sich entweder um eine konstitutiv aktive Threonin 172 Kinase, die durch ERK-1/2 inhibiert wird, oder um eine Phosphatase, die durch ERK-1/2 aktiviert wird, handeln.

6.1.4 Die LKB1 als AMPKK

Es sind zwei Phosphatasen bekannt, die in der Lage sind die AMPK an Threonin 172 zu dephosphorylieren. Zum einen die Protein Phosphatase (PP) 2C und zum anderen PP2A [Davies, 1995; Wu, 2007]. Dabei stellen die beiden Phosphatasen eher einen Rückstellmechanismus dar, um die durch eine AMPKK phosphorylierte AMPK wieder in den Grundzustand zurückzusetzen [Hardie, 2011]. Die genauen Mechanismen, die der Regulation durch Phosphatasen zugrunde liegen, sind noch unklar und müssen erst noch genauer charakterisiert werden [Carling, 2011]. Bisher ist noch kein Signalweg bekannt, bei dem eine Phosphatase GPCR-vermittelt an einer Inhibition der AMPK beteiligt ist.

Wie unter 3.8.6 beschrieben sind drei Kinasen etabliert, die in der Lage sind das Threonin 172 der AMPK zu phosphorylieren: TAK1, CaMKK und LKB1. Für eine erste Validierung wurden die Effekte von spezifischen Inhibitoren gegen die entsprechende AMPKK auf die basale Phosphorylierung der AMPK getestet. Für die Untersuchung der LKB1 wurde der etablierte indirekte Inhibitor Radicol eingesetzt. Radicol inhibiert Hsp90, einen LKB1-Stabilisator, und führt somit zu einer

reduzierten LKB1 Expression [Boudeau, 2003]. Die Behandlung der GT1-7 Zellen mit Radicol führt simultan zu einer Reduktion der LKB1 Expression und zu einer verminderten Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Eine neue Studie zeigt allerdings, dass Hsp90 ebenfalls direkt mit der AMPK interagieren kann. In HEK-293 Zellen und HeLa Zellen konnte gezeigt werden, dass Hsp90 direkt mit der α - und der γ -Untereinheit der AMPK interagiert [Zhang, 2012]. Von daher wäre es möglich, dass die Radicol-vermittelte verminderte AMPK Phosphorylierung nicht durch die simultane Reduktion der LKB1 Expression zu Stande kommt, sondern dass eine Modulation der direkten Interaktion von Hsp90 mit der AMPK zu einer verminderten AMPK Phosphorylierung führt. Allerdings sprechen die Versuche unter serumhaltigen Bedingungen gegen diese Theorie, da die AMPK Phosphorylierung an Threonin 172 und die LKB1 Expression unter diesen Bedingungen nicht mehr im gleichen Maße durch Radicol moduliert werden. Würde die Hsp90 Inhibition direkte Auswirkungen auf die AMPK haben, sollte die Inhibition durch Radicol unter beiden Bedingungen im gleichen Maße stattfinden und die Phosphorylierung der AMPK nicht von 0,52-fach auf 0,81-fach von basal steigen, während die Auswirkung auf die LKB1 nicht signifikant verändert ist (siehe Abbildung 5.39 und Abbildung 5.63).

Um die Möglichkeit einer unspezifischen Regulation durch Radicol zu umgehen, wurden zusätzlich drei siRNAs gegen die LKB1 eingesetzt. Dabei zeigen alle drei eine Inhibition der LKB1 Expression und simultan eine Verminderung der AMPK Phosphorylierung an Threonin 172. Trägt man die Abnahme der LKB1 Expression gegen die Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 auf, ergibt sich die in Abbildung 5.46 dargestellte Gesetzmäßigkeit, wobei sowohl eine exponentielle als auch eine lineare Abhängigkeit der beiden Größen voneinander möglich ist. Die Abweichung von der perfekten linearen Korrelation mit einem Regressionskoeffizient von 0,92 kann mehrere Gründe haben. Zum einen ist es möglich, dass die LKB1 nicht die einzige vorgeschaltete Kinase der AMPK in diesem Zellsystem ist. Da mit Hilfe von Inhibitoren schon gezeigt werden konnte, dass weder die CaMKK noch die TAK1 an der Regulation der AMPK beteiligt sind (siehe 5.2.2.6), müsste es sich um eine vierte, bisher unbekannte AMPKK, handeln. Eine weitere Erklärung wäre, dass der Antikörper gegen das Threonin 172 der AMPK nicht nur exklusiv das Protein erkennt, wenn es phosphoryliert ist, sondern auch zu einem gewissen Anteil das nicht phosphorylierte

Protein. Das würde zu einem anfangs linearen Abfall der Kurve führen, der sich dann einem Plateau nähert. Das Plateau stellt dabei die „unspezifischen“ Bindung des AMPK Antikörpers dar und kann durch einen exponentiellen Abfall der Kurve beschrieben werden. Dabei beträgt der Regressionskoeffizient 0,93 mit einem Plateau bei 23 % der relativen AMPK Phosphorylierung. Die zweite Interpretation würde mit den Ergebnissen mit dem AMPK Antikörper gegen das Threonin 172 übereinstimmen, da unter keiner Bedingung ein vollständiger Verlust der immunoreaktiven Bande gezeigt werden konnte. Bei konsequenter Subtraktion der postulierten „unspezifischen“ Bindung des phosphospezifischen AMPK Antikörpers folgt, dass die α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK deutlich stärker sind und die Ergebnisse daher unterschätzt würden. Für das Aufklären des detaillierten Zusammenhangs zwischen der LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung wären weitere Experimente notwendig. Unter anderem könnten Kinase-Aktivitätsversuche helfen, die genaue Beziehung zwischen der LKB1 und der AMPK zu identifizieren. Unabhängig von dieser Problematik konnte durch den Inhibitor Radicicol und den Einsatz von siRNAs die dominierende Bedeutung der LKB1 als AMPKK in GT1-7 Zellen etabliert werden.

Neben den Effekten auf den basalen Phosphorylierungszustand führen sowohl Radicicol als auch die siRNAs, zu einer fast vollständigen Inhibition der α -MSH-induzierten Effekte auf die AMPK Phosphorylierung, während die Effekte auf die ERK-1/2 Phosphorylierung nicht beeinflusst werden, was für eine lineare Anordnung der einzelnen Komponenten in der Kaskade spricht. Eine Arbeitsgruppe liefert dabei einen möglichen Mechanismus für den Zusammenhang zwischen der ERK-1/2 Aktivierung und der AMPK Inaktivierung über LKB1. In Melanom Zellen führt eine konstitutiv aktive B-Raf zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2. Diese phosphoryliert das Serin 325 der konstitutiv aktiven LKB1, die somit gehemmt wird. Damit wird auch die nachgeschaltete Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 vermindert [Zheng, 2009]. Da der LKB1 Antikörper gegen das Serin 325 nicht kommerziell erhältlich ist, kann an diesem Punkt nur spekuliert werden, dass α -MSH die LKB1 eben über jenes Serin reguliert. Allerdings ist die Beteiligung der LKB1 an den α -MSH-vermittelten Effekten durch den indirekten Inhibitor Radicicol und den Einsatz von siRNAs nachgewiesen und somit ergibt sich die in Abbildung 6.1 dargestellte, lineare Signaltransduktionskaskade.

6.1.5 Vergleich mit *in vivo* Befunden

In GT1-7 Zellen führt die Stimulation mit α -MSH in einer linearen Kaskade zu einer Dephosphorylierung der AMPK bei der PKA, ERK-1/2 und LKB1 involviert sind. Den beteiligten Komponenten konnte größtenteils *in vivo* schon eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Energiehaushaltes zugeordnet werden.

Die PKA besteht aus jeweils zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten [Murray, 2008]. Die regulatorische Untereinheit RII β zeigt ein hohes Expressionsniveau im Gehirn und ist für die Inhibition der basalen PKA-Aktivität verantwortlich [Licameli, 1992; Cummings, 1996]. Der zusätzliche *knock out* der RII β -Untereinheit in der A^{vy} -Maus führt dazu, dass der Agouti-induzierte Phänotyp fast vollständig aufgehoben wird [Czyzyk, 2008]. Die zweifach genmanipulierten Mäuse sind durch die Aktivierung der PKA kleiner, fressen und wiegen weniger und auch die Leptinspiegel sinken wieder im Vergleich zu der A^{vy} -Maus. Die PKA spielt also eine entscheidende Rolle bei der Energieregulation im Hypothalamus. ERK-1/2 hat ebenfalls im Hypothalamus bei der Nahrungsaufnahme eine wichtige Aufgabe. Die Injektion von MT-II führt zu einer verminderten Nahrungsaufnahme in Ratten, die durch einen MEK-Inhibitor fast vollständig blockierbar ist [Sutton, 2005]. Zusätzlich führt die Injektion von MT-II zu einer Dephosphorylierung der AMPK in verschiedenen Bereichen des Hypothalamus [Minokoshi, 2004]. Wie unter 3.8.3 beschrieben spielt die AMPK im Hypothalamus ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Energieregulation. Dabei führt eine Phosphorylierung der AMPK zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme, während die Dephosphorylierung den gegenteiligen Effekt hat.

Die in dieser Arbeit dargestellte α -MSH-induzierte Signalkaskade in GT1-7 Zellen stimmt damit mit bisherigen *in vivo* Befunden überein. Des Weiteren wurden hier die verschiedenen Komponenten auf zellulärer Ebene verknüpft und bilden ein einheitliches Bild mit den *in vivo* Daten aus der Literatur.

6.2 α -MSH-induzierte Signalwege unter serumhaltigen Bedingungen

Der AMPK wurde nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Energiehomöostase des Körpers zugewiesen, sondern sie fungiert auch als Energiesensor der Zelle. Dabei reagiert die AMPK auf das Fehlen von Nährstoffen wie Glucose oder Wachstumsfaktoren und wird vermutlich so über einen Anstieg des AMP/ATP-Ratios aktiviert [Hardie, 1997]. Da die Versuchsdurchführung unter serumfreien Bedingungen schon die Aktivität der AMPK moduliert (siehe 5.3), sollte geklärt werden, ob die α -MSH-induzierte Signalkaskade durch den Serumentzug beeinflusst wird. Daher wurde in dieser Arbeit die α -MSH-induzierte Signalkaskade auch unter serumhaltigen Bedingungen untersucht.

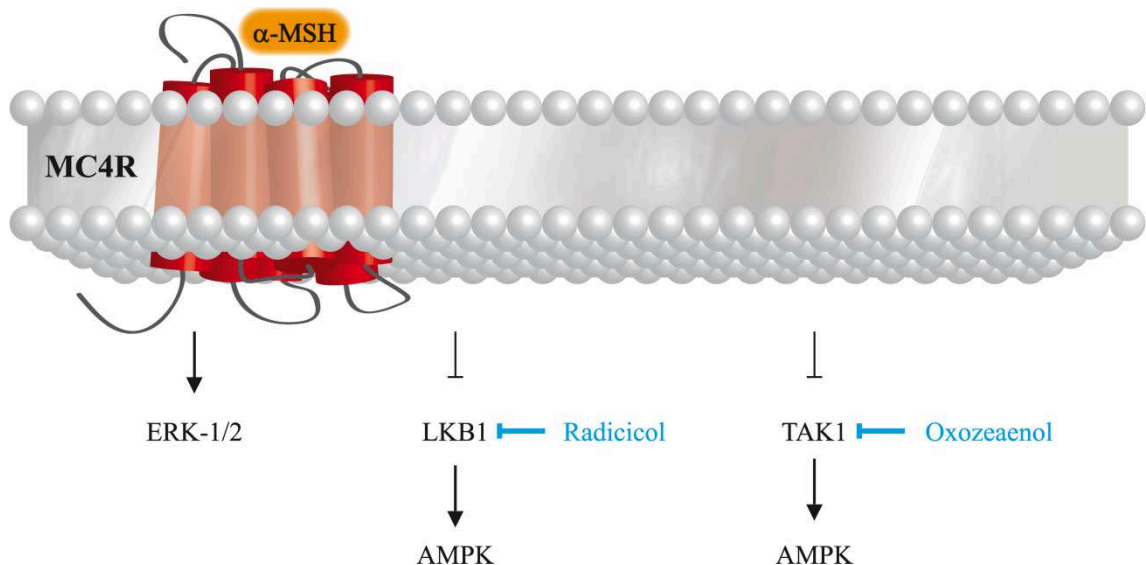


Abbildung 6.2: α -MSH-induzierte Signalwege unter serumhaltigen Bedingungen

Die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH führt zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und parallel zu einer Dephosphorylierung der AMPK, die sowohl von der AMPKK LKB1 als auch von TAK1-abhängig ist. Die durch α -MSH regulierten Effektoren sind in schwarz dargestellt, die Inhibitoren die zu deren Identifizierung beigetragen haben in blau.

Zusammenfassend ergab sich dabei folgendes Bild: Die Stimulation der GT1-7 Zellen mit α -MSH unter serumhaltigen Bedingungen führt, wie unter serumfreien Bedingungen, zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Allerdings ist die Regulation der AMPK nicht mehr PKA- und ERK-1/2-abhängig. Zusätzlich wird die AMPK nicht mehr exklusiv über LKB1 reguliert, sondern die AMPKK TAK1 spielt, sowohl bei den

basalen, als auch bei den α -MSH-induzierten Effekten, eine Rolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.2. zusammengefasst.

Der letzte Unterschied ist besonders interessant, da die Regulation der AMPK in den verschiedenen Organen meist exklusiv durch eine AMPKK gesteuert wird. Bisher gibt es nur zwei Arbeiten, die eine duale Regulation der AMPK aufzeigen. Im Herzmuskel von Ratten, die spontan einen diabetischen Phänotyp entwickeln („spontaneous Diabetic Torii“), korreliert sowohl die LKB1, als auch die TAK1 Expression mit dem Phosphorylierungsstatus der AMPK [Lakshmanan, 2012]. In einer weiteren Arbeit konnte in hippocampalen Neuronen durch die Gabe (ip) von Cyclosporin A (CsA), einem Calcineurin-Inhibitor, die gleichzeitige Phosphorylierung der LKB1 an Serin 431 und der Phosphorylierung der TAK1 an Threonin 184/187 induziert werden, was zusätzlich zu einer Aktivierung der AMPK führte [Park, 2011]. Weder wurde dabei untersucht welche Komponenten die LKB1 und TAK1 regulieren, noch, ob es sich dabei um dasselbe Protein handelt. Es konnte noch nicht geklärt werden, wie generell die Aktivierung eines GPCR zu einer TAK1-Regulation führen kann.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen unter serumfreien Bedingungen ist die α -MSH-vermittelte AMPK-Regulation unter serumhaltigen Bedingungen nicht mehr MEK-abhängig. Allerdings wird durch die beiden MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 die basale AMPK Phosphorylierung leicht gesteigert, während der Inhibitor PD184352 keinen Einfluss nimmt (siehe Abbildung 5.59). Eine Arbeitsgruppe konnte 2005 zeigen, dass die beiden MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126, nicht aber PD184352, konzentrationsabhängig zu einer gesteigerten Phosphorylierung der AMPK an Threonin 172 und damit zu einer Erhöhung der AMPK-Aktivität führen [Dokladda, 2005]. Allerdings liegt dieser Effekt nicht an einem direkten funktionellen Zusammenhang zwischen ERK-1/2 und AMPK, sondern an einer Erhöhung der AMP/ATP-Ratio in der Zelle durch die Inhibitoren und einer daraus resultierenden gesteigerten AMPK-Aktivität. Nur der MEK-Inhibitor PD184352 führt nicht zu einer verfälschten AMPK-Aktivierung über eine gesteigerte AMP/ATP-Ratio. Die Befunde dieser Arbeit unter serumhaltigen Bedingungen stimmen mit den Ergebnissen der oben erwähnten Gruppe überein. Die gesteigerte AMPK Phosphorylierung kann durch eine steigende AMP/ATP-Ratio durch PD98059 und U0126 erklärt werden, wofür ebenfalls

das Ausbleiben dieses Effektes durch PD184352 spricht. Es gibt also unter serumhaltigen Bedingungen weder auf basaler Ebene, noch im Bezug auf α -MSH einen Zusammenhang zwischen ERK-1/2 und AMPK.

6.2.1 PepChip-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PepChips eingesetzt, um unter serumhaltigen Bedingungen neue Komponenten der α -MSH-induzierten, MC4R-vermittelten Signaltransduktionskaskade zu identifizieren. Dabei wird der Aktivitätszustand verschiedener Kinasen in der Zelle durch die Übertragung eines radioaktiv markierten Phosphatrestes auf unterschiedliche Peptidsequenzen, die auf einem Objektträger immobilisiert sind, identifiziert.

Insgesamt ergaben sich nach der Stimulation mit α -MSH zehn Peptide, die im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen einen signifikant veränderten Phosphorylierungsstatus aufwiesen. Der erste positive Punkt auf dem PepChip verbindet die Stimulation der GT1-7 Zellen mit α -MSH mit einer GPCR Aktivierung. Die Peptidsequenz an Position 12/8 entspricht einer Sequenz aus der GRK5, einer Proteinkinase, die an der Deaktivierung von GPCRs beteiligt ist (siehe 3.4). Nach Agonisten-induzierter Aktivierung des Rezeptors phosphorylieren die GRKs diesen an intrazellulären Serinen und Threoninen, so dass Arrestine an den Rezeptor binden und diesen internalisieren können [Buenemann, 1999; Premont, 2007]. Die GRK5 ist eine von sieben GRKs und wird auch im Gehirn exprimiert, unter anderem auch im Hypothalamus [Erdtmann-Vourliotis, 2001]. Auch in GT1-7 Zellen werden verschiedene GRK-Subtypen exprimiert, die zudem an der MC4R Internalisierung beteiligt sind [Shinyama, 2003]. Somit würde sich folgendes Modell ergeben: Die Aktivierung des MC4R durch α -MSH führt zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der GRK5, die dann das Agonisten-induzierte Signal durch Phosphorylierung des MC4R abschaltet. Zu diesem Befund passt auch, dass FSK als G-Protein-unabhängiger Stimulus nicht zu einer Phosphorylierung des Peptids an Position 12/8 führt, was für die hohe Spezifität des α -MSH-induzierten Signals spricht.

