

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

**CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung  
in murinen Hypothalamuszellen**

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

vorgelegt von

**Evi Glas**

aus Ingolstadt

2016

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alexander Faußner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2017



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
3.1	Adipositas als Krankheitsbild .....	5
3.2	Appetitregulation und Energiehomöostase .....	6
3.2.1	Periphere Appetitregulation .....	7
3.2.2	Appetitregulation im Hypothalamus.....	9
3.2.3	Thyreotroper Regelkreis.....	11
3.3	G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	13
3.4	<i>cAMP response element-binding protein</i> (CREB) als Transkriptionsfaktor .....	15
3.4.1	Aufbau und Cofaktoren von CREB .....	16
3.4.2	Aktivierung von CREB .....	18
3.4.3	Phosphorylierung von CREB am Serin 133.....	19
3.4.4	Funktionen von CREB.....	20
3.4.5	Rolle von CREB im Hypothalamus .....	21
3.5	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon und der MC4R.....	21
3.5.1	$\alpha$ -MSH-induzierte Expression von TRH .....	22
3.6	<i>Exchange factor directly activated by cAMP</i> .....	24
3.7	<i>Extracellular signal-regulated kinase-1/2</i> .....	28
3.8	Neuropeptid Y .....	30
3.9	Bradykinin.....	31
3.10	Serotonin .....	33
3.11	Wachstumsfaktoren.....	34
3.11.1	Epidermaler Wachstumsfaktor .....	35
3.11.2	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren.....	36
3.11.3	Nervenwachstumsfaktor .....	37
3.12	Zielsetzung .....	40
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>42</b>
4.1	Material.....	42
4.1.1	Geräte.....	42
4.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	42
4.1.3	Reagenzien .....	43
4.1.4	Zielstrukturen und Konzentrationen der eingesetzten Agonisten .....	43
4.1.5	Zielstrukturen und Konzentrationen der chemischen Inhibitoren und Antagonisten.....	44
4.1.6	Antikörper.....	44
4.1.6.1	Primärantikörper (nicht konjugiert) .....	44
4.1.6.2	Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert.....	44

4.1.7	siRNA.....	44
4.1.8	Molekularbiologie .....	45
4.1.9	Zelllinien und Nährmedien .....	45
4.1.10	Bakterien .....	46
4.1.11	Reportergenkonstrukt .....	46
4.2	Methoden .....	47
4.2.1	Zellkultur.....	47
4.2.1.1	Kultivierung von Zellen.....	47
4.2.1.2	Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff.....	47
4.2.1.3	Auftauen kryokonservierter Zellen.....	48
4.2.1.4	Transfektion.....	48
4.2.1.4.1	Transfektion mit TurboFect® .....	48
4.2.1.4.2	Transfektion von small interfering RNA mittels Elektroporation.....	49
4.2.1.5	Herstellung stabil-exprimierender mHypoA-2/10-CRE-Luc Zellen.....	50
4.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	51
4.2.2.1	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien .....	51
4.2.2.2	Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock .....	52
4.2.2.3	Quantitative Plasmidisolierung .....	52
4.2.2.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen .....	53
4.2.3	Zellbiologische Methoden.....	54
4.2.3.1	Messung der Phosphorylierung von Proteinen.....	54
4.2.3.1.1	Herstellung von Proteinlysaten.....	54
4.2.3.1.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) .....	55
4.2.3.1.3	Western Blot .....	56
4.2.3.2	Nachweis der PKA-Aktivität .....	59
4.2.3.3	Bestimmung der zellulären cAMP-Akkumulation.....	60
4.2.3.4	Messung der CRE-Reporteraktivität .....	62
4.2.3.4.1	Stabile Expression des CRE-Reportergenkonstrukts.....	62
4.2.3.4.2	Transiente Expression des CRE-Reportergenkonstrukts.....	64
4.2.3.5	Messung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen mittels Fura-2-AM.....	64
4.2.3.5.1	Bestimmung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen (Plate Reader).....	65
4.2.3.5.2	Bestimmung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentrationen (Calcium-Imaging).....	66
4.2.3.6	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	67
4.2.3.6.1	RNA-Isolation aus Zellen.....	68
4.2.3.6.2	Reverse Transkription .....	69
4.2.3.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR.....	69
4.2.4	Statistische Methoden.....	72
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>73</b>
5.1	Charakterisierung einer hypothalamischen Zelllinie .....	73
5.1.1	Funktioneller Nachweis des MCR und des YR .....	73
5.1.2	Funktioneller Nachweis des BR.....	78
5.1.3	Funktioneller Nachweis des 5-HTR.....	79

5.2	Liganden-induzierte CREB-Phosphorylierung.....	84
5.3	Liganden-induzierte CRE-Reporteraktivierung.....	87
5.4	Korrelation zwischen CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivität .....	88
5.5	Abhängigkeit der BK-induzierten CREB/CRE-Aktivierung von PKC .....	89
5.6	$\alpha$ -MSH-induzierte CREB/CRE-Aktivierung .....	91
5.6.1	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von PKA.....	92
5.6.2	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von EPAC....	94
5.7	Nachweis der $\alpha$ -MSH-vermittelten PKA-Aktivierung.....	95
5.8	Funktioneller Nachweis des MC4R in GT1-7 und HEK-293-Zellen .....	96
5.9	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung von PKA und EPAC in GT1-7 und HEK-293-Zellen .....	98
5.9.1	HEK-293-MC4R-Zellen .....	98
5.9.2	GT1-7-Zellen .....	100
5.10	Analyse der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197.....	101
5.10.1	Abhängigkeit der Serum-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von ESI-09 und HJC0197 .....	102
5.10.2	Effekte von ESI-09 und HJC0197 auf die BK-induzierte $Ca^{2+}$ -Freisetzung.....	103
5.10.3	Effekte von ESI-09 auf die $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation 104	
5.11	$\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung .....	106
5.11.1	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von PKA .....	106
5.11.2	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von EPAC... ..	107
5.12	Rolle der ERK-1/2 bei der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung.....	108
5.12.1	$\alpha$ -MSH-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung.....	108
5.12.2	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung von EPAC 109	
5.12.3	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2 110	
5.12.4	Abhängigkeit der EGF-, IGF- und NGF-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2 .....	111
5.12.5	Abhängigkeit der 5-HT-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2..	113
5.12.6	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von ERK-1/2 115	
5.13	Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von Rap1A	117
5.14	Bedeutung von PKA und EPAC für die $\alpha$ -MSH-induzierte Genexpression in mHypoA-2/10-CRE-Zellen.....	121
5.14.1	c-Fos-mRNA-Expression.....	121
5.14.2	TRH-mRNA-Expression.....	122
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>124</b>
6.1	$\alpha$ -MSH-vermittelte CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus .....	124
6.2	mHypoA-2/10-CRE-Zellen als geeignetes Zellsystem.....	125

6.3	Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Reporteraktivierung.....	128
6.4	CREB- und CRE-regulierende Kinasen im PVN.....	135
6.5	EPAC als neues ‚Target‘ des MC4R.....	142
6.6	Rolle von EPAC bei der $\alpha$ -MSH-induzierten Genexpression.....	146
6.7	Ausblick.....	149
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>151</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>I</b>
	Abbildungsverzeichnis.....	I
	Tabellenverzeichnis.....	III
	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
	Strukturformeln der chemischen Inhibitoren, Agonisten und Antagonisten.....	VIII
	Publikationsverzeichnis.....	IX
	Eidesstattliche Versicherung.....	X
	Danksagung.....	XI

# 1 Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein* (CREB) ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, darunter auch an der Appetitregulation im Hypothalamus. Für die Regulation des Appetits ist die Phosphorylierung von CREB durch das anorexigene  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH) von essentieller Bedeutung, da diese Phosphorylierung mit einer Aktivierung von CRE-abhängiger Genexpression gleichgesetzt wird. Eine  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung konnte im rekombinanten Zellsystem und *in vivo* gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wird eine Rolle für die cAMP-abhängige Protein-kinase A (PKA) bei der CREB-Phosphorylierung und ein Zusammenhang zwischen der CREB-Phosphorylierung und CRE-abhängiger Genexpression nur postuliert. Es fehlen experimentelle Nachweise, da die Untersuchung dieser intrazellulären Signalkaskaden *in vivo* nur bedingt möglich ist und ein geeignetes Zellmodell bislang fehlte. Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines geeigneten Zellmodells die  $\alpha$ -MSH-induzierte Signalkaskade detailliert zu analysieren.

In dieser Arbeit konnte für hypothalamische mHypoA-2/10-CRE-Zellen der Maus erstmals gezeigt werden, dass nicht die PKA, sondern die *extracellular signal-regulated kinases-1/2* (ERK-1/2) die zuständigen Kinasen für die CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung durch  $\alpha$ -MSH sind. Zur weiteren Vervollständigung der Signalkaskade wurde zum ersten Mal gezeigt, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Phosphorylierung von ERK-1/2 vom *exchange factor directly activated by cAMP* (EPAC) abhängig war. Die Bedeutung der EPAC/ERK-1/2/CREB Signalkaskade konnte durch eigene Daten aus murinen GT1-7-Zellen und humanen HEK-293-Zellen gestützt werden. Da die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Expression des physiologisch relevanten, CREB-abhängigen Gens für das Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) auch von EPAC abhängig war, kann die  $\alpha$ -MSH-induzierte EPAC/ERK-1/2/CREB-Signalkaskade für die Behandlung der Adipositas interessant sein.

In dieser Arbeit wurden weitere Hormone identifiziert, die im hypothalamischen Zellmodell CREB phosphorylieren. Für Bradykinin wurde sowohl für die CREB-Phosphorylierung als

auch für die CRE-Reporteraktivierung gezeigt, dass beide Ereignisse durch die Proteinkinase C vermittelt werden. Interessanterweise war die CREB-Phosphorylierung durch 5-Hydroxytryptamin und Wachstumsfaktoren (EGF, IGF und NGF), ähnlich zu  $\alpha$ -MSH, ERK-1/2-abhängig, jedoch führte diese Modulation von CREB nicht zu einer Erhöhung der CRE-Reporteraktivität. Diese Ergebnisse zeigen, dass die CREB-Phosphorylierung in hypothalamischen Zellen nicht mit einer CRE-Aktivierung gleichgesetzt werden kann und die Untersuchung der CREB-Phosphorylierung nicht ausreichend ist, um auf eine CRE-abhängige Genexpression *in vivo* zu schließen.

## 2 Summary

$\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)-induced phosphorylation of the *cAMP response element-binding protein* (CREB) at serin 133 is an important event in hypothalamic appetite regulation and appears to be connected with CRE-dependent gene expression.  $\alpha$ -MSH-induced phosphorylation of CREB has been shown in numerous recombinant cell models as well as *in vivo*, but the role of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) in this process has not been rigorously worked out experimentally. Furthermore, experiments showing the connection between CREB phosphorylation and hypothalamic CRE activation are missing. So far the analysis of these intracellular signaling pathways was hindered, due to the lack of suitable cell models. The aim of this work was to characterize  $\alpha$ -MSH-induced CREB/CRE activation in detail by using appropriate hypothalamic cell models.

Analysis of the hypothalamic murine cell line mHypoA-2/10-CRE revealed that *extracellular signal-regulated kinases-1/2* (ERK-1/2) and not PKA are responsible for  $\alpha$ -MSH-induced CREB phosphorylation and CRE activation. Additionally, *exchange factors directly activated by cAMP* (EPAC) were identified as the molecular connection between the  $\alpha$ -MSH-bound receptor and ERK-1/2. The significance of this new EPAC/ERK-1/2/CREB signaling pathway was shown in murine GT1-7 and human HEK-293 cells.  $\alpha$ -MSH-induced EPAC/ERK-1/2/CREB signaling pathways could be useful for developing anti-obesity drugs, because  $\alpha$ -MSH-induced expression of TRH, which is physiologically relevant for energy homeostasis, was also found to be EPAC-dependent.

The presented work revealed for the first time that other hormones besides  $\alpha$ -MSH also phosphorylate CREB in hypothalamic cells. For example, bradykinin-induced CREB phosphorylation and CRE activation was found to be dependent on protein kinase C activity. Of note, no ligand-induced CRE activation was detectable although CREB phosphorylation induced by 5-hydroxytryptamine or growth factors (EGF, IGF and NGF) was, as with  $\alpha$ -MSH, dependent on ERK-1/2 activity. These results strongly suggest that hypothalamic CREB

phosphorylation does not necessarily lead to CRE-dependent gene expression. Hence, monitoring CREB phosphorylation is not sufficient to make conclusions on CRE-dependent gene expression *in vivo*.

## 3 Einleitung

### 3.1 Adipositas als Krankheitsbild

Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wurden im Jahr 2014 39 % der Weltbevölkerung im Alter von über 18 Jahren als übergewichtig eingestuft, weitere 13 % galten als adipös (WHO 2014). Adipositas bezeichnet eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfetts. Als Maß für die Klassifizierung des Übergewichts wird der Body-Mass-Index (BMI) verwendet, der sich nach der Formel  $\text{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / \text{Körperlänge [m]}^2$  berechnet (WHO 1995). Ein BMI von 18,5–25  $\text{kg/m}^2$  wird als Normalgewicht eingestuft, alle Werte darunter als Untergewicht. Bei einem BMI von 25–30  $\text{kg/m}^2$  spricht man von Präadipositas (Übergewicht), während man ab einem BMI von 30  $\text{kg/m}^2$  als adipös gilt (WHO 1995). Der durchschnittliche BMI der Deutschen lag bei 26,3  $\text{kg/m}^2$ , also laut Definition über dem Normalgewicht (WHO 2014).

Adipositas gilt als chronische, multifaktoriell verursachte Erkrankung, welche durch genetische Ursachen und viele Umwelt- und Lebensstilfaktoren beeinflusst wird (WHO 2000; WIRTH *et al.* 2014). Neben den offensichtlichen Faktoren wie Fehlernährung oder Bewegungsmangel kommen auch Risikofaktoren wie Erkrankungen oder einige Medikamente hinzu (WIRTH *et al.* 2014). Adipositas wird mit zahlreichen Folgeerkrankungen wie kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2, Insulinresistenz und einer Vielzahl an Tumorerkrankungen assoziiert und geht mit einer erhöhten Mortalität einher (CHAN *et al.* 1994; ABBASI *et al.* 2002; WILSON *et al.* 2002; GORAN *et al.* 2003; MOKDAD *et al.* 2003; QATANANI UND LAZAR 2007; FLEGAL *et al.* 2013). Trotz der vielen Adipositaspatienten gibt es nur verhältnismäßig wenige Therapieansätze, die mit hohen Kosten und teilweise schweren Nebenwirkungen verbunden sind, während die Effekte auf die Gewichtsreduktion moderat sind (PADWAL UND MAJUMDAR 2009; KANG UND PARK 2012; SALTIEL 2016). Zur Behandlung wird zum Beispiel der spezifische Serotonin-2C-Rezeptor (5-HT<sub>2C</sub>R)-Agonist Lorcaserin eingesetzt (ARONNE *et al.* 2014).

Eine interessante Zielstruktur für die Behandlung von Adipositas stellt der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) dar, auf dessen Rolle bei der Appetitregulation in Kapitel 3.2.2 und 3.5

genauer eingegangen wird. Die Aktivierung des MC4R hat eine anorexigene Wirkung und erhöht den Energieverbrauch des Organismus (CUMMINGS UND SCHWARTZ 2000). An Tiermodellen konnte für Melanotan-II (MT-II) nach intracerebroventrikulärer Injektion eine Gewichtsreduktion festgestellt werden (HANSEN *et al.* 2005). Es wurde bereits eine Vielzahl von MC4R-Agonisten in vorklinischen und klinischen Studien bezüglich Gewichtsabnahme und Nebenwirkungen untersucht, z. B. MT-II und MK-0493 (FANI *et al.* 2014). Wegen unspezifischer Bindungen an weitere MCR und Nebenwirkungen wie Geschmacksaversion (= Ablehnung gewisser Geschmacksreize) und Erektionsstörungen wurde MT-II nicht für klinische Studien zugelassen (WESSELLS *et al.* 2000; HANSEN *et al.* 2005; FANI *et al.* 2014). Durch die chronische Behandlung mit MC4R-Agonisten stiegen Blutdruck und Herzfrequenz (KIEVIT *et al.* 2013).

Es besteht ein großer Forschungsbedarf, um das Verständnis der Energiehomöostase und Appetitregulation zu erweitern und um neue Therapieansätze und Medikamente zur Gewichtsreduktion zu entwickeln, deren Effekte größer und die Nebenwirkungen geringer ausfallen.

### 3.2 Appetitregulation und Energiehomöostase

Die Regulation des Appetits und der Energiehomöostase des Körpers ist komplex und durch unterschiedliche Komponenten gesteuert. Hauptsächlich erfolgt die Appetitregulation über das zentrale Nervensystem (ZNS) und über periphere Organe und Gewebe wie z. B. den GI-Trakt, das Fettgewebe, das Pankreas oder die Leber (DRUCE UND BLOOM 2006). Neben der Beteiligung von physiologischen Mechanismen spielen auch psychologische Faktoren sowie das Verhalten eine wichtige Rolle (GREENBERG *et al.* 2005), auf die im Rahmen dieser Arbeit aber nicht näher eingegangen wird. Die Aufrechterhaltung der Energiehomöostase ist notwendig, damit die Nahrungsaufnahme und der Energieverbrauch im Gleichgewicht sind, um Adipositas oder auch Untergewicht zu vermeiden.

### 3.2.1 Periphere Appetitregulation

Vor, während und nach der Nahrungsaufnahme werden durch die beteiligten Organe und Gewebe Sättigungssignale und -hormone an das ZNS weitergeben und dort verarbeitet.

Die Bildung von Insulin erfolgt in den  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas in Folge eines erhöhten Blutzuckerspiegels. Sättigungshormone wie *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) oder auch Cholecystokin (CCK) nehmen Einfluss auf die Insulinsekretion. Insulin wirkt über die Bindung an den Insulin-Rezeptor (IR), welcher in vielen Zellen, aber besonders in Fett-, Leber- und Muskelzellen und im Hypothalamus exprimiert wird (CUATRECASAS 1972; WERTHER *et al.* 1987; BRUNETTI *et al.* 1989). Die Folge der Insulinbindung ist die Senkung des Blutglucosespiegels (PILKIS UND GRANNER 1992; MICHAEL *et al.* 2000; OBICI *et al.* 2002). Eine Störung des Insulinhaushalts führt zum Diabetes. Da IR und Leptin-Rezeptoren (Ob-R) im ZNS zu finden sind, bewirkt die direkte Injektion von Leptin oder Insulin in das Gehirn von Tieren eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, verbunden mit einem Gewichtsverlust (FRIEDMAN UND HALAAS 1998; AIR *et al.* 2002).

Leptin ist ein Adipokin (= Fettgewebshormon), welches hauptsächlich in den Adipozyten des weißen Fettgewebes, aber auch im Magen und im Hypothalamus synthetisiert wird (ZHANG *et al.* 1994; BADO *et al.* 1998; MORASH *et al.* 1999). Da die Plasmakonzentration von Leptin direkt proportional zum Körperfettanteil ist, wird damit der Energiestatus des Körpers widerspiegelt (CONSIDINE *et al.* 1996). Ob-R sind in diversen Organen wie Leber, Herz und Niere zu finden, aber auch in unterschiedlichen Kerngebieten des Hypothalamus, wie dem Nucleus arcuatus (ARC) und dem Nucleus paraventricularis (PVN) (MARGETIC *et al.* 2002). Durch die Bindung von Leptin an Ob-R im Hypothalamus wird die Stimulation von anorexigenen Peptiden gefördert und die Produktion von orexigenen Hormonen gehemmt (BANKS 2006). Speziell an den Neuronen im PVN führt die Stimulation mit Leptin zur Expression des Thyreotropin Releasing Hormons (TRH) (HARRIS *et al.* 2001; GUO *et al.* 2004). Leptin wirkt aber nicht nur auf Neurone des ZNS, sondern z. B. auch auf T-Zellen oder auf Zellen des Pankreas (LORD *et al.* 1998; SEUFERT 2004).

Das erste als Sättigungssignal charakterisierte Hormon ist CCK (GIBBS *et al.* 1973). Durch Nahrungsbestandteile wie Fettsäuren oder Proteine wird CCK aus den enteroendokrinen I-Zellen des Duodenum ins Blut sezerniert. Durch die Bindung an CCK-Rezeptoren führt CCK zu einer Kontraktion der Gallenblase und steigert die Freisetzung pankreatischer Enzyme, hemmt die Entleerung des Magens und die Sekretion von Magensäure (CHEY *et al.* 1970; YAMAGISHI UND DEBAS 1978; GRIDER 1994; SONOBE *et al.* 1995; LIDDLE 1997; RAYBOULD 2007). CCK-Rezeptoren sind sowohl im Nervus vagus als auch im Gehirn exprimiert. Die Stimulation der CCK-Rezeptoren im Gehirn bewirkt ein Sättigungsgefühl und gipfelt im Stopp der Nahrungsaufnahme (REHFELD 1981; BOOSALIS *et al.* 1992).