Die beiden Peptide an Position 15/1 und 19/24 sind Fragmente von Mitgliedern der Superfamilie der kleinen GTPasen, K-Ras und Rap-1 [Wennerberg, 2005]. Beide sind, wie unter 3.7.2 beschrieben, beteiligte Komponenten bei der Regulation der

ERK-1/2. Dabei führt die Aktivierung der K-Ras zu einer Aktivierung von C-Raf und einer anschließenden ERK-1/2 Phosphorylierung, während die Aktivierung von Rap-1 über B-Raf zu einer Aktivierung der ERK-1/2 führt [Vossler, 1997; Takai, 2001]. Das Threonin 59 von K-Ras befindet sich in der GTP-Bindestelle des Proteins und wird durch Übertragen des Phosphatrestes von GTP phosphoryliert und somit aktiviert [Shih, 1982]. Das Serin 179 von Rap-1 wird durch PKA phosphoryliert und ist für seine Aktivität essentiell [Altschuler, 1993; Ribeiro-Neto, 2002]. Die Stimulation der GT1-7 Zellen mit α -MSH führt zu einer Phosphorylierung von K-Ras an Threonin 59 und damit zu dessen Aktivierung und gleichzeitig zu einer verminderten Phosphorylierung von Rap-1 an Serin 179 und damit zu dessen Inaktivierung. Das steht interessanterweise im Kontrast zu den oben diskutierten Ergebnissen unter serumfreien Bedingungen, bei denen die ERK-1/2 Aktivierung wahrscheinlich über Rap-1 und B-Raf verläuft (siehe Abbildung 3.7). Demnach läuft die α -MSH-vermittelte ERK-1/2 Aktivierung unter serumhaltigen Bedingungen nicht über Rap-1 und B-Raf, sondern über K-Ras und C-Raf. Eventuell liegt schon in diesem frühen Stadium der Signaltransduktionskaskade der entscheidende Punkt für die später unterschiedliche Regulation der AMPK. FSK erhöht auf dem PepChip ebenfalls den Phosphorylierungsstatus von K-Ras und dephosphoryliert Rap-1. Die Aktivierung von ACs über FSK sollte zu einer Aktivierung der PKA und damit verbunden zu einer Rap-1 Aktivierung führen, nicht aber zu einer Ras Aktivierung [Vossler, 1997]. Da es aber die Tendenz der α -MSH-vermittelten Effekte widerspiegelt, deuten die Ergebnisse auf eine AC-, aber nicht PKA-Abhängigkeit der Effekte hin.

Die durch α -MSH erhöhte Phosphorylierung der beiden Punkte an Position 7/40 und 6/4 spricht für eine ERK-1/2-Regulation. Der Punkt 7/40 steht für eine Sequenz aus dem „kinase supressor of Sst2“ (KSS1), der Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [Errede, 1995]. KSS1 ist eine MAPK und das phosphorylierte Peptid an Position 7/40 ist bis auf zwei Aminosäuren identisch mit der Sequenz von ERK-1/2. Interessanterweise wurde die regulatorische Phosphorylierungsstelle der ERK-1/2 mit Hilfe der Sequenz der KSS1 identifiziert [Payne, 1991]. Punkt 6/4 entspricht einer Peptidsequenz aus dem „myelin basic protein“ (MBP) um das Threonin 79. MBP ist eines der ersten entdeckten Substrate der ERK-1/2 und dient immer noch als Vorlage für Substrate in Kinase-Aktivitätsversuchen [Ahn, 1990; Erickson, 1990; Clark-Lewis,

1991]. Die Ergebnisse unterstützen die vorherigen Resultate, wonach α -MSH K-Ras-vermittelt C-Raf aktiviert und damit zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führt. Dies wird zusätzlich untermauert, da FSK auch hier die gleichen Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus der beiden Sequenzen wie α -MSH hat, und stimmt so mit einer linearen Signalkaskade von K-Ras, C-Raf und ERK-1/2 überein.

Als potentes Ziel nach der Aktivierung der ERK-1/2 kommt unter anderem Synapsin in Frage. Synapsin reguliert die Neurotransmitter-Freisetzung und ist exklusiv präsynaptisch lokalisiert [Hilfiker, 1999]. Bei synaptischer Aktivität wird Synapsin phosphoryliert, dissoziiert von dem Vesikel und dieses kann so freigesetzt werden [Tallent, 2009]. Dieser Prozess kann dabei durch die ERK-1/2-Kaskade induziert werden, unter anderem durch Phosphorylierung von Synapsin an Position 62, 67 und 553 [Jovanovic, 1996; Kushner, 2005]. Allerdings wird das Serin 553 nicht nur durch ERK-1/2 phosphoryliert, sondern auch die „cyclin-dependent kinase 5“ (CDK5) ist in der Lage, das Serin an Position 553 zu phosphorylieren und damit zu aktivieren [Tallent, 2009]. Interessanterweise konnte Synapsin-1 auf Proteinebene in GT1-7 Zellen nachgewiesen werden [Yamanaka, 2007]. Die Punkte 13/39 und 14/35 auf dem PepChip entsprechen den Positionen 67 und 553 von Synapsin, so dass deren vermehrte Phosphorylierung als Synapsin Aktivierung zu werten ist. Die Stimulation mit α -MSH erhöht bei beiden Peptiden die Phosphorylierung, was einer Aktivierung von Synapsin und damit eventuell einer Vesikel-Freisetzung entsprechen sollte.

Somit konnte hier mittels PepChip gezeigt werden, dass im Bezug auf die Aktivierung der ERK-1/2 unter serumhaltigen Bedingungen sich ein Signalweg ergeben könnte, der über K-Ras und C-Raf zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führt und nachgeschaltet zu einer Synapsin Aktivierung. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6.3 zusammengefasst.

Ein großer Vorteil des PepChips ist die parallele Analyse verschiedener Fragestellungen. So besteht beispielsweise die Möglichkeit, die erhaltenen Daten in Bezug auf potentielle Effektoren, denen eine Bedeutung bei der Energiehomöostase zugewiesen wurde, zu analysieren. Dabei scheint das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) interessant (Punkt 1/3), da die Gabe (ip) von Amphetamin, unter anderem ein Anti-Adipositas Präparat aus den 50er Jahren, in Ratten zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führt, einem Effekt, der durch einem TH-Inhibitor vollständig blockierbar ist

[Hsieh, 2011]. Die TH katalysiert die Umwandlung von Tyrosin zu DOPA, das in weiteren Schritten zu Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin umgewandelt wird. Die Aktivität der TH bei der Katecholamin-Synthese ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die TH hat vier Serine an Position 8, 19, 31 und 40, die durch unterschiedliche Kinasen phosphoryliert werden [Toska, 2002; Dunkley, 2004]. Die Phosphorylierung an Serin 19 durch die CaMKII führt über eine Konformationsänderung zu der Phosphorylierung des Serins an Position 40 und damit zu einer Aktivitätssteigerung der Kinase [Bevilaqua, 2001; Daubner, 2011]. Im PepChip konnte gezeigt werden, dass α -MSH die Phosphorylierung an Serin 19 erhöht, was über die Regulation des Serin an Position 40 zu einer gesteigerten Kinase-Aktivität führen würde und daher mit einer erhöhten Katecholamin-Synthese einhergehen sollte. Dabei muss berücksichtigt werden, dass GT1-7 Zellen zwar TH exprimieren und damit DOPA produzieren, aber aufgrund des Fehlens der folgenden Enzyme der Katecholamin-Synthese keine weiteren Katecholamine gebildet werden [Pimpinelli, 2003]. Von daher wären weitere Experimente *in vivo* besser geeignet, um α -MSH-induzierte Effekte im Bezug auf Katecholamine und ihre Synthese genauer zu verifizieren. Das Serin 19 wird durch die CaMKII phosphoryliert, was insofern nicht mit der bisher aufgezeigten Signalkaskade übereinstimmt, da in dieser Arbeit keine Mobilisation von Calcium-Ionen durch α -MSH detektiert werden konnte, welche aber essentiell für die Aktivität der CaMKII ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es lokal nicht doch zu einem Anstieg der Calcium-Ionen-Konzentration kommt und somit zu einer CaMKII Aktivierung. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass weitere Kinasen das Serin 19 der TH phosphorylieren und α -MSH somit die TH Calcium-Ionen-unabhängig reguliert.

In der Einleitung dieser Arbeit wurde bereits die ACC als ein Effektor der AMPK vorgestellt (siehe 3.8.1). Mit Hilfe des PepChips kann auch eine potentielle Regulation der ACC durch α -MSH untersucht werden, da sich an Position 2/3 ein Fragment der ACC-1 auf dem PepChip befindet. Die Aktivierung der ACC ist der erste geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Fettsäure-Synthese und, wie unter 3.8.1 beschrieben, ist die ACC ein AMPK Substrat [Carlson, 1973]. Die Aktivierung der AMPK führt zu einer Phosphorylierung der ACC und somit zu einer Inhibition derselbigen [Yeh, 1980]. Das Serin 79 der ACC ist die am besten untersuchte Phosphorylierungsstelle durch die AMPK und wird in Kinase-Aktivitätsversuchen als

Substrat der AMPK verwendet [Davies, 1989]. Das Peptid an Position 2/3 auf dem PepChip entspricht hingegen dem Serin an Position 29 der ACC, es wird durch die „casein kinase II“ (CKII) phosphoryliert, allerdings ist die Auswirkung auf die Kinase-Aktivität der ACC nicht bekannt [Haystead, 1988]. Sowohl α -MSH als auch FSK führen zu einer Phosphorylierung dieses Peptides. Da die Auswirkungen der Phosphorylierung auf die Kinase-Aktivität unbekannt sind, kann über den Effekt nur spekuliert werden. Prinzipiell führt eine aktivierte AMPK zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung der ACC. Da aber α -MSH zu einer AMPK Dephosphorylierung an Threonin 172 und damit zu einer Inaktivierung führt, müsste im Umkehrschluss die Stimulation mit α -MSH zu einer Aktivierung der ACC führen. Das wiederum würde in einer Anreicherung von Malonyl-CoA resultieren und zu einer verringerten Nahrungsaufnahme führen (siehe 6.4). Erste Versuche in GT1-7 Zellen zeigen eine α -MSH-induzierte Dephosphorylierung der ACC an Serin 79 und damit eine Aktivierung, allerdings unter serumfreien Bedingungen [Damm, 2012].

In Bezug auf die Regulation der AMPK durch α -MSH ist ein weiterer Punkt auf dem PepChip interessant. Punkt 19/5 ist eine Sequenz aus dem Hsp90 Protein. Es handelt sich um eine Phosphorylierungsstelle, die durch Doppelstrang (ds)-DNA phosphoryliert wird, in der Regel an Threonin 5 und Threonin 7 [Lees-Miller, 1989]. Welche Auswirkung die Phosphorylierungen an diesen Positionen haben ist bisher nicht bekannt. Hsp90 wird ubiquitär expremiert und erfüllt eine Fülle von Aufgaben in der Zelle, wie zum Beispiel Proteinfaltung, Stabilisierung, Aktivierung und vieles mehr [Pratt, 2003; Hahn, 2009]. In Bezug auf die AMPK spielt Hsp90 eine besondere Rolle, da es für die Stabilität der AMPKK LKB1, verantwortlich ist. Dieser Zusammenhang und dessen Bedeutung für die Regulation der AMPK an Threonin 172 wurde in dieser Arbeit unter anderem mit dem Hsp90-Inhibitor Radicicol analysiert. Im PepChip führte die Stimulation mit α -MSH zu einer erhöhten Hsp90 Phosphorylierung, da die Auswirkung der Phosphorylierung für die Hsp90 Funktion nicht bekannt ist, bleibt die Hypothese einer indirekten Verminderung der LKB1 Funktion rein spekulativ.

Die gerade diskutierten potentiellen α -MSH-Effektoren unter serumhaltigen Bedingungen sind in Abbildung 6.3 graphisch dargestellt.

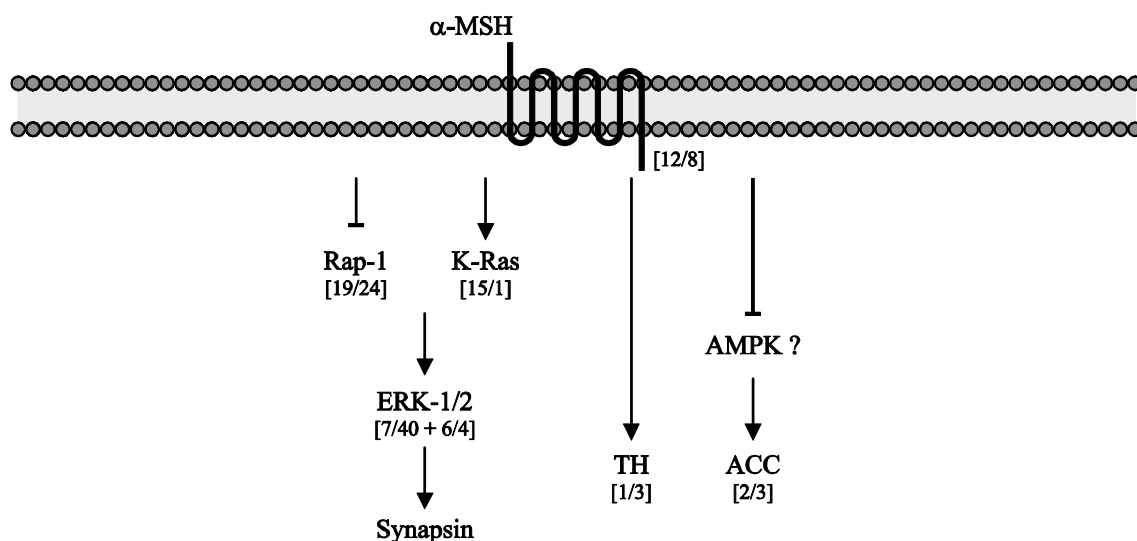


Abbildung 6.3: Potentielle MC4R-vermittelte Signalwege nach Auswertung der PepChips

Die Stimulation der GT1-7 Zellen unter serumhaltigen Bedingungen mit α -MSH führt zu einer K-Ras Phosphorylierung und Rap-1 Dephosphorylierung. K-Ras aktiviert daraufhin ERK-1/2, die nachgeschaltet Synapsin phosphoryliert und aktiviert. Als weitere potentielle α -MSH-Effektoren kommen sowohl ACC als auch TH in Frage. In Klammern sind die Positionen der entsprechenden Punkte auf dem PepChip angegeben.

Nach den Ergebnissen aus 5.3 sollten drei weitere Peptidsequenzen auf dem PepChip durch α -MSH reguliert werden. Zum einen zwei Fragmente von ERK-1/2, zum anderen die Peptidsequenz um das Threonin 172 der AMPK. Die Sequenz an Position 11/37 besteht aus neun Aminosäuren und entspricht der MEK-Konsensussequenz. Unter basalen Bedingungen zeigt sich keine Phosphorylierung der Peptidsequenz. Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus dem Immunoblot, wo die ERK-1/2 eine basale Phosphorylierung zeigt. Bei jeweils einem Duplikat, sowohl für α -MSH, als auch für FSK erkennt man eine leichte Phosphorylierung der Peptidsequenz, so dass zumindest tendenziell von einer α -MSH-vermittelten ERK-1/2 Aktivierung gesprochen werden kann. Punkt 22/12 entspricht ebenfalls einer Sequenz aus ERK-1/2, die, im Gegensatz zu der Sequenz an Punkt 11/37 auf dem PepChip, am C-Terminus um zwei Aminosäuren verkürzt und am N-Terminus um zwei Aminosäuren verlängert ist. Interessanterweise ist hier schon eine starke basale Phosphorylierung vorhanden, was mit den Ergebnissen aus dem Immunoblot korreliert. Allerdings sind weder α -MSH, noch FSK, in der Lage, diese Phosphorylierung zu steigern. Obwohl auf dem PepChip drei homologe Sequenzen aus der ERK-1/2 aufgebracht sind (6/4, 11/37 und 22/12) werden diese sowohl unter basalen, als auch unter stimulierten Bedingungen, sehr unterschiedlich phosphoryliert. Alle drei Peptide beinhalten das typische TEY-Motiv

der ERK-1/2, das exklusiv durch MEK phosphoryliert wird. Erstaunlicherweise zeigt die Sequenz aus der Bierhefe eine eindeutige α -MSH-induzierte Phosphorylierung, während die anderen beiden Peptide nur eine Tendenz erkennen lassen. Nur eine der drei Sequenzen weist eine deutliche basale Phosphorylierung auf, was einer konstitutiven Aktivierung der Kinase entspricht und mit den Ergebnissen aus dem Immunoblot übereinstimmt. Daher kann an diesem Punkt die Frage letztendlich nicht geklärt werden, ob der PepChip die Daten mit dem phosphospezifischen ERK-1/2 Antikörpern reproduzieren kann.

Im Bezug auf die AMPK-Regulation befindet sich im PepChip an Position 17/1 eine Sequenz, die der Umgebung des Threonin 172 der AMPK entspricht. Allerdings wurde das Cystein an Position 7 (beziehungsweise 174 im AMPK-Protein) durch ein Alanin ersetzt. Weder unter basalen, noch unter stimulierten Bedingungen, ist eine Phosphorylierung des Peptides zu erkennen. Da keine basale Phosphorylierung vorhanden ist, ist es auch nicht möglich eine α -MSH-induzierte Dephosphorylierung nachzuweisen. Eventuell liegt die nicht vorhandene basale Phosphorylierung an dem Aminosäuren-Austausch an Position 7. Die Notwendigkeit der genauen Identität der kompletten Sequenz der AMPK wird schon dadurch deutlich, dass eine Mutation an Serin 173 ausreicht, damit LKB1 nicht mehr in der Lage ist das Threonin zu phosphorylieren [Djouder, 2010]. Daher lässt der PepChip aufgrund der fehlenden exakten Sequenz um das Threonin der AMPK keine Bestätigung der Daten mit den phosphospezifischen Antikörper zu (siehe 5.3.1).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PepChips erste Anhaltspunkte für potentielle Ziele der α -MSH-induzierten Signale unter serumhaltigen Bedingungen liefern. Allerdings muss aus technischer Sicht angeführt werden, dass die minimalen Unterschiede der Phosphorylierungsmuster der einzelnen PepChips nicht leicht zu identifizieren sind. Zusätzlich zeigen die Duplikate nicht immer ein einheitliches Bild und die Positivkontrolle FSK phosphoryliert weder alle PKA Zielsequenzen, noch sind die induzierten Signale stark ausgeprägt. Trotzdem konnte ein potentieller Signalweg, der unter serumhaltigen Bedingungen α -MSH vermittelt zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung führt, aufgezeigt werden. Interessant dabei ist, dass die ERK-1/2-Regulation über K-Ras und nicht, wie unter serumfreien Bedingungen, über Rap-1 abläuft. Die α -MSH-induzierte AMPK-Regulation konnte nicht genauer

aufgeklärt werden. Das Hauptproblem stellt dabei das Fehlen eines Peptids mit der exakten Sequenz um das Threonin 172 der AMPK dar. Zusätzlich sind die Peptide von potentiellen vorgeschalteten Komponenten wie der LKB1 oder der TAK1 nicht auf dem PepChip aufgebracht, was potentiell mit bisher unzureichenden Informationen über deren Regulation zu begründen ist. Damit ist auch eine Suche nach homologen Peptidsequenzen nicht möglich. Interessanterweise konnten trotzdem zwei potentielle Effektoren der α -MSH-vermittelten anorexigenen Effekte identifiziert werden, zum einen die ACC und zum anderen die TH. Im Bezug auf die ACC ist dabei eine Modulation durch die AMPK möglich. Diese Ergebnisse müssen noch im Immunoblot mit den entsprechenden Antikörpern und spezifischen Inhibitoren bestätigt werden. Erste Versuche die Phosphorylierung von Synapsin und TH im Immunoblot mit Antikörper gegen das Serin 553 von Synapsin und gegen das Serin 19 von TH nachzuweisen, waren bisher allerdings noch nicht erfolgreich.

6.3 Vergleich der Signalwege unter beiden Bedingungen

Wie unter 5.2 beschrieben ist der Serumentzug eine etablierte Methode, um Zellen zu synchronisieren und die gesamte basale Aktivität der Zelle zu verringern. Allerdings bietet der Serumentzug nicht nur Vorteile, sondern kann auch nachteilige Effekte haben. Zum einen werden unter anderem Prozesse wie Apoptose induziert, die eventuell mit Agonisten-vermittelten Effekten interferieren, zum anderen können wichtige Prozesse unbemerkt beeinflusst werden, was indirekte Folgen haben könnte.

Sowohl unter serumfreien, als auch unter serumhaltigen Bedingungen, führt die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 und zu einer Dephosphorylierung der AMPK an Threonin 172. Dabei wird unter serumfreien Bedingungen eine lineare Kaskade durch α -MSH-induziert, in der PKA vermittelt die Aktivierung der ERK-1/2 zu einer Inhibition der konstitutiv aktiven LKB1 führt, was in einer verminderten AMPK Phosphorylierung resultiert. Im Gegensatz dazu ist die α -MSH-induzierte AMPK Dephosphorylierung unter serumhaltigen Bedingungen weder PKA- noch ERK-1/2-abhängig.

Der Unterschied zwischen den beiden Bedingungen scheint sich schon früh in der Kaskade zu manifestieren. Nach den Ergebnissen aus den PepChips wird die ERK-1/2-Regulation unter serumhaltigen Bedingungen nicht mehr über Rap-1, wie unter serumfreien Bedingungen, sondern wird über K-Ras vermittelt. Eine GPCR-vermittelte Ras Aktivierung konnte schon für β/γ -Untereinheiten von G-Proteinen gezeigt werden [Mattingly, 1996; Tian, 2001]. Die Unabhängigkeit der AMPK-Regulation von ERK-1/2 könnte also schon weit oben in der Kaskade durch den Unterschied in der ERK-1/2 Aktivierung zustande kommen. Der Befund, dass abhängig vom Initiator der Kaskade, ERK-1/2, die über dieselbe MEK-aktiviert wird, unterschiedliche nachgeschalteten Effekte hat, stellt eine neue Feinregulation dar, welche die Vielfalt und das breite Spektrum von ERK-1/2-vermittelten Prozessen erklären könnte. Als mechanistischer Ansatz zur Erklärung solcher Effekte können beispielsweise Gerüstproteine dienen, durch deren selektive Bindungspartner, distinkte Effektoren und Kinasen, einzelne Wege eines Signaltransduktionnetzwerkes bevorzugt werden.

In der Literatur findet man nur wenige Arbeiten, die sich explizit mit der Bedeutung des Serumentzugs auseinandersetzen. In PC12 Zellen führt die Stimulation mit FSK zu einer Inhibition von B-Raf und damit zu einer Inaktivierung der ERK-1/2, aber nur nach Serumentzug (0,1 %) und nicht unter Standardbedingungen (10 % Serum) [Erhardt, 1995]. In vier verschiedenen Zellsystemen (C6, NB2A, CHO und PC12) führt die Stimulation mit einem cAMP Analog entweder zu einer Aktivierung der ERK-1/2 oder zu einer Inhibition. Nach 48 h unter reduziertem Serum (0,1 %) bleiben diese Tendenzen der Phosphorylierung bestehen, während sich sowohl die basale als auch die Agonisten-induzierte Stimulation leicht verändert [Qiu, 2000]. Bisher hat sich nur eine Arbeitsgruppe ausführlich mit dem Thema Serum im Medium beschäftigt [Pirkmajer, 2011]. Dabei wurde der basale Phosphorylierungsstatus von vier Proteinen (AMPK, ACC, ERK-1/2 und mTOR) in drei Zellsystemen (primäre humane Myotuben, L6 Myotuben aus der Ratte und HEK-293 Zellen) untersucht. Nach insgesamt 24 h Serumentzug und Bestimmung des Phosphorylierungsstatus der Proteine zeigt sich kein einheitliches Bild im Sinne einer Reduktion der basalen Aktivität der Zelle, vielmehr oszillieren die Phosphorylierungsmuster der verschiedenen Proteine über die Zeit [Pirkmajer, 2011].

Analysiert man die in der Literatur beschriebenen MC4R-Effektoren in den verschiedenen Zellsystemen unter besonderer Berücksichtigung der Versuchsbedingungen, stellt man fest, dass die Ergebnisse ebenfalls unter unterschiedlichen Serumleveln generiert wurden (siehe 3.6.3.2). Interessanterweise sind alle Studien, die eine Calcium-Ionen-Mobilisation durch MC4R Agonisten zeigen, unter serumhaltigen Bedingungen generiert wurden, während die ERK-1/2-Regulation bis auf eine Ausnahme, die PI3K-Abhängigkeit in CHO-K1 Zellen, unter serumfreien Bedingungen untersucht wurde [Vongs, 2004]. Serum ist eine etablierte Positivkontrolle um Calcium-Ionen in der Zelle freizusetzen. Durch eine permanente Stimulation unter Standardbedingungen mit Serum würde man erwarten, dass eine Dauerstimulation eine Art von Desensitisierungseffekten auslöst, so dass das Serum-induzierte Signal unter serumfreien Bedingungen höher sein sollte als unter serumhaltigen. Demnach sollten Agonisten-induzierte Effekte auf die Mobilisation von Calcium-Ionen in der Zelle unter serumfreien Bedingungen stärker ausgeprägt sein als unter serumhaltigen. Zusätzlich gibt es in den Studien unterschiedliche Definitionen für den Zeitraum des Serumentzuges. Dabei schwanken die Zeitangaben von 14 - 24 h oder werden eher undefiniert mit der Formulierung „over night“ angegeben [Chai, 2006; Patten, 2007; Chai, 2009].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass abhängig vom zu untersuchenden Effektor standardisierte Verfahrensabläufe, unter anderem serumfreie oder serumhaltige Bedingungen vorherrschen, ohne dass es dabei definierte Gesetzmäßigkeiten gibt. Es ist interessant, dass die grundlegenden Bedingungen für einen Versuchsaufbau häufig wenig hinterfragt werden und mit den zwei Worten „serum starved“ zusammengefasst werden können. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass so Signaltransduktionskaskaden verändert werden können und wie wichtig daher die konsequente und exakte Angabe der jeweiligen Versuchsbedingung ist.

6.4 Ausblick

Die Aktivierung der AMPK im Hypothalamus führt zu einer Gewichtszunahme, während die Inaktivierung der AMPK in einer Reduktion des Körpergewichts resultiert. Obwohl mehrere anorexigene und orexigene Stimuli, zum Beispiel Leptin und Ghrelin, die AMPK im Hypothalamus regulieren, ist wenig über die Effektoren der AMPK bekannt. Aus Untersuchungen in diversen anderen Geweben, wie der Leber und dem Fettgewebe, sind unter anderem die ACC und mTOR als AMPK-Effektoren etabliert.

mTOR ist eine hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, die Translationsprozesse in der Zelle reguliert und durch den spezifischen Inhibitor Rapamycin inhibiert wird [Hay, 2004]. Die Aktivierung der AMPK führt zu einer Inhibition von mTOR und damit einer verringerten Proteinbiosynthese [Bolster, 2002]. mTOR wird in verschiedenen Regionen des Hypothalamus exprimiert und ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt [Cota, 2006]. Für verschiedene anorexigene und orexigene Stimuli konnte eine Aktivierung beziehungsweise Inaktivierung von mTOR im Hypothalamus gezeigt werden [Watterson, 2012]. Die mTOR Stimulation im Hypothalamus durch die Gabe von Leucin beziehungsweise Leptin führt zu einer verringerten Nahrungsaufnahme, die durch Rapamycin vollständig blockierbar ist. [Cota, 2006]. Allerdings zeigt mTOR eine hohe Expression im ARC vor allem in NPY/AgRP-Neuronen und nur in einem geringeren Maße in POMC/AgRP-Neuronen [Inhoff, 2010]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Effekte von MT-II im Hypothalamus auf die Nahrungsaufnahme durch Rapamycin nicht blockiert werden können [Cota, 2006]. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von GT1-1 Zellen mit NDP-MSH keinen Effekt auf die mTOR Phosphorylierung hat, aber dass durch die Anwesenheit von NDP-MSH die Insulin-induzierte Aktivierung auf mTOR potenziert wird [Chai, 2010]. Daher scheint mTOR zwar an orexigenen und anorexigenen Signalwegen beteiligt zu sein, allerdings werden diese Effekte eher im ARC vermittelt und haben daher nur indirekte Auswirkungen auf die nachgeschaltete MC4R-Kaskade im PVN.

Die ACC ist ein etablierter Effektor der AMPK und war 1973 der Ausgangspunkt für die Entdeckung der AMPK in der Leber [Carlson, 1973]. Die ACC ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Fettsäure-Synthese und katalysiert irreversibel die Carboxylierung von Acetyl-CoA zu Malonyl-CoA. Die Aktivierung der

AMPK führt zu einer Phosphorylierung der ACC an Serin 79 und inhibiert diese somit, was wiederum in der Abnahme der Malonyl-CoA-Konzentration in der Zelle resultiert [Munday, 1988]. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Malonyl-CoA im Hypothalamus zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme führt, so dass die ACC einen interessanten Effektor der AMPK im Hypothalamus darstellt [Hu, 2005; Lane, 2005]. Dieses konnte in GT1-7 Zellen bestätigt werden, da die Stimulation der AMPK mit AICAR zu einer Phosphorylierung der ACC an Serin 79 führt und simultan zu einer Abnahme der Malonyl-CoA-Konzentration [Hu, 2005]. Zusätzlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Stimulation von GT1-7 Zellen mit α -MSH zu einer Dephosphorylierung der ACC an Serin 79 führt [Damm, 2012].

In Bezug auf die Unterschiede bei der ERK-1/2 und AMPK-Regulation unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen muss noch genauer untersucht werden, ab welchen Zeitpunkten sich der Serumentzug auf die einzelnen Komponenten in der Zelle auswirkt. Der kurzzeitige Serumentzug im Bereich bis zu einer Stunde hat schon Auswirkungen auf die AMPK-Aktivität, von daher könnten Zeiträume von bis zu 10 h ausreichen, um den hier beobachteten Wechsel in der Signalkaskade zu induzieren. Dabei wird es spannend zu sehen, ab welchem Zeitpunkt des Serumentzuges die α -MSH-induzierte Kaskade nicht mehr über K-Ras, sondern schon über Rap-1 verläuft. Ob dabei im Weiteren unter beiden Bedingungen nochmals gleiche Zielstrukturen reguliert werden oder ob die Signalwege komplett unterschiedlich weiter laufen, muss noch gezeigt werden. Dabei sind die drei Zielstrukturen Synapsin, ACC und TH aus dem PepChip potentielle Kandidaten, die vorrangig untersucht werden sollten.

Unabhängig von den gewählten Bedingungen ist die AMPK ein entscheidender Faktor bei der Energiehomöostase, deren Aktivität durch α -MSH reduziert wird. Angesichts der anscheinend simplen Zusammenhänge im Hypothalamus zwischen dem Phosphorylierungsstatus der AMPK und der Auswirkung auf die Nahrungsaufnahme (siehe 3.8.3) wird die AMPK als potentielles Ziel für die Behandlung von Adipositas diskutiert [Inoki, 2012]. Die Behandlung mit einem spezifischen AMPK-Inhibitor würde nach jetziger Datenlage zu einer verringerten Nahrungsaufnahme führen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die AMPK zum einen in jeder Zelle vorkommt und somit die AMPK Inhibition auf zellulärer Ebene zum Beispiel Auswirkung auf Proliferationsprozesse haben könnte. Zum anderen reguliert die AMPK

in verschiedenen Organen wie dem Herzen und der Leber weitere wichtige Funktionen unabhängig von der Energiehomöostase (siehe 3.8.2). Eine Gabe von AMPK Modulatoren könnte daher auch dramatische Auswirkungen auf andere lebenswichtige Organe haben. Von daher sind genauere Kenntnisse des Signalweges dringend notwendig, insbesondere die Identifizierung von Komponenten, die spezifisch für den Hypothalamus sind.

Entscheidend ist allerdings die Frage, welche der beiden Bedingungen den physiologischen Gegebenheiten am nächsten kommt. Der neuronale Phänotyp der GT1-7 Zellen ist unter serumfreien Bedingungen stärker ausgeprägt als unter serumhaltigen, was für eine physiologischere Bedeutung unter diesen Versuchsbedingungen spricht [Mellon, 1990]. Vergleicht man die Befunde auf zellulärer Ebene mit den *in vivo* Befunden, spricht ebenfalls einiges für die Ergebnisse unter serumfreien Bedingungen. Allerdings müssten Studien durchgeführt werden, die die natürlichen Gegebenheiten im Gehirn genauer untersuchen und feststellen, was „physiologisch“ genau bedeutet. Erst wenn diese grundlegenden Fragen geklärt sind, wird es möglich sein, gezielt in die MC4R vermittelte Signaltransduktionskaskade einzugreifen und wirksame Anti-Adipositas Präparate zu generieren.

7 Literaturverzeichnis

- ADEREM, A. (1992) The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell*, 71 (5): 713-6.
- AGUIRRE, V., UCHIDA, T., YENUSH, L., DAVIS, R. & WHITE, M. F. (2000) The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *The Journal of biological chemistry*, 275 (12): 9047-54.
- AHN, N. G., WEI, J. E., CHAN, C. P. & KREBS, E. G. (1990) Identification of multiple epidermal growth factor-stimulated protein serine/threonine kinases from Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry*, 265 (20): 11487-94.
- AIR, E. L., BENOIT, S. C., BLAKE SMITH, K. A., CLEGG, D. J. & WOODS, S. C. (2002) Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 72 (1-2): 423-9.
- AL-OBEIDI, F., CASTRUCCI, A. M., HADLEY, M. E. & HRUBY, V. J. (1989) Potent and prolonged acting cyclic lactam analogues of alpha-melanotropin: design based on molecular dynamics. *Journal of medicinal chemistry*, 32 (12): 2555-61.
- ALESSI, D. R., SAITO, Y., CAMPBELL, D. G., COHEN, P., SITHANANDAM, G., RAPP, U., ASHWORTH, A., MARSHALL, C. J. & COWLEY, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *The EMBO Journal*, 13 (7): 1610-9.
- ALTSCHULER, D. & LAPETINA, E. G. (1993) Mutational analysis of the cAMP-dependent protein kinase-mediated phosphorylation site of Rap1b. *The Journal of biological chemistry*, 268 (10): 7527-31.
- ALVAREZ, E., RONCERO, I., CHOWEN, J. A., THORENS, B. & BLAZQUEZ, E. (1996) Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *Journal of neurochemistry*, 66 (3): 920-7.
- ANDERSON, N. G., MALLER, J. L., TONKS, N. K. & STURGILL, T. W. (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 343 (6259): 651-3.
- ANDERSON, R. A., ZWAIN, I. H., ARROYO, A., MELLON, P. L. & YEN, S. S. (1999) The insulin-like growth factor system in the GT1-7 GnRH neuronal cell line. *Neuroendocrinology*, 70 (5): 353-9.
- ANDERSSON, U., FILIPSSON, K., ABBOTT, C. R., WOODS, A., SMITH, K., BLOOM, S. R., CARLING, D. & SMALL, C. J. (2004) AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *The Journal of biological chemistry*, 279 (13): 12005-8.
- BAGNOL, D., LU, X. Y., KAELIN, C. B., DAY, H. E., OLLMANN, M., GANTZ, I., AKIL, H., BARSH, G. S. & WATSON, S. J. (1999) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of neuroscience*, 19 (18): RC26.
- BALLINGER, A. (2000) Orlistat in the treatment of obesity. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 1 (4): 841-7.
- BALTHASAR, N., DALGAARD, L. T., LEE, C. E., YU, J., FUNAHASHI, H., WILLIAMS, T., FERREIRA, M., TANG, V., MCGOVERN, R. A., KENNY, C. D., CHRISTIANSEN, L. M., EDELSTEIN, E., CHOI, B., BOSS, O., ASCHKENASI, C., ZHANG, C. Y., MOUNTJOY, K., KISHI, T., ELMQUIST, J. K. & LOWELL, B. B. (2005) Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 123 (3): 493-505.
- BARAZZONI, R., ZANETTI, M., STURNEGA, M., STEBEL, M., SEMOLIC, A., PIRULLI, A., VINCI, P., ZENTILIN, L., GIACCA, M., CATTIN, L. & GUARNIERI, G. (2011) Insulin downregulates SIRT1 and AMPK activation and is associated with changes in liver fat, but not in inflammation and mitochondrial oxidative capacity, in streptozotocin-diabetic rat. *Clinical nutrition*, 30 (3): 384-90.
- BARIOHAY, B., ROUX, J., TARDIVEL, C., TROUSLARD, J., JEAN, A. & LEBRUN, B. (2009) Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology*, 150 (6): 2646-53.

- BASKIN, D. G., HAHN, T. M. & SCHWARTZ, M. W. (1999) Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Hormone and metabolic research* 31 (5): 345-50.
- BATTERHAM, R. L., COHEN, M. A., ELLIS, S. M., LE ROUX, C. W., WITHERS, D. J., FROST, G. S., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. (2003) Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *The New England journal of medicine*, 349 (10): 941-8.
- BATTERHAM, R. L., COWLEY, M. A., SMALL, C. J., HERZOG, H., COHEN, M. A., DAKIN, C. L., WREN, A. M., BRYNES, A. E., LOW, M. J., GHATEI, M. A., CONE, R. D. & BLOOM, S. R. (2002) Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature*, 418 (6898): 650-4.
- BEN-SHLOMO, S., ZVIBEL, I., SHNELL, M., SHLOMAI, A., CHEPURKO, E., HALPERN, Z., BARZILAI, N., OREN, R. & FISHMAN, S. (2011) Glucagon-like peptide-1 reduces hepatic lipogenesis via activation of AMP-activated protein kinase. *Journal of hepatology*, 54 (6): 1214-23.
- BERGHUIS, A. M., LEE, E., RAW, A. S., GILMAN, A. G. & SPRANG, S. R. (1996) Structure of the GDP-Pi complex of Gly203-->Ala g1alpha1: a mimic of the ternary product complex of galphacatalyzed GTP hydrolysis. *Structure*, 4 (11): 1277-90.
- BERSTEIN, G., BLANK, J. L., JHON, D. Y., EXTON, J. H., RHEE, S. G. & ROSS, E. M. (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell*, 70 (3): 411-8.
- BEVILAQUA, L. R., GRAHAM, M. E., DUNKLEY, P. R., VON NAGY-FELSOBUKI, E. I. & DICKSON, P. W. (2001) Phosphorylation of Ser(19) alters the conformation of tyrosine hydroxylase to increase the rate of phosphorylation of Ser(40). *The Journal of biological chemistry*, 276 (44): 40411-6.
- BEWICK, G. A., GARDINER, J. V., DHILLO, W. S., KENT, A. S., WHITE, N. E., WEBSTER, Z., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. (2005) Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *The FASEB journal*, 19 (12): 1680-2.
- BHATTACHARYA, M., BABWAH, A. V. & FERGUSON, S. S. (2004) Small GTP-binding protein-coupled receptors. *Biochemical Society transactions*, 32 (Pt 6): 1040-4.
- BIEBERMANN, H., CASTANEDA, T. R., VAN LANDEGHEM, F., VON DEIMLING, A., ESCHER, F., BRABANT, G., HEBEBRAND, J., HINNEY, A., TSCHOP, M. H., GRUTERS, A. & KRUDE, H. (2006) A role for beta-melanocyte-stimulating hormone in human body-weight regulation. *Cell metabolism*, 3 (2): 141-6.
- BOKOCH, G. M., KATADA, T., NORTHUP, J. K., HEWLETT, E. L. & GILMAN, A. G. (1983) Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *The Journal of biological chemistry*, 258 (4): 2072-5.
- BOLSTER, D. R., CROZIER, S. J., KIMBALL, S. R. & JEFFERSON, L. S. (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *The Journal of biological chemistry*, 277 (27): 23977-80.
- BOS, J. L., REHMANN, H. & WITTINGHOFER, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*, 129 (5): 865-77.
- BOUDEAU, J., DEAK, M., LAWLOR, M. A., MORRICE, N. A. & ALESSI, D. R. (2003) Heat-shock protein 90 and Cdc37 interact with LKB1 and regulate its stability. *The Biochemical journal*, 370 (Pt 3): 849-57.
- BOULTON, T. G. & COBB, M. H. (1991) Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell regulation*, 2 (5): 357-71.
- BOUVIER, M., HAUSDORFF, W. P., DE BLASI, A., O'DOWD, B. F., KOBILKA, B. K., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature*, 333 (6171): 370-3.
- BREEN, D. M., SANLI, T., GIACCA, A. & TSIANI, E. (2008) Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and biophysical research communications*, 374 (1): 117-22.
- BREHMER, D., GODL, K., ZECH, B., WISSING, J. & DAUB, H. (2004) Proteome-wide identification of cellular targets affected by bisindolylmaleimide-type protein kinase C inhibitors. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 3 (5): 490-500.
- BREIT, A., BUCH, T. R., BOEKHOFF, I., SOLINSKI, H. J., DAMM, E. & GUDERMANN, T. (2011) Alternative G protein coupling and biased agonism: new insights into melanocortin-4 receptor signalling. *Molecular and cellular endocrinology*, 331 (2): 232-40.