Als weiteres Sättigungshormon ist GLP-1 bekannt, dessen Produktion in den L-Zellen des Ileums und des Kolons stattfindet. GLP-1 zählt zu den Inkretinen, welche die Freisetzung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas stimulieren, die Freisetzung von Glucagon inhibieren und somit maßgeblich am Glucosemetabolismus des Körpers beteiligt sind (DRUCKER *et al.* 1987; MOJSOV *et al.* 1987). Die Sekretion von GLP-1 führt zu einer verzögerten Entleerung des Magens in den Darm und hemmt die Produktion von Magensaft (O'HALLORAN *et al.* 1990; IMERYUZ *et al.* 1997). Rezeptoren für GLP-1 sind in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen oder dem GI-Trakt zu finden, aber auch in Neuronen des ZNS (THORENS 1992; WEI UND MOJSOV 1995; ALVAREZ *et al.* 2005). Wegen der anorexigenen Wirkung und der Stimulation der Insulinsekretion werden GLP-1-Rezeptor-Agonisten für die Behandlung von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt (TURTON *et al.* 1996; AHREN 2011).

Auch das anorexigen wirkende Hormon Peptid YY (PYY) wird von den L-Zellen des Ileums und des Kolons synthetisiert und ausgeschüttet (LUNDBERG *et al.* 1982; BATTERHAM *et al.* 2002). Die Freisetzung von PYY erfolgt hauptsächlich als Antwort auf Fette, die mit der Nahrung aufgenommen werden (LIN UND CHEY 2003). PYY liegt in zwei Formen vor: PYY<sub>1-36</sub> und PYY<sub>3-36</sub>, welche beide an Rezeptoren der Familie des Neuropeptids Y (NPY) binden. Dabei bindet PYY<sub>1-36</sub> an die Subtypen NPY-1-Rezeptoren (Y1R), Y2R und Y5R, während PYY<sub>3-36</sub> bevorzugt den Y2R aktiviert, der auch im Hypothalamus vertreten ist. Es wurde gezeigt, dass PYY über den Y2R seine anorexigene Wirkung stimuliert, da in Y2R-defizienten

Mäusen die PYY-vermittelte Reduktion der Nahrungsaufnahme inhibiert ist (BATTERHAM *et al.* 2002; BATTERHAM UND BLOOM 2003). Die intracerebroventrikuläre Gabe von PYY<sub>3-36</sub> in den PVN hat im Gegensatz dazu einen orexigenen Effekt und stimuliert die Nahrungsaufnahme durch die Aktivierung von Y1R und Y5R, welche auf den Neuronen des PVNs zu finden sind (MORLEY *et al.* 1985; STANLEY *et al.* 1985; DE SILVA UND BLOOM 2012).

Bei Ghrelin handelt es sich um einen orexigenen Stimulus, der hauptsächlich in den Epithelzellen im Fundusbereich des Magens, aber auch in der Niere und im ZNS synthetisiert wird (KOJIMA *et al.* 1999; WILLESEN *et al.* 1999; MORI *et al.* 2000; YAMAZAKI *et al.* 2002). Im ZNS ist der Hypothalamus die wichtigste Struktur, die Ghrelin synthetisiert (SATO *et al.* 2005). Ghrelin bindet direkt an *growth hormone secretagogue* (GHS)-Rezeptoren u. a. im ARC des Hypothalamus und im Stammhirn, um seine orexigene Wirkung zu entfalten (WIEDMER *et al.* 2007; FERRINI *et al.* 2009). Erhöhte Ghrelin-Konzentrationen werden in Patienten mit Prader-Willi-Syndrom für die Entwicklung von Hyperphagie und Übergewicht verantwortlich gemacht (CUMMINGS *et al.* 2002).

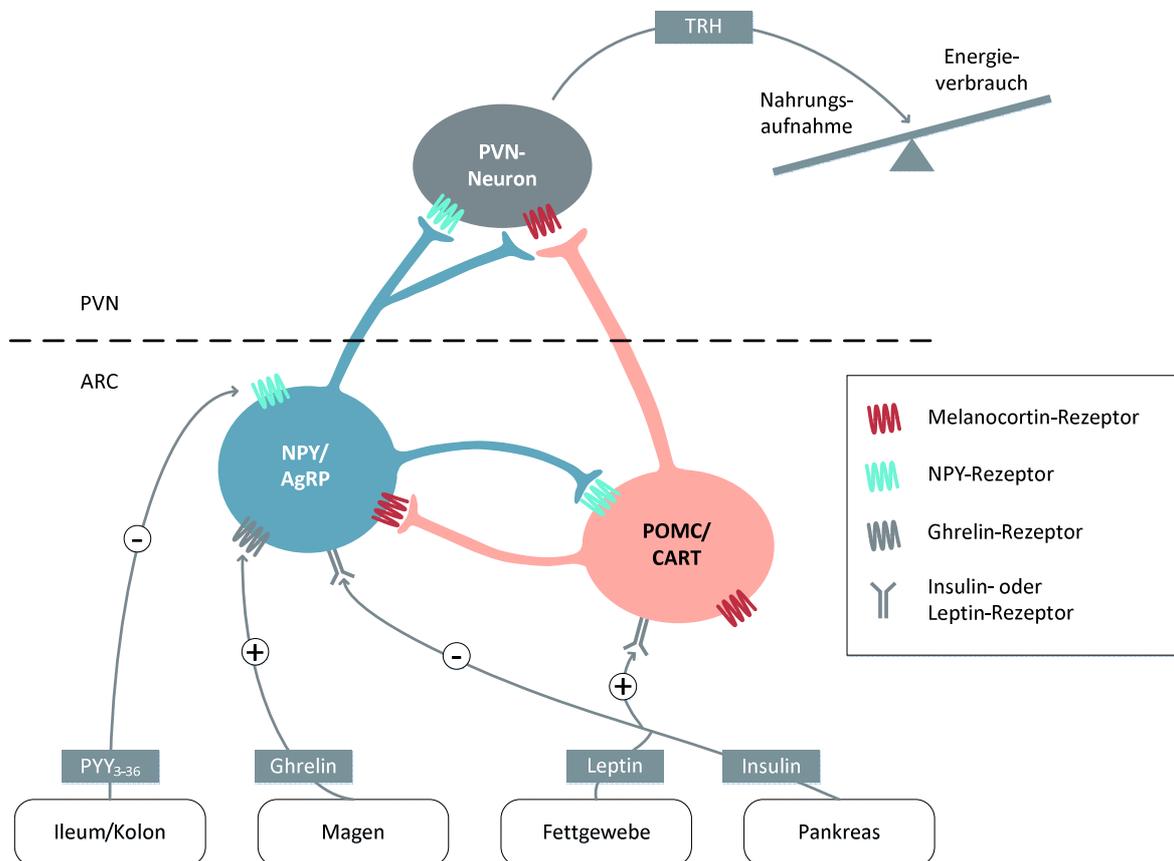
### 3.2.2 Appetitregulation im Hypothalamus

Für die Aufnahme und Verarbeitung der Hunger- und Sättigungssignale aus der Peripherie ist der Hypothalamus die zentrale Schaltstelle im ZNS (Abbildung 3.1). Wichtig ist dabei der ARC, ein Kerngebiet des Hypothalamus, der reziproke Verbindungen zu anderen Teilen des Hypothalamus wie dem PVN und dem lateralen Hypothalamus besitzt. Die Neuronen des ARC lassen sich in 2 Gruppen gliedern. Einerseits gibt es die NPY/AgRP-Neurone, welche die orexigen wirkenden Peptide NPY und *agouti-related protein* (AgRP) freisetzen können (MORTON UND SCHWARTZ 2001). Andererseits gibt es Neurone, die die anorexigenen Hormone Pro-Opiomelanocortin (POMC) und *cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART) synthetisieren können und als POMC/CART-Neurone bezeichnet werden (VRANG *et al.* 1999). Die Freisetzung von NPY im ARC ist abhängig vom Energiestatus. Im gesättigten Zustand ist die NPY-Konzentration verringert, unter Hungerbedingungen erhöht (BECK *et al.* 1990). Die Konzentration des Prohormons POMC bzw. des daraus prozessierten Peptidhormons  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon ( $\alpha$ -MSH) verhält sich dazu invertiert.

Unter Hungerbedingungen ist die Expression von POMC/ $\alpha$ -MSH verringert, im gesättigten Zustand liegen die anorexigenen Hormone in höherer Konzentration vor (SCHWARTZ *et al.* 1997). Das Fehlen von POMC oder POMC/CART-Neuronen führt zur Ausbildung von Adipositas in Mäusen (YASWEN *et al.* 1999; GROPP *et al.* 2005; SMART *et al.* 2006). Im Vergleich hierzu führt der *knock-out* von AgRP in älteren Mäusen zu einer verringerten Nahrungsaufnahme und resultiert in einem reduzierten Körpergewicht, wohingegen junge Mäuse weder von einem AgRP- noch von einem NPY-Defizit beeinträchtigt sind (PALMITER *et al.* 1998; QIAN *et al.* 2002; BEWICK *et al.* 2005; LUQUET *et al.* 2005). Das Vorhandensein von Rezeptoren für z. B. PYY, GLP-1, Ghrelin, Leptin und Insulin auf Neuronen des Hypothalamus ermöglicht die Kommunikation mit der Peripherie (MARGETIC *et al.* 2002; BATTERHAM UND BLOOM 2003; WIEDMER *et al.* 2007; SANDOVAL *et al.* 2008; LIN *et al.* 2010). Die Stimulation durch das in der Peripherie freigesetzte Leptin führt im ARC zu einer Stimulation der anorexigenen POMC/CART-Neurone und inhibiert die orexigenen NPY/AgRP-Neurone, was in einer Verminderung der Nahrungsaufnahme und Erhöhung des Energieumsatzes resultiert (ELIAS *et al.* 1998). Das in Kapitel 3.2.1 beschriebene Hungerhormon Ghrelin erhöhte im ARC die Aktivität der NPY/AgRP-Neurone und somit die Ausschüttung orexigener Hormone (COWLEY *et al.* 2003).

Die orexigenen und anorexigenen Signale des ARC werden an Neurone in anderen Kerngebieten des Hypothalamus weitergeleitet, wobei der PVN von besonderer Bedeutung ist. Die Neuronen des PVN zeichnen sich durch den Besitz einer besonders hohen Anzahl an Melanotonin-3-Rezeptoren (MC3R) und MC4R aus, aber auch durch die Expression von verschiedenen YR (GERALD *et al.* 1996; KIM *et al.* 2000; SHUKLA *et al.* 2012). Der MC4R kann sowohl durch die Stimulation von den POMC/CART-Neuronen produzierten MC4R-Agonisten anorexigen wirken oder durch die von den AgRP/NPY-Neuronen freigesetzten MC4R-Antagonisten inhibiert werden (WISSE UND SCHWARTZ 2001). Dadurch wird deutlich, welche zentrale Rolle der MC4R bei der Appetitregulation einnimmt. Durch die Stimulation der PVN-Neurone mit Hormonen aus dem ARC werden je nach Neuronentyp über differenzierte Signalkaskaden das TRH oder das Corticotropin-Releasing Hormon (CRH)

freigesetzt (FEKETE *et al.* 2000b; FEKETE *et al.* 2000c). Sowohl TRH als auch CRH wirken anorexigen und reduzieren über unterschiedliche Signalwege die Nahrungsaufnahme (RICHARD *et al.* 2000). Im nachfolgenden Kapitel 3.2.3 wird der thyreotrope Regelkreis, der die Signalkaskade von TRH umfasst, genauer erläutert.



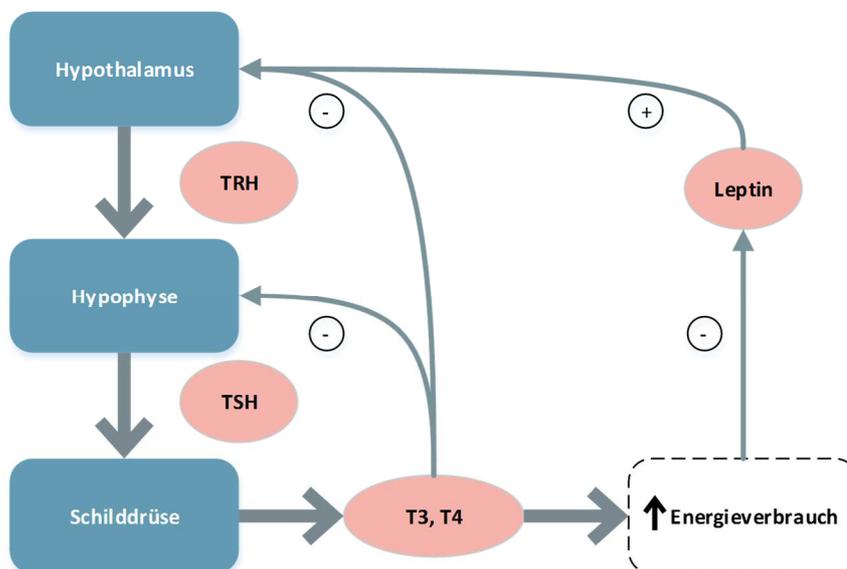
**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Appetitregulation durch Sättigungssignale aus der Peripherie und deren Verarbeitung im ARC und PVN des Hypothalamus**

Die POMC/CART- und NPY/AgRP-Neurone des ARC empfangen Hunger- und Sättigungssignale aus der Peripherie und verarbeiten diese über die jeweiligen Rezeptoren. In Folge der Stimulation der Neurone des ARC wird das orexigen wirkende NPY bzw. das anorexigen wirkende  $\alpha$ -MSH freigesetzt. Die freigesetzten Hormone regulieren über Rezeptoren auf den Neuronen des PVN die Freisetzung des TRH, wodurch die Nahrungsaufnahme vermindert wird und der Energieverbrauch erhöht wird. Plus- bzw. Minus-Zeichen symbolisieren die Stimulation bzw. Inhibition der jeweiligen Neurone.

### 3.2.3 Thyreotroper Regelkreis

Der thyreotrope Regelkreis, welcher auch als *hypothalamic-pituitary-thyroid axis* (HPT-Achse) bezeichnet wird, beschreibt die Regulation von Schilddrüsenhormonen im Plasma (YAMADA *et al.* 1997b). Leptin kann sowohl direkt über Ob-R im PVN oder indirekt über die Stimulation der POMC/CART-Neurone und Inhibition der AgRP/NPY-Neurone im ARC die Expression von TRH initiieren (ELIAS *et al.* 1998; HARRIS *et al.* 2001; GUO *et al.*

2004). Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, wird dafür das im Hypothalamus gebildete TRH über das hypothalamisch-hypophysäre Portalgefäßsystem an die Hypophyse weitergeleitet, wo es nach der Bindung an den TRH-Rezeptor-1 (TRHR1) zu einer Ausschüttung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) kommt. Über das Blut gelangt das TSH zur Schilddrüse, wo es die Bildung der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) stimuliert. Über eine negative Rückkopplung führt die Produktion von T3 und T4 im Hypothalamus und im Hypophysenvorderlappen zu einer Inhibition der TRH- bzw. TSH-Freisetzung (DIETRICH *et al.* 2004). T3 und T4 erhöhen den Energieverbrauch und die metabolische Effizienz des Körpers (YEHUDA-SHNAIDMAN *et al.* 2014).



**Abbildung 3.2: Thyreotroper Regelkreis**

Durch die Freisetzung von Leptin wird die Expression von TRH im Hypothalamus stimuliert. Als Folge der TRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus wird in der Hypophyse die Expression von TSH angeregt. Das sekretierte TSH führt in der Schilddrüse zur Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4, die den Energieverbrauch des Körpers erhöhen und die Nahrungsaufnahme reduzieren. Die Hochregulation von T3 und T4 inhibiert über negative Rückkopplung die Expression von TRH im Hypothalamus und TSH in der Hypophyse.

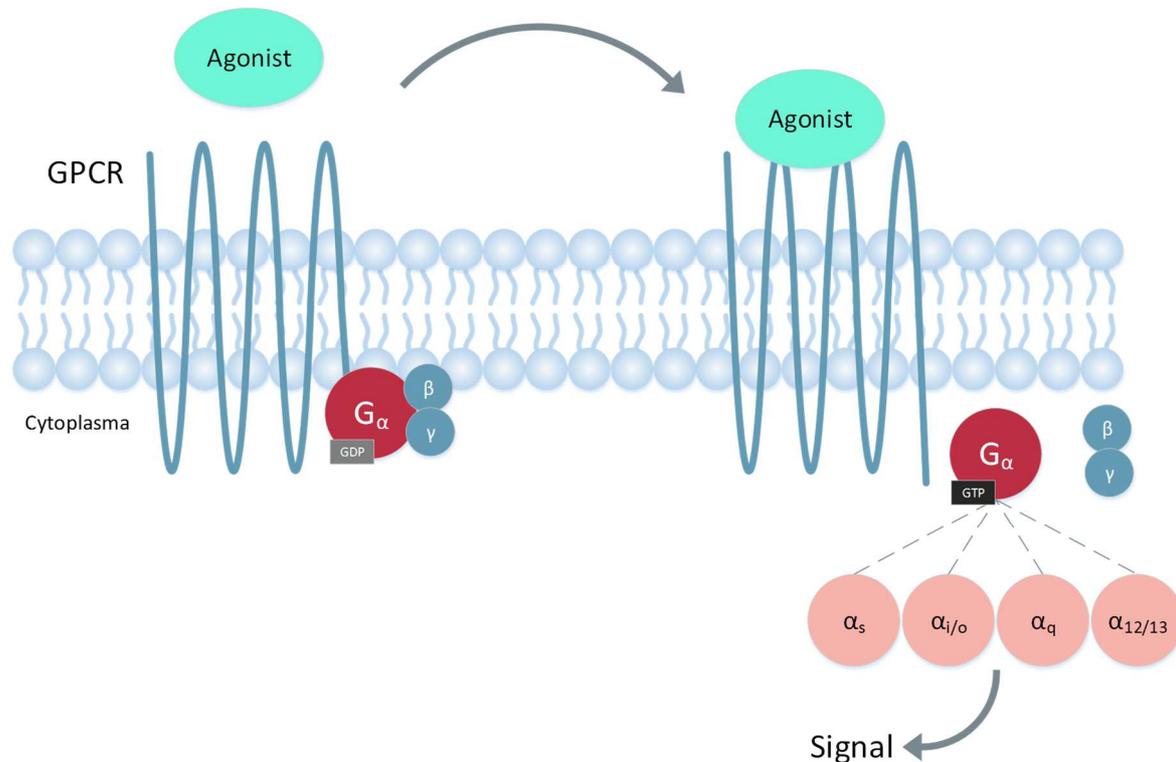
Den bekanntesten Stimulus für TRH stellt das von den POMC/CART-Neuronen im ARC gebildete  $\alpha$ -MSH dar (FEKETE *et al.* 2000a; HARRIS *et al.* 2001). Die Untersuchung der Genexpression von TRH mittels eines Überexpressionssystems hat gezeigt, dass die Stimulation der Zellen sowohl mit  $\alpha$ -MSH als auch mit Leptin zu einer Aktivierung des TRH-Promoters führten, dafür jedoch unterschiedliche Signalwege verantwortlich waren.  $\alpha$ -MSH aktivierte TRH über die Phosphorylierung des *cAMP response element-binding proteins* (CREB) und

Leptin über die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3) (HARRIS *et al.* 2001). Obwohl bereits gezeigt wurde, dass Leptin zu einer TRH-Expression im PVN führte, war lange unklar, ob diese Stimulation direkt erfolgte oder über Signale, die vom ARC an den PVN weitergeleitet wurden (LEGRADI *et al.* 1997a). Daten, die zeigten, dass die chemische Ausschaltung des ARC die Expression von TRH durch Leptin blockte, unterstützten die Hypothese, dass Leptin nur indirekt die TRH-Ausschüttung beeinflussen kann (LEGRADI *et al.* 1998). Es wurde auch postuliert, dass Leptin direkt und indirekt an der TRH-Freisetzung im PVN beteiligt ist (HARRIS *et al.* 2001; GUO *et al.* 2004).

### 3.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Für die Verarbeitung einer Vielzahl von Sättigungssignalen in Organen, Geweben und Neuronen des ZNS ist die Interaktion von Hormonen mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) essentiell. Über GPCR werden extrazelluläre Signale in das Zellinnere geleitet und Signalkaskaden werden aktiviert. GPCRs stellen mit über 1000 Mitgliedern die größte Proteinsuperfamilie im Genom der Säuger dar (JACOBY *et al.* 2006). Sie sind mit ihren sieben Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert und mit heterotrimeren Guanosin-nukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) im Zellinneren verbunden. Die Helixstrukturen, welche die Zellmembran durchspannen, sind über jeweils drei intra- bzw. extrazelluläre Peptidketten miteinander verknüpft. Im extrazellulären Raum ist der N-Terminus der GPCR lokalisiert, während der C-Terminus im intrazellulären Raum liegt. Die Bindung eines Agonisten aus dem extrazellulären Raum resultiert in einer Aktivierung der intrazellulären G-Proteine, die unterschiedliche Signalkaskaden zur Signalweiterleitung benutzen können (WETTSCHURECK UND OFFERMANN 2005; JACOBY *et al.* 2006; STEVENS *et al.* 2013). Die heterotrimeren G-Proteine sind aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit zusammengesetzt, wobei die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit einen Komplex bilden (GILMAN 1987). Im inaktiven Zustand ist an die  $\alpha$ -Untereinheit des GPCRs ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden, welches durch die Aktivierung des GPCRs in Funktion eines *guanine nucleotide exchange factors* (GEF) freigesetzt wird und ein GTP an die Untereinheit bindet. Aus der Aktivierung des G-Proteins resultiert der Zerfall der  $\alpha$ -Untereinheit und des  $\beta/\gamma$ -Komplexes

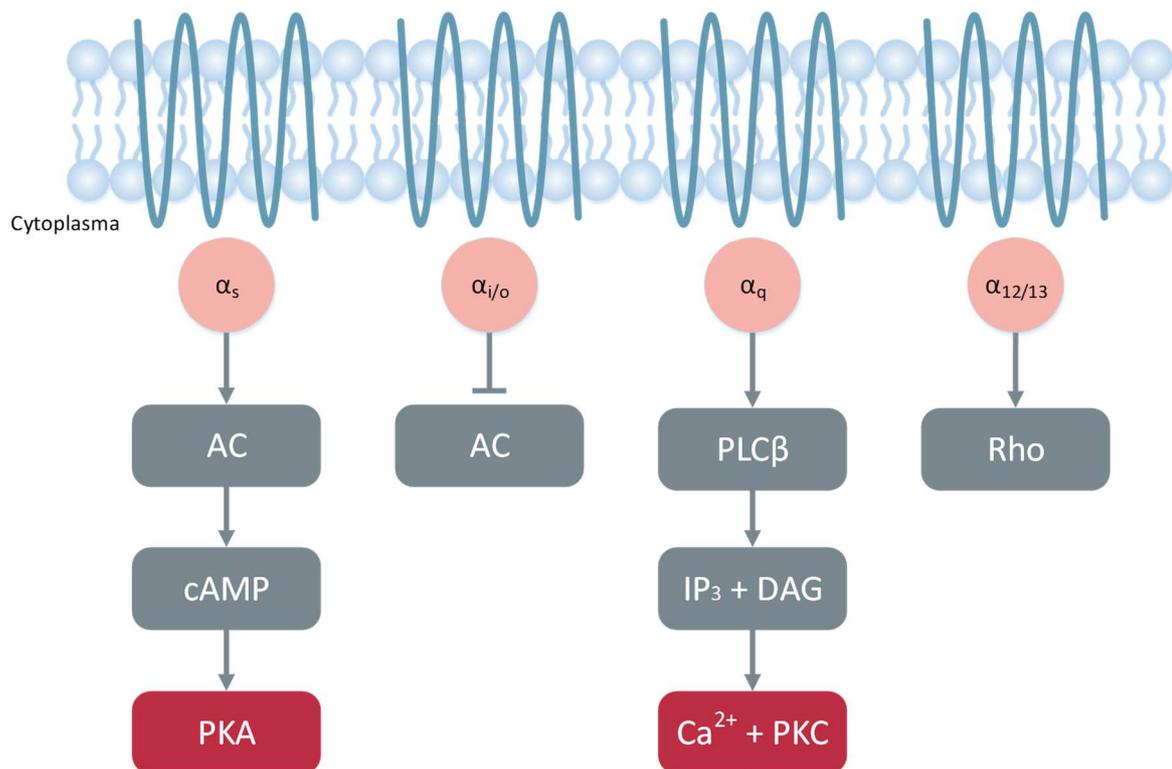
und die Stimulation diverser Signalkaskaden (Abbildung 3.3). Die Hydrolyse von GTP zu GDP der  $\alpha$ -Untereinheit durch *GTPase activating proteins* (GAP) ermöglicht die Bildung eines neuen heterotrimeren G-Proteins.



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der G-Protein-Aktivierung**

Nach der Bindung eines Agonisten aus dem extrazellulären Raum an den GPCR kommt es zu einer Trennung der heterotrimeren G-Proteine, wobei die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit einen Komplex bilden. Im inaktiven Zustand ist GDP an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden, welches nach Aktivierung mittels eines GTP-Austauschfaktors zu GTP wird. Man unterscheidet zwischen 4  $\alpha$ -Untergruppen der G-Proteine:  $G_s$ ,  $G_{i/o}$ ,  $G_q$  und  $G_{12/13}$ . Die Aktivierung der G-Proteine löst je nach Agonist und  $\alpha$ -Untereinheit verschiedene Signalkaskaden im intrazellulären Raum der Zielzelle aus.

Die G-Proteine lassen sich durch ihre induzierten Signalkaskaden in vier Gruppen einteilen:  $G_s$ ,  $G_{q/11}$ ,  $G_{i/o}$  und  $G_{12/13}$  (HEPLER UND GILMAN 1992). Vereinfacht in Abbildung 3.4 dargestellt, resultiert aus der Aktivierung von G-Proteinen die Konzentrationsänderung eines *second messenger* (z. B. cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP),  $Ca^{2+}$  oder Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ )). Durch den *second messenger* können je nach Signal unterschiedliche Kinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die der Signalweiterleitung dienen (WETTSCHURECK UND OFFERMANN 2005; JACOBY *et al.* 2006). Auf die Wirkungsweisen und typischen Signalwege einzelner  $G\alpha$ -Proteine wird anhand ausgewählter Liganden genauer eingegangen.



**Abbildung 3.4: Darstellung der charakteristischen Signalkaskaden der 4 Subtypen von G $\alpha$ -Untereinheiten**

Durch die Aktivierung von G $_s$ -Proteinen werden Adenylzyklasen (AC) aktiviert, was in einer Erhöhung des cAMP-Spiegels resultiert. Dies kann z. B. zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führen. Die Aktivierung von G $_{i/o}$ -Proteinen hat einen inhibitorischen Effekt auf die AC. Als zelluläre Antwort auf die Aktivierung von G $_q$ -Proteinen wird die Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) stimuliert, wodurch die Spaltung von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) in IP $_3$  und Diacylglycerin (DAG) katalysiert wird. Dies resultiert in einer Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration und einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Das *ras homologue* (Rho) wird durch die Aktivierung von G $_{12/13}$  Proteinen aktiviert.

### 3.4 *cAMP response element-binding protein* (CREB) als Transkriptionsfaktor

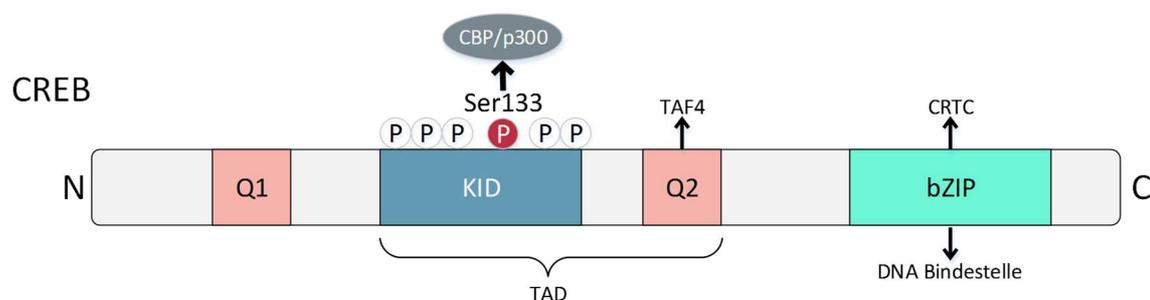
Die Interaktion von Hormonen mit ihren GPCRs führt zur Aktivierung von Signalkaskaden im intrazellulären Raum. So kann das von Neuronen im ARC freigesetzte Hormon  $\alpha$ -MSH an seine Rezeptoren auf Neuronen des PVN binden und die Expression von Zielgenen wie TRH bewirken (FEKETE *et al.* 2000b). Innerhalb der intrazellulären Signalkaskaden sind Transkriptionsfaktoren notwendig, die die Transkription des Zielgens positiv oder negativ regulieren, indem sie Einfluss auf die Initiation der Transkription nehmen. Transkriptionsfaktoren können an bestimmte Zielsequenzen der DNA in der Region eines Promotors binden. Es gibt jedoch auch Transkriptionsfaktoren, die nicht direkt an die DNA binden, sondern an andere DNA-bindende Proteine. Über Protein-Protein-Interaktionen können Transkriptionsfaktoren neben der DNA noch weitere Transkriptionsfaktoren oder die RNA-Polymerase binden. Der Aktivitätszustand von Transkriptionsfaktoren kann direkt durch

die Synthese, aber auch durch weitere Modifikationen, wie z. B. die Phosphorylierung beeinflusst werden (PABO UND SAUER 1992; SPITZ UND FURLONG 2012). Man unterscheidet zwischen allgemeinen Transkriptionsfaktoren, die grundsätzlich für die Transkription eines Zielgens notwendig sind, und spezifischen Transkriptionsfaktoren, die vermitteln, welches Gen exprimiert werden soll. Allgemeine Transkriptionsfaktoren werden in allen Zellen exprimiert, während spezifische Transkriptionsfaktoren auch nur in bestimmten Zellen vorkommen können (PABO UND SAUER 1992). Zu den bekanntesten spezifischen Transkriptionsfaktoren gehört CREB, der die Expression von Zielgenen stimulieren kann, die eine spezifische *cAMP response element* (CRE)-Sequenz in ihrem Promotor enthalten. Namensgebend für den Transkriptionsfaktor CREB ist, dass er in Folge von einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle aktiviert wird und an eine CRE-Sequenz binden kann (JOHANNESSEN *et al.* 2004; CARLEZON *et al.* 2005).

### 3.4.1 Aufbau und Cofaktoren von CREB

Zur CREB-Familie der *cAMP-responsive activators* gehören CREB, der *cAMP response element modulator* (CREM) und der *activating transcription factor 1* (ATF-1). Der Transkriptionsfaktor CREB ist aus unterschiedlichen funktionellen Domänen aufgebaut: *amino-terminal transactivation domain* (TAD), *carboxy-terminal basic Leu zipper* (bZIP) DNA-Bindestelle und Dimerisierungsstelle (Abbildung 3.5). Die TAD lässt sich in die *central kinase-inducible domain* (KID) und die glutaminreiche *constitutive activation domain* (Q2) einteilen (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Die Q2-Domäne kann die Transkriptionsrate des Zielgens durch die Interaktion mit dem TBP-associated factor 4 (TAF4), der zu dem basalen Transkriptionsfaktor IID (TFIID) gehört, erhöhen (FERRERI *et al.* 1994). Die KID-Domäne zeichnet sich durch eine Vielzahl an Phosphorylierungsstellen aus, die bei der CREB-Aktivierung beteiligt sein können (BRINDLE *et al.* 1993; QUINN 1993; ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in der KID-Domäne führt zur Interaktion mit der KIX-Domäne des *CREB-binding protein* (CBP) und seinem Paralog p300 (KID-KIX-Komplex) (CARDINAUX *et al.* 2000; SHAYWITZ *et al.* 2000). Die Bindung von

CBP/p300 erhöht die Expressionsrate des Zielgens durch die Acetylierung von nukleosomalen Histonen und die Rekrutierung von RNA-Polymerase-II-Komplexen (BANNISTER UND KOUZARIDES 1996; KEE *et al.* 1996; ASAHARA *et al.* 2001). Die Rekrutierung des CBP/p300-Komplexes an die KID-Domäne ist für die cAMP-vermittelte CREB-Aktivierung spezifisch (ZHANG *et al.* 2005). An die bZIP-Domäne können Proteine der Familie der CREB-Coaktivatoren *cAMP-regulated transcriptional co-activators* (CRTC oder TORC) binden, was die CREB-vermittelte Transkription von Zielgenen erhöht (CONKRIGHT *et al.* 2003; IOURGENKO *et al.* 2003; BITTINGER *et al.* 2004; SCREATON *et al.* 2004). Alle drei CRTC-Proteine (CRTC1, CRTC2 und CRTC3) bestehen aus einer N-terminalen CREB-Bindedomäne (CBD), einer zentralen regulatorischen Domäne, einer Splicing-Domäne und einer C-terminalen TAD (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Während CRTCs unter basalen Bedingungen im Cytoplasma an 14-3-3 Proteine gebunden lokalisiert sind, so werden sie als Antwort auf die cAMP-Erhöhung oder Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung über die Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und in den Kern gebracht, wo sie an die CREB-Proteine binden können (BITTINGER *et al.* 2004; SCREATON *et al.* 2004; WANG *et al.* 2010). Im CRTC2 *knock-out* Mausmodell ist die Konzentration der Blutglucose verringert und die Insulinsensitivität verbessert, was die Bedeutung von CRTC2 im Energiehaushalt deutlich macht (KOO *et al.* 2005; WANG *et al.* 2010). Die O-Glykosylierung von CRTC2 scheint zur Erhöhung der Glucosekonzentration bei Insulinresistenz beizutragen (DENTIN *et al.* 2008). In Mäusen mit einer Prädisposition für Adipositas ist die Konzentration von O-glykosyliertem CRTC2 erhöht (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011).



**Abbildung 3.5: Funktioneller Aufbau des Transkriptionsfaktors CREB**

CREB setzt sich aus einer TAD- und einer bZIP-Domäne zusammen. Die TAD-Domäne besteht aus der KID-Domäne mit einer Vielzahl an Phosphorylierungsstellen und der Q2-Domäne. Die Q2-Domäne bindet an TAF4, während die bZIP-Domäne sowohl CRTC bindet als auch die DNA Bindestelle beinhaltet.

### 3.4.2 Aktivierung von CREB

Die funktionelle Vielfalt und Bedeutung von CREB in zellulären Prozessen wird daraus ersichtlich, dass CREB-Bindestellen in über 4000 Genen zu finden sind (ZHANG *et al.* 2005). Erstmals wurde 1986 eine CRE-Sequenz im Promoter von Somatostatin entdeckt (MONTMINY *et al.* 1986). Das wohl am häufigsten untersuchte Zielgen für CREB-abhängige Expression ist c-Fos (BERKOWITZ *et al.* 1989; FISCH *et al.* 1989). Für die vorliegende Arbeit ist es von besonderem Interesse, dass auch der Promoter von TRH eine CRE-Sequenz besitzt, da TRH maßgeblich in die Regulation der Schilddrüsenhormone und des Energiehaushalts des Körpers involviert ist (SARKAR *et al.* 2002; BIANCO UND KIM 2006; COTE-VÉLEZ *et al.* 2011). Für die Regulation der Transkription durch die Bindung an die CRE-Sequenz des Zielgens ist die Dimerisierung von CREB notwendig (YAMAMOTO *et al.* 1988). Umgekehrt ist für die Dimerisierung von CREB die Anwesenheit von DNA notwendig (WU *et al.* 1998). Die Dimerisierung findet über ein Motiv im Bereich des C-Terminus von CREB statt (SHAYWITZ UND GREENBERG 1999). Aus der  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII)-induzierten Phosphorylierung am Serin 142 resultiert eine Dissoziation des CREB-Dimers und eine Reduktion der CREB-vermittelten Gentranskription (MATTHEWS *et al.* 1994; WU UND MCMURRAY 2001). Neben der Dimerisierung ist die Bindung von CREB an die DNA wichtig. Die Bindestelle befindet sich in der bZIP-Domäne von CREB (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Die Stärke der DNA-Bindung von CREB ist davon abhängig, ob das konservierte CRE-Sequenzmotiv symmetrisch (TGACGTCA) oder asymmetrisch (CGTCA) vorliegt. Beim Vorliegen symmetrischer CRE-Sequenzen ist die Bindung höher (YAMAMOTO *et al.* 1988; NICHOLS *et al.* 1992). Es wird kontrovers diskutiert, ob die Phosphorylierung von CREB die Bindung an die DNA verstärken kann oder ob kein Zusammenhang besteht (SHAYWITZ UND GREENBERG 1999). Für die Bindung von CREB an CRE *in vivo* scheint die Methylierung eines zentralen CpG-Dinukleotids von CRE einen inhibitorischen Effekt zu haben (IGUCHI-ARIGA UND SCHAFFNER 1989). Neben der Dimerisierung und DNA-Bindung ist die Bildung des KID-KIX-Komplexes für die Vermittlung der Genexpression unbedingt erforderlich (CARDINAUX *et al.* 2000). Mutationen, die eine Assoziation des Komplexes erhöhen, verstärkten die Expression, wohingegen aus einer Störung der

Komplexbildung eine Abnahme der Genexpression resultierte (CARDINAUX *et al.* 2000; SHAYWITZ *et al.* 2000). Wird die Komplexbildung durch kleine Moleküle inhibiert, so wird auch die CREB-vermittelte Expression des Zielgens blockiert (BEST *et al.* 2004).

### 3.4.3 Phosphorylierung von CREB am Serin 133

Ebenso vielseitig wie die Zielgene sind die Stimulatoren und Kinasen, die eine CREB-Aktivierung durch Phosphorylierung oder andere posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung oder Glycosylierung beeinflussen (JOHANNESSEN *et al.* 2004). Die CREB-Phosphorylierung am Serin 133 stellt die häufigste Modifikation dar. Es wurden über 300 Stimuli identifiziert, die CREB phosphorylieren können. Darunter sind Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF und NGF, Peptidhormone wie *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH), Insulin,  $\alpha$ -MSH, Bradykinin (BK) und auch Zytokine, Phospholipide, Stressfaktoren und Komponenten intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwege zu finden. Abhängig von der jeweiligen Signalkaskade gibt es eine große Menge an Kinasen, die für die CREB-Phosphorylierung zuständig sind. So wurde beispielweise für CaMKI und CaMKII, verschiedene Vertreter der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) oder MAPKK, PKA, PKB/Akt und Proteinkinase C (PKC) gezeigt, dass sie zu einer Phosphorylierung von CREB am Serin 133 beitragen (MAYR UND MONTMINY 2001; JOHANNESSEN *et al.* 2004). Bei der CREB-induzierten Transkription von Zielgenen muss deutlich zwischen einer Phosphorylierung von CREB und einer Aktivierung unterschieden werden. So wird diskutiert, ob eine CREB-Phosphorylierung immer für eine Aktivierung ausreichend ist (LONZE UND GINTY 2002; JOHANNESSEN *et al.* 2004). Bereits 1995 wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung am Serin 133 nicht suffizient ist (BONNI *et al.* 1995; THOMPSON *et al.* 1995; BITO *et al.* 1996; LIU UND GRAYBIEL 1996). Beim Bradykinin-2-Rezeptor (B2R) in Neuroblastomzellen war die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 durch BK nicht ausreichend, um eine CRE-Reporteraktivität zu induzieren (ROSETHORNE *et al.* 2008). Ebenso ist die Phosphorylierung von CREB für die Expression von c-Fos unzureichend (LONZE UND GINTY 2002). In einem Zellmodell für die Analyse von T-Zellen führte die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors ebenfalls nicht zu einer Translation des Zielgens (BRINDLE *et al.* 1995).

Als Erklärung dafür, dass die Phosphorylierung von CREB alleine nicht für die Aktivierung ausreichend ist, wird angenommen, dass es an der fehlenden Rekrutierung von CBP liegt (CARDINAUX *et al.* 2000; MAYR UND MONTMINY 2001; LONZE UND GINTY 2002; JOHANNESSEN *et al.* 2004). Der genaue Mechanismus, wie CBP die Genexpression beeinflusst, bleibt allerdings unklar (CARDINAUX *et al.* 2000). Einerseits scheint CBP/p300 durch Interaktion mit verschiedenen Komponenten den Präinitiationskomplex zu stabilisieren, andererseits soll CBP über die Modifikation von Chromatinkomponenten die Expression beeinflussen (CARDINAUX *et al.* 2000). Die Phosphorylierung von CREB ist für eine Aktivierung notwendig, da die Mutation von Serin 133 zu Asparagin 133 die Aktivierung von CREB inhibiert (GONZALEZ UND MONTMINY 1989). Die PKA-abhängige Phosphorylierung von CREB hat keinen Einfluss auf die Dimerisierung und somit kann CREB nicht aktiviert werden (WU *et al.* 1998). Es wird deutlich, dass die CREB-Phosphorylierung nicht als Synonym für die CREB-Aktivierung oder eine CREB-abhängige Transkription verwendet werden kann (LONZE UND GINTY 2002).

#### 3.4.4 Funktionen von CREB

CREB ist in eine Vielzahl zellulärer Prozesse involviert, besonders ausgeprägt ist die Rolle von CREB im Nervensystem. Dazu zählen u. a. die Entwicklung und das Überleben von Neuronen, neuronale Differenzierung, Neuritenwachstum und Lern- und Gedächtnisprozesse (LONZE UND GINTY 2002). Da CREB sowohl durch Wachstumsfaktoren als auch durch Entzündungsmediatoren moduliert werden kann, ist es auch für das Immunsystem von Bedeutung, beispielsweise bei der Produktion von Zytokinen oder bei der Regulation von T-Zellen (WEN *et al.* 2010). Beteiligt ist CREB auch an der Regulation der Energiehomöostase und des Appetits. CREB reguliert cAMP-abhängig über PKA durch direkte Bindung an die Promotersequenzen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und der Glucose-6-Phosphatase die Neusynthese von Glucose in der Leber (WYNshaw-BORIS *et al.* 1986; QUINN UND GRANNER 1990; HERZIG *et al.* 2001). Zusätzlich wird die Gluconeogenese auch durch CRTc2

moduliert (KOO *et al.* 2005). Es wurde außerdem herausgefunden, dass Insulin die Gluconeogenese durch das Unterbrechen der Interaktion zwischen CREB und CBP über die Phosphorylierung von CBP am Serin 436 inhibieren kann (ZHOU *et al.* 2004; HE *et al.* 2009).