- BREIT, A., WOLFF, K., KALWA, H., JARRY, H., BUCH, T. & GUDERMANN, T. (2006) The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *The Journal of biological chemistry*, 281 (49): 37447-56.
- BRONSTEIN, I., FORTIN, J., STANLEY, P. E., STEWART, G. S. & KRICKA, L. J. (1994) Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Analytical biochemistry*, 219 (2): 169-81.
- BROWN, M. S., BRUNSCHEDE, G. Y. & GOLDSTEIN, J. L. (1975) Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. An adenine nucleotide-dependent reaction catalyzed by a factor in human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 250 (7): 2502-9.
- BUCH, T. R., HELING, D., DAMM, E., GUDERMANN, T. & BREIT, A. (2009) Pertussis toxin-sensitive signaling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist. *The Journal of biological chemistry*, 284 (39): 26411-20.
- BUCHWALTER, G., GROSS, C. & WASYLYK, B. (2004) Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324: 1-14.
- BULT, M. J., VAN DALEN, T. & MULLER, A. F. (2008) Surgical treatment of obesity. *European journal of endocrinology*, 158 (2): 135-45.
- BULTMAN, S. J., MICHAUD, E. J. & WOYCHIK, R. P. (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell*, 71 (7): 1195-204.
- BUENEMANN, M. & HOSEY, M. M. (1999) G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *The Journal of physiology*, 517 (Pt 1): 5-23.
- BURCH, J., MCKENNA, C., PALMER, S., NORMAN, G., GLANVILLE, J., SCULPHER, M. & WOOLACOTT, N. (2009) Rimonabant for the treatment of overweight and obese people. *Health technology assessment*, 13 Suppl 3: 13-22.
- BUTLER, A. A. (2006) The melanocortin system and energy balance. *Peptides*, 27 (2): 281-90.
- CAMPS, M., CAROZZI, A., SCHNABEL, P., SCHEER, A., PARKER, P. J. & GIERSCHIK, P. (1992) Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature*, 360 (6405): 684-6.
- CARAI, M. A., COLOMBO, G. & GESSA, G. L. (2005) Rimonabant: the first therapeutically relevant cannabinoid antagonist. *Life sciences*, 77 (19): 2339-50.
- CARLING, D. (2004) The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences*, 29 (1): 18-24.
- CARLING, D., MAYER, F. V., SANDERS, M. J. & GAMBLIN, S. J. (2011) AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature chemical biology*, 7 (8): 512-8.
- CARLSON, C. A. & KIM, K. H. (1973) Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 248 (1): 378-80.
- CATANIA, A. (2008) Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends in neurosciences*, 31 (7): 353-60.
- CHAI, B., LI, J. Y., ZHANG, W., NEWMAN, E., AMMORI, J. & MULHOLLAND, M. W. (2006) Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogen-activated protein kinase. *Peptides*, 27 (11): 2846-57.
- CHAI, B., LI, J. Y., ZHANG, W., WANG, H. & MULHOLLAND, M. W. (2009) Melanocortin-4 receptor activation inhibits c-Jun N-terminal kinase activity and promotes insulin signaling. *Peptides*, 30 (6): 1098-104.
- CHAI, B., LI, J. Y., ZHANG, W., WU, X., ZHANG, C. & MULHOLLAND, M. W. (2010) Melanocortin-4 receptor activation promotes insulin-stimulated mTOR signaling. *Peptides*, 31 (10): 1888-93.
- CHEN, A. S., MARSH, D. J., TRUMBAUER, M. E., FRAZIER, E. G., GUAN, X. M., YU, H., ROSENBLUM, C. I., VONGS, A., FENG, Y., CAO, L., METZGER, J. M., STRACK, A. M., CAMACHO, R. E., MELLIN, T. N., NUNES, C. N., MIN, W., FISHER, J., GOPAL-TRUTER, S., MACINTYRE, D. E., CHEN, H. Y. & VAN DER PLOEG, L. H. (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nature genetics*, 26 (1): 97-102.
- CHEN, E. C., KING, T. S., CHANG, X., NORRIS, C., SCHENKEN, R. S. & JAVORS, M. A. (1999) Thrombin-stimulated increases in cytosolic Ca²⁺ level and gonadotropin-releasing hormone release in GT1-7 neurons. *Peptides*, 20 (7): 859-64.

- CHEN, H. C., BANDYOPADHYAY, G., SAJAN, M. P., KANO, Y., STANDAERT, M., FARESE, R. V., JR. & FARESE, R. V. (2002) Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *The Journal of biological chemistry*, 277 (26): 23554-62.
- CHEN, L., JIAO, Z. H., ZHENG, L. S., ZHANG, Y. Y., XIE, S. T., WANG, Z. X. & WU, J. W. (2009) Structural insight into the autoinhibition mechanism of AMP-activated protein kinase. *Nature*, 459 (7250): 1146-9.
- CHEN, W., KELLY, M. A., OPITZ-ARAYA, X., THOMAS, R. E., LOW, M. J. & CONE, R. D. (1997) Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell*, 91 (6): 789-98.
- CHENG, X. B., WEN, J. P., YANG, J., YANG, Y., NING, G. & LI, X. Y. (2011) GnRH secretion is inhibited by adiponectin through activation of AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase. *Endocrine*, 39 (1): 6-12.
- CHHAJLANI, V., MUCENIECE, R. & WIKBERG, J. E. (1993) Molecular cloning of a novel human melanocortin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, 195 (2): 866-73.
- CHHAJLANI, V. & WIKBERG, J. E. (1992) Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Letters*, 309 (3): 417-20.
- CLAPHAM, D. E. & NEER, E. J. (1997) G protein beta gamma subunits. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37: 167-203.
- CLARK-LEWIS, I., SANGHERA, J. S. & PELECH, S. L. (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 266 (23): 15180-4.
- CODELUPPI, S., GREGORY, E. N., KJELL, J., WIGERBLAD, G., OLSON, L. & SVENSSON, C. I. (2011) Influence of rat substrain and growth conditions on the characteristics of primary cultures of adult rat spinal cord astrocytes. *Journal of neuroscience methods*, 197 (1): 118-27.
- CONE, R. D. (2006) Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocrine reviews*, 27 (7): 736-49.
- COOK, S. J. & MCCORMICK, F. (1993) Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science*, 262 (5136): 1069-72.
- COTA, D., PROULX, K., SMITH, K. A., KOZMA, S. C., THOMAS, G., WOODS, S. C. & SEELEY, R. J. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*, 312 (5775): 927-30.
- COWLEY, M. A., PRONCHUK, N., FAN, W., DINULESCU, D. M., COLMERS, W. F. & CONE, R. D. (1999) Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron*, 24 (1): 155-63.
- COWLEY, M. A., SMART, J. L., RUBINSTEIN, M., CERDAN, M. G., DIANO, S., HORVATH, T. L., CONE, R. D. & LOW, M. J. (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, 411 (6836): 480-4.
- COYRAL-CASTEL, S., TOSCA, L., FERREIRA, G., JEANPIERRE, E., RAME, C., LOMET, D., CARATY, A., MONGET, P., CHABROLLE, C. & DUPONT, J. (2008) The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 20 (3): 335-46.
- CRASTO, W., KHUNTI, K. & DAVIES, M. J. (2011) An update on exenatide, a novel therapeutic option for patients with type 2 diabetes. *Drugs of today*, 47 (11): 839-56.
- CRESPO, P., XU, N., SIMONDS, W. F. & GUTKIND, J. S. (1994) Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 369 (6479): 418-20.
- CRUTE, B. E., SEEFELD, K., GAMBLE, J., KEMP, B. E. & WITTERS, L. A. (1998) Functional domains of the alpha1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273 (52): 35347-54.
- CULMSEE, C., MONNIG, J., KEMP, B. E. & MATTSON, M. P. (2001) AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *Journal of molecular neuroscience*, 17 (1): 45-58.
- CUMMINGS, D. E., BRANDON, E. P., PLANAS, J. V., MOTAMED, K., IDZERDA, R. L. & MCKNIGHT, G. S. (1996) Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII beta subunit of protein kinase A. *Nature*, 382 (6592): 622-6.
- CZYZYK, T. A., SIKORSKI, M. A., YANG, L. & MCKNIGHT, G. S. (2008) Disruption of the RIIbeta subunit of PKA reverses the obesity syndrome of Agouti lethal yellow mice. *PNAS*, 105 (1): 276-81.

- DAAKA, Y., LUTTRELL, L. M., AHN, S., DELLA ROCCA, G. J., FERGUSON, S. S., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 273 (2): 685-8.
- DAAKA, Y., PITCHER, J. A., RICHARDSON, M., STOFFEL, R. H., ROBISHAW, J. D. & LEFKOWITZ, R. J. (1997) Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases. *PNAS*, 94 (6): 2180-5.
- DALVI, P. S., NAZARIANS-ARMAVIL, A., TUNG, S. & BELSHAM, D. D. (2011) Immortalized neurons for the study of hypothalamic function. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 300 (5): R1030-52.
- DAMM, E., BUECH, T. R., GUDERMANN, T. & BREIT, A. (2012) Melanocortin-Induced PKA Activation Inhibits AMPK Activity Via ERK-1/2 and LKB-1 in Hypothalamic GT1-7 Cells. *Molecular endocrinology*, 26 (4): 643-54.
- DANIELS, D., PATTEN, C. S., ROTH, J. D., YEE, D. K. & FLUHARTY, S. J. (2003) Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. *Brain Research*, 986 (1-2): 1-11.
- DAUBNER, S. C., LE, T. & WANG, S. (2011) Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508 (1): 1-12.
- DAVAL, M., FOUFELLE, F. & FERRE, P. (2006) Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *The Journal of physiology*, 574 (Pt 1): 55-62.
- DAVIES, S. P., CARLING, D. & HARDIE, D. G. (1989) Tissue distribution of the AMP-activated protein kinase, and lack of activation by cyclic-AMP-dependent protein kinase, studied using a specific and sensitive peptide assay. *European journal of biochemistry*, 186 (1-2): 123-8.
- DAVIES, S. P., HELPS, N. R., COHEN, P. T. & HARDIE, D. G. (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Letters*, 377 (3): 421-5.
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. & COHEN, P. (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *The Biochemical journal*, 351 (Pt 1): 95-105.
- DJOUDE, N., TUERK, R. D., SUTER, M., SALVIONI, P., THALI, R. F., SCHOLZ, R., VAAHTOMERI, K., AUCHLI, Y., RECHSTEINER, H., BRUNISHOLZ, R. A., VIOLLET, B., MAKELA, T. P., WALLIMANN, T., NEUMANN, D. & KREK, W. (2010) PKA phosphorylates and inactivates AMPKalpha to promote efficient lipolysis. *The EMBO Journal*, 29 (2): 469-81.
- DOKLADDA, K., GREEN, K. A., PAN, D. A. & HARDIE, D. G. (2005) PD98059 and U0126 activate AMP-activated protein kinase by increasing the cellular AMP:ATP ratio and not via inhibition of the MAP kinase pathway. *FEBS Letters*, 579 (1): 236-40.
- DOSS, R. C., PERKINS, J. P. & HARDEN, T. K. (1981) Recovery of beta-adrenergic receptors following long term exposure of astrocytoma cells to catecholamine. Role of protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 256 (23): 12281-6.
- DOWNES, G. B. & GAUTAM, N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics*, 62 (3): 544-52.
- DU, J., GUAN, T., ZHANG, H., XIA, Y., LIU, F. & ZHANG, Y. (2008) Inhibitory crosstalk between ERK and AMPK in the growth and proliferation of cardiac fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 368 (2): 402-7.
- DUNKLEY, P. R., BOBROVSKAYA, L., GRAHAM, M. E., VON NAGY-FELSOBUKI, E. I. & DICKSON, P. W. (2004) Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *Journal of neurochemistry*, 91 (5): 1025-43.
- ELIAS, C. F., LEE, C., KELLY, J., ASCHKENASI, C., AHIMA, R. S., COUCEYRO, P. R., KUCHAR, M. J., SAPER, C. B. & ELMQUIST, J. K. (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*, 21 (6): 1375-85.
- ERDTMANN-VOURLIOTIS, M., MAYER, P., AMMON, S., RIECHERT, U. & HOLLT, V. (2001) Distribution of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) isoforms 2, 3, 5 and 6 mRNA in the rat brain. *Brain Research*, 95 (1-2): 129-37.
- ERHARDT, P., TROPFMAIR, J., RAPP, U. R. & COOPER, G. M. (1995) Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Molecular and cellular biology*, 15 (10): 5524-30.

- ERICKSON, A. K., PAYNE, D. M., MARTINO, P. A., ROSSOMANDO, A. J., SHABANOWITZ, J., WEBER, M. J., HUNT, D. F. & STURGILL, T. W. (1990) Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 265 (32): 19728-35.
- ERREDE, B., CADE, R. M., YASHAR, B. M., KAMADA, Y., LEVIN, D. E., IRIE, K. & MATSUMOTO, K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Molecular reproduction and development*, 42 (4): 477-85.
- ETIENNE-MANNEVILLE, S. & HALL, A. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature*, 420 (6916): 629-35.
- EVANS-BROWN, M., DAWSON, R. T., CHANDLER, M. & MCVEIGH, J. (2009) Use of melanotan I and II in the general population. *British Medical Journal*, 338: b566.
- FAN, W., BOSTON, B. A., KESTERSON, R. A., HRUBY, V. J. & CONE, R. D. (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*, 385 (6612): 165-8.
- FAROOQI, I. S., KEOGH, J. M., YEO, G. S., LANK, E. J., CHEETHAM, T. & O'RAHILLY, S. (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *The New England journal of medicine*, 348 (12): 1085-95.
- FERGUSON, S. S., BARAK, L. S., ZHANG, J. & CARON, M. G. (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 74 (10): 1095-110.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391 (6669): 806-11.
- FLAHERTY, P., RADHAKRISHNAN, M. L., DINH, T., REBRES, R. A., ROACH, T. I., JORDAN, M. I. & ARKIN, A. P. (2008) A dual receptor crosstalk model of G-protein-coupled signal transduction. *PLoS computational biology*, 4 (9): e1000185.
- FLIER, J. S. (2004) Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*, 116 (2): 337-50.
- FLIER, J. S. (2006) AgRP in energy balance: Will the real AgRP please stand up? *Cell metabolism*, 3 (2): 83-5.
- FONG, T. M., MAO, C., MACNEIL, T., KALYANI, R., SMITH, T., WEINBERG, D., TOTA, M. R. & VAN DER PLOEG, L. H. (1997) ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochemical and biophysical research communications*, 237 (3): 629-31.
- FRIEDMAN, J. M. & HALAAS, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395 (6704): 763-70.
- FU, D., WAKABAYASHI, Y., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & ARIAS, I. M. (2011) Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway. *PNAS*, 108 (4): 1403-8.
- FUNAHASHI, K., CAO, X., YAMAUCHI, M., KOZAKI, Y., ISHIGURO, N. & KAMBE, F. (2009) Prostaglandin E2 negatively regulates AMP-activated protein kinase via protein kinase A signaling pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 88 (1-2): 31-5.
- GALLWITZ, B. (2012) Anorexigenic effects of GLP-1 and its analogues. *Handbook of experimental pharmacology*, (209): 185-207.
- GAMBLE, J. & LOPASCHUK, G. D. (1997) Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism: clinical and experimental*, 46 (11): 1270-4.
- GANTZ, I., KONDA, Y., TASHIRO, T., SHIMOTO, Y., MIWA, H., MUNZERT, G., WATSON, S. J., DELVALLE, J. & YAMADA, T. (1993a) Molecular cloning of a novel melanocortin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 268 (11): 8246-50.
- GANTZ, I., MIWA, H., KONDA, Y., SHIMOTO, Y., TASHIRO, T., WATSON, S. J., DELVALLE, J. & YAMADA, T. (1993b) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 268 (20): 15174-9.
- GAUTHIER, M. S., MIYOSHI, H., SOUZA, S. C., CACICEDO, J. M., SAHA, A. K., GREENBERG, A. S. & RUDERMAN, N. B. (2008) AMP-activated protein kinase is activated as a consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *The Journal of biological chemistry*, 283 (24): 16514-24.