### 3.4.5 Rolle von CREB im Hypothalamus

Eine zentrale Rolle spielt CREB bei der Regulation des Appetits im Hypothalamus. Die Expression von TRH im Hypothalamus ist ein wesentlicher Bestandteil der Appetitregulation und der Energiehomöostase (Kapitel 3.2.3). Die TRH-Expression kann von verschiedenen Transkriptionsfaktoren kontrolliert werden. Der TRH-Promoter beinhaltet Bindestellen für CREB, STAT und *specificity protein 1* (Sp-1). Während Leptin die TRH-Expression durch Phosphorylierung von STAT-3 reguliert, steuert das anorexigene Peptidhormon  $\alpha$ -MSH als einzig bisher bekannter Stimulus diese wichtige Genexpression über den Transkriptionsfaktor CREB und CRE im PVN (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; PERELLO *et al.* 2006).

## 3.5 $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon und der MC4R

Aus dem Vorläuferpeptid POMC werden durch unterschiedliche Prozesse folgende Spaltprodukte generiert: die drei Melanocortine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH, das *adrenocorticotropic hormone* (ACTH) und  $\beta$ -Endorphin. Durch Melanocortine und ACTH können die fünf MCR (MCR1–MCR5) mit differenzierter Affinität aktiviert werden (YANG 2011). MCR sind in viele zelluläre Prozesse involviert. Dazu gehört neben der Pigmentierung und Reproduktion auch die Regulation der Energiehomöostase (TSATMALI *et al.* 2002; SCHIÖTH *et al.* 2003).

Im Zentrum der Appetitregulation stehen allerdings der MC4R und sein endogener Agonist  $\alpha$ -MSH, aber auch der einzige endogene Antagonist AgRP (HASKELL-LUEVANO *et al.* 1999; YEO UND HEISLER 2012). Die Bedeutung von POMC und MC4R für die Appetitregulation im Hypothalamus wurde in Kapitel 3.2.2 dargestellt und zeigt sich nochmal durch den Effekt von Mutationen im POMC oder MC4R bei Maus und Mensch, welche zu Hyperphagie und Adipositas führen (HUSZAR *et al.* 1997; VAISSE *et al.* 1998; YASWEN *et al.* 1999; CHALLIS *et al.* 2004). Eine Haploinsuffizienz im MC4R ist die häufigste monogene Ursache für schwere

Adipositas und betrifft bis zu 5 % der Fälle (CONE 2005). MC4R *knock-out* Mäuse weisen neben einem erhöhten Körpergewicht auch Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie auf (HUSZAR *et al.* 1997). Neben der anorexigenen Funktion ist die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Aktivierung des MC4R bei Lern- und Gedächtnisprozessen, beim Neuritenwachstum und bei der Neuroprotektion wichtig (ADAN *et al.* 1996; GIULIANI *et al.* 2006; GONZALEZ *et al.* 2009).

Der MC4R ist ein GPCR, der hauptsächlich mit  $G_s$ -Proteinen interagiert, wobei die stimulierende Wirkung für die  $G_s$ -Untereinheit namensgebend ist. Der MC4R kann aber auch über  $G_{i/o}$ - und  $G_q$ -Proteine Signalkaskaden aktivieren (CHAI *et al.* 2006; NEWMAN *et al.* 2006; BUCH *et al.* 2009).  $G_s$ -Proteine zeichnen sich durch die Aktivierung der Adenylylzyklasen (AC) und einer daraus resultierenden intrazellulären Produktion des *second messengers* cAMP aus (GANTZ *et al.* 1993). Über die MC4R-vermittelte Aktivierung von  $G_s$ -Proteinen können signalwegabhängig unterschiedliche Kinasen für die Signaltransduktion aktiviert werden (Abbildung 3.4). Über den MC4R werden sowohl Ionenkanäle als auch die Expression von Genen reguliert (LEE *et al.* 2001; CARUSO *et al.* 2004; FU UND VAN DEN POL 2008; CARUSO *et al.* 2012; CARNIGLIA *et al.* 2013; RAMIREZ *et al.* 2015). So wurde gezeigt, dass über den MC4R die PKA (CARUSO *et al.* 2012; DAMM *et al.* 2012; LI *et al.* 2013; SHEN *et al.* 2013), die *extracellular signal-regulated kinase-1/2* (ERK-1/2) (VONGS *et al.* 2004; SUTTON *et al.* 2005; CHAI *et al.* 2006; PATTEN *et al.* 2007; RAMIREZ *et al.* 2015), die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) (MINOKOSHI *et al.* 2004; DAMM *et al.* 2012) sowie die c-jun-Kinase (CHAI *et al.* 2009), die Phosphoinositidkinase-3 (PI3K) (VONGS *et al.* 2004; RAMIREZ *et al.* 2015) und die PKC (CHAI *et al.* 2006) moduliert werden können. Effekte des MC4R auf die Genexpression wurden *in vivo* und *in vitro* der Phosphorylierung von CREB zugeschrieben, allerdings ohne einen direkten experimentellen Nachweis dafür zu erbringen (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002; CYR UND BOUKADOUM 2013; RU *et al.* 2015).

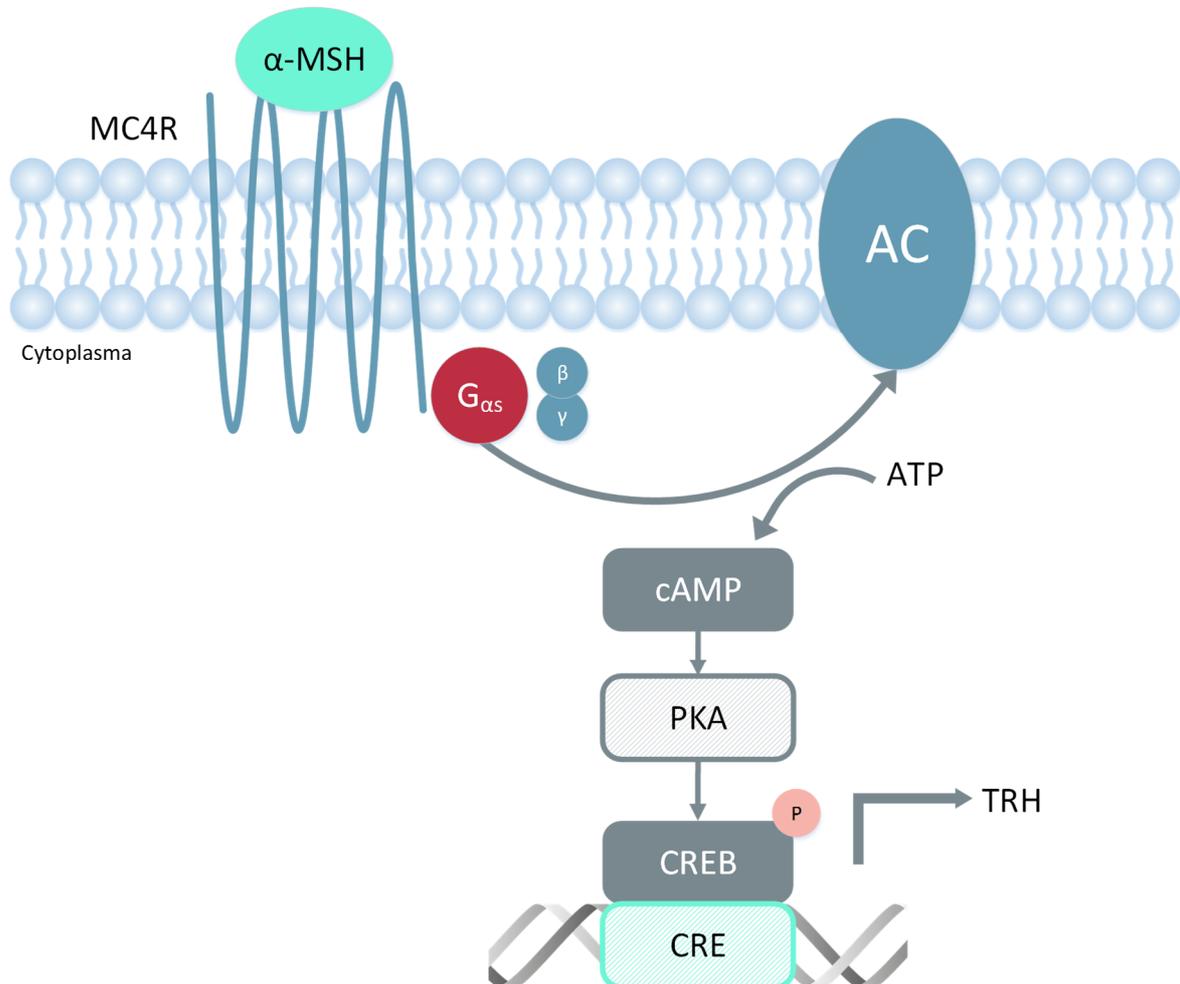
### 3.5.1 $\alpha$ -MSH-induzierte Expression von TRH

Aufgrund der  $\alpha$ -MSH-induzierten TRH-Reporteraktivität wurde postuliert, dass  $\alpha$ -MSH über CREB/CRE im Hypothalamus die Expression von TRH stimuliert (HARRIS *et al.* 2001).

Bislang wurde kein weiteres Hormon beschrieben, dass über CREB/CRE die Expression von TRH im Hypothalamus induziert. Die  $\alpha$ -MSH-induzierte Phosphorylierung von CREB in TRH-Neuronen des PVN war *in vivo* durch den orexigenen Stimulus NPY blockierbar (SARKAR UND LECHAN 2003; CYR *et al.* 2013). Der Signalweg und die Funktion von NPY werden in Kapitel 3.8 geschildert. Es wird davon ausgegangen, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB/CRE-Aktivierung über den MC4R durch den Anstieg des cAMP-Spiegels über die PKA induziert wird (MOUNTJOY *et al.* 1999; SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO *et al.* 2012; CYR UND BOUKADOUM 2013). Obwohl diese Annahme weit verbreitet ist und diese Signalkaskade im PVN entscheidend zur Appetitregulation beitragen soll, gibt es dafür keine experimentelle Bestätigung. Es wurde demonstriert, dass die Aktivierung des MC4R zu einer Phosphorylierung von CREB führt (HARRIS *et al.* 2001; SUTTON *et al.* 2005; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO *et al.* 2012). Es wurde aber auch beschrieben, dass PKA-abhängige CREB-Phosphorylierung aufgrund der fehlenden Dimerisierung nicht zu einer Aktivierung von CREB führen konnte (WU *et al.* 1998). Explizit wurde sowohl in TRH-Neuronen durch intracerebroventrikuläre Injektion als auch im rekombinanten Zellsystem die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Phosphorylierung von CREB beschrieben (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002). Über den MC4R wurde durch  $\alpha$ -MSH die Expression von TRH *in vivo* und im rekombinanten Zellsystem induziert (HARRIS *et al.* 2001; KIM *et al.* 2002). In POMC *knock-out* Mäusen war die Konzentration von TRH im Hypothalamus reduziert (MARTIN *et al.* 2004). In einigen Publikation wurde postuliert, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung über PKA moduliert wird, jedoch wurde die Vermutung nicht experimentell bestätigt (SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO *et al.* 2012; CYR UND BOUKADOUM 2013; RAMIREZ *et al.* 2015).

Für das Verständnis der Regulation von TRH ist es notwendig, die Signalkaskade, die über die Stimulierung des MC4R mit  $\alpha$ -MSH zur CREB/CRE-vermittelten TRH-Expression

führt, genauer zu analysieren. Besonders für eine Pharmakotherapie von Adipositaspatienten könnte die genaue Untersuchung der Signalkaskade auf Ebene des MC4R eine Möglichkeit zur Intervention bieten (Kapitel 3.1).



**Abbildung 3.6: Bisheriges Modell zur α-MSH-induzierten TRH-Expression im Hypothalamus**

α-MSH aktiviert den MC4R, was zu einer intrazellulären Erhöhung des cAMP-Spiegels führt. Bei der CREB-modulierenden Kinase handelt es sich um die PKA. Über die Phosphorylierung von CREB wird CRE aktiviert und die Transkription von TRH initiiert. Komponenten der Signalkaskade, für die bislang der experimentelle Nachweis fehlte, wurden mit einem Muster gekennzeichnet.

### 3.6 Exchange factor directly activated by cAMP

Lange Zeit wurde nicht nur der α-MSH-vermittelten TRH-Expression über den G<sub>s</sub>-Proteingekoppelten MC4R, sondern allen cAMP-abhängigen, intrazellulären Prozessen eine Interaktion von cAMP mit der PKA oder mit Ionenkanälen zugeordnet, u. a. weil es keine alternativen Möglichkeiten gab (BOS 2006; SCHMIDT *et al.* 2013). Jedoch gibt es außer der PKA auch noch den *exchange factor directly activated by cAMP* (EPAC) als Modulator, der als

Antwort auf die Aktivierung von G<sub>s</sub>-gekoppelten Rezeptoren, die damit verbundene Aktivierung von ACs und die Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle stimuliert werden kann. EPAC selbst wurde erst 1998 im Zuge einer Datenbankrecherche entdeckt, um PKA-unabhängige Effekte der GTPase Rap1 zu erklären. Bei EPAC handelt es sich um einen GEF, der durch den Austausch von GDP gegen GTP die zwei Mitglieder der Ras-Familie *ras-related protein 1* und *2* (Rap1 und Rap2) aktivieren kann (DE ROOIJ *et al.* 1998; KAWASAKI *et al.* 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft werden EPAC-Proteine in der Literatur häufig auch als cAMP-GEF oder RAPGEF bezeichnet. Es gibt jedoch auch EPAC-abhängige Prozesse in Zellen, die unabhängig von Rap sind. Dazu gehören beispielsweise die EPAC-induzierte Aktivierung von Mitgliedern der JNK-Familie, die Aktivierung der Phospholipase D und das Mikrotubuliwachstum (HOCHBAUM *et al.* 2003; LOPEZ DE JESUS *et al.* 2006; SEHRAWAT *et al.* 2008). Außerdem können über EPAC, außer Rap1 und Rap2, noch andere Proteine der Ras Superfamilie aktiviert werden, wie z. B. Rho oder Rac (MAILLET *et al.* 2003; KRUGMANN *et al.* 2004). Die EPAC-Proteine lassen sich in zwei Isoformen unterteilen: EPAC1 und EPAC2. Beide Isoformen bestehen aus mehreren Proteindomänen, darunter die autoinhibitorische N-terminale Domäne mit regulatorischer Funktion und die katalytische C-terminale Domäne. EPAC2 hat zusätzlich noch eine weitere N-terminale Domäne, an die zyklische Nucleotide binden können (BOS 2006; SCHMIDT *et al.* 2013). Während EPAC1 ubiquitär exprimiert wird, kommt EPAC2 hauptsächlich in Gehirn, Leber, Pankreas und Nebenniere vor (DE ROOIJ *et al.* 1998; KAWASAKI *et al.* 1998).

EPAC ist in unterschiedliche biologische Prozesse involviert und gewinnt durch neue *in vitro* und *in vivo* Studien auch im Bereich der Pathophysiologie an Bedeutung (ALMAHARIQ *et al.* 2014). Besonders im Gehirn sind die Funktionen von EPAC vielseitig. So wird EPAC teilweise eine Beteiligung bei zellulären Prozessen im Gehirn wie der Regulation des Neuritenwachstums, der neuronalen Differenzierung oder der Regeneration von Axonen zugesprochen, die zuvor nur der PKA zugeordnet waren (CHRISTENSEN *et al.* 2003; KIERMAYER *et al.* 2005; MONAGHAN *et al.* 2008; CORREDOR *et al.* 2012). Es besteht die Möglichkeit, dass auch weitere Signalkaskaden von EPAC abhängig sind, denen bislang eine Beteiligung der PKA

zugesprochen wurde. Bezüglich der Appetitregulation und der Energiehomöostase kommt EPAC eine Funktion bei Leptin- und Insulin-induzierten Signalwegen zu, welche aber kontrovers diskutiert wird. So wurde gezeigt, dass die Leptin-vermittelte STAT-3-Phosphorylierung durch eine Erhöhung des cAMP-Spiegels inhibiert werden konnte. Dieser inhibitorische Effekt war PKA-unabhängig (FUKUDA *et al.* 2011). Notwendig war die Phosphorylierung von STAT-3 für die Leptin-vermittelte Expression von POMC (BATES *et al.* 2003). Die selektive Aktivierung von EPAC hingegen hatte einen abschwächenden Effekt auf den Leptin-Signalweg, verbesserte die Leptin-induzierte Depolarisation von POMC-Neuronen im Hypothalamus und inhibierte die anorexigene Wirkung von Leptin *in vivo* (FUKUDA *et al.* 2011). Die Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass eine Aktivierung des Signalwegs von cAMP über EPAC im Hypothalamus zu einer Leptin-Resistenz führt (FUKUDA *et al.* 2011; ALMAHARIQ *et al.* 2014). Bei der Leptin-vermittelten Signaltransduktion war Untersuchungen zufolge der EPAC1-Subtyp involviert. Mit Hilfe eines EPAC1 *knock-out* Mausmodells wurde gezeigt, dass EPAC1-defiziente Mäuse weniger weißes Fettgewebe und verringerte Leptin-Konzentrationen im Plasma vorwiesen als Wildtypmäuse. Im Vergleich dazu zeigten sie aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber Leptin. EPAC1 *knock-out* Mäuse waren gegenüber *high-fat diet*-induzierter Adipositas resistenter (YAN *et al.* 2013). Kontrovers dazu wurde in weiteren *in vitro* Studien demonstriert, dass die Stimulation von EPAC1 die Expression von *suppressor of cytokine signaling-3* (SOCS-3) erhöhte, ein negativer Regulator von STAT-3 und des Leptin-Signalwegs (BORLAND *et al.* 2009; WILLIAMS UND PALMER 2012). Jedoch blieben durch chemische Inhibition und durch genetische Deletion von EPAC1 die zellulären Konzentrationen von SOCS-3 unverändert (YAN *et al.* 2013). Bekannt ist, dass EPAC wichtig für die Leptin-vermittelte Signalwege ist, die genaue Funktion bleibt jedoch unklar. Ebenso komplex ist die Rolle von EPAC2 bei der Insulinfreisetzung aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas. Über die Bindung von GLP-1 an seinen Rezeptor auf den Zellen wurde cAMP gebildet und EPAC2 aktiviert. Durch diese Aktivierung wurde die glucosevermittelte Insulin-Sekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen in bestimmten Phasen des Prozesses verstärkt (CHEPURNY *et al.* 2009; KELLEY *et al.* 2009). Diese Funktion von EPAC2 konnte für die frühe Phase der Insulinfreisetzung auch in *knock-out* Modellen bestätigt werden. Jedoch wurde

auch gezeigt, dass die Stimulation mit Glucose, selbst in hohen Konzentrationen, keinen Einfluss auf die Insulinsekretion in EPAC2 *knock-out* Mäusen hatte (SONG *et al.* 2013). Ein maßgeblicher Einfluss von EPAC2 auf die Insulinsekretion ist durch die Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Level zu erklären (GLOERICH UND BOS 2010; ALMAHARIQ *et al.* 2014). Dabei ist EPAC2 z. B. an der Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER beteiligt (KIM *et al.* 2008; DZHURA *et al.* 2010; JARRARD *et al.* 2013). Es gibt immer noch viele Unklarheiten über die genauen Funktionen von EPAC, jedoch könnten EPAC1 und EPAC2 interessante Zielstrukturen für therapeutische Ansätze bei Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 sein (ALMAHARIQ *et al.* 2014).

Es gibt cAMP-abhängige Prozesse, in denen EPAC eigenständig agieren kann, aber ebenso Signalkaskaden, bei denen eine Interaktion mit PKA notwendig ist. Bei der cAMP-induzierten Zelldifferenzierung in der Hypophyse sind beispielsweise sowohl EPAC als auch PKA notwendig (VITALI *et al.* 2014). Für EPAC wurden Interaktionen mit vielen unterschiedlichen Effektoren und Kinasen, wie z. B. ERK-1/2 (Zellproliferation, Genexpression, Lern- und Gedächtnisprozesse), PLC ( $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation in Kardiomyozyten) und PKB/Akt (Neuronale Signalwege), nachgewiesen (GRANDOCH *et al.* 2010). Im Jahre 2009 wurde ein weiterer Zusammenhang zwischen EPAC und der Energiehomöostase hergestellt. Es wurde gezeigt, dass in AtT20-Zellen (aus der Hypophyse einer Maus) der *corticotropin releasing factor* (CRF) die ERK-1/2 cAMP-abhängig über EPAC2 phosphorylierte. Dabei ist für CRF selbst bekannt, dass es die Expression des ACTH-Vorläufers POMC stimuliert, der an der Regulation der HPA-Achse beteiligt ist (VAN KOLEN *et al.* 2010). Zwischen Melanocortinen bzw. MCR und EPAC gibt es wenige Verbindungen. Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Aktivierung von Signalkaskaden der DNA-Reparatur nach UV-Schäden über den MC1R ist PKA-unabhängig und abhängig von EPAC (DONG *et al.* 2010). Bislang gibt es keine Verbindung zwischen MC4R und EPAC, jedoch zeigten EPAC1-defiziente Mäuse eine erhöhte Nahrungsaufnahme, welche zu einem Anstieg des Körpergewichts führte und ein metabolisches Syndrom zur Folge hatten (KAI *et al.* 2013). MC4R-defiziente Mäuse zeigten vergleichbare Veränderungen (BALTHASAR *et al.* 2005). Des Weiteren führte die Stimulation von Melanomzellen

mit  $\alpha$ -MSH zu einer Aktivierung von Rap1. Diese Aktivierung von Rap1 könnte im Zusammenhang mit EPAC stehen, wurde experimentell allerdings nicht näher untersucht (BALJINNYAM *et al.* 2010). Zwei weitere Arbeiten zeigten eine Verbindung zwischen EPAC und CREB. In PC12-Zellen war die Dopamin-induzierte CREB-Phosphorylierung am Serin 133 von EPAC abhängig. Die Phosphorylierung wurde über ERK-1/2 vermittelt (PARK *et al.* 2014). Ebenso wurden eine EPAC-abhängige Aktivierung von Rap1 und eine Phosphorylierung von CREB durch ein cAMP-Analogon in Hypophysenzellen nachgewiesen (VITALI *et al.* 2014).

### 3.7 Extracellular signal-regulated kinase-1/2

Die anorexigene Wirkung des MC4R-Agonisten MT-II wurde nicht nur mit der Phosphorylierung von CREB in Verbindung gebracht, sondern es wurde auch gezeigt, dass der Effekt abhängig von ERK-1/2 war. Daraufhin wurde ein cAMP/ERK-1/2/CREB-Signalweg für die Regulation der Nahrungsaufnahme über den MC4R postuliert (SUTTON *et al.* 2005). Die ERK-1/2 gehören zu den MAPK (Serin/Threonin Kinasen) und sind Bestandteil der MAPK-Kaskade. Ein charakteristisches Merkmal der MAPK-Kaskaden ist der mehrstufige Aufbau, in dem mindestens drei Kinasen in Folge geschaltet sind. Der Reihe nach werden eine MAPKKK, eine MAPKK und eine MAPK durch Phosphorylierung aktiviert. Die MAPK lassen sich in drei Familien unterteilen: p38-Kinasen, JNK und ERK. Die Familie der ERK ist in die Subtypen ERK1–ERK8 gegliedert. Da die humanen ERK1 und ERK2 zu 84 % strukturell identisch sind und in einem Großteil der Funktionen übereinstimmen, werden sie als ERK-1/2 zusammengefasst (ROSKOSKI 2012). Die ERK-1/2 werden ubiquitär exprimiert und sind Teil der *rat sarcoma* (Ras)-Raf-MEK-ERK Signalkaskade (WORTZEL UND SEGER 2011). In vielen humanen Karzinomen sind Mutationen sowohl in den Ras- als auch in den Raf-Genen, oder auch eine Hochregulation der Signalkaskade zu finden (BOS 1989; DAVIES *et al.* 2002).

Ras kann sowohl über die Stimulation von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) oder GPCR, durch den Austausch von GDP zu GTP, aktiviert werden (MARGOLIS UND SKOLNIK 1994; BLAUKAT *et al.* 2000). Interessanterweise wurde für  $G_q$ -,  $G_{i/o}$ - und  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren

gezeigt, dass deren Stimulation zu einer Aktivierung von Ras führen kann (BELCHEVA *et al.* 1998; NORUM *et al.* 2003; WILLIAMS *et al.* 2007). Über aktives Ras-GTP können Raf Kinasen aktiviert werden, welche zu einer Phosphorylierung von MEK-1/2 führen (JELINEK *et al.* 1996). Das einzige bisher bekannte physiologische Substrat für MEK-1/2 sind die ERK-1/2, welche durch Phosphorylierung aktiviert werden (ROSKOSKI 2012). Über GPCRs können die ERK-1/2 auch Ras-unabhängig aktiviert werden. Dazu zählt die  $G_q$ -Protein-induzierte Aktivierung der PKD oder PKC, die über c-Raf zu einer Phosphorylierung der ERK-1/2 führt (VAN BIESEN *et al.* 1996; GUDERMANN *et al.* 2000; SINNETT-SMITH *et al.* 2004). Bei der Stimulation von  $G_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren kann über die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit PLC aktiviert werden, welche über PKC oder PKD ERK-1/2 phosphorylieren (CAMPS *et al.* 1992). Durch die Untereinheit kann aber auch die Ras/c-Raf-Signalkaskade angestoßen werden (CRESPO *et al.* 1994). Zudem wurde auch eine c-Raf-Aktivierung studiert, die unabhängig von Ras ERK-1/2 aktivierte (PUMIGLIA *et al.* 1995). Über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren wurden sowohl Inhibitionen als auch Aktivierungen der ERK-1/2 gezeigt. Die Stimulation von  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren kann über die Inhibition von c-Raf oder die PKA-induzierte Inhibition von B-Raf die Phosphorylierung von ERK-1/2 blockieren (COOK UND MCCORMICK 1993; ERHARDT *et al.* 1995). Über cAMP-vermittelte PKA-Aktivierung konnte aber auch direkt Rap1 aktiviert werden, was wiederum über B-Raf zu einer Phosphorylierung der MEK-1/2 führte (VOSSLER *et al.* 1997).

Bisher wurden mehr als 160 Zielstrukturen für ERK-1/2 im Cytoplasma und im Nukleus identifiziert (YOON UND SEGER 2006). Unter den Zielstrukturen ist auch der Transkriptionsfaktor CREB (Kapitel 3.4.4). Zusammenhänge zwischen ERK-1/2 und CREB wurden in diversen funktionell unterschiedlichen Prozessen gefunden, dazu gehören die Entwicklung von Neuronen oder die Regulation des Überlebens pankreatischer  $\beta$ -Zellen (OBRIETAN *et al.* 2002; SONG *et al.* 2005; COSTES *et al.* 2006; HA UND REDMOND 2008). Für die ERK-1/2-vermittelte CREB-Phosphorylierung sind häufig Kinasen der RSK-Proteinfamilie zuständig. RSK1, RSK2 und RSK3 können von MAPK in Antwort auf Wachstumsfaktoren aktiviert werden und zu einer CREB-Phosphorylierung führen (XING *et al.* 1996; DE CESARE *et al.*

1998; XING *et al.* 1998). Ebenso stellen die ERK-1/2 ein wichtiges Element bei der Regulation des Appetits und der Energiehomöostase dar. Es wurde gezeigt, dass über cAMP, ERK-1/2 und CREB der anorexigene Effekt von peripheren CCK oder auch von dem MC4R-Agonisten MT-II im Nucleus solitarius des Markhirns reguliert wird. Es wird vermutet, dass die cAMP-ERK-1/2-CREB-Kaskade eine molekulare Schaltstelle zwischen Sättigungssignalen der Peripherie und des Gehirns darstellt (SUTTON *et al.* 2004; SUTTON *et al.* 2005). 2014 wurde aufgedeckt, dass die TRH-Expression über CREB im ZNS von ERK-1/2 abhängig ist (XIA *et al.* 2015). Im Hypothalamus der Maus führte die Nahrungsaufnahme zur Verringerung des erhöhten Phosphorylierungsstatus von ERK-1/2, p38 und CREB des gehungerten Zustands (UEYAMA *et al.* 2004). In den murinen hypothalamischen GT1-7-Zellen war die Inhibition des orexigen wirkenden Energiesensors AMPK über  $\alpha$ -MSH von ERK-1/2 und LKB-1 abhängig (DAMM *et al.* 2012).

### 3.8 Neuropeptid Y

Um dem anorexigenen Effekt von  $\alpha$ -MSH im Hypothalamus entgegenzuwirken oder ihn zu regulieren, gibt es neben dem endogenen Antagonisten AgRP des MC4R auch einen funktionellen Gegenspieler (COWLEY *et al.* 1999). Wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt, sind im ARC neben POMC/CART-Neuronen auch NPY/AgRP-Neuronen vorhanden, die nach ihrer Aktivierung das orexigen wirkende Peptidhormon NPY freisetzen. NPY ist Effektor von YR, wobei alle fünf Subtypen der Rezeptorfamilie mit  $G_{i/o}$ -Proteinen interagieren (BLOMQVIST UND HERZOG 1997).  $G_{i/o}$ -Proteine wirken inhibitorisch auf die AC und den intrazellulären cAMP-Status, haben den gegenteiligen Effekt von  $G_s$ -Proteinen. Charakteristisch ist ihre Sensitivität gegenüber Pertussis-Toxin (WETTSCHURECK UND OFFERMANN 2005). Für die Appetitregulation sind die Subtypen Y1R und Y5R von Bedeutung. Dem Y1R wird eine regulatorische Rolle zugesprochen, er wird wie der Y5R sowohl im ARC als auch im PVN exprimiert und häufig mit dem MC4R coexprimiert (LECKLIN *et al.* 2003; WOLAK *et al.* 2003; KISHI *et al.* 2005). NPY übt seinen inhibitorischen, orexigenen Effekt auf  $\alpha$ -MSH über verschiedene Wege aus. NPY hat einen direkten Effekt auf die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-

Phosphorylierung und reduziert die Menge an  $\alpha$ -MSH im PVN. Beides vermindert die Expression von TRH. Andererseits soll NPY auch die posttranslationale Prozessierung von POMC zu  $\alpha$ -MSH inhibieren, indem die Menge des Prohormons Convertase-2 vermindert wird, welches an der Prozessierung beteiligt ist (CYR *et al.* 2013).

### 3.9 Bradykinin

Das Peptidhormon BK ist als Teil des Kallikrein-Kinin-Systems zu verstehen, ein physiologisches Regelsystem zur Freisetzung von Plasmakinenen. Die Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems sind an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, darunter Entzündungsreaktionen, Vasodilatation, Zellwachstum/-überleben und Expression proinflammatorischer Gene (CAMPBELL 2001). Während der Bradykinin-1-Rezeptor (B1R) des-Arg<sup>9</sup>-Bradykinin und des-Arg<sup>10</sup>-Kallidin binden kann, sind BK und Kallidin Agonisten für den B2R (MARCEAU 1995). Beide Rezeptorsubtypen interagieren mit G<sub>q</sub>- und G<sub>i/o</sub>-Proteinen (LEEB-LUNDBERG *et al.* 2005). Über G<sub>q</sub>-Proteine wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert, was zur Entstehung der Signalmoleküle IP<sub>3</sub> und Diacylglycerin (DAG) führt. Das Spaltprodukt IP<sub>3</sub> bewirkt über Freisetzung aus intrazellulären Calciumspeichern eine Erhöhung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Ca<sup>2+</sup> und DAG agieren als Aktivatoren der PKC (HUANG 1989)(Abbildung 3.4).

Obwohl der B1R im Gegensatz zum konstitutiv und ubiquitär exprimierten B2R hauptsächlich unter Stress oder bei inflammatorischen Prozessen exprimiert wird, gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen, die beide Rezeptorsubtypen in unterschiedlichen Arealen des ZNS nachgewiesen haben. So wurde im Jahr 1997 die Expression von B1R im Thalamus, im Rückenmark und im Hypothalamus gezeigt, die Expression von B2R im Stammhirn, den Basalganglien, im zerebralen Kortex, im Thalamus und im Hypothalamus (RAIDOO UND BHOOLA 1997). Wegen der Lokalisation der BR in Neuronen wird ihnen eine wichtige Bedeutung in neurophysiologischen Prozessen und der Hormonregulation zugesprochen. BK ist an der Erhöhung der vaskulären Permeabilität, der Vasodilatation und der Freisetzung von Entzündungsmediatoren beteiligt. BK bewirkte aber auch die Translokation des Gluco-

setransporters GLUT4, was die Sensitivität für Insulin verbesserte (HEITSCH 2000). In Leptin-defizienten Mäusen, welche eine schwere Adipositas und Hyperphagie ausbilden, wurde demonstriert, dass die Expression von BR neu reguliert wurde. Dafür wurde die B1R-mRNA in der Leber und dem Fundusbereich des Magens überexprimiert. Die Expression des B2R war hingegen sowohl im weißen Fettgewebe als auch im Hypothalamus reduziert (ABE *et al.* 2007). B1R *knock-out* Mäuse zeigten nach fettreicher Kost im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine verminderte Gewichtszunahme, einen verbesserten Lipidmetabolismus, eine reduzierte Nahrungsaufnahme und eine erhöhte Sensitivität gegenüber Leptin (MORI *et al.* 2008). Im Hypothalamus von Ratten mit Diabetes mellitus Typ 1 oder 2 wurde eine erhöhte Expression von B2R gefunden (QADRI *et al.* 2004). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten, dass es einen physiologischen Zusammenhang zwischen dem Kallikrein-Kinin-System im ZNS und der HPT-Achse gibt. Durch die BK-vermittelte Induktion des SOCS-3-Gens über den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) in einem hypothalamischen Zellsystem wurde eine direkte molekulare Wirkungsweise von BK auf die HPT-Achse demonstriert (BREIT *et al.* 2015). Auch BK kann die Phosphorylierung von CREB modulieren. Es wurde an Hautfibroblasten gezeigt, dass die BK-induzierte CREB-Phosphorylierung durch ERK-1/2 vermittelt wird (ZHAO *et al.* 2002). In glatten Muskelzellen der Atemwege stimulierte BK die Bindung von CREB, eine Aktivierung von CRE und eine daraus resultierende Expression von Cyclooxygenase 2 (NIE *et al.* 2003). An humanen Neuroblastomzellen wurden mit dem B2R und dem muskarinischen Acetylcholinrezeptor M<sub>3</sub> (M<sub>3</sub> mACh) zwei G<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptoren untersucht. Während die Stimulation des B2R mit BK zu einer Phosphorylierung von CREB am Serin 133 führte und durch PKC, CaMKII und ERK-1/2 reguliert wurde, war die Phosphorylierung von CREB über den M<sub>3</sub> mACh von PKC und CaMKII abhängig. Interessanterweise führte nur die CaMKII-vermittelte CREB-Phosphorylierung durch den M<sub>3</sub> mACh zu einer Aktivierung einer CRE-abhängigen Genexpression, die mit Hilfe eines Luciferase-Reporterkonstrukts und dem Nachweis von c-Fos demonstriert wurde (ROSETHORNE *et al.* 2008). Es gibt keine Daten, die eine BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung und/oder Aktivierung von CRE oder TRH im Hypothalamus beschreiben.

### 3.10 Serotonin

Neben  $\alpha$ -MSH und BK ist der Neurotransmitter 5-Hydroxytryptamin (5-HT), auch Serotonin genannt, ein weiterer Ligand, der im ZNS und im enterischen Nervensystem über Rezeptoren unterschiedliche Funktionen erfüllt. Die mindestens 14 5-HT-Rezeptoren (5-HTR) sind in sieben Familien unterteilt, wobei es sich bei allen Rezeptoren außer dem 5-HT<sub>3</sub>R um GPCR handelt. Unter den 5-HTR gibt es G<sub>s</sub>-gekoppelte (5-HT<sub>4</sub>R, 5-HT<sub>6</sub>R und 5-HT<sub>7</sub>R), G<sub>i/o</sub>-gekoppelte (5-HT<sub>1</sub>R) und G<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptoren (5-HT<sub>2</sub>R). Die Klasse der 5-HT<sub>3</sub>R weist mehrere intrazelluläre Effektoren auf (LAM *et al.* 2010). 5-HT kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und wird in Säugern aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan in Neuronen selbst synthetisiert (GRAHAME-SMITH 1967; BLUNDELL 1977). Das in den Raphe-Kernen des ZNS synthetisierte 5-HT wird in Vesikel gepackt und über den synaptischen Spalt freigesetzt, wo es über die 5-HTR an einer Vielzahl von Regionen des ZNS, wie u. a. im Kleinhirn, Hippocampus, Hypothalamus und Mandelkernkomplex wirkt. Raphe-Kerne projizieren in verschiedene Regionen des Hypothalamus, darunter sowohl an Neuronen des ARC als auch an Neuronen des PVN (LAM *et al.* 2010).

Die Funktionen von 5-HT im ZNS sind vielseitig. Im Rahmen der Appetitregulation wird 5-HT eine anorexigene Wirkung zugeordnet. Die Reduktion der Nahrungsaufnahme durch 5-HT kann durch verschiedene Mechanismen über Neuronen des Hypothalamus gesteuert werden: über die 5-HT<sub>2c</sub>R-vermittelte Anregung der POMC/CART-Neuronen im ARC, die 5-HT<sub>1b</sub>R-induzierte Inhibition der AgRP/NPY-Neuronen im ARC und die direkte Wirkung an den 5-HTR der PVN-Neurone (CURRIE *et al.* 2002; SOHN *et al.* 2011; DOSLIKOVA *et al.* 2013; BURKE *et al.* 2014). Nach chemischer Inhibition der Tryptophanhydroxylase (Tph) oder in Tph *knock-out* Mausmodellen, wodurch die 5-HT-Synthese im Gehirn nicht stattfindet, wurden sowohl Hyperphagie und Gewichtszunahme als auch Wachstumsstörungen und andere physiologische Dysfunktionen festgestellt (BREISCH *et al.* 1976; SAVELIEVA *et al.* 2008; ALENINA *et al.* 2009; YADAV *et al.* 2009). Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass der *knock-out* des 5-HT<sub>2c</sub>R zu Hyperphagie und Hyperglykämie, Insulinresistenz und Adipositas führt (TECOTT *et al.* 1995; NONOGAKI *et al.* 1998). Durch eine selektive Reexpression

des 5-HT<sub>2C</sub>R in POMC-Neuronen von *knock-out* Modellen konnte sowohl die Hyperphagie als auch die Adipositas wieder gebessert werden (XU *et al.* 2008). In Nagetieren wurde durch 5-HT<sub>2C</sub>R-Agonisten eine verminderte Nahrungsaufnahme analysiert, während ein gegenteiliger Effekt durch 5-HT<sub>2C</sub>R-Antagonisten festgestellt wurde (KENNETT UND CURZON 1988; KITCHENER UND DOURISH 1994; MARTIN *et al.* 1998; SCHREIBER UND DE VRY 2002). 5-HTR-Agonisten wie Lorcaserin, die selektiv den 5-HT<sub>2C</sub>R stimulieren, werden beim Menschen als Medikamente zur Behandlung von Adipositas eingesetzt (Kapitel 3.1). Die Rolle des 5-HT<sub>1B</sub>R scheint im Gegensatz dazu bisher noch nicht geklärt zu sein. Einerseits war in 5-HT<sub>1B</sub>R *knock-out* Mäusen die basale Nahrungsaufnahme unverändert, der absolute Nahrungsverbrauch führte zu einer Erhöhung des Körpergewichts, aber nicht zu Übergewicht (LUCAS *et al.* 1998; BOUWKNECHT *et al.* 2001). 5-HT gehört zu den GPCR-Agonisten, die den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren können. In induzierten pluripotenten Zellen von Mäusen wurde gezeigt, dass 5-HT über den G<sub>s</sub>-gekoppelten 5-HT<sub>4</sub>R PKA-abhängig CREB phosphorylierte (ISHIZUKA *et al.* 2014). Eine Phosphorylierung von CREB konnte in Gegenwart des spezifischen 5-HT<sub>4</sub>R-Agonisten im Hippocampus von Ratten nachgewiesen werden, wobei die zuständige Kinase nicht bekannt ist (LUCAS *et al.* 2010). Die CREB-Phosphorylierung im ventromedialen Hypothalamus von Mäusen durch 5-HT ist wichtig für die Regulation der Knochenmasse. Die Modifikation ist von der CaMKK-β und der CaMKIV abhängig und findet über die Aktivierung des 5-HT<sub>2C</sub>R statt (OURY *et al.* 2010). Eine 5-HT-vermittelte CREB-Phosphorylierung oder CREB-abhängige Genexpression im PVN wurde bisher nicht gezeigt, obwohl die Stimulation von 5-HTR im PVN mit einer anorexigenen Wirkung einherging (CURRIE *et al.* 2002).

### 3.11 Wachstumsfaktoren

Es gibt eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wobei im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) und dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) liegt.