Literaturverzeichnis

- GIRAUDO, S. Q., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A. S. (1998) Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. *Brain Research*, 809 (2): 302-6.
- GRAHAM, M., SHUTTER, J. R., SARMIENTO, U., SAROSI, I. & STARK, K. L. (1997) Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nature genetics*, 17 (3): 273-4.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260 (6): 3440-50.
- GSCHWENDT, M., DIETERICH, S., RENNECKE, J., KITTSSTEIN, W., MUELLER, H. J. & JOHANNES, F. J. (1996) Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Letters*, 392 (2): 77-80.
- GU, W. & LI, Y. (2012) The therapeutic potential of the adiponectin pathway. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 26 (1): 1-8.
- GUDERMANN, T., GROSSE, R. & SCHULTZ, G. (2000) Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 361 (4): 345-62.
- GUH, D. P., ZHANG, W., BANSBACK, N., AMARSI, Z., BIRMINGHAM, C. L. & ANIS, A. H. (2009) The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*, 9: 88.
- HADLEY, M. E. (2005) Discovery that a melanocortin regulates sexual functions in male and female humans. *Peptides*, 26 (10): 1687-9.
- HADLEY, M. E. & DORR, R. T. (2006) Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization. *Peptides*, 27 (4): 921-30.
- HAHN, J. S. (2009) The Hsp90 chaperone machinery: from structure to drug development. *BMB reports*, 42 (10): 623-30.
- HAHN, T. M., BREININGER, J. F., BASKIN, D. G. & SCHWARTZ, M. W. (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience*, 1 (4): 271-2.
- HAMANN, A. & MATTHAEI, S. (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 104 (4): 293-300.
- HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166 (4): 557-80.
- HARDIE, D. G. (2008) AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International journal of obesity*, 32 Suppl 4: S7-12.
- HARDIE, D. G. (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & development*, 25 (18): 1895-908.
- HARDIE, D. G. & CARLING, D. (1997) The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European journal of biochemistry*, 246 (2): 259-73.
- HARDIE, D. G. & MACKINTOSH, R. W. (1992) AMP-activated protein kinase--an archetypal protein kinase cascade? *Bioessays*, 14 (10): 699-704.
- HARDIE, D. G., SCOTT, J. W., PAN, D. A. & HUDSON, E. R. (2003) Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Letters*, 546 (1): 113-20.
- HAWLEY, S. A., BOUDEAU, J., REID, J. L., MUSTARD, K. J., UDD, L., MAKELA, T. P., ALESSI, D. R. & HARDIE, D. G. (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of Biology*, 2 (4): 28.
- HAWLEY, S. A., DAVISON, M., WOODS, A., DAVIES, S. P., BERI, R. K., CARLING, D. & HARDIE, D. G. (1996) Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 271 (44): 27879-87.
- HAWLEY, S. A., PAN, D. A., MUSTARD, K. J., ROSS, L., BAIN, J., EDELMAN, A. M., FRENGUELLI, B. G. & HARDIE, D. G. (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell metabolism*, 2 (1): 9-19.
- HAY, N. & SONENBERG, N. (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18 (16): 1926-45.
- HAYES, M. R., LEICHNER, T. M., ZHAO, S., LEE, G. S., CHOWANSKY, A., ZIMMER, D., DE JONGHE, B. C., KANOSKI, S. E., GRILL, H. J. & BENCE, K. K. (2011) Intracellular signals mediating the food intake-suppressive effects of hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation. *Cell metabolism*, 13 (3): 320-30.

- HAYSTEAD, T. A., CAMPBELL, D. G. & HARDIE, D. G. (1988) Analysis of sites phosphorylated on acetyl-CoA carboxylase in response to insulin in isolated adipocytes. Comparison with sites phosphorylated by casein kinase-2 and the calmodulin-dependent multiprotein kinase. *European journal of biochemistry*, 175 (2): 347-54.
- HE, S., YE, Z., DOBBELAAR, P. H., BAKSHI, R. K., HONG, Q., DELLUREFICIO, J. P., SEBHAT, I. K., GUO, L., LIU, J., JIAN, T., LAI, Y., FRANKLIN, C. L., REIBARKH, M., HOLMES, M. A., WEINBERG, D. H., MACNEIL, T., TANG, R., TAMVAKOPOULOS, C., PENG, Q., MILLER, R. R., STEARNS, R. A., CHEN, H. Y., CHEN, A. S., STRACK, A. M., FONG, T. M., WYVRATT, M. J., JR. & NARGUND, R. P. (2010a) Discovery of highly potent and efficacious MC4R agonists with spiroindane N-Me-1,2,4-triazole privileged structures for the treatment of obesity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20 (22): 6524-32.
- HE, S., YE, Z., DOBBELAAR, P. H., SEBHAT, I. K., GUO, L., LIU, J., JIAN, T., LAI, Y., FRANKLIN, C. L., BAKSHI, R. K., DELLUREFICIO, J. P., HONG, Q., WEINBERG, D. H., MACNEIL, T., TANG, R., STRACK, A. M., TAMVAKOPOULOS, C., PENG, Q., MILLER, R. R., STEARNS, R. A., CHEN, H. Y., CHEN, A. S., FONG, T. M., WYVRATT, M. J., JR. & NARGUND, R. P. (2010b) Spiroindane based amides as potent and selective MC4R agonists for the treatment of obesity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20 (15): 4399-405.
- HEIKER, J. T., KOSEL, D. & BECK-SICKINGER, A. G. (2010) Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biological chemistry*, 391 (9): 1005-18.
- HEMMINKI, A., MARKIE, D., TOMLINSON, I., AVIZIENYTE, E., ROTH, S., LOUKOLA, A., BIGNELL, G., WARREN, W., AMINOFF, M., HOGLUND, P., JARVINEN, H., KRISTO, P., PELIN, K., RIDANPAA, M., SALOVAARA, R., TORO, T., BODMER, W., OLSCHWANG, S., OLSEN, A. S., STRATTON, M. R., DE LA CHAPELLE, A. & AALTONEN, L. A. (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*, 391 (6663): 184-7.
- HENIN, N., VINCENT, M. F., GRUBER, H. E. & VAN DEN BERGHE, G. (1995) Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *The FASEB journal*, 9 (7): 541-6.
- HEPLER, J. R. & GILMAN, A. G. (1992) G proteins. *Trends in biochemical sciences*, 17 (10): 383-7.
- HERRERO-MARTIN, G., HOYER-HANSEN, M., GARCIA-GARCIA, C., FUMAROLA, C., FARKAS, T., LOPEZ-RIVAS, A. & JAATTELA, M. (2009) TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *The EMBO Journal*, 28 (6): 677-85.
- HILFIKER, S., PIERIBONE, V. A., CZERNIK, A. J., KAO, H. T., AUGUSTINE, G. J. & GREENGARD, P. (1999) Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 354 (1381): 269-79.
- HIMMLER, A., STRATOWA, C. & CZERNILOFSKY, A. P. (1993) Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines. *Journal of receptor research*, 13 (1-4): 79-94.
- HO, G. & MACKENZIE, R. G. (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *The Journal of biological chemistry*, 274 (50): 35816-22.
- HONG, Q., BAKSHI, R. K., PALUCKI, B. L., PARK, M. K., YE, Z., HE, S., POLLARD, P. G., SEBHAT, I. K., LIU, J., GUO, L., CASHEN, D. E., MARTIN, W. J., WEINBERG, D. H., MACNEIL, T., TANG, R., TAMVAKOPOULOS, C., PENG, Q., MILLER, R. R., STEARNS, R. A., CHEN, H. Y., CHEN, A. S., STRACK, A. M., FONG, T. M., MACINTYRE, D. E., WYVRATT, M. J. & NARGUND, R. P. (2011) Discovery of a piperazine urea based compound as a potent, selective, orally bioavailable melanocortin subtype-4 receptor partial agonist. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21 (8): 2330-4.
- HONG, S. P., LEIPER, F. C., WOODS, A., CARLING, D. & CARLSON, M. (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *PNAS*, 100 (15): 8839-43.
- HONG, S. P., MOMCILOVIC, M. & CARLSON, M. (2005) Function of mammalian LKB1 and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase alpha as Snf1-activating kinases in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 280 (23): 21804-9.
- HONN, K. V., SINGLEY, J. A. & CHAVIN, W. (1975) Fetal bovine serum: a multivariate standard. *PNAS*, 149 (2): 344-7.

- HORMAN, S., VERTOMMEN, D., HEATH, R., NEUMANN, D., MOUTON, V., WOODS, A., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLING, D., HUE, L. & RIDER, M. H. (2006) Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *The Journal of biological chemistry*, 281 (9): 5335-40.
- HOUSLAY, M. D. & KOLCH, W. (2000) Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Molecular pharmacology*, 58 (4): 659-68.
- HSIEH, Y. S., YANG, S. F., CHEN, P. N., CHU, S. C., CHEN, C. H. & KUO, D. Y. (2011) Knocking down the transcript of protein kinase C-lambda modulates hypothalamic glutathione peroxidase, melanocortin receptor and neuropeptide Y gene expression in amphetamine-treated rats. *Journal of psychopharmacology*, 25 (7): 982-94.
- HSU, Y. C. & IP, M. M. (2011) Conjugated linoleic acid-induced apoptosis in mouse mammary tumor cells is mediated by both G protein coupled receptor-dependent activation of the AMP-activated protein kinase pathway and by oxidative stress. *Cellular signalling*, 23 (12): 2013-20.
- HU, Z., DAI, Y., PRENTKI, M., CHOHNAN, S. & LANE, M. D. (2005) A role for hypothalamic malonyl-CoA in the control of food intake. *The Journal of biological chemistry*, 280 (48): 39681-3.
- HUDSON, E. R., PAN, D. A., JAMES, J., LUCOCQ, J. M., HAWLEY, S. A., GREEN, K. A., BABA, O., TERASHIMA, T. & HARDIE, D. G. (2003) A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current biology*, 13 (10): 861-6.
- HUISAMEN, B., GENADE, S. & LOCHNER, A. (2008) Signalling pathways activated by glucagon-like peptide-1 (7-36) amide in the rat heart and their role in protection against ischaemia. *Cardiovascular journal of Africa*, 19 (2): 77-83.
- HURLEY, R. L., ANDERSON, K. A., FRANZONE, J. M., KEMP, B. E., MEANS, A. R. & WITTERS, L. A. (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *The Journal of biological chemistry*, 280 (32): 29060-6.
- HURLEY, R. L., BARRE, L. K., WOOD, S. D., ANDERSON, K. A., KEMP, B. E., MEANS, A. R. & WITTERS, L. A. (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *The Journal of biological chemistry*, 281 (48): 36662-72.
- HUSZAR, D., LYNCH, C. A., FAIRCHILD-HUNTRESS, V., DUNMORE, J. H., FANG, Q., BERKEMEIER, L. R., GU, W., KESTERSON, R. A., BOSTON, B. A., CONE, R. D., SMITH, F. J., CAMPFIELD, L. A., BURN, P. & LEE, F. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88 (1): 131-41.
- HUTCHINSON, D. S., CHERNOGUBOVA, E., DALLNER, O. S., CANNON, B. & BENGTSSON, T. (2005) Beta-adrenoceptors, but not alpha-adrenoceptors, stimulate AMP-activated protein kinase in brown adipocytes independently of uncoupling protein-1. *Diabetologia*, 48 (11): 2386-95.
- HUTCHINSON, D. S., SUMMERS, R. J. & BENGTSSON, T. (2008) Regulation of AMP-activated protein kinase activity by G-protein coupled receptors: potential utility in treatment of diabetes and heart disease. *Pharmacology & therapeutics*, 119 (3): 291-310.
- INGALLS, A. M., DICKIE, M. M. & SNELL, G. D. (1950) Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of heredity*, 41 (12): 317-8.
- INHOFF, T., STENGEL, A., PETER, L., GOEBEL, M., TACHE, Y., BANNERT, N., WIEDENMANN, B., KLAPP, B. F., MONNIKES, H. & KOBELT, P. (2010) Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats. *Peptides*, 31 (2): 257-62.
- INOKI, K., KIM, J. & GUAN, K. L. (2012) AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52: 381-400.
- ISELI, T. J., WALTER, M., VAN DENDEREN, B. J., KATSIS, F., WITTERS, L. A., KEMP, B. E., MICHELL, B. J. & STAPLETON, D. (2005) AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *The Journal of biological chemistry*, 280 (14): 13395-400.
- ITO, A., SATOH, T., KAZIRO, Y. & ITOH, H. (1995) G protein beta gamma subunit activates Ras, Raf, and MAP kinase in HEK 293 cells. *FEBS Letters*, 368 (1): 183-7.

- IWABU, M., YAMAUCHI, T., OKADA-IWABU, M., SATO, K., NAKAGAWA, T., FUNATA, M., YAMAGUCHI, M., NAMIKI, S., NAKAYAMA, R., TABATA, M., OGATA, H., KUBOTA, N., TAKAMOTO, I., HAYASHI, Y. K., YAMAUCHI, N., WAKI, H., FUKAYAMA, M., NISHINO, I., TOKUYAMA, K., UEKI, K., OIKE, Y., ISHII, S., HIROSE, K., SHIMIZU, T., TOUHARA, K. & KADOWAKI, T. (2010) Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature*, 464 (7293): 1313-9.
- JACOBY, E., BOUHELAL, R., GERSPACHER, M. & SEUWEN, K. (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*, 1 (8): 761-82.
- JAMES, W. P. (1998) What are the health risks? The medical consequences of obesity and its health risks. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 106 Suppl 2: 1-6.
- JAMES, W. P., CATERSON, I. D., COUTINHO, W., FINER, N., VAN GAAL, L. F., MAGGIONI, A. P., TORP-PEDERSEN, C., SHARMA, A. M., SHEPHERD, G. M., RODE, R. A. & RENZ, C. L. (2010) Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *The New England journal of medicine*, 363 (10): 905-17.
- JAMORA, C., YAMANOUYE, N., VAN LINT, J., LAUDENSLAGER, J., VANDENHEEDE, J. R., FAULKNER, D. J. & MALHOTRA, V. (1999) Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell*, 98 (1): 59-68.
- JAVADOV, S., RAJAPUROHITAM, V., KILIC, A., ZEIDAN, A., CHOI, A. & KARMAZYN, M. (2009) Anti-hypertrophic effect of NHE-1 inhibition involves GSK-3beta-dependent attenuation of mitochondrial dysfunction. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46 (6): 998-1007.
- JEON, M. K. & CHEON, H. G. (2009) Promising strategies for obesity pharmacotherapy: melanocortin-4 (MC-4) receptor agonists and melanin concentrating hormone (MCH) receptor-1 antagonists. *Current topics in medicinal chemistry*, 9 (6): 504-38.
- JOHANNESSEN, M., DELGHANDI, M. P. & MOENS, U. (2004) What turns CREB on? *Cellular signalling*, 16 (11): 1211-27.
- JOVANOVIC, J. N., BENFENATI, F., SIOW, Y. L., SIHRA, T. S., SANGHERA, J. S., PELECH, S. L., GREENGARD, P. & CZERNIK, A. J. (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *PNAS*, 93 (8): 3679-83.
- KADOWAKI, T. & YAMAUCHI, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, 26 (3): 439-51.
- KALLAL, L., GAGNON, A. W., PENN, R. B. & BENOVIC, J. L. (1998) Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry*, 273 (1): 322-8.
- KANG, J. G. & PARK, C. Y. (2012) Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & metabolism journal*, 36 (1): 13-25.
- KANOSKI, S. E., RUPPRECHT, L. E., FORTIN, S. M., DE JONGHE, B. C. & HAYES, M. R. (2012) The role of nausea in food intake and body weight suppression by peripheral GLP-1 receptor agonists, exendin-4 and liraglutide. *Neuropharmacology*, 62 (5-6): 1916-27.
- KAZGAN, N., WILLIAMS, T., FORSBERG, L. J. & BRENMAN, J. E. (2010) Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase. *Molecular biology of the cell*, 21 (19): 3433-42.
- KHAODHIAR, L., MCCOWEN, K. C. & BLACKBURN, G. L. (1999) Obesity and its comorbid conditions. *Clinical cornerstone*, 2 (3): 17-31.
- KHONG, K., KURTZ, S. E., SYKES, R. L. & CONE, R. D. (2001) Expression of functional melanocortin-4 receptor in the hypothalamic GT1-1 cell line. *Neuroendocrinology*, 74 (3): 193-201.
- KIM, E. K., MILLER, I., AJA, S., LANDREE, L. E., PINN, M., MCFADDEN, J., KUHAJDA, F. P., MORAN, T. H. & RONNETT, G. V. (2004) C75, a fatty acid synthase inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 279 (19): 19970-6.
- KIM, H. S., KIM, M. J., KIM, E. J., YANG, Y., LEE, M. S. & LIM, J. S. (2012) Berberine-induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression. *Biochemical pharmacology*, 83 (3): 385-94.
- KIM, H. S., YUMKHAM, S., CHOI, J. H., SON, G. H., KIM, K., RYU, S. H. & SUH, P. G. (2006) Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC gamma1 pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *The Journal of endocrinology*, 190 (3): 581-91.

Literaturverzeichnis

- KIM, J. A., CHO, K., SHIN, M. S., LEE, W. G., JUNG, N., CHUNG, C. & CHANG, J. K. (2008) A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode. *Biosensors & bioelectronics*, 23 (9): 1353-60.
- KIM, M. S., ROSSI, M., ABUSNANA, S., SUNTER, D., MORGAN, D. G., SMALL, C. J., EDWARDS, C. M., HEATH, M. M., STANLEY, S. A., SEAL, L. J., BHATTI, J. R., SMITH, D. M., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. (2000) Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes*, 49 (2): 177-82.
- KIM, M. S., SMALL, C. J., RUSSELL, S. H., MORGAN, D. G., ABBOTT, C. R., ALAHMED, S. H., HAY, D. L., GHATEI, M. A., SMITH, D. M. & BLOOM, S. R. (2002) Effects of melanocortin receptor ligands on thyrotropin-releasing hormone release: evidence for the differential roles of melanocortin 3 and 4 receptors. *Journal of neuroendocrinology*, 14 (4): 276-82.
- KIM, S. J., NIAN, C. & MCINTOSH, C. H. (2007) Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *The Journal of biological chemistry*, 282 (12): 8557-67.
- KIMBALL, S. R., SIEGFRIED, B. A. & JEFFERSON, L. S. (2004) Glucagon represses signaling through the mammalian target of rapamycin in rat liver by activating AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 279 (52): 54103-9.
- KISHI, K., YUASA, T., MINAMI, A., YAMADA, M., HAGI, A., HAYASHI, H., KEMP, B. E., WITTERS, L. A. & EBINA, Y. (2000) AMP-Activated protein kinase is activated by the stimulations of G(q)-coupled receptors. *Biochemical and biophysical research communications*, 276 (1): 16-22.
- KISHI, T., ASCHKENASI, C. J., LEE, C. E., MOUNTJOY, K. G., SAPER, C. B. & ELMQUIST, J. K. (2003) Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *The Journal of comparative neurology*, 457 (3): 213-35.
- KLEBIG, M. L., WILKINSON, J. E., GEISLER, J. G. & WOYCHIK, R. P. (1995) Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *PNAS*, 92 (11): 4728-32.
- KNOLL, B. & NORDHEIM, A. (2009) Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends in neurosciences*, 32 (8): 432-42.
- KOCH, T., BRANDENBURG, L. O., SCHULZ, S., LIANG, Y., KLEIN, J. & HOLLT, V. (2003) ADP-ribosylation factor-dependent phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis. *The Journal of biological chemistry*, 278 (11): 9979-85.
- KOLA, B., HUBINA, E., TUCCI, S. A., KIRKHAM, T. C., GARCIA, E. A., MITCHELL, S. E., WILLIAMS, L. M., HAWLEY, S. A., HARDIE, D. G., GROSSMAN, A. B. & KORBONITS, M. (2005) Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 280 (26): 25196-201.
- KORZH, A., KEREN, O., GAFNI, M., BAR-JOSEF, H. & SARNE, Y. (2008) Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell. *Brain Research*, 1189: 23-32.
- KREEGIPUU, A., BLOM, N. & BRUNAK, S. (1999) PhosphoBase, a database of phosphorylation sites: release 2.0. *Nucleic acids research*, 27 (1): 237-9.
- KRETSINGER, R. H. (1980) Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC critical reviews in biochemistry*, 8 (2): 119-74.
- KRUDE, H., BIEBERMANN, H., LUCK, W., HORN, R., BRABANT, G. & GRUTERS, A. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nature genetics*, 19 (2): 155-7.
- KUBOTA, N., YANO, W., KUBOTA, T., YAMAUCHI, T., ITOH, S., KUMAGAI, H., KOZONO, H., TAKAMOTO, I., OKAMOTO, S., SHIUCHI, T., SUZUKI, R., SATOH, H., TSUCHIDA, A., MOROI, M., SUGI, K., NODA, T., EBINUMA, H., UETA, Y., KONDO, T., ARAKI, E., EZAKI, O., NAGAI, R., TOBE, K., TERAUCHI, Y., UEKI, K., MINOKOSHI, Y. & KADOWAKI, T. (2007) Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell metabolism*, 6 (1): 55-68.
- KURTH-KRACZEK, E. J., HIRSHMAN, M. F., GOODYEAR, L. J. & WINDER, W. W. (1999) 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*, 48 (8): 1667-71.