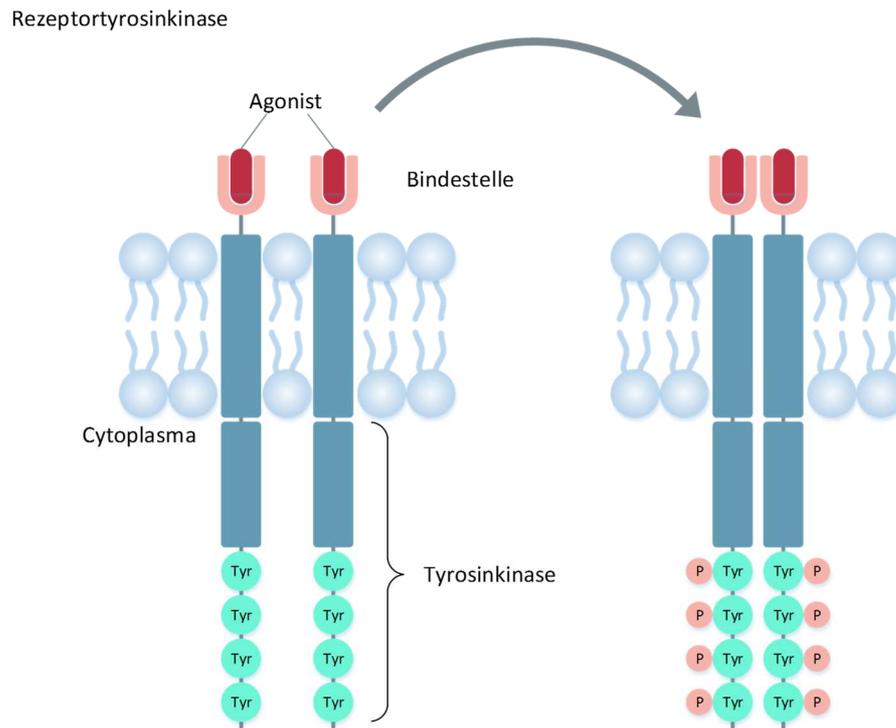


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase durch einen Agonisten

Die Signalübertragung durch Wachstumsfaktoren erfolgt nach Bindung an ihre Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche der Zielzellen zu finden sind. Bei den Transmembranrezeptoren von EGF, IGF1 und NGF handelt es sich um RTK, die sich durch die Tyrosinkinase als intrazelluläre Domäne auszeichnen. Durch die Bindung eines extrazellulären Agonisten kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die eine Dimerisierung begünstigt. Infolge der Dimerisierung autophosphorylieren sich die intrazellulären Domänen des Rezeptors an ihren Tyrosinresten (Abbildung 3.7). An die phosphorylierten Tyrosinreste können nun Proteine mit einer *Src-homology 2* (SH2)-Domäne binden und die Phosphorylierung von Zielproteinen, d. h. die intrazelluläre Signaltransduktion, kann erfolgen (LEMMON UND SCHLESSINGER 2010).

### 3.11.1 Epidermaler Wachstumsfaktor

Der Wachstumsfaktor EGF wurde bereits 1962 entdeckt und wird u. a. in den Nieren, im Pankreas, im Dünndarm und im Gehirn synthetisiert und kommt in vielen Körperflüssigkeiten vor (COHEN 1962; ZENG UND HARRIS 2014). Im ZNS wirkt EGF durch die Bindung an den EGFR, der auf Neuronen zu finden ist (JORISSEN *et al.* 2003; WONG UND GUILLAUD 2004;

ZENG UND HARRIS 2014). EGF ist an der Regulation von vielen metabolischen und physiologischen Prozessen beteiligt, hauptsächlich bei der Zelldifferenzierung und -proliferation (YAMADA *et al.* 1997a). Es wurde vielfach beschrieben, dass EGF sowohl über den Ras/MAPK-, den Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B (PI3K/Akt)- oder den Januskinase (JAK)/STAT-Signalweg Kaskaden im Zellinneren anstoßen kann, welche zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und zur Genexpression führen (JORISSEN *et al.* 2003; WONG UND GUILLAUD 2004). Im Hypothalamus wurde gezeigt, dass EGF die Expression von TRH stimulieren kann (REN *et al.* 1998). Die EGF-induzierte Expression von TRH und SOCS-3 waren abhängig von der Phosphorylierung von STAT-3 (BREIT *et al.* 2015). Die intracerebroventrikuläre Injektion von EGF bewirkte einen anorexigenen Effekt (PLATA-SALAMAN 1988). EGF ist außerdem an der Regulation von TRHR in der Hypophyse beteiligt. Die Stimulation von Zellen der Hypophyse mit EGF führte zu einer reversiblen Inhibition der TRHR-Expression (HINKLE P.M. *et al.* 1991; MONDEN *et al.* 1995). Der EGFR ist auch aus pathologischer Sicht interessant, da er bei einigen Karzinomarten mutiert vorliegt oder überexprimiert wird, was zu einer unkontrollierten Zellteilung der Tumorzellen führt, wie z. B. in vielen Brust-, nicht-kleinzelligen Bronchial- und Kolonkarzinomen. Für die Behandlung dieser Karzinome werden u. a. EGFR Inhibitoren eingesetzt (NORMANNO *et al.* 2006). Wie viele Wachstumsfaktoren kann auch EGF CREB phosphorylieren. Die Phosphorylierung kann über diverse Kinasen ablaufen (JOHANNESSEN *et al.* 2004). Die EGF-vermittelte CRE-Aktivierung in neuronalen Stammzellen war PKA-abhängig (IGUCHI *et al.* 2011). In Trophoblasten hingegen war die EGF-vermittelte Expression des humanen Choriongonadotropins- $\alpha$  über CREB PKC-abhängig und PKA- und MAPK1-unabhängig (MATSUMOTO *et al.* 1998). Weitere Daten zeigten, dass p38 und ERK-1/2 an der EGF-vermittelten CREB-Phosphorylierung beteiligt waren (SWARTHOUT *et al.* 2002). Bisher fehlen Studien zur EGF-vermittelten Aktivierung des CREB/CRE-Signalwegs im Hypothalamus.

### 3.11.2 Insulinähnliche Wachstumsfaktoren

Zu den IGF gehören sowohl IGF1 als auch IGF2, namensgebend ist ihre strukturelle Ähnlichkeit zu dem humanen Proinsulin. IGF1 wird in allen Zelltypen produziert und ist vor

allem in der perinatalen Phase in bestimmten Arealen des Gehirns stark exprimiert, darunter im Neocortex, Hippocampus, Zerebellum und Hypothalamus. IGF2 kommt in hohen Konzentrationen besonders während der Entwicklung, aber auch im adulten Gehirn vor. Der IGF1 Rezeptor (IGF1R), der mit dem IR interagieren kann, kann hauptsächlich über zwei Signalkaskaden arbeiten, einerseits über PI3K/Akt, andererseits über Ras/MAPK. Der IGF2R, der nicht zu den RTK, sondern zu den Glycoproteinen zählt, kann von IGF2, aber auch mit niedriger Affinität von IGF1 gebunden werden. Durch die Rekrutierung von G-Proteinen können über den Rezeptor PLC/PKC-Signalwege stimuliert werden. Beide IGFR werden im Gehirn exprimiert, der IGF1R hauptsächlich im Neocortex, Thalamus und Plexus chorioideus, der IGF2R im Plexus chorioideus, Hippocampus und Neocortex. IGF können im Gehirn entweder parakrin über die lokale Produktion in Zellen des Gehirns oder endokrin über die Zirkulation durch die Blut-Hirn-Schranke wirken. Sie sind sowohl bei der Entwicklung des ZNS involviert als auch bei der Regulation der Energiehomöostase, bei akuten Verletzungen und degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (RUSSO *et al.* 2005; BENARROCH 2012; FERNANDEZ UND TORRES-ALEMAN 2012). In Bezug auf die Energiehomöostase konnte durch die intracerebroventrikuläre Gabe von IGF1 die Konzentration von Insulin im Serum verringert werden (FOSTER *et al.* 1991). Eine klinische Studie zeigte, dass höhere Konzentrationen von IGF1 mit einem verminderten Risiko für die Entwicklung von Glucoseintoleranz und Diabetes mellitus Typ 2 einhergingen (SANDHU *et al.* 2002). Neben EGF kann auch IGF CREB phosphorylieren. In PC12 Zellen war die IGF-vermittelte Expression des Chromogranin A Gens CREB-abhängig und wurde über MAPK, PI3K und p38 reguliert (PUGAZHENTHI *et al.* 1999). In pankreatischen  $\beta$ -Zellen konnte die IGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung durch PKA- und MAPK-Inhibitoren blockiert werden (LIU *et al.* 2002). Im PVN wurde bislang keine CREB-Phosphorylierung oder CRE-Aktivierung durch IGF demonstriert, ebenso fehlen Daten zur IGF-vermittelten TRH-Expression.

### 3.11.3 Nervenwachstumsfaktor

Der Wachstumsfaktor NGF gehört zur Gruppe der Neurotrophine und hat eine starke strukturelle Ähnlichkeit zum ‚*brain-derived neurotrophic factor*‘ (BDNF) (BUTTE *et al.* 1998). NGF

fungiert als Agonist sowohl für den *tropomyosin receptor kinase A*-Rezeptor (TrkAR), wobei es mit niedriger Affinität auch an den p75-Neurotrophinrezeptor (p75NTR) bindet, ein transmembranäres Glycoprotein (BOTHWELL 1995; KAPLAN UND MILLER 1997). Die Anwesenheit des p75NTR erhöhte die Bindeaffinität von NGF zu TrkAR (ESPOSITO *et al.* 2001). Durch die Bindung von NGF an die RTK TrkAR können viele unterschiedliche Signalkaskaden ausgelöst werden. Dabei sind beispielsweise der Ras/MAPK-, Ras/Rsk-, PI3K/Akt- oder auch der PLC $\gamma$ /PKC-Signalweg beteiligt (SOFRONIEW *et al.* 2001). Die Stimulation des TrkAR führte sowohl zur Genexpression von c-Fos als auch von ‚VGF *nerve growth factor inducible*‘ (VGF) (HAWLEY *et al.* 1992; GINTY *et al.* 1994). Im ZNS wurde NGF hauptsächlich im Kortex, Hippocampus und der Hypophyse nachgewiesen, ebenso aber in den Basalganglien und dem Thalamus (MCALLISTER 2001).

NGF und NGFR spielen während der Entwicklung eine wichtige Rolle bei Reifungsprozessen und Überleben von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen, ebenso bei neuronalen Entwicklungsprozessen in erwachsenen Individuen. Eine entscheidende Bedeutung kommt dem NGF außerdem bei der Nozizeption in sensorischen Neuronen, bei Immun- und Entzündungsreaktionen sowie bei der Neuroprotektion zu. NGF und dessen Rezeptoren werden nach Verletzungen oder bei degenerativen Krankheiten sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem in den betroffenen Zellen (u. a. Astrozyten, Mikroglia, Makrophagen, Mastzellen und einige Neuronen) hochreguliert (SOFRONIEW *et al.* 2001). Obwohl es bisher nur wenige Zusammenhänge zwischen NGF und der Appetitregulation gibt, wurde jedoch festgestellt, dass in Patienten mit Adipositas die Plasmakonzentrationen von NGF erhöht waren (BULLO *et al.* 2007). In Patienten mit metabolischem Syndrom waren die Plasmakonzentrationen von NGF und BDNF verringert (CHALDAKOV *et al.* 2004). Außerdem wurde gezeigt, dass NGF in Adipozyten exprimiert wird und eine Sekretion von NGF stattfindet. Durch die Stimulation mit Insulin wurde die Expression von NGF signifikant inhibiert (PEERAULLY *et al.* 2004). NGF hatte über die Reduktion der CCK-Konzentration im Hypothalamus einen Effekt auf die Gewichtsabnahme in weiblichen Ratten (LAPCHAK UND ARAUJO 1994). Durch die Stimulation der VGF-Expression im Hypothalamus (ARC und

PVN) nahm NGF indirekt Einfluss auf die Appetitregulation (JETHWA UND EBLING 2008). VGF-defiziente Mäuse hatten ein verringertes Körpergewicht aufgrund von 50 % weniger Körperfett im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Die Serumglucose- und Insulinkonzentrationen waren reduziert, ebenso das Glycogen in der Leber (WATSON *et al.* 2005). Die Expression von AgRP und NPY war stark erhöht, die POMC-mRNA-Level erniedrigt. Die *knock-out* Mäuse nahmen mehr Kalorien pro Gramm Körpergewicht auf als Wildtyp-Tiere, jedoch reichte diese Aufnahme nicht aus, um ein normales Körpergewicht zu erreichen (HAHM *et al.* 1999; JETHWA UND EBLING 2008). Die NGF-induzierte Expression von VGF wird interessanterweise über CREB und die CRE-Sequenz im Promoter von VGF reguliert, wobei Mutationen in der CRE-Sequenz zu einer verminderten Induktion führten (HAWLEY *et al.* 1992; MANDOLESI *et al.* 2002). CREB spielt auch bei der NGF-vermittelten Expression von weiteren Zielgenen eine Rolle. NGF war in PC12-Zellen (Zellmodell für neuronale Zellen) in der Lage, über ERK-1/2 und Kinasen der RSK-Familien (ribosomale S6-Kinasen) oder über p38 zu einer CREB-Phosphorylierung am Serin 133 zu führen (XING *et al.* 1998). Für die Genexpression von Calcitonin *gene-related peptide* in neuronalen Zellen war eine p42/p44 MAPK-vermittelte CREB-Phosphorylierung notwendig (FREELAND *et al.* 2000). Daten zur Wirkung von NGF auf CREB/CRE in PVN-Neuronen und TRH-Expression fehlen bislang.

### 3.12 Zielsetzung

Der Transkriptionsfaktor CREB ist von zentraler Bedeutung für die Regulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse, wie zum Beispiel des Neuritenwachstums, von Lern- und Gedächtnisprozessen oder der Appetitregulation. Die Phosphorylierung von CREB wird häufig direkt mit der Aktivierung von CRE und damit verbundener Modulation der Genexpression assoziiert. Bisher handelt es sich bei  $\alpha$ -MSH um den einzigen Stimulus, von dem bekannt ist, dass er über CREB die Expression von TRH im Hypothalamus reguliert und somit maßgeblichen Anteil an der Appetitregulation hat. Eine detaillierte Analyse der Signalkaskade von  $\alpha$ -MSH fehlt bislang. Obwohl es eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren oder Hormonen gibt, denen eine orexigene oder anorexigene Wirkung zugesprochen wird und für die in anderen zellulären Prozessen eine Interaktion mit CREB bekannt ist, wurden bisher keine Zusammenhänge im Hypothalamus beschrieben.

Diese Arbeit sollte Aufschluss über die Korrelation zwischen CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung bringen. Dabei sollte die Rolle der  $\alpha$ -MSH-induzierten Signalkaskade bei der Appetitregulation im Hypothalamus und die zelluläre Modulation von CREB und CRE durch ausgewählte Wachstumsfaktoren und GPCR-Liganden untersucht werden.

Um den Zusammenhang zwischen CREB und CRE im Hypothalamus auf molekularer Ebene analysieren zu können, musste eine geeignete Zelllinie hergestellt werden. Hierfür sollten die hypothalamischen mHypoA-2/10-Zellen mit einem CREB-regulierten CRE-Reportergenkonstrukt transfiziert und charakterisiert werden.

Mit Hilfe der mHypoA-2/10-CRE-Zellen sollte untersucht werden, welche Korrelation es zwischen der  $\alpha$ -MSH-induzierten CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung gibt. Ausgewählte Hormone, die CREB modulieren können, sollten zur Erweiterung der Analyse herangezogen werden. Die Wahl fiel auf Bradykinin, Serotonin und die drei Wachstumsfaktoren EGF, IGF und NGF.

Schließlich sollte die bislang fehlende, detaillierte Analyse der  $\alpha$ -MSH-vermittelten Signalkaskade der Appetitregulation im Hypothalamus erfolgen. Dabei sollte studiert werden, welche Kinase an der Phosphorylierung von CREB durch die ausgewählten Liganden beteiligt ist. Außerdem sollte anhand der Proteine TRH und c-Fos, welche eine CRE-Sequenz in ihrem endogenen Promoter enthalten, die Bedeutung der  $\alpha$ -MSH-induzierten CREB- und CRE-Aktivierung eingeordnet werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Bakterieninkubator	Heraeus, Hanau
Bakterienschüttler MaxQ 6000	Thermo, Dreieich
ChemiSmart 5000	Peqlab, Erlangen
Feinwaage HR-202	Bachofer, Reutlingen
Fluoreszenzmikroskop IX-71	Olympus, Hamburg
Kühlzentrifuge Fresco 21	Thermo, Dreieich
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
Magnetrührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
Mikroliterpipetten	Peqlab, Erlangen
Monochromator Polychrom 5000	Till Photonics, Gräfelfing
Neon®-Elektroporationssystem	Invitrogen, Darmstadt
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Novex® Semi-Dry Blotter	Invitrogen, Darmstadt
pH-Meter Orion Star A111	Thermo, Dreieich
Photometer BioPhotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plate Reader FluoStar Omega	BMG Labtech, Offenburg
Polyacrylamidgelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad, München
Spannungsquelle EV 231	Peqlab, Erlangen
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo, Dreieich
Szintillationszähler WS1414	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermoschüttler TS-100	Peqlab, Erlangen
Ultraschallstab	Werkstatt Walther-Straub-Institut, München
UV-Transilluminator	Peqlab, Erlangen
Vortexer MS3 basic	Ika, Staufen
Waage EG-N	Kern, Balingen
Wasserbad HI 1210	Memmert, Schwabach
Zellkulturinkubator HeraCell 240	Thermo, Dreieich
Zentrifuge Labofuge 400	Thermo, Dreieich
Zentrifuge Pico 17	Thermo, Dreieich

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Filterpapier 2,45 mm	Bio-Rad, München
Mikroschraubröhre	Sarstedt, Nürnbergrecht
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Whatman GmbH, Dassel
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Petrischalen, 100 mm	Sarstedt, Nürnbergrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbergrecht

qPCR 96-well Mikrotiterplatten	Roche, Mannheim
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt, Nürnberg
Szintillationsgefäße, 20 ml	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen, 175cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 6-well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 12-well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 24-well Mikrotiterplatten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 96-well Mikrotiterplatten	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

#### 4.1.3 Reagenzien

Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fura-2-AM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Luziferase-Substrat	Promega, Mannheim
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sybr Green I Mastermix	Roche, Mannheim
TRI Reagent®	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TurboFect®	Thermo, Dreieich
Wasser (nukleasefrei)	Thermo, Dreieich
Zeocin	Invitrogen, Darmstadt
[ <sup>3</sup> H]-Adenin	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

Alle anderen Chemikalien wurden von Carl-Roth, Karlsruhe, oder Sigma-Aldrich, Deisenhofen, bezogen.

#### 4.1.4 Zielstrukturen und Konzentrationen der eingesetzten Agonisten

Agonist	Zielstruktur	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
BP554	5-HT <sub>1A</sub> R	100 nM	Tocris, Bristol, UK
Bradykinin	B2R	1 µM	Biotrend, Köln
CP94253	5-HT <sub>1B</sub> R	100 nM	Tocris, Bristol, UK
EGF	EGFR	10 ng/ml	PeptoTech GmbH, Hamburg
Forskolin	AC Aktivator	10 µM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
IGF	IGFR	10 ng/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NGF	NGFR	10 ng/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NPY	YR	100 nM	Tocris, Bristol, UK
Serotonin	5-HTR	1 µM	Tocris, Bristol, UK
WAY161503	5-HT <sub>2C</sub> R	100 nM	Tocris, Bristol, UK
α-MSH	MC3R, MC4R	1 µM	Tocris, Bristol, UK
γ-MSH	MC3R > MC4R	1 pM–10 µM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Die chemischen Strukturformeln einiger Agonisten sind in Kapitel 8 zu finden.

#### 4.1.5 Zielstrukturen und Konzentrationen der chemischen Inhibitoren und Antagonisten

Inhibitor	Zielstruktur	Finale Konzentration	Lösungsmittel	Hersteller
A812511	PKA	10 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	Abcam, Cambridge, UK
BIM-X	PKC	5 $\mu$ M	DMSO	Enzo, Lörrach
ESI-05	EPAC2	50 $\mu$ M	DMSO	Biolog, Bremen
ESI-09	EPAC	20 $\mu$ M	DMSO	Biolog, Bremen
GGTI-298	Rap1A	50 $\mu$ M	DMSO	Tocris, Bristol, UK
HJC0197	EPAC	25 $\mu$ M	DMSO	Biolog, Bremen
HS024	MCR	1 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	Tocris, Bristol, UK
KN-93	CaMKII	5 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	Enzo, Lörrach
KT5720	PKA	5 $\mu$ M	DMSO	Abcam, Cambridge, UK
PD184352	MEK-1/2	10 $\mu$ M	DMSO	Tocris, Bristol, UK
Rp-Br-cAMPs	PKA	50 $\mu$ M	H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SB242084	5-HT <sub>2c</sub> R	100 nM	H <sub>2</sub> O	Tocris, Bristol, UK

Die chemischen Strukturformeln der Inhibitoren und Antagonisten sind in Kapitel 8 zu finden.

#### 4.1.6 Antikörper

##### 4.1.6.1 Primärantikörper (nicht konjugiert)

Antigen	Donorspezies	Verdünnung	Hersteller
Histon H3	Kaninchen	1:10000	Abcam, Cambridge, UK
pCREB (Ser133)	Kaninchen	1:2500	Cell Signaling, Danvers
pERK-1/2	Maus	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
Rap1A	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Tubulin	Maus	1:4000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

##### 4.1.6.2 Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	1:5000–10000	Bio-Rad, München
Anti-Maus-IgG	1:5000	Bio-Rad, München

#### 4.1.7 siRNA

Zielgen	Sequenz	Katalognummer
RAP1A	5'-GCAAGUCGAGGUAGAUUGCtt-3' 3'-ggCGUUCAGCUCCAUCUAACG-5'	AM16708
(-)	Negativkontrolle	AM4611

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

#### 4.1.8 Molekularbiologie

Reagenz	Hersteller
Erststrang cDNA-Synthesekit	Thermo, Dreieich
Größenstandard: BLUEplus-wide prestained Protein Ladder	Biomol, Hamburg
NuPAGE® Transfer Buffer	Invitrogen, Darmstadt
PKA Aktivierungskit	Abcam, Cambridge, UK
Plasmidaufreinigungskit	Machery-Nagel, Düren
Primer für qPCR	Metabion, Planegg
Roti®-GelStain	Carl Roth, Karlsruhe

#### 4.1.9 Zelllinien und Nährmedien

Bei den verwendeten mHypoA-2/10-Zellen handelt es sich um eine murine, hypothalamische Zelllinie, welche 2009 von Belsham et al. generiert wurde (BELSHAM *et al.* 2009). Hierfür wurden zunächst hypothalamische Neuronen von zwei Monate alten, männlichen C57BL/6-Mäusen isoliert. Diese Primärkulturen wurden für fünf bis sieben Tage mit dem rekombinanten Neuroprotektor CNTF (ziliärer neurotropher Faktor) der Ratte behandelt, um ein Absterben der Neurone zu verhindern und die Neurogenese der isolierten Zellen auszulösen. Schließlich wurden die Zellen durch den retroviralen Transfer des SV40-T-Antigens (Simian Vacuolating Virus 40 Tag) immortalisiert und mit dem Antibiotikum G418 (Geneticin) selektioniert.