- KUSHNER, S. A., ELGERSMA, Y., MURPHY, G. G., JAARSMA, D., VAN WOERDEN, G. M., HOJJATI, M. R., CUI, Y., LEBOUTILLIER, J. C., MARRONE, D. F., CHOI, E. S., DE ZEEUW, C. I., PETIT, T. L., POZZO-MILLER, L. & SILVA, A. J. (2005) Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *The Journal of neuroscience*, 25 (42): 9721-34.
- KYRIAKIS, J. M. & AVRUCH, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiological reviews*, 81 (2): 807-69.
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-5.
- LAKSHMANAN, A. P., HARIMA, M., SUKUMARAN, V., SOETIKNO, V., THANDAVARAYAN, R. A., SUZUKI, K., KODAMA, M., NAGATA, M., TAKAGI, R. & WATANABE, K. (2012) Modulation of AT-1R/AMPK-MAPK cascade plays crucial role for the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy in transgenic type 2 diabetic (Spontaneous Diabetic Torii) rats. *Biochemical pharmacology*, 83 (5): 653-60.
- LAM, D. D., FAROOQI, I. S. & HEISLER, L. K. (2007) Melanocortin receptors as targets in the treatment of obesity. *Current topics in medicinal chemistry*, 7 (11): 1085-1097.
- LANE, M. D., HU, Z., CHA, S. H., DAI, Y., WOLFGANG, M. & SIDHAYE, A. (2005) Role of malonyl-CoA in the hypothalamic control of food intake and energy expenditure. *Biochemical Society transactions*, 33 (Pt 5): 1063-7.
- LANGAN, E. A., NIE, Z. & RHODES, L. E. (2010) Melanotropic peptides: more than just 'Barbie drugs' and 'sun-tan jabs'? *The British journal of dermatology*, 163 (3): 451-5.
- LEE, K., LI, B., XI, X., SUH, Y. & MARTIN, R. J. (2005) Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology*, 146 (1): 3-10.
- LEE, Y., NASEEM, R. H., DUPLOMB, L., PARK, B. H., GARRY, D. J., RICHARDSON, J. A., SCHAFFER, J. E. & UNGER, R. H. (2004) Hyperleptinemia prevents lipotoxic cardiomyopathy in acyl CoA synthase transgenic mice. *PNAS*, 101 (37): 13624-9.
- LEES-MILLER, S. P. & ANDERSON, C. W. (1989) The human double-stranded DNA-activated protein kinase phosphorylates the 90-kDa heat-shock protein, hsp90 alpha at two NH2-terminal threonine residues. *The Journal of biological chemistry*, 264 (29): 17275-80.
- LI, B., LEE, K. & MARTIN, R. J. (2006) Overexpression of glucose transporter 2 in GT1-7 cells inhibits AMP-activated protein kinase and agouti-related peptide expression. *Brain Research*, 1118 (1): 1-5.
- LI, M. F. & CHEUNG, B. M. (2011) Rise and fall of anti-obesity drugs. *World journal of diabetes*, 2 (2): 19-23.
- LICAMELI, V., MATTIACE, L. A., ERLICHMAN, J., DAVIES, P., DICKSON, D. & SHAFIT-ZAGARDO, B. (1992) Regional localization of the regulatory subunit (RII beta) of the type II cAMP-dependent protein kinase in human brain. *Brain Research*, 578 (1-2): 61-8.
- LIU, Q., GAUTHIER, M. S., SUN, L., RUDERMAN, N. & LODISH, H. (2010) Activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway by adiponectin and insulin in mouse adipocytes: requirement of acyl-CoA synthetases FATP1 and Acs11 and association with an elevation in AMP/ATP ratio. *The FASEB journal*, 24 (11): 4229-39.
- LOGOTHETIS, D. E., KURACHI, Y., GALPER, J., NEER, E. J. & CLAPHAM, D. E. (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature*, 325 (6102): 321-6.
- LOPEZ-ILASACA, M. (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochemical pharmacology*, 56 (3): 269-77.
- LU, D., WILLARD, D., PATEL, I. R., KADWELL, S., OVERTON, L., KOST, T., LUTHER, M., CHEN, W., WOYCHIK, R. P., WILKISON, W. O. & ET AL. (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature*, 371 (6500): 799-802.
- LU, D. Y., TANG, C. H., CHEN, Y. H. & WEI, I. H. (2010) Berberine suppresses neuroinflammatory responses through AMP-activated protein kinase activation in BV-2 microglia. *Journal of cellular biochemistry*, 110 (3): 697-705.
- LUTTRELL, L. M., HAWES, B. E., VAN BIESEN, T., LUTTRELL, D. K., LANSING, T. J. & LEFKOWITZ, R. J. (1996) Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *The Journal of biological chemistry*, 271 (32): 19443-50.

- MACKENZIE, R. G. (2006) Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides*, 27 (2): 395-403.
- MACNEIL, D. J., HOWARD, A. D., GUAN, X., FONG, T. M., NARGUND, R. P., BEDNAREK, M. A., GOULET, M. T., WEINBERG, D. H., STRACK, A. M., MARSH, D. J., CHEN, H. Y., SHEN, C. P., CHEN, A. S., ROSENBLUM, C. I., MACNEIL, T., TOTA, M., MACINTYRE, E. D. & VAN DER PLOEG, L. H. (2002) The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *European journal of pharmacology*, 450 (1): 93-109.
- MARIGGIO, S., BAVEC, A., NATALE, E., ZIZZA, P., SALMONA, M., CORDA, D. & DI GIROLAMO, M. (2006) Galpha13 mediates activation of the cytosolic phospholipase A2alpha through fine regulation of ERK phosphorylation. *Cellular signalling*, 18 (12): 2200-8.
- MARSIN, A. S., BERTRAND, L., RIDER, M. H., DEPREZ, J., BEAULOYE, C., VINCENT, M. F., VAN DEN BERGHE, G., CARLING, D. & HUE, L. (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology*, 10 (20): 1247-55.
- MARTIN, N. M., SMITH, K. L., BLOOM, S. R. & SMALL, C. J. (2006) Interactions between the melanocortin system and the hypothalamo-pituitary-thyroid axis. *Peptides*, 27 (2): 333-9.
- MASUZAKI, H., TANAKA, T., EBIHARA, K., HOSODA, K. & NAKAO, K. (2009) Hypothalamic melanocortin signaling and leptin resistance--perspective of therapeutic application for obesity-diabetes syndrome. *Peptides*, 30 (7): 1383-6.
- MATTINGLY, R. R. & MACARA, I. G. (1996) Phosphorylation-dependent activation of the Ras-GRF/CDC25Mm exchange factor by muscarinic receptors and G-protein beta gamma subunits. *Nature*, 382 (6588): 268-72.
- MCNEELY, W. & BENFIELD, P. (1998) Orlistat. *Drugs*, 56 (2): 241-9; discussion 250.
- MEANS, A. R. (2008) The Year in Basic Science: calmodulin kinase cascades. *Molecular endocrinology*, 22 (12): 2759-65.
- MELLON, P. L., WINDLE, J. J., GOLDSMITH, P. C., PADULA, C. A., ROBERTS, J. L. & WEINER, R. I. (1990) Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*, 5 (1): 1-10.
- MILLER, M. W., DUHL, D. M., VRIELING, H., CORDES, S. P., OLLMANN, M. M., WINKES, B. M. & BARSH, G. S. (1993) Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes & development*, 7 (3): 454-67.
- MILLINGTON, G. W. (2006) Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors. *Clinical and experimental dermatology*, 31 (3): 407-12.
- MINOKOSHI, Y., ALQUIER, T., FURUKAWA, N., KIM, Y. B., LEE, A., XUE, B., MU, J., FOUFELLE, F., FERRE, P., BIRNBAUM, M. J., STUCK, B. J. & KAHN, B. B. (2004) AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428 (6982): 569-74.
- MINOKOSHI, Y., KIM, Y. B., PERONI, O. D., FRYER, L. G., MULLER, C., CARLING, D. & KAHN, B. B. (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, 415 (6869): 339-43.
- MITCHELHILL, K. I., STAPLETON, D., GAO, G., HOUSE, C., MICHELL, B., KATSIS, F., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. (1994) Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 269 (4): 2361-4.
- MOMCILOVIC, M., HONG, S. P. & CARLSON, M. (2006) Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 281 (35): 25336-43.
- MORRISON, C. D., XI, X., WHITE, C. L., YE, J. & MARTIN, R. J. (2007) Amino acids inhibit AgRP gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 293 (1): E165-71.
- MORTE, B., INIGUEZ, M. A., LORENZO, P. I. & BERNAL, J. (1997) Thyroid hormone-regulated expression of RC3/neurogranin in the immortalized hypothalamic cell line GT1-7. *Journal of neurochemistry*, 69 (3): 902-9.
- MORTON, G. J., CUMMINGS, D. E., BASKIN, D. G., BARSH, G. S. & SCHWARTZ, M. W. (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443 (7109): 289-95.
- MORTON, G. J. & SCHWARTZ, M. W. (2001) The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 25 Suppl 5: S56-62.

- MOUNTJOY, K. G. (2010) Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *The Biochemical journal*, 428 (3): 305-24.
- MOUNTJOY, K. G., JENNY WU, C. S., DUMONT, L. M. & WILD, J. M. (2003) Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology*, 144 (12): 5488-96.
- MOUNTJOY, K. G., KONG, P. L., TAYLOR, J. A., WILLARD, D. H. & WILKISON, W. O. (2001) Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. *Physiological Genomics*, 5 (1): 11-9.
- MOUNTJOY, K. G., MORTRUD, M. T., LOW, M. J., SIMERLY, R. B. & CONE, R. D. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular endocrinology*, 8 (10): 1298-308.
- MOUNTJOY, K. G., ROBBINS, L. S., MORTRUD, M. T. & CONE, R. D. (1992) The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*, 257 (5074): 1248-51.
- MUEHLICH, S., WANG, R., LEE, S. M., LEWIS, T. C., DAI, C. & PRYWES, R. (2008) Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology*, 28 (20): 6302-13.
- MUNDAY, M. R., CAMPBELL, D. G., CARLING, D. & HARDIE, D. G. (1988) Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry*, 175 (2): 331-8.
- MUNDAY, M. R., HAYSTEAD, T. A., HOLLAND, R., CARLING, D. A. & HARDIE, D. G. (1986) The role of phosphorylation/dephosphorylation of acetyl-CoA carboxylase in the regulation of mammalian fatty acid biosynthesis. *Biochemical Society transactions*, 14 (3): 559-62.
- MURRAY, A. J. (2008) Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling*, 1 (22): re4.
- MUST, A., SPADANO, J., COAKLEY, E. H., FIELD, A. E., COLDITZ, G. & DIETZ, W. H. (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *The journal of the American Medical Association*, 282 (16): 1523-9.
- NAKAZATO, M., MURAKAMI, N., DATE, Y., KOJIMA, M., MATSUO, H., KANGAWA, K. & MATSUKURA, S. (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature*, 409 (6817): 194-8.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M., WANG, Y. & HOFSCHEIDER, P. H. (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal*, 1 (7): 841-5.
- NEVES, S. R., RAM, P. T. & IYENGAR, R. (2002) G protein pathways. *Science*, 296 (5573): 1636-9.
- NEW, D. C. & WONG, Y. H. (2007) Molecular mechanisms mediating the G protein-coupled receptor regulation of cell cycle progression. *Journal of molecular signaling*, 2: 2.
- NEWMAN, E. A., CHAI, B. X., ZHANG, W., LI, J. Y., AMMORI, J. B. & MULHOLLAND, M. W. (2006) Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *Journal of Surgical Research*, 132 (2): 201-7.
- NICKOLLS, S. A., FLECK, B., HOARE, S. R. & MAKI, R. A. (2005) Functional selectivity of melanocortin 4 receptor peptide and nonpeptide agonists: evidence for ligand-specific conformational states. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 313 (3): 1281-8.
- NORDSTROM, E., FISONE, G. & KRISTENSSON, K. (2009) Opposing effects of ERK and p38-JNK MAP kinase pathways on formation of prions in GT1-1 cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23 (2): 613-22.
- NORMAN, C., RUNSWICK, M., POLLOCK, R. & TREISMAN, R. (1988) Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 55 (6): 989-1003.
- ONO, K. & HAN, J. (2000) The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cellular signalling*, 12 (1): 1-13.
- PARK, D., JHON, D. Y., LEE, C. W., LEE, K. H. & RHEE, S. G. (1993) Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *The Journal of biological chemistry*, 268 (7): 4573-6.
- PARK, H. G., YI, H., KIM, S. H., YU, H. S., AHN, Y. M., LEE, Y. H., ROH, M. S. & KIM, Y. S. (2011) The effect of cyclosporine A on the phosphorylation of the AMPK pathway in the rat hippocampus. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35 (8): 1933-7.

- PARK, M., LYONS, J., 3RD, OH, H., YU, Y., WOLTERING, E. A., GREENWAY, F. & YORK, D. A. (2008) Enterostatin inhibition of angiogenesis: possible role of pAMPK and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A). *International journal of obesity*, 32 (6): 922-9.
- PATTEN, C. S., DANIELS, D., SUZUKI, A., FLUHARTY, S. J. & YEE, D. K. (2007) Structural and signaling requirements of the human melanocortin 4 receptor for MAP kinase activation. *Regulatory Peptides*, 142 (3): 111-22.
- PAYNE, D. M., ROSSOMANDO, A. J., MARTINO, P., ERICKSON, A. K., HER, J. H., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO Journal*, 10 (4): 885-92.
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3 (9): 639-50.
- PIMPINELLI, F., REDAELLI, E., RESTANO-CASSULINI, R., CURIA, G., GIACOBINI, P., CARIBONI, A., WANKE, E., BONDILOTTI, G. P., PIVA, F. & MAGGI, R. (2003) Depolarization differentially affects the secretory and migratory properties of two cell lines of immortalized luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *The European journal of neuroscience*, 18 (6): 1410-8.
- PIRKMAJER, S. & CHIBALIN, A. V. (2011) Serum starvation: caveat emptor. *American journal of physiology. Cell physiology*, 301 (2): C272-9.
- PRATT, W. B. & TOFT, D. O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine*, 228 (2): 111-33.
- PREMONT, R. T. & GAINETDINOV, R. R. (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology*, 69: 511-34.
- PRITCHARD, L. E., TURNBULL, A. V. & WHITE, A. (2002) Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *The Journal of endocrinology*, 172 (3): 411-21.
- PROIETTO, J., FAM, B. C., AINSLIE, D. A. & THORBURN, A. W. (2000) Novel anti-obesity drugs. *Expert opinion on investigational drugs*, 9 (6): 1317-26.
- PUMIGLIA, K. M., LEVINE, H., HASKE, T., HABIB, T., JOVE, R. & DECKER, S. J. (1995) A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 270 (24): 14251-4.
- QIAN, S., CHEN, H., WEINGARTH, D., TRUMBAUER, M. E., NOVI, D. E., GUAN, X., YU, H., SHEN, Z., FENG, Y., FRAZIER, E., CHEN, A., CAMACHO, R. E., SHEARMAN, L. P., GOPAL-TRUTER, S., MACNEIL, D. J., VAN DER PLOEG, L. H. & MARSH, D. J. (2002) Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Molecular and cellular biology*, 22 (14): 5027-35.
- QIU, W., ZHUANG, S., VON LINTIG, F. C., BOSS, G. R. & PILZ, R. B. (2000) Cell type-specific regulation of B-Raf kinase by cAMP and 14-3-3 proteins. *The Journal of biological chemistry*, 275 (41): 31921-9.
- RAMAMURTHY, S. & RONNETT, G. V. (2006) Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. *The Journal of physiology*, 574 (Pt 1): 85-93.
- RAMAN, M., CHEN, W. & COBB, M. H. (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, 26 (22): 3100-12.
- RENQUIST, B. J., LIPPERT, R. N., SEBAG, J. A., ELLACOTT, K. L. & CONE, R. D. (2011) Physiological roles of the melanocortin MC receptor. *European journal of pharmacology*, 660 (1): 13-20.
- RIBEIRO-NETO, F., URBANI, J., LEMEE, N., LOU, L. & ALTSCHULER, D. L. (2002) On the mitogenic properties of Rap1b: cAMP-induced G(1)/S entry requires activated and phosphorylated Rap1b. *PNAS*, 99 (8): 5418-23.
- RITTER, S. L. & HALL, R. A. (2009) Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews*, 10 (12): 819-30.
- ROSSI, J., BALTHASAR, N., OLSON, D., SCOTT, M., BERGLUND, E., LEE, C. E., CHOI, M. J., LAUZON, D., LOWELL, B. B. & ELMQUIST, J. K. (2011) Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell metabolism*, 13 (2): 195-204.
- ROZENGURT, E. (2007) Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *Journal of cellular physiology*, 213 (3): 589-602.