Die verwendeten GT1-7-Zellen sind ebenfalls eine hypothalamische Zelllinie der Maus. Genauer handelt es sich hierbei um GnRH-Neuronen, welche 1990 von Mellon et al. isoliert und mittels gezielter Tumorgenese in transgenen Mäusen immortalisiert wurden (MELLON *et al.* 1990). Die GT1-7-Zellen wurden von Dr. Hubertus Jarry, Georg-August-Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt.

Neben den beiden hypothalamischen Zelllinien der Maus wurden auch HEK-293-MC4R-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine embryonale Nierenzelllinie, welche stabil den humanen MC4R exprimiert und für diese Arbeit freundlicherweise von Dr. Andreas Breit (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München) zur Verfügung gestellt wurde (BREIT *et al.* 2006).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit einem Gehalt von 25 mM Glucose, 4 mM L-Glutamin und 1 mM Pyruvat kultiviert. Das Medium wurde mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) sowie Penicillin (5000 U/ml) und Streptomycin (5000 µg/ml) versetzt. Für den Serumentzug von Zellen wurde DMEM-Medium ohne FCS und ohne Antibiotika verwendet.

#### 4.1.10 Bakterien

Es wurden die in der Molekularbiologie etablierten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien des Stammes DH5α verwendet.

#### 4.1.11 Reporter-genkonstrukt

Das verwendete 6xCRE-Luc-Reporter-genkonstrukt wurde von Himmler et al. generiert (HIMMLER *et al.* 1993) und für diese Arbeit freundlicherweise von Dr. Andreas Breit (Walter-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München) zur Verfügung gestellt. Eine schematische Abbildung des Plasmids ist in Abbildung 4.1 zu sehen. Die CRE-Sequenzen sind kurze Nukleotidsequenzen, die durch die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zur Aktivierung von CRE führen. Die sechs CRE-Sequenzmotive bestehen aus drei CRE-Sequenzen des Somatostatins und drei CRE-Sequenzen des bovinen Leukämie-Virus (BLV). Die sechs CRE-Motive beinhalten jeweils die konservierte, symmetrische Sequenz (TGACGTCA) (HIMMLER *et al.* 1993).

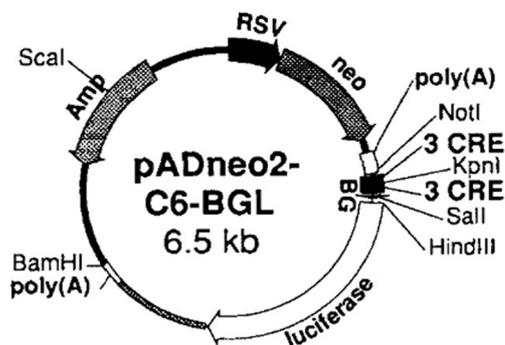


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des verwendeten 6xCRE-Luc-Reporter-genkonstrukts (HIMMLER *et al.* 1993)

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

#### 4.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die immortalisierten, murinen Hypothalamuszelllinien mHypoA-2/10 und GT1-7, sowie die HEK293-MC4R-Zellen zeichnen sich durch ihre nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus. Alle hier verwendeten Zelllinien wurden in 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen als adhärenente Monolayer in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 80 bis 90 % erreicht hatten. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen nach visueller Kontrolle gesplittet, um eine Kontaktinhibition und die damit verbundene Verminderung der Proliferation zu verhindern. Für das Splitten der Zellen wurde das DMEM-Zellkulturmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen mit 5 ml Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS erfolgte das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch die Verwendung von 5 ml Trypsin/EDTA für etwa 3 min bei 37 °C. Um die proteolytische Aktivität des Trypsins zu beenden, wurden die abgelösten Zellen in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert. Ein geeigneter Teil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung überführt, die restlichen Zellen konnten für die jeweiligen Versuche in der optimalen Zellzahl auf Mikrotiterplatten oder in Petrischalen ausgesät werden und standen nach 24 h Inkubation im Brutschrank zur Verfügung.

#### 4.2.1.2 Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff

Für die dauerhafte Konservierung eukaryotischer Zellen ist eine anhaltende Lagerung in flüssigem Stickstoff notwendig. Dafür wurden die Zellen nach dem Ablösen vom Flaschenboden mit Trypsin/EDTA (Kapitel 4.2.1.1) in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Sedimentierung der Zellen erfolgte für 5 min bei 800 x g. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurden die Zellen in eiskaltem Serum mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend für 24 h bei -20 °C gelagert, weitere 24 h bei -80 °C und letztendlich in flüssigen Stickstoff zur Dauerlagerung überführt.

### 4.2.1.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Um kryokonservierte Zellen aufzutauen, wurde ein Kryoröhrchen der gewünschten Zelllinie aus dem Stickstofftank entnommen und durch kurze Inkubation bei 37 °C angetaut. Die Zellen wurden zunächst in 25 ml Kulturmedium überführt und nachfolgend in eine Zellkulturflasche ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Austausch des Mediums, um das DMSO des Einfriermediums zu entfernen.

### 4.2.1.4 Transfektion

Die Transfektion von Zellen, also das Einbringen von fremder DNA in eine Zelle, kann durch unterschiedliche Methoden erfolgen. Neben der Verwendung von speziellen Transfektionsreagenzien können Zellen auch mittels Elektroporation transfiziert werden.

#### 4.2.1.4.1 *Transfektion mit TurboFect®*

Die Zellen wurden mit TurboFect® nach Herstellerprotokoll transfiziert. Das Transfektionsreagenz ist eine Lösung kationischer Polymere, welche mit der Plasmid-DNA stabile, positiv geladene Komplexe bilden. Der Komplex wird über Endozytose in die Zelle aufgenommen und in die Endosomen transportiert. Da das TurboFect® im endosomalen Kompartiment Protonen bindet, wird die spontane Hydrolyse der Plasmid-DNA verhindert und zusätzlich die Nuklease-vermittelte DNA-Hydrolyse aufgrund des zu hohen pH-Wertes unterdrückt. Durch die veränderte Protonenkonzentration kommt es zu einer Erhöhung des osmotischen Drucks, welcher in einem Rupturieren der Endosomen resultiert, was wiederum zu einer Freisetzung der Plasmid-DNA ins Cytoplasma führt. Der Mechanismus des Transports der DNA in den Nukleus ist bisher noch ungeklärt. Im Nukleus wird die eingebrachte Plasmid-DNA für zwei bis drei Tage transkribiert und die resultierende mRNA translatiert. Alle Versuche dieser Arbeit wurden 24 bis 72 h nach der Transfektion durchgeführt.

Für die Transfektion von Zellen mittels TurboFect® wurden am Vortag 2 bis 4 x 10<sup>4</sup> Zellen in 24-well Mikrotiterplatten ausgesät. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 250 ng Plasmid-DNA mit doppelter Menge TurboFect® (in µl) in 100 µl serumfreiem DMEM angesetzt und zur Komplexbildung für 30 min bei RT inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf die Zellen getropft. Vor dem Serumentzug wurden die Zellen für mindestens 24 h inkubiert.

#### 4.2.1.4.2 Transfektion von *small interfering RNA* mittels Elektroporation

*Small interfering RNAs* (siRNA) werden verwendet, um ein bestimmtes Gen in Zellen abzuschalten. Durch das Prinzip der RNA-Interferenz kann die Translation von bestimmten Zielgenen unterdrückt werden. Die RNA-Interferenz ist ein natürlich vorkommender Mechanismus in eukaryotischen Zellen, der sowohl beim Abbau von fremder DNA, wie z. B. bei Virusinfektionen oder auch bei der Regulation der Genexpression zum Einsatz kommt (FIRE *et al.* 1998). siRNA bezeichnet ein doppelsträngiges RNA-Segment mit einer Länge von 20 bis 23 Basenpaaren mit jeweils zwei ungepaarten Basenpaaren am 3'-Ende. Nach der Transfektion der Zellen mit siRNA bindet diese im Cytoplasma an den *RNA induced silencing complex* (RISC) durch Interaktion mit Argonautenproteinen. Die siRNA wird in zwei Einzelstränge gespalten, wovon einer als Komplementärstrang für die mRNA des Zielgens dient. Durch die Bindung des siRNA-Einzelstrangs an die mRNA über Basenpaarung wird die Ribonuklease-Aktivität von RISC induziert. Durch das Zerschneiden der mRNA kann das Zielgen nicht mehr translatiert werden und die Expression wird inhibiert (MEISTER UND TUSCHL 2004). Als Negativkontrolle wird eine siRNA verwendet, deren Sequenz nicht im Genom vorkommt und daher keine Effekte auf die mRNA der Zelle hat. Sie ist notwendig, um mögliche unspezifische Effekte der Transfektion zu erkennen. Der *knock-down* des Zielproteins und somit die Wirksamkeit der siRNA ist von der Transfektionseffizienz abhängig. Deswegen ist es unabdingbar zu testen, mit welcher Transfektionsmethode die höchste Effizienz erreicht wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Transfektion der mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit siRNA die Methode der Elektroporation verwendet. Durch ein elektrisches Feld und kurze elektrische Impulse mit hoher Feldstärke entstehen bei der Elektroporation von Zellen kurzzeitig kleine Poren, durch welche die siRNA direkt in das Cytoplasma der Zelle gelangen kann (NEUMANN *et al.* 1982). Der darauffolgende Transport der Nukleotidsequenz in den Nukleus ist bisher noch nicht bekannt. Mittels Elektroporation können hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden, wenn die Bedingungen wie Stromstärke sowie Dauer und Anzahl der Pulse an die jeweilige Zelllinie ideal angepasst sind.

Die Elektroporation der Zellen mit dem Neon®-Elektroporationsgerät erfolgte nach Herstellerprotokoll der Firma Invitrogen. Bei der Optimierung der Elektroporationsbedingungen

für die mHypoA-2/10-CRE-Zellen war die Datenbank der Firma Invitrogen hilfreich, in der man Arbeitsbedingungen für verschiedene Zelltypen, die zugehörige Transfektionseffizienz und Angaben zur Zellvitalität findet.

Für die Elektroporation wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche abgelöst und die gewünschte Zellmenge durch Zentrifugation bei 800 x g für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und pro Elektroporationsschritt wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Resuspensionspuffer R (Invitrogen) aufgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 50 nM der siRNA, welche zuvor in R-Puffer verdünnt wurde. Die Zellen wurden mit einer Stromstärke von 1450 V für 30 ms mit einem Puls elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in Kulturmedium ohne Antibiotika überführt und in Mikrotiterplatten ( $1 \times 10^6$  Zellen/well einer 6-well Mikrotiterplatte,  $1,5 \times 10^3$  Zellen/well einer 96-well Mikrotiterplatte) überführt. Die Zellen wurden nach 24 h Inkubation für 16–20 h auf Serumentzug gesetzt. Anschließend wurden die mit siRNA transfizierten Zellen für den Western Blot (Kapitel 4.2.3.1.1) vorbereitet oder für Messungen der Reporterogenaktivität verwendet (Kapitel 4.2.3.4).

### 4.2.1.5 Herstellung stabil-exprimierender mHypoA-2/10-CRE-Luc Zellen

Zellen, die ein Reportergenkonstrukt stabil in ihr Genom integriert haben, können zu einer Vereinfachung der Versuche und letztendlich auch zu einer Zeitersparnis führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mHypoA-2/10-Zellen stabil mit dem 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukt transfiziert (Kapitel 4.1.11). Dafür wurden zunächst mHypoA-2/10-Zellen auf eine 6-well Mikrotiterplatte ausgesät und mit dem 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukt und einem leeren pcDNA4-Vektor cotransfiziert. Für die Transfektion wurden pcDNA4 und Reportergenkonstrukt in einem DNA-Mengenverhältnis von 1:10 eingesetzt. Die Transfektion erfolgte mittels TurboFect® in dem vom Hersteller empfohlenen DNA-TurboFect®-Verhältnis von 1:2. Der leere pcDNA4-Vektor enthielt neben dem *origin of replication* (ORI) ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Zeocin, um nach der Transfektion die Zellen mit Zeocin zu selektionieren. Bei Zeocin handelt es sich um ein Glykopeptid-Antibiotikum, hauptsächlich Phleomycin D1, das durch Induktion von DNA-Strangbrüchen den Zelltod hervorruft (CHEN UND STUBBE 2005). Nach der Transfektion wurden die Zellen mit 400-600  $\mu$ g/ml

Zeocin für etwa 4 Wochen selektiert. Positiv getestete Klone, sprich Klone, die das 6xCRE-Reportergenkonstrukt und den pcDNA4-Vektor in ihr Genom integriert hatten, wurden anschließend kultiviert und für weitere Versuche verwendet (BREIT *et al.* 2015).

## 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Bakterien sind unter natürlichen Bedingungen in der Lage im umgebenden Medium vorhandene DNA aufzunehmen, jedoch mit einer geringen Effizienz. Um die Permeabilität der Bakterien und somit die Effizienz der DNA-Aufnahme zu erhöhen, werden chemisch kompetente Bakterien nach einer Methode von Hanahan hergestellt (HANAHAN 1983). Hierfür wurden in dieser Arbeit *E. coli*-Bakterien des DH5 $\alpha$ -Stammes verwendet.

Für die Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst Bakterien über Nacht in 1 ml LB-Medium angeimpft. Nachdem am nächsten Tag 10  $\mu$ l der Bakteriensuspension in 100 ml LB/K-Medium verdünnt worden waren, wurde dieser Ansatz bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 bei 37 °C und 255 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) in einem Bakterienschüttler MaxQ 6000 inkubiert. Durch eine anschließende Zentrifugation für 10 min bei 4 °C mit 200 x g wurden die Bakterien sedimentiert, in 20 ml eisgekühltem FSP-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 200 x g und 4 °C wurden die Bakterien in 4 ml FSP-Puffer, dem 150  $\mu$ l DMSO zugesetzt wurden, resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nachdem erneut 150  $\mu$ l DMSO hinzugegeben und die Bakterien für weitere 10 min auf Eis inkubierten, wurden die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die chemisch kompetenten Bakterien bei –80 °C gelagert.

#### LB-Medium

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

#### LB/K-Medium

LB-Medium  
110 mM Glucose  
20 mM MgSO<sub>4</sub>

#### FSP-Puffer (pH 6,4)

10 mM KAcetat  
45 mM MnCl<sub>2</sub>  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
100 mM KCl  
10 % Glycerin (v/v)  
3 mM Co(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Cl<sub>3</sub>

### 4.2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Das Einbringen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation (OISHI UND COSLOY 1972). Um die gewünschte Plasmid-DNA zu amplifizieren wurden kompetente *E. coli*-Bakterien (Kapitel 4.2.2.1) mittels Hitzeschock transformiert. Durch den kurzzeitigen Hitzeschock wurde die Membran der Zellen durchlässig und die Plasmid-DNA konnte aufgenommen werden (INOUE *et al.* 1990). Durch das in der Plasmid-DNA vorhandene Resistenzgen für ein Antibiotikum konnten die Bakterien nach dem Ausstreichen auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz selektioniert werden. Bakterien, welche die zu amplifizierende Plasmid-DNA aufgenommen haben, konnten anschließend im Bakterieninkubator vermehrt werden.

Für die Transformation wurden das gewünschte Plasmid und die kompetenten Bakterien aus dem tiefgefrorenen Zustand auf Eis aufgetaut. 100 µl der kompetenten Bakterien wurden mit ca. 2,5 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien für 90 s bei 42 °C (oder für 5 min bei 37 °C) und nachfolgend für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Nach dem Ausplattieren der Bakteriensuspension auf Agarplatten mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin (50 µg/ml) erfolgte eine Inkubation im Bakterienbrutschrank bei 37 °C über Nacht. Eine sogenannte Vorkultur wurde angesetzt, indem ein Bakterienklon am nächsten Tag isoliert, in 2 ml LB-Medium mit Antibiotikuzusatz überführt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Bakterienschüttler inkubiert wurde. Aus dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag die sogenannte Hauptkultur angesetzt, indem 200 µl Vorkultur in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt wurden. Die Hauptkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm im Bakterienschüttler inkubiert.

#### Agarplatten

LB-Medium

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

### 4.2.2.3 Quantitative Plasmidisolierung

Die quantitative Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des ‚*Plasmid DNA purification Nucleo-Bond<sup>®</sup> Xtra Midi/Maxi<sup>®</sup>*‘-Kits der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben und mit den

mitgelieferten Puffern durchgeführt. Hierfür wurde die hergestellte Hauptkultur, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, zunächst bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Zellyse erfolgte durch die Zugabe von 8 ml Lysispuffer und mehrmaligen Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Bakteriensuspension mit 8 ml Neutralisationspuffer neutralisiert. Um das Lysat aufzureinigen, wurde es auf die NucleoBond® Xtra Säule geladen, welche zuvor mit 12 ml Äquilibrationpuffer benetzt wurde. Nachdem die Säule mit 5 ml Äquilibrationpuffer gewaschen wurde, wurde die Säule entfernt und der Filter mit 8 ml des Waschpuffers gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer eluiert. Die Konzentrierung und Entsalzung der Plasmid-DNA erfolgte durch den NucleoBond® Finalizer. Nach dem Präzipitieren der DNA mit 3,5 ml Isopropanol und 2 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat mit Hilfe des NucleoBond® Finalizers gewaschen und durch die Zugabe von 2 ml 70%igem Ethanol getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde mit einem Volumen von 400 µl Reinstwasser eluiert. Der DNA-Gehalt und die Reinheit des Eluats wurden mit Hilfe einer photometrischen Messung bestimmt (Kapitel 4.2.2.4). Die kurzfristige Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C, die längerfristige Lagerung bei -20 °C.

#### 4.2.2.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration resultiert aus der Messung der Absorption bei 260 nm und Berechnung mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA- und RNA-Konzentrationen mit Hilfe der Tray Cell-Erweiterung des ‚BioPhotometer plus‘ der Firma Eppendorf bestimmt. Der Vorteil dieser Erweiterung gegenüber herkömmlichen Photometern liegt in der Verwendung der unverdünnten Probe mit einem geringen Probenvolumen. Neben der Messung der DNA-Konzentration bei OD<sub>260</sub> gibt die Messung durch die Angabe der OD<sub>280</sub> Aufschluss über die Reinheit der Probe bzw. Verunreinigungen durch RNA. Die Formel für die Berechnung der DNA-Konzentration lautet:

$$50 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g DNA/ml}$$

Ein Verhältnis der optischen Dichten bei 260 und 280 nm von 1,8 steht für eine hohe Reinheit der DNA. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde ebenfalls die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgt anhand folgender Formel:

$$40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

Die Reinheit der gemessenen RNA lässt sich anhand des Quotienten der beiden optischen Dichten bei 260 und 280 nm ermitteln, welcher bei hoher Reinheit der RNA bei etwa 2 liegen sollte.

### 4.2.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.2.3.1 Messung der Phosphorylierung von Proteinen

Für die Aktivität von Proteinen ist deren Phosphorylierungsstatus oftmals von großer Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von ERK-1/2 und CREB mittels hochspezifischer Antikörper (Kapitel 4.1.6) im Western Blot untersucht.

##### 4.2.3.1.1 Herstellung von Proteinlysaten

Um Proteine mittels Western Blot nachweisen zu können, mussten die Proteine zunächst aus der Zelle isoliert und denaturiert werden. Dies geschah durch die Verwendung von Laemmli-Puffer (LAEMMLI 1970). Das darin enthaltene Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), welches nichtkovalente Bindungen der Proteine aufbricht, sowie das ebenfalls im Puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol, welches vorhandene Disulfidbrücken reduziert, führen zu einer Auflösung der Proteinstruktur.

Für die Herstellung von Proteinlysat wurden zwei Tage zuvor Zellen auf 6-well Mikrotiterplatten ausgesät ( $1 \times 10^5$  Zellen/well) und am nachfolgenden Tag für 16–20 h in Serumfreiem Medium inkubiert. Je nach Versuch wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten stimuliert. Bei der Verwendung von Inhibitoren wurden Zellen für 30 min mit 900  $\mu\text{l}$  des Inhibitors vorinkubiert und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  einer 10-fach-konzentrierten Ligandenlösung stimuliert. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 150–200  $\mu\text{l}$  1-fach-konzentrierten Laemmli-Puffer lysiert. Nach der Überführung des Lysats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, wurde durch eine Behandlung mit

Ultraschall für ca. 10 s die genomische DNA zerstört. Anschließend erfolgte die Inkubation des Lysats für 5 min bei 65 °C und die Lagerung bei –20 °C.