- RUBINFELD, H. & SEGER, R. (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Molecular biotechnology*, 31 (2): 151-74.
- RUSSELL, R. R., 3RD, BERGERON, R., SHULMAN, G. I. & YOUNG, L. H. (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *The American journal of physiology*, 277 (2 Pt 2): H643-9.
- RYAN, D. H., KAISER, P. & BRAY, G. A. (1995) Sibutramine: a novel new agent for obesity treatment. *Obesity research*, 3 Suppl 4: 553S-559S.
- SALOMON, Y., LONDOS, C. & RODBELL, M. (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Analytical biochemistry*, 58 (2): 541-8.
- SALVADOR, J., GOMEZ-AMBROSI, J. & FRUHBECK, G. (2001) Perspectives in the therapeutic use of leptin. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2 (10): 1615-22.
- SAWYER, T. K., SANFILIPPO, P. J., HRUBY, V. J., ENGEL, M. H., HEWARD, C. B., BURNETT, J. B. & HADLEY, M. E. (1980) 4-Norleucine, 7-D-phenylalanine-alpha-melanocyte-stimulating hormone: a highly potent alpha-melanotropin with ultralong biological activity. *PNAS*, 77 (10): 5754-8.
- SCHIOTH, H. B., HAITINA, T., LING, M. K., RINGHOLM, A., FREDRIKSSON, R., CERDAREVERTER, J. M. & KLOVINS, J. (2005) Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic characteristics of the melanocortin receptor subtypes. *Peptides*, 26 (10): 1886-900.
- SCHIOTH, H. B., MUCENIECE, R. & WIKBERG, J. E. (1996) Characterisation of the melanocortin 4 receptor by radioligand binding. *Pharmacology & toxicology*, 79 (3): 161-5.
- SCHLESSINGER, J. (1993) How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends in biochemical sciences*, 18 (8): 273-5.
- SCHOENEBERG, T., HOFREITER, M., SCHULZ, A. & ROMPLER, H. (2007) Learning from the past: evolution of GPCR functions. *Trends in pharmacological sciences*, 28 (3): 117-21.
- SCOTT, J. W., HAWLEY, S. A., GREEN, K. A., ANIS, M., STEWART, G., SCULLION, G. A., NORMAN, D. G. & HARDIE, D. G. (2004) CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation*, 113 (2): 274-84.
- SEGER, R. & KREBS, E. G. (1995) The MAPK signaling cascade. *The FASEB journal*, 9 (9): 726-35.
- SEO, S., JU, S., CHUNG, H., LEE, D. & PARK, S. (2008) Acute effects of glucagon-like peptide-1 on hypothalamic neuropeptide and AMP activated kinase expression in fasted rats. *Endocrine journal*, 55 (5): 867-74.
- SHAH, B. H., FARSHORI, M. P., JAMBUSARIA, A. & CATT, K. J. (2003) Roles of Src and epidermal growth factor receptor transactivation in transient and sustained ERK1/2 responses to gonadotropin-releasing hormone receptor activation. *The Journal of biological chemistry*, 278 (21): 19118-26.
- SHAH, B. H., SHAH, F. B. & CATT, K. J. (2006) Role of metalloproteinase-dependent EGF receptor activation in alpha-adrenoceptor-stimulated MAP kinase phosphorylation in GT1-7 neurons. *Journal of neurochemistry*, 96 (2): 520-32.
- SHAUL, Y. D. & SEGER, R. (2007) The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1773 (8): 1213-26.
- SHAW, R. J., KOSMATKA, M., BARDEESY, N., HURLEY, R. L., WITTERS, L. A., DEPINHO, R. A. & CANTLEY, L. C. (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *PNAS*, 101 (10): 3329-35.
- SHEHZAD, A., IQBAL, W., SHEHZAD, O. & LEE, Y. S. (2012) Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones*, 11 (1): 8-20.
- SHIBATA, R., SATO, K., PIMENTEL, D. R., TAKEMURA, Y., KIHARA, S., OHASHI, K., FUNAHASHI, T., OUCHI, N. & WALSH, K. (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nature medicine*, 11 (10): 1096-103.
- SHIH, T. Y., STOKES, P. E., SMYTHERS, G. W., DHAR, R. & OROSZLAN, S. (1982) Characterization of the phosphorylation sites and the surrounding amino acid sequences of the p21 transforming proteins coded for by the Harvey and Kirsten strains of murine sarcoma viruses. *The Journal of biological chemistry*, 257 (19): 11767-73.

- SHIM, J. H., XIAO, C., PASCHAL, A. E., BAILEY, S. T., RAO, P., HAYDEN, M. S., LEE, K. Y., BUSSEY, C., STECKEL, M., TANAKA, N., YAMADA, G., AKIRA, S., MATSUMOTO, K. & GHOSH, S. (2005) TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & development*, 19 (22): 2668-81.
- SHINYAMA, H., MASUZAKI, H., FANG, H. & FLIER, J. S. (2003) Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization. *Endocrinology*, 144 (4): 1301-14.
- SIDEROVSKI, D. P. & WILLARD, F. S. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International journal of biological sciences*, 1 (2): 51-66.
- SINNETT-SMITH, J., ZHUKOVA, E., HSIEH, N., JIANG, X. & ROZENGURT, E. (2004) Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry*, 279 (16): 16883-93.
- SMALL, C. J. & BLOOM, S. R. (2005) The therapeutic potential of gut hormone peptide YY3-36 in the treatment of obesity. *Expert opinion on investigational drugs*, 14 (5): 647-53.
- SOLINSKI, H. J., BOEKHOFF, I., BOUVIER, M., GUDERMANN, T. & BREIT, A. (2010) Sensory neuron-specific MAS-related gene-X1 receptors resist agonist-promoted endocytosis. *Molecular pharmacology*, 78 (2): 249-59.
- SOLTYS, C. L., KOVACIC, S. & DYCK, J. R. (2006) Activation of cardiac AMP-activated protein kinase by LKB1 expression or chemical hypoxia is blunted by increased Akt activity. *American journal of physiology*, 290 (6): H2472-9.
- SOYKA, M. (2008) Rimonabant and depression. *Pharmacopsychiatry*, 41 (5): 204-5.
- STAPLETON, D., GAO, G., MICHELL, B. J., WIDMER, J., MITCHELHILL, K., TEH, T., HOUSE, C. M., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. (1994) Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 269 (47): 29343-6.
- STAPLETON, D., MITCHELHILL, K. I., GAO, G., WIDMER, J., MICHELL, B. J., TEH, T., HOUSE, C. M., FERNANDEZ, C. S., COX, T., WITTERS, L. A. & KEMP, B. E. (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry*, 271 (2): 611-4.
- STATISTISCHES-BUNDESAMT. (2009). *Mikrozensus 2009*, <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/GesundheitszustandRelevantesVerhalten/Tabellen/Koerpermasse.html>.
- STEPHENS, L., SMRCKA, A., COOKE, F. T., JACKSON, T. R., STERNWEIS, P. C. & HAWKINS, P. T. (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell*, 77 (1): 83-93.
- STRYER, L. & BOURNE, H. R. (1986) G proteins: a family of signal transducers. *Annual review of cell biology*, 2: 391-419.
- SUGDEN, P. H. & CLERK, A. (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular signalling*, 9 (5): 337-51.
- SULLIVAN, J. E., BROCKLEHURST, K. J., MARLEY, A. E., CAREY, F., CARLING, D. & BERI, R. K. (1994) Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS Letters*, 353 (1): 33-6.
- SUTHERLAND, C. M., HAWLEY, S. A., MCCARTNEY, R. R., LEECH, A., STARK, M. J., SCHMIDT, M. C. & HARDIE, D. G. (2003) Elm1p is one of three upstream kinases for the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 complex. *Current biology*, 13 (15): 1299-305.
- SUTTON, G. M., DUOS, B., PATTERSON, L. M. & BERTHOUD, H. R. (2005) Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology*, 146 (9): 3739-47.
- TAKAI, Y., SASAKI, T. & MATOZAKI, T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiological reviews*, 81 (1): 153-208.
- TALLENT, M. K., VARGHIS, N., SKOROBOGATKO, Y., HERNANDEZ-CUEBAS, L., WHELAN, K., VOCADLO, D. J. & VOSELLER, K. (2009) In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 284 (1): 174-81.
- TANG, W. J. & GILMAN, A. G. (1991) Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. *Science*, 254 (5037): 1500-3.
- TAO, Y. X. (2010) The melanocortin-4 receptor: physiology, pharmacology, and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 31 (4): 506-43.

- TAYLOR, C. W. & PROLE, D. L. (2012) Ca(2+) Signalling by IP(3) Receptors. *Sub-cellular biochemistry*, 59: 1-34.
- TIAN, X. & FEIG, L. A. (2001) Basis for signaling specificity difference between Sos and Ras-GRF guanine nucleotide exchange factors. *The Journal of biological chemistry*, 276 (50): 47248-56.
- TIAN, X., SWITZER, A. G., DEROSE, S. A., MISHRA, R. K., SOLINSKY, M. G., MUMIN, R. N., EBETINO, F. H., JAYASINGHE, L. R., WEBSTER, M. E., COLSON, A. O., CROSSDOERSEN, D., PINNEY, B. B., FARMER, J. A., DOWTY, M. E., OBRINGER, C. M., CRUZE, C. A., BURKLOW, M. L., SUCHANEK, P. M., DONG, L., DIRR, M. K., SHELDON, R. J. & WOS, J. A. (2008) Discovery of orally bioavailable 1,3,4-trisubstituted 2-oxopiperazine-based melanocortin-4 receptor agonists as potential antiobesity agents. *Journal of medicinal chemistry*, 51 (19): 6055-66.
- TOSKA, K., KLEPPE, R., ARMSTRONG, C. G., MORRICE, N. A., COHEN, P. & HAAVIK, J. (2002) Regulation of tyrosine hydroxylase by stress-activated protein kinases. *Journal of neurochemistry*, 83 (4): 775-83.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, 76 (9): 4350-4.
- TREEBAK, J. T. & WOJTASZEWSKI, J. F. (2008) Role of 5'AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *International journal of obesity*, 32 Suppl 4: S13-7.
- TURNLEY, A. M., STAPLETON, D., MANN, R. J., WITTERS, L. A., KEMP, B. E. & BARTLETT, P. F. (1999) Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 72 (4): 1707-16.
- TURTON, M. D., O'SHEA, D., GUNN, I., BEAK, S. A., EDWARDS, C. M., MEERAN, K., CHOI, S. J., TAYLOR, G. M., HEATH, M. M., LAMBERT, P. D., WILDING, J. P., SMITH, D. M., GHATEI, M. A., HERBERT, J. & BLOOM, S. R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379 (6560): 69-72.
- TUTEJA, N. (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior*, 4 (10): 942-7.
- VAISSE, C., CLEMENT, K., DURAND, E., HERCBERG, S., GUY-GRAND, B. & FROGUEL, P. (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *The Journal of clinical investigation*, 106 (2): 253-62.
- VAISSE, C., CLEMENT, K., GUY-GRAND, B. & FROGUEL, P. (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature genetics*, 20 (2): 113-4.
- VAN BIESEN, T., LUTTRELL, L. M., HAWES, B. E. & LEFKOWITZ, R. J. (1996) Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews*, 17 (6): 698-714.
- VAZQUEZ, G., DUVAL, S., JACOBS, D. R., JR. & SILVENTOINEN, K. (2007) Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis. *Epidemiologic reviews*, 29: 115-28.
- VETTER, M. L., FAULCONBRIDGE, L. F., WEBB, V. L. & WADDEN, T. A. (2010) Behavioral and pharmacologic therapies for obesity. *Nature reviews. Endocrinology*, 6 (10): 578-88.
- VOISEY, J., CARROLL, L. & VAN DAAL, A. (2003) Melanocortins and their receptors and antagonists. *Current drug targets*, 4 (7): 586-97.
- VOISEY, J. & VAN DAAL, A. (2002) Agouti: from mouse to man, from skin to fat. *Pigment cell research*, 15 (1): 10-8.
- VONGS, A., LYNN, N. M. & ROSENBLUM, C. I. (2004) Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regulatory Peptides*, 120 (1-3): 113-8.
- VOSSLER, M. R., YAO, H., YORK, R. D., PAN, M. G., RIM, C. S. & STORK, P. J. (1997) cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*, 89 (1): 73-82.
- VRANG, N., LARSEN, P. J., CLAUSEN, J. T. & KRISTENSEN, P. (1999) Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19 (10): RC5.
- WANG, M. Y., ORCI, L., RAVAZZOLA, M. & UNGER, R. H. (2005) Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *PNAS*, 102 (50): 18011-6.

- WARDEN, S. M., RICHARDSON, C., O'DONNELL, J., JR., STAPLETON, D., KEMP, B. E. & WITTERS, L. A. (2001) Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization. *The Biochemical journal*, 354 (Pt 2): 275-83.
- WATTERSON, K. R., BESTOW, D., GALLAGHER, J., HAMILTON, D. L., ASHFORD, F. B., MEAKIN, P. J. & ASHFORD, M. L. (2012) Anorexigenic and Orexigenic Hormone Modulation of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Activity and the Regulation of Hypothalamic Agouti-Related Protein mRNA Expression. *Neuro-Signals*.
- WEBB, T. R. & CLARK, A. J. (2010) Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins. *Molecular endocrinology*, 24 (3): 475-84.
- WELCH, L. C., LECUONA, E., BRIVA, A., TREJO, H. E., DADA, L. A. & SZNAJDER, J. I. (2010) Extracellular signal-regulated kinase (ERK) participates in the hypercapnia-induced Na,K-ATPase downregulation. *FEBS Letters*, 584 (18): 3985-9.
- WEN, J. P., LIU, C. E., HU, Y. T., CHEN, G. & LIN, L. X. (2010) Globular adiponectin regulates energy homeostasis through AMP-activated protein kinase-acetyl-CoA carboxylase (AMPK/ACC) pathway in the hypothalamus. *Molecular and cellular biochemistry*, 344 (1-2): 109-15.
- WEN, J. P., LV, W. S., YANG, J., NIE, A. F., CHENG, X. B., YANG, Y., GE, Y., LI, X. Y. & NING, G. (2008) Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochemical and biophysical research communications*, 371 (4): 756-61.
- WENNERBERG, K., ROSSMAN, K. L. & DER, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*, 118 (Pt 5): 843-6.
- WESSELLS, H., GRALNEK, D., DORR, R., HRUBY, V. J., HADLEY, M. E. & LEVINE, N. (2000) Effect of an alpha-melanocyte stimulating hormone analog on penile erection and sexual desire in men with organic erectile dysfunction. *Urology*, 56 (4): 641-6.
- WETTSCHURECK, N. & OFFERMANN, S. (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological reviews*, 85 (4): 1159-204.
- WILDING, J. (2000) The future of obesity treatment. *Experientia*, 89: 181-91.
- WINDER, W. W. & HARDIE, D. G. (1996) Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *The American journal of physiology*, 270 (2 Pt 1): E299-304.
- WISSE, B. E. & SCHWARTZ, M. W. (2001) Role of melanocortins in control of obesity. *Lancet*, 358 (9285): 857-9.
- WOODS, A., DICKERSON, K., HEATH, R., HONG, S. P., MOMCILOVIC, M., JOHNSTONE, S. R., CARLSON, M. & CARLING, D. (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*, 2 (1): 21-33.
- WOODS, A., JOHNSTONE, S. R., DICKERSON, K., LEIPER, F. C., FRYER, L. G., NEUMANN, D., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLSON, M. & CARLING, D. (2003a) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology*, 13 (22): 2004-8.
- WOODS, A., VERTOMMEN, D., NEUMANN, D., TURK, R., BAYLISS, J., SCHLATTNER, U., WALLIMANN, T., CARLING, D. & RIDER, M. H. (2003b) Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278 (31): 28434-42.
- WORTLEY, K. E., ANDERSON, K. D., GARCIA, K., MURRAY, J. D., MALINOVA, L., LIU, R., MONCRIEFFE, M., THABET, K., COX, H. J., YANCOPOULOS, G. D., WIEGAND, S. J. & SLEEMAN, M. W. (2004) Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *PNAS*, 101 (21): 8227-32.
- WREN, A. M., SMALL, C. J., WARD, H. L., MURPHY, K. G., DAKIN, C. L., TAHERI, S., KENNEDY, A. R., ROBERTS, G. H., MORGAN, D. G., GHATEL, M. A. & BLOOM, S. R. (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*, 141 (11): 4325-8.
- WU, J., DENT, P., JELINEK, T., WOLFMAN, A., WEBER, M. J. & STURGILL, T. W. (1993) Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, 262 (5136): 1065-9.
- WU, X., MOTOSHIMA, H., MAHADEV, K., STALKER, T. J., SCALIA, R. & GOLDSTEIN, B. J. (2003) Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes*, 52 (6): 1355-63.

Literaturverzeichnis

- WU, Y., SONG, P., XU, J., ZHANG, M. & ZOU, M. H. (2007) Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 282 (13): 9777-88.
- XIAO, R. P. (2001) Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Science's STKE*, 2001 (104): re15.
- XU, A. W. & BARSH, G. S. (2006) MC4R neurons weigh in differently. *Nature neuroscience*, 9 (1): 15-6.
- XU, B., GOULDING, E. H., ZANG, K., CEPOI, D., CONE, R. D., JONES, K. R., TECOTT, L. H. & REICHARDT, L. F. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature neuroscience*, 6 (7): 736-42.
- XU, Y., ELMQUIST, J. K. & FUKUDA, M. (2011) Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1243 (1): 1-14.
- YAMANAKA, A., HIRAGAMI, Y., MAEDA, N., TOKU, S., KAWAHARA, M., NAITO, Y. & YAMAMOTO, H. (2007) Involvement of CaM kinase II in gonadotropin-releasing hormone-induced activation of MAP kinase in cultured hypothalamic neurons. *Archives of biochemistry and biophysics*, 466 (2): 234-41.
- YAMAUCHI, T., KAMON, J., MINOKOSHI, Y., ITO, Y., WAKI, H., UCHIDA, S., YAMASHITA, S., NODA, M., KITA, S., UEKI, K., ETO, K., AKANUMA, Y., FROGUEL, P., FOUFELLE, F., FERRE, P., CARLING, D., KIMURA, S., NAGAI, R., KAHN, B. B. & KADOWAKI, T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*, 8 (11): 1288-95.
- YANG, C. & KAZANIETZ, M. G. (2003) Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends in pharmacological sciences*, 24 (11): 602-8.
- YAO, Z. & SEGER, R. (2009) The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments. *BioFactors*, 35 (5): 407-16.
- YASWEN, L., DIEHL, N., BRENNAN, M. B. & HOCHGESCHWENDER, U. (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature medicine*, 5 (9): 1066-70.
- YEH, L. A., LEE, K. H. & KIM, K. H. (1980) Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. *The Journal of biological chemistry*, 255 (6): 2308-14.
- YEO, G. S., FAROOQI, I. S., AMINIAN, S., HALSALL, D. J., STANHOPE, R. G. & O'RAHILLY, S. (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nature genetics*, 20 (2): 111-2.
- YIN, W., MU, J. & BIRNBAUM, M. J. (2003) Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, 278 (44): 43074-80.
- YOON, S. & SEGER, R. (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*, 24 (1): 21-44.
- YOUNG, S. H. & ROZENGURT, E. (2010) Crosstalk between insulin receptor and G protein-coupled receptor signaling systems leads to Ca(2)+ oscillations in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 401 (1): 154-8.
- YU, X., MCCORKLE, S., WANG, M., LEE, Y., LI, J., SAHA, A. K., UNGER, R. H. & RUDERMAN, N. B. (2004) Leptinomimetic effects of the AMP kinase activator AICAR in leptin-resistant rats: prevention of diabetes and ectopic lipid deposition. *Diabetologia*, 47 (11): 2012-21.
- ZAMANI, M. R. & BRISTOW, D. R. (1996) The histamine H1 receptor in GT1-7 neuronal cells is regulated by calcium influx and KN-62, a putative inhibitor of calcium/calmodulin protein kinase II. *British journal of pharmacology*, 118 (5): 1119-26.
- ZHANG, L., YI, Y., GUO, Q., SUN, Y., MA, S., XIAO, S., GENG, J., ZHENG, Z. & SONG, S. (2012) Hsp90 interacts with AMPK and mediates acetyl-CoA carboxylase phosphorylation. *Cellular signalling*, 24 (4): 859-65.
- ZHANG, Q., BRATTON, G. R., AGARWAL, R. K., CALISE, D., KUGEL, G., WAN, Y. & KUMAR, A. M. (2003) Lead-induced cell signaling cascades in GT1-7 cells. *Brain research bulletin*, 61 (2): 207-17.
- ZHENG, B., JEONG, J. H., ASARA, J. M., YUAN, Y. Y., GRANTER, S. R., CHIN, L. & CANTLEY, L. C. (2009) Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Molecular cell*, 33 (2): 237-47.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Periphere Energie-Regulation	6
Abbildung 3.2:	POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone	10
Abbildung 3.3:	G-Proteinzyklus eines GPCR.....	14
Abbildung 3.4:	GPCR-vermittelte Signaltransduktionskaskaden	15
Abbildung 3.5:	POMC-Spaltprodukte.....	18
Abbildung 3.6:	MAPK-Kaskade	27
Abbildung 3.7:	GPCR-vermittelte Regulation von ERK-1/2.....	30
Abbildung 3.8:	Struktur der AMPK	35
Abbildung 3.9:	Regulation der AMPK an Threonin 172	37
Abbildung 4.1:	Exemplarische Fura-2 Graphen.....	50
Abbildung 4.2:	Schematische Darstellung des Transfersystems.....	56
Abbildung 4.3:	Densitometrische Auswertung eines Immunoblots.....	58
Abbildung 4.4:	Graphische Auswertung von Immunoblots.....	58
Abbildung 4.5:	Funktionsweise einer siRNA.....	61
Abbildung 4.6:	Kinase-Aktivitäts-Array	63
Abbildung 4.7:	PepChip	64
Abbildung 5.1:	cAMP-Akkumulation in GT1-7 Zellen durch verschiedene Stimuli	67
Abbildung 5.2:	Konzentrations-Wirkungs-Kurven verschiedener Melanocortine ...	68
Abbildung 5.3:	α -MSH und NDP-MSH-induzierte ERK Phosphorylierung.....	71
Abbildung 5.4:	Quantifizierung der MC4R-Liganden-induzierten ERK Phosphorylierung	72
Abbildung 5.5:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren.....	73
Abbildung 5.6:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren.....	73
Abbildung 5.7:	Calcium-Ionen-Mobilisation in GT1-7 Zellen durch verschiedene Stimuli	74
Abbildung 5.8:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren	75
Abbildung 5.9:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren	76
Abbildung 5.10:	α -MSH- und DAMGO-induzierte ERK Phosphorylierung	77
Abbildung 5.11:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX.....	77

Anhang

Abbildung 5.12:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von β/γ - und PI3K-Inhibitoren	78
Abbildung 5.13:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von β/γ - und PI3K-Inhibitoren	78
Abbildung 5.14:	FSK-induzierte ERK Phosphorylierung.....	79
Abbildung 5.15:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 30 min.....	80
Abbildung 5.16:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 30 min.....	81
Abbildung 5.17:	KT5720-induzierte ERK Phosphorylierung.....	81
Abbildung 5.18:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 10 min.....	82
Abbildung 5.19:	Quantifizierung der ERK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren für 10 min.....	83
Abbildung 5.20:	Reportergenaktivität in GT1-7 nach verschiedenen Stimuli.....	84
Abbildung 5.21:	α -MSH-induzierte AMPK und ERK Phosphorylierung	85
Abbildung 5.22:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK und ERK Phosphorylierung	86
Abbildung 5.23:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.....	86
Abbildung 5.24:	Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKC-Inhibitoren.....	87
Abbildung 5.25:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX, β/γ - und PI3K-Inhibitoren	88
Abbildung 5.26:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PTX, β/γ - und PI3K-Inhibitoren	89
Abbildung 5.27:	FSK-induzierte AMPK Dephosphorylierung.....	89
Abbildung 5.28:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren.....	90
Abbildung 5.29:	Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren.....	90
Abbildung 5.30:	Basale-Regulation der ERK und AMPK in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren	91
Abbildung 5.31:	Quantifizierung der basalen ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren.....	92
Abbildung 5.32:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren.....	92
Abbildung 5.33:	Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren.....	93
Abbildung 5.34:	Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von AMPKK-Inhibitoren	94
Abbildung 5.35:	Quantifizierung der basalen AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von AMPKK-Inhibitoren	95

Anhang

Abbildung 5.36:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von CaMKK- und TAK1-Inhibitoren	95
Abbildung 5.37:	Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von CaMKK- und TAK1-Inhibitoren	96
Abbildung 5.38:	Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung und der LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor	96
Abbildung 5.39:	Quantifizierung der basalen LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung	97
Abbildung 5.40:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung und LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor	98
Abbildung 5.41:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor	98
Abbildung 5.42:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor	99
Abbildung 5.43:	LKB1 Expression nach Elektroporation von verschiedenen siRNAs	100
Abbildung 5.44:	Basale-Regulation der AMPK Phosphorylierung und der LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von verschiedenen siRNAs	101
Abbildung 5.45:	Quantifizierung der LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit verschiedener siRNAs	101
Abbildung 5.46:	Zusammenhang zwischen der Abnahme der LKB1 Expression und der AMPK Phosphorylierung	102
Abbildung 5.47:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung und LKB1 bzw. ERK Expression in Anwesenheit von siRNAs	103
Abbildung 5.48:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung und LKB1 Expression in Anwesenheit von siRNAs	103
Abbildung 5.49:	Quantifizierung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von siRNAs	104
Abbildung 5.50:	Zusammenfassung der α -MSH-induzierten ERK bzw. AMPK Phosphorylierung in GT1-7 Zellen nach Serumentzug	106
Abbildung 5.51:	Morphologische Veränderung der GT1-7 Zellen nach Serumentzug	107
Abbildung 5.52:	Auswirkungen des Serumentzugs auf die basale AMPK und ERK Phosphorylierung	108
Abbildung 5.53:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung	109
Abbildung 5.54:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung	109
Abbildung 5.55:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	110
Abbildung 5.56:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	111

Anhang

Abbildung 5.57:	α -MSH-induzierte ERK Phosphorylierung unter serumhaltigen Bedingungen	112
Abbildung 5.58:	Basale ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen.....	112
Abbildung 5.59:	Quantifizierung der basalen ERK und AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von MEK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	113
Abbildung 5.60:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	113
Abbildung 5.61:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von PKA-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	114
Abbildung 5.62:	LKB1 Expression und basale Regulation der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor unter serumhaltigen Bedingungen.....	115
Abbildung 5.63:	Quantifizierung der LKB1 Expression und der basalen AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von einem indirektem LKB1-Inhibitor unter serumhaltigen Bedingungen.....	115
Abbildung 5.64:	α -MSH-induzierte AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen	116
Abbildung 5.65:	Quantifizierung der α -MSH-induzierten AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von verschiedenen AMPKK-Inhibitoren unter serumhaltigen Bedingungen.....	117
Abbildung 5.66:	Zusammenfassung der α -MSH-induzierten Effekte in Anwesenheit von Inhibitoren	119
Abbildung 5.67:	PepChip Phosphorylierungsmuster nach verschiedenen Stimuli...	120
Abbildung 5.68:	Quantifizierung einzelner Punkte der PepChips	121
Abbildung 5.69:	PepChip Teil I	122
Abbildung 5.70:	PepChip Teil II.....	123
Abbildung 5.71:	PepChip Teil III.....	125
Abbildung 6.1:	α -MSH-induzierter Signalweg unter serumfreien Bedingungen ...	127
Abbildung 6.2:	α -MSH-induzierte Signalwege unter serumhaltigen Bedingungen	135
Abbildung 6.3:	Potentielle MC4R-vermittelte Signalwege nach Auswertung der PepChips	142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	BMI-Klassifizierung	4
Tabelle 3.2:	Übersicht über die MCR-Familie.....	20
Tabelle 3.3:	Übersicht über die verschiedenen Melanocortine	21
Tabelle 3.4:	Signalwege des MC4R in diversen Zellsystemen chronologisch geordnet.....	25
Tabelle 3.5:	Regulation der AMPK-Aktivität durch verschiedene Mediatoren...	34
Tabelle 4.1:	Überblick über die verwendeten Inhibitoren.....	53
Tabelle 5.1:	Pharmakologische Parameter der verschiedenen Agonisten.....	68
Tabelle 5.2:	Zusammenfassung der ERK-1/2 beziehungsweise AMPK Phosphorylierung [X-fach von basal]	105
Tabelle 5.3:	Zusammenfassung der AMPK Phosphorylierung in Anwesenheit von Inhibitoren [X-fach von basal]	118
Tabelle 5.4:	Positive Ziele der PepChip-Analyse	124
Tabelle 5.5:	PepChip Peptidsequenzen von ERK-1/2 und AMPK	124

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklen
ACC	acetyl-CoA carboxylase
ACTH	Adrenocorticotrop hormone
ADP	Adenosindiphosphat
AgRP	agouti-related protein
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside
AID	autoinhibitorische-Domäne
AMPK	AMP-activated protein kinase
AMPKK	AMP-activated protein kinase kinase
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARC	<i>nucleus arcuatus hypothalami</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A^{yy}	<i>viable yellow agouti mouse</i>
BIM	BIM-X
Bk	Bradykinin
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovine serum albumine
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CaMKK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CART	cocaine and amphetamine regulated transcript
CBS	cystathionine beta synthase
CC	Compound C
CDK5	cyclin-dependent kinase 5
CKII	casein kinase II
CRE	cAMP-response element
CREB	cAMP-response element binding protein
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DCV	<i>dorsal vagal complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	Doppelstrang
DTT	1,4-Dithiothreitol

Anhang

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELK-1	E twenty-six-like transcription factor-1
ER	endoplasmatische Retikulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EtOH	Ethanol
FSK	Forskolin
g	Gramm
GAP	GTPase activating protein
GBD	glycogen binding domain
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	glucagon like peptide-1
Glut4	glucose transporter type 4
GnRH	gonadotropin-releasing hormone
Gö	Gö-6983
GPCR	G Protein coupled receptor
GRK	G Protein coupled receptor kinase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
Hsp90	Heat-shock protein 90
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
icv	intracerebroventricular
ip	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS-1	insulin receptor substrate-1
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KSS1	kinase supressor of Sst2
KT	KT-5720
L	Liter

Anhang

LKB1	liver kinase B1
LM	Lösungsmittel
LY	LY294002
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPK-Kinase-Kinase
MBP	myelin basic protein
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCR	Melanocortin-Rezeptor
MeOH	Methanol
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MSH	melanocyte-stimulating hormone
MT-II	Melanotan-II
mTOR	mammalian target of rapamycin
NES	nuclear export sequence
NPY	Neuropeptide Y
ns	nicht signifikant
NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
OR	Opioid-Rezeptor
Oxo	Oxozeanol
PBS	phosphate buffered saline
PD18	PD184352
PD98	PD98059
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLC	Phospholipase C
POMC	Pro-opiomelanocortin
PP	Protein Phosphatase
PTX	<i>pertussis toxin</i>

Anhang

PVN	<i>nucleus paraventricularis hypothalami</i>
PYY	Peptide YY
Radi	Radicicol
RISC	RNA induced silencing complex
RT	Raumtemperatur
RTK	receptor tyrosine kinase
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
STO	STO609
TAK1	TGF- β -activated kinase-1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	Tyrosinhydroxylase
TMB	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U0	U0126
VMH	<i>nucleus ventromedialis hypothalami</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

Aminosäurenverzeichnis

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Norleucin	Nle	
Ornithin	Orn	O
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	Y
Valin	Val	V

PepChip

Spalte	Reihe	Sequenz	Position	Kinase	Zielstruktur
15	1	ILDTTGQEE	T-59		K-Ras
13	2	EEDLSDENI	S-720	CKII	ARS-binding factor 1
28	2	ESLSSSEES	S-33	CKI	beta-casein
1	3	RRAVSEQDA	S-19	CaMKII	tyrosinehydroxylase
2	3	SEDNSEDEI	S-29	CKII	Acetyl-CoA carboxylase-1
9	3	SGADYPDEL	Y-154		Trypsin-1
25	3	AGDGSDEEV	S-1944		Myosin-9
6	4	RTPPPSG			myelin basic protein
13	4	PRRASATSS	S-116	PKA	glycogen synthase
20	4	EEESD	S-514	CKII	synaptic vesicular amine transporter
19	5	PEETQTQD	T-5	ds-DNA	Heat-shock protein 90
17	6	QEPGSGPPE	S-351		somatostatin receptor type 3
14	7	PRRSSIRNA	S-304		neutrophil cytosol factor 1
21	7	QLSTSEENS	S-146	CKI	alpha-S2-casein
12	8	IEQFSTVKG	S-484	GRK5	G protein coupled receptor kinase
1	12	SSTDSADSG	S-231		early E1A (32 kDa protein)
14	13	PVPKSPVEE	S-608		neurofilament medium polypeptide
16	13	PENDYEDVE	Y-378		HCLS1
14	14	PRRRTRRAS	T-5	PKA	protamine-YII
10	15	EEELYLEPL	Y-918		tyrosine-protein kinase receptor torso
20	16	EENTYDEYE	Y-499	v-Src	src substrate protein p85
15	21	KLINSIADT	S-359		serine/threonine-protein kinase STE7
15	22	IGSESTEDQ	S-63	CKII	alpha-S1-casein
22	23	GSPGTPGSR	T-205		microtubule-associated protein tau
7	24	ETAESSQAE	S-203	CKII	neuromodulin
19	24	ARKKSSAQL	S-179	PKA	Rap-1
28	24	GDVKYADIE	Y-763		PDGF-R-beta
4	25	RPPGFSPFR	S-6		
26	29	KQLASFEIY	S-119		cystatin-S
6	30	DSTYYKASK	Y-577		focal adhesion kinase 1
8	31	RRPTPATVA			protein phosphatase 1
19	31	ARKFSSARP	S-6	PKA	sodium channel protein

Anhang

Spalte	Reihe	Sequenz	Position	Kinase	Zielstruktur
9	32	AVRRSDAA			troponin I
12	32	SEGDSERGE	S-83		serum response factor
10	33	VKRISGLIY	S-47	H4-PK-I	histone H4
4	34	SSNEYMDMK	Y-719	PI3K	SCFR
9	34	LSELSRRRI	S-51	ds-RNA	cap-associated protein CAF 20
17	34	PWRITDNEL	T-1114		NKCC1
9	35	KSFGSPNRI	S-170		cyclin-dependent kinase 7
10	35	KRKQISVAGL			glycogen phosphorylase
14	35	PAAPSPGSS	S-67	ERK-1/2	Synapsin-1
20	36	NDSNYVVKG	Y-821		SCFR
8	37	GNFNYVEFT	Y-155		myosin regulatory light chain 2
14	37	ENPEYLGLD	Y-1248		receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
9	38	SFKKSFKLS	S-161	PKC	MARCKS
17	38	GGYSLG			lysozyme
7	39	VGPDS	S-389		cellular tumor antigen p53
11	39	RRKASGPPV	S-35	PKA	histone H1.1
13	39	PASPSPQRQ	S-553	CDK5	Synapsin-1
1	40	SSSEGAPE	S-13	CKII	clathrin light chain B
7	40	VGFMTYVA	T-183		kinase supressor of Sst2
8	40	STNEYMDMK	Y-721		SCFR
15	41	SRRGSESSE	S-16	PKA	
17	41	PWQVSLRTR	S-597		plasminogen
11	42	SQESSEEEQ	S-91		HMG-I/Y

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Gudermann für die Möglichkeit, am Walther-Straub-Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Bei meinem Doktorvater Dr. Dr. Harald Mückter möchte ich mich herzlichst bedanken: Lieber Harald, vielen Dank für die grandiose, lange, intensive Betreuung und den Ouzo.

Ich möchte mich im Voraus bei meinen unbekanntem Gutachtern für die Mühe bei der Begutachtung bedanken.

Ganz herzlich darf, will, kann, möchte und muss ich mich bei Dr. Andreas Breit bedanken. Für seine lange Unterstützung, viele Freiheiten, die zwei Möglichkeiten, eine immer offene Tür, Burger und Football, und natürlich für die viel zitierte gute Flasche Wein. Danke.

Ein riesiges, gigantisches, phänomenales, unendlich großes Dankeschön geht an den besten Kollegen der Welt: Jürgen Solinski. Es ist unglaublich wie viel Du in den letzten Jahren für mich gewesen bist: Kollege, DJ, Büronachbar, Lexikon, Wasser-Taxi, Sänger, Laborabschnittsgefährte, Kellerkind, Notrufsäule, Mensch, der einem den Rücken freihält (wörtlich und bildlich), Kaffeegeldeintreiber, Arbeitsehemann, Wachholder-Liebhaber, Lektor und vor allem Freund. Ich wünsche Dir und Franzi von ganzem Herzen alles Gute.

Dann sind da natürlich noch meine Mädels: Andrea, Dorke, Heike, Lilli und Nele, die jeden Arbeitstag deutlich aufgewertet haben.

Andrea Wartenberg möchte ich für ihre stets hilfsbereite Art danken und bedauere, dass unsere gemeinsame Zeit im Institut nicht länger war.

Der unglaublichen „Erklärbarin“ Dorke Meyer möchte ich besonders danken. Danke fürs Mitleiden, Arbeitsvermitteln, Korrigieren, Diskutieren, Immer da sein, Aufbauen, Abbauen, Organisieren und und und... Danke, Du bist großartig.

Heike Borth möchte ich für vieles danken: Für Raucherpausen (für eine Nichtraucherin), Zuhören, Reden, Kuchen, Kaffee und den ganz normalen Wahnsinn.

Anhang

Lill(i) Arndt danke ich vor allem dafür, dass sie einen immer wieder zum Lachen bringt. Vielen Dank für die Unterstützung bei der Besteigung des Mount-Everest, die Gerüstwette und natürlich danke für Wolle. Bleibt nur noch zu sagen: Löwe.

Nele Zitranski möchte ich für jedes Frühstück in den letzten Jahren danken und für die positive Assoziation mit dem Geruch von verbranntem Toast. Und vor allem Danke für die wundervoll kreativen Zettel - es ist unglaublich, wie einen das Anstellen der Kühlzentrifuge zum Lächeln bringen kann.

Stefanie Stohr, der einsamen Wächterin des ersten Stocks, möchte ich ebenfalls danken. Der Gang zum Chemi-Smart war durch deine Anwesenheit deutlich angenehmer, Skifahrten lustiger, der Heimweg sicherer und der Eisbock leckerer.

Dann sind da natürlich noch meine beiden Männer: Heinz Janser und Peter Mann, die vom ersten Tag an den Umzug nach München lohnenswert gemacht haben. Danke vor allem für die vielen kleinen und großen Dinge, die über die sonst schon großartige Arbeit von euch hinausgegangen sind, wie z.B. die Raubtierfütterungen im Keller und der grandiose Fahrrad-Reparatur-Service.

Allen anderen WASTI-Mitarbeitern, die den Laboralltag so angenehm gemacht haben möchte ich ebenfalls danken. Besonders müssen noch Renate Heilmair und Christiana „Oehli“ Oehlmann erwähnt werden, die durch ihre erfrischende Art es immer schaffen einen aufzubauen.

Ich möchte mich ebenfalls bei Doris Estermann und Rosa Rizzi bedanken, die jeden Morgen für mich da waren und leider viel zu wenig gewürdigt werden.

Meiner großen Schwester Sibylle Elisabeth Damm danke ich für das Aufnehmen der kleinen Schwester in München und die vielen kleinen und großen Unterstützungen.

Nun zu meinen Eltern: Vielen Dank, dass ihr die besten Eltern der Welt seid. Ich hab zwar immer noch kein Pony, aber das darf auch so bleiben. Danke für alles!

Um abschließend alles aufzulisten, wofür ich Stefan Thier danke, bräuchte ich nochmal so viele Seiten. Deswegen nur kurz: Danke.