Laemmli-Puffer (pH 6,8):

0,025 % Bromphenolblau (w/v)	15 mM Tris/HCl
5 % Glycerin (v/v)	1,25 % β-Mercaptoethanol (w/v)
1 % SDS (w/v)	

4.2.3.1.2 *Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)*

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung der mit SDS denaturierten Proteine nach ihrer Größe mit Hilfe eines diskontinuierlichen Polyacrylamidgels. Das diskontinuierliche Gel besteht aus einem oberen Sammelgel, in welchem das gesamte aufgetragene Protein konzentriert wird, und einem unteren Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung nach Molekulargewicht erfolgt. Dabei laufen kleine Proteine schneller durch das Gel als Proteine mit höherem Molekulargewicht. Das Sammelgel und das Trenngel unterscheiden sich in ihrem pH-Wert und der Porengröße, was wiederum zu schärferen Banden führt und den Einsatz kleinerer Probenvolumina erlaubt als ohne Sammelgel. Für die in dieser Arbeit nachzuweisenden Proteine wurde Trenngel mit 10 % Acrylamid-Anteil verwendet. Je höher die Konzentration des Acrylamids, desto kleiner sind die Poren und umso langsamer laufen die Proteine durch das Gel.

Bevor das Proteinlysate auf das Polyacrylamidgel aufgetragen wurde, wurde es für 5 min bei 17000 x g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile (mögliche Reste genomischer DNA) zu sedimentieren. Aus dem Überstand wurden 25 µl auf ein Gel aufgetragen. Zunächst wurde eine Spannung von 80 V an das Gel angelegt. Nachdem die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Auftrennung der Proteine war umso klarer, je länger das Gel lief. Als Orientierung für die Molekülmasse der Proteine diente der mitgeführte Größenstandard *BLUEplus-wide prestained Protein Ladder* von Biomol.

Trenngellösung (pH 8,8)

375 mM Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)
10 % Rotiphorese Gel 30
100 µl APS (10 %)
20 µl TEMED

Sammelgellösung (pH 6,8)

125 mM Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)
4 % Rotiphorese Gel 30
100 µl APS (10 %)
20 µl TEMED

SDS-Laufpuffer

2,5 mM Tris/HCl
0,01 % SDS
19 mM Glycin

#### 4.2.3.1.3 Western Blot

Im Anschluss an die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. In dieser Arbeit wurde dafür das sog. halbtrockene Verfahren (*semi-dry*) von Towbin angewendet (TOWBIN *et al.* 1979). Nach dem Blotten der Proteine auf die Membran wurden die Proteine durch eine unspezifische und reversible Anfärbung durch Ponceau S sichtbar gemacht und somit der Transfer überprüft. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindestellen durch z. B. Milchpulver oder bovines Serumalbumin (BSA) wurde die Expression oder der Phosphorylierungsstatus von Proteinen auf der Membran mittels hoch-spezifischer Antikörper (Kapitel 4.1.6) untersucht. Dabei band der Primärantikörper an das gewünschte Epitop, welches anschließend wiederum von einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörper erkannt wurde. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde die Chemilumineszenz des durch HRP katalysierten Umsatzes von Luminol unter Verbrauch von  $H_2O_2$  mit einer sensitiven Kamera gemessen (ChemiSmart 5000, Peqlab). Mit Hilfe des Programms ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA) erfolgte durch eine densitometrische Analyse eine Semi-Quantifizierung der Proteinbanden und der Proteinphosphorylierung. Um Western Blots auswerten zu können, war eine sog. Ladekontrolle unerlässlich. Als Ladekontrolle diente ein Protein, bei dem man davon ausgeht, dass es in allen Zellen unabhängig von der Stimulation in gleicher Menge vorhanden ist. Um möglichst die gleichen Proteinmengen der Lysate auf ein Gel aufzutragen, wurden nur Proteinlysate verwendet, welche zusammen auf einer 6-well Mikrotiterplatte ausgesät und lysiert wurden. Für die Ladekontrolle wurde die Membran nach dem Proteintransfer horizontal geschnitten, wobei dann eines der beiden Membranstücke dem Nachweis des gewünschten Proteins diente, während der andere Abschnitt für den Nachweis der Ladekontrolle verwendet wurde. Im Rahmen dieser Arbeit dienten Tubulin und Histon H3 als Ladekontrolle. Für beide Proteine war zuvor getestet worden, dass die Stimulation der Zellen keinen Einfluss auf die Proteinexpression nahm und somit beide Proteine als Ladekontrolle geeignet waren. Bei der Auswertung wurde jede Proteinbande auf ihre zugehörige Ladekontrolle normiert.

Als Transferkammer wurde der *Novex® Semi-Dry Blotter* (Invitrogen, Darmstadt) verwendet und es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Hierbei handelt es sich um ein Transfersystem, bei dem die Anode nach unten orientiert ist. Der Aufbau eines Western Blots ist in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt. Auf die Anode wurden zunächst 2 Filterpapiere gelegt, welche in 2x *NuPAGE® Transfer Buffer* getränkt wurden. Danach folgte die Nitrozellulosemembran, ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Auf die Nitrozellulosemembran wurde das Polyacrylamidgel gelegt, bevor zwei weitere, in Puffer getränkte Filterpapiere auf dem Stapel positioniert wurden. Nach jeder Komponente wurden Luftblasen vorsichtig entfernt, welche einen gleichmäßigen Proteintransfer negativ beeinflussen können.

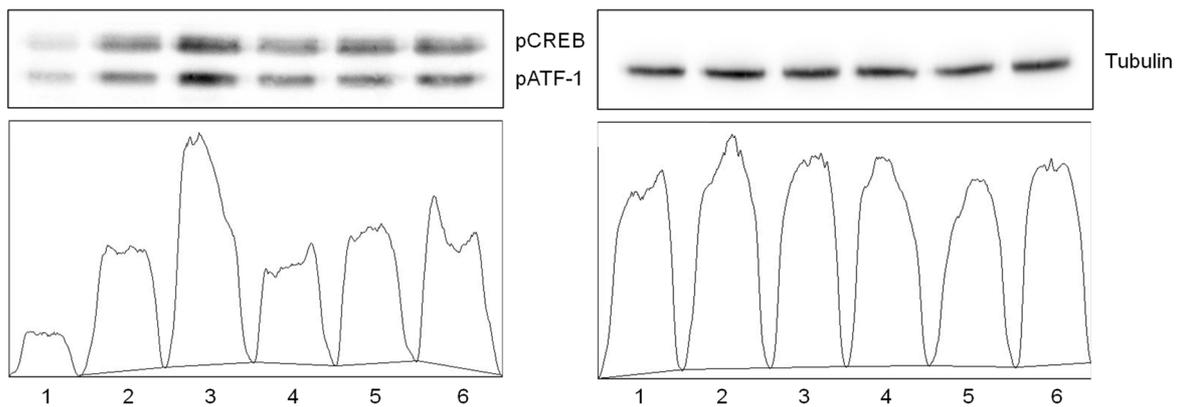


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau eines Western Blots

Es wurde eine konstante Stromstärke von 20 mA angelegt und für 2 h transferiert. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran für 2 bis 3 min in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend in ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde die Membran horizontal auf gewünschter Höhe geschnitten, um die Membran für das gewünschte Protein und die Ladekontrolle zu unterteilen. Nachdem die Membranen dreimal für 10 min mit *Tris-buffered saline Tween* (TBST) gewaschen worden waren, wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit der jeweiligen Blockierlösung für 30 min blockiert. Es folgte die Inkubation der Membranen mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C (Kapitel 4.1.6.1). Am nächsten Tag wurden die Membranen für 3 x 10 min mit TBST gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, bevor sie für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Anschließend folgten erneut 3 Waschschrift für jeweils 10 min mit TBST. Für die Entwicklung am ChemiSmart 5000 wurden Substratlösung 1 (S1) und Substratlösung 2 (S2) in Verhältnis 1:1 gemischt und für etwa 1 min mit der Membran inkubiert. Nachdem die Membran zwischen zwei Folien positioniert

worden ist, um eine Austrocknung zu verhindern, wurde im ChemiSmart 5000, je nach vorliegender Signalstärke, für 5 bis 15 min belichtet. Dabei wurde die Funktion der Auto-Belichtung des Geräts verwendet, um die Belichtungszeit der Signalstärke anzupassen. Die Quantifizierung und Analyse der Signale erfolgte mit Hilfe von ImageJ. In Abbildung 4.3 ist sowohl die densitometrische Analyse mittels ImageJ als auch die zugehörige Auswertung eines Western Blots exemplarisch dargestellt.

A



B

Proteinbande	Fläche pCREB	Fläche Tubulin	pCREB/ Tubulin	Phosphorylierung zu basal [%]	Phosphorylierung über basal [%]
1	3977	19162	0,21	100	0
2	14159	22358	0,63	300	200
3	23226	19929	1,17	557	457
4	11711	20263	0,58	276	176
5	14497	17445	0,83	395	295
6	16732	19710	0,85	405	305

Abbildung 4.3: Exemplarische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung eines Western Blots

Bei der densitometrischen Auswertung wurden sowohl bei der Verwendung des Antikörpers gegen pERK-1/2 und pCREB beide Proteinbanden berücksichtigt. Bei den Doppelbanden handelt es sich um die Proteinbanden von phosphoryliertem ERK-1 und ERK-2 bzw. um die Proteinbanden von phosphoryliertem CREB und ATF-1, einem weiteren Mitglied der *cAMP-responsive activators*. Der Phosphorylierungsstatus von pCREB bzw. pERK-1/2 wurde als Quotient des Signals von pCREB bzw. pERK-1/2 und der jeweiligen Ladekontrolle

dargestellt (pCreb/Ladekontrolle oder pERK-1/2/Ladekontrolle). Für die weitere Auswertung wurde das Signal der nicht stimulierten Zellen bzw. der Zellen, die nur mit dem Vehikel oder dem Inhibitor behandelt worden waren, als 100 % Phosphorylierung definiert und die stimulierten Zellen dazu ins Verhältnis gesetzt. So wurde jedes stimulusinduzierte Signal auf den jeweiligen Basalwert (evtl. mit Lösungsmittel) normiert, während jedes stimulusinduzierte Signal in Anwesenheit des Inhibitors auf den Basalwert des Inhibitors normiert wurde.

<u>2x NuPAGE® Transfer Buffer</u>	<u>TBST (pH 7,4)</u>	<u>Ponceau-S-Lösung (pH 10,4)</u>
50 ml Transfer Buffer (20x)	10 mM Tris/HCl	0,1 % Ponceau S
50 ml Methanol	150 mM NaCl	5 % Essigsäure (v/v)
500 µl NuPAGE® Antioxidant	0,05 % Tween (v/v)	
400 ml H <sub>2</sub> O		
<u>S1-Lösung (pH 8,5)</u>	<u>S2-Lösung (pH 8,5)</u>	
0,1 M Tris/HCl	0,1 M Tris/HCl	
0,02 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	250 µM Luminol	
	400 µM 4-Hydroxyzimtsäure	

#### 4.2.3.2 Nachweis der PKA-Aktivität

Um die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Aktivierung der PKA zu analysieren, wurde das *PKA kinase activity kit* der Firma Abcam verwendet. Dieser Aktivitätsnachweis beruht auf einem *enzyme-linked immuno-adsorbent Assay* (ELISA) unter Verwendung eines spezifischen Substrats für die PKA und einem polyklonalen Antikörper, der die phosphorylierte Form des Substrats erkennt. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Herstellung der Zelllysate wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/well einer 6-well Mikrotiterplatte ausgesät und am darauffolgenden Tag für 16–20 h unter Serumentzug inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2,5 min mit DMEM ohne Serum bzw.  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor 1 ml Lysispuffer auf die Zellen pipettiert wurde. Dem Lysispuffer wurden kurz vor der Verwendung noch die Proteaseinhibitoren Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF), Leupeptin und Aprotinin hinzugefügt. Nach 10 min Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen von der Zellkulturplatte abgeschabt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt und für  $3 \times 20$  s auf Eis sonifiziert. Die Lysate wurden anschließend für 15 min bei  $16.000 \times g$  zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion im Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Für die Durchführung des ELISAs wurde jede zu verwendende Vertiefung der im Kit enthaltenen *PKA substrate microtiter* Platte mit 50 µl *kinase assay dilution buffer* für 10 min bei RT inkubiert; danach wurde der Puffer abgesaugt. Es wurden jeweils 30 µl der verdünnten Lysate (1 µl Lysate in 29 µl *kinase assay dilution buffer*) in die Platte pipettiert. Die Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt, als Blindwert diente der *kinase assay dilution buffer*. Zu jeder Probe wurden nun 10 µl ATP pipettiert. Die Platte wurde für 90 min bei 30 °C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach dem Absaugen der Reaktionsflüssigkeiten wurden 40 µl *phosphospecific substrate antibody* in jede Vertiefung pipettiert und die Platte für 60 min bei RT inkubiert. Nach der Entfernung des Antikörpers wurde jeder Ansatz der Reaktionsplatte 4 Mal für 1 bis 2 min mit 100 µl *wash buffer* gewaschen. In Folge des letzten Waschschritts wurde die Flüssigkeit von den Proben entfernt und durch 40 µl des 1:1000 verdünnten *anti-rabbit IgG: HRP conjugate* ersetzt. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 30 min bei RT, bevor die 4 Waschschrte mit *wash buffer* wiederholt wurden. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und 60 µl Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat zu jedem Ansatz gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 min bei RT wurde die Reaktion durch die Zugabe von jeweils 20 µl *stop solution 2* gestoppt, als ein gut sichtbarer Farbumschlag von farblos zu blau erreicht war, jedoch bevor sich eine Farbsättigung einstellt hatte. Es wurde die Absorption bei 450 nm am Plate Reader FLUOstar Omega gemessen. Für die Auswertung wurde die Absorption des Blindwerts von allen Proben abgezogen.

### Lysispuffer

20 mM MOPS	5 mM EGTA/ 2 mM EDTA
50 mM beta-Glycerolphosphat	1 % NP40
50 mM Natriumfluorid	1 mM Dithiothreitol (DTT)
1 mM Natriumvanadat	1 mM Benzamidin

### 4.2.3.3 Bestimmung der zellulären cAMP-Akkumulation

Der sekundäre Botenstoff cAMP stellt ein wichtiges Molekül bei der Signaltransduktion von G<sub>s</sub>- und G<sub>i/o</sub>-gekoppelten Rezeptoren dar. Er wird intrazellulär durch die membranständige AC aus ATP gebildet und führt z. B. zu einer Aktivierung von PKA und EPAC. Durch ein Protokoll von Salomon (SALOMON *et al.* 1974) und eine Modifikation desselben durch Du-

muis (DUMUIS *et al.* 1988) ist es möglich, die cAMP-Akkumulation nach metabolischer Markierung der Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Adenin über eine sequentielle Säulenchromatographie und Szintillationsmessung zu bestimmen.

Für die Bestimmung der cAMP-Akkumulation wurden zwei Tage vor der eigentlichen Messung  $6 \times 10^4$  Zellen auf eine 12-well Mikrotiterplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit  $2 \mu\text{Ci/ml}$  [<sup>3</sup>H]-Adenin ( $27,2 \text{ Ci/mmol}$ ) in serumfreiem Medium über Nacht markiert. Nach etwa 16 h Inkubationszeit wurde die Markierungslösung von den Zellen abgesaugt und  $450 \mu\text{l}$  serumfreies Medium mit  $1 \text{ mM}$  1-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) gegebenenfalls mit Inhibitor, auf die Zellen pipettiert. Die im Medium enthaltene heterozyklische Verbindung IBMX blockiert hierbei den cAMP-Abbau durch Phosphodiesterasen. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen durch die Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  einer 10-fach-konzentrierten Ligandenlösung. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand entfernt und  $1 \text{ ml}$  eiskalte, 5%ige Trichloressigsäure auf die Zellen gegeben. Dies führte zur Extraktion des Cytoplasmas. Vor Beginn der eigentlichen Säulenchromatographie wurden die Dowex-Resin-AG50-W-Säulen (8 % Quervernetzung) mit  $10 \text{ ml}$  HCl ( $1 \text{ M}$ ) und  $10 \text{ ml}$  H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Überstand der Zellen wurde komplett auf die Dowex-Resin-Säulen übertragen, wo mittels einer Ionenaustauschchromatographie eine Trennung von cAMP und ATP erfolgte. Die Säulen wurden mit  $4 \text{ ml}$  H<sub>2</sub>O gewaschen. Das in diesen beiden Schritten im Eluat enthaltene ATP wurde optional in Szintillationsröhrchen aufgefangen. Der Inhalt der Dowex-Resin-Säulen wurde durch die Zugabe von  $10 \text{ ml}$  H<sub>2</sub>O direkt auf die Aluminiumoxidsäulen (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) eluiert. Die weitere Aufreinigung der Überstände durch die Aluminiumoxidsäulen diente der Abtrennung unerwünschter Nebenprodukte. Nachdem die Aluminiumoxidsäulen mit  $1 \text{ ml}$  Imidazol ( $0,1 \text{ M}$ ) gewaschen worden waren, wurde mit  $5 \text{ ml}$  der gleichen Lösung eluiert. Das Eluat wurde in Szintillationsgefäßen aufgefangen. In diese Röhrchen wurden  $12 \text{ ml}$  Szintillationsflüssigkeit gegeben. Mit Hilfe des Szintillationsmessgeräts (WS1414, Perkin Elmer) wurde für jeweils 3 min die Tritium-abhängige Betastrahlung gemessen und als Zerfälle pro Minute (DPM) angegeben. Falls ATP und cAMP gemessen wurde, wurde die cAMP-Akkumulation als Quotient angegeben, welche folgendermaßen berechnet wurde:

$$\text{cAMP-Akkumulation} = \text{cAMP} / (\text{cAMP} + \text{ATP}) * 1000$$

Um die Liganden-vermittelte Inhibition der cAMP-Akkumulation über  $G_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren bestimmen zu können, wurde der direkte AC-Aktivator Forskolin (FSK) verwendet, wodurch die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert und das System sensitiver wurde. Dafür wurden die Zellen nach der Markierung mit 10  $\mu\text{M}$  FSK stimuliert oder mit dem Liganden in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  FSK für 30 min stimuliert. Mit Hilfe des berechneten Quotienten wurde bestimmt, um wieviel Prozent der Ligand die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation inhibiert hatte. Die Bestimmung der cAMP-Akkumulation erfolgte in Form von Quadruplikaten.

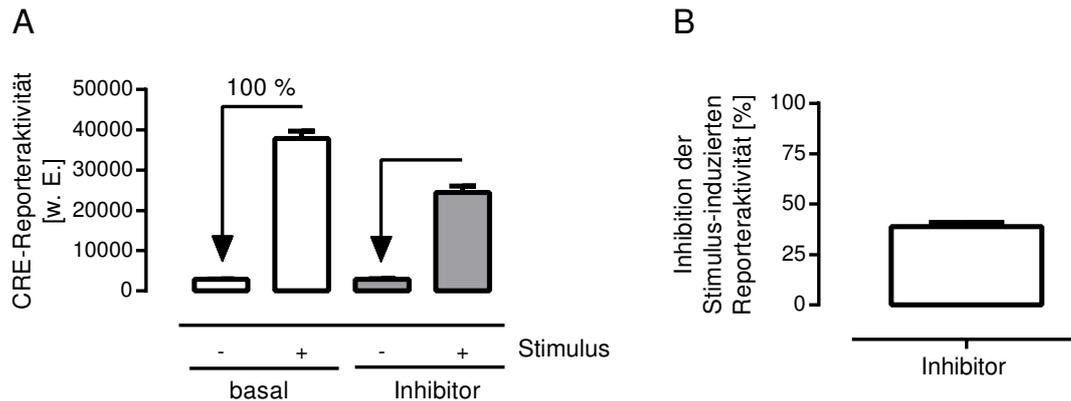
#### 4.2.3.4 Messung der CRE-Reporteraktivität

Reportergenkonstrukte dienen dem Nachweis eines spezifischen Signalwegs, der die Transkription von Zielgenen reguliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukt gearbeitet (Kapitel 4.1.11). Wenn durch Stimulation von Zellen mit einem Liganden der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert wird, dann kann er an die CRE-Reportergensequenz binden. Die CRE-Sequenzen des Konstrukts sind zusammen mit dem Reportergen Luziferase unter Kontrolle eines basalen Promoters geschaltet. Durch die Aktivierung von CRE über die Bindung des Transkriptionsfaktors verändert sich die Expression des Reportergenprodukts. Das Reportergen Luziferase aus dem *Photinus pyralis* ist ein Enzym, welches unter Verbrauch von ATP die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin katalysiert. Die dabei frei werdenden Photonen können mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden. Die Lichtmenge ist dabei linear abhängig von der Luziferasemenge und somit auch von der Reportergenaktivität. Alle Reporter-messungen wurden in Form von Quadruplikaten durchgeführt.

##### 4.2.3.4.1 Stabile Expression des CRE-Reportergenkonstrukts

Für die Messung der transkriptionellen Regulation mit Reportergenkonstrukten wurden die mHypoA-2/10-CRE-Luc-Zellen zwei Tage zuvor ausgesät (1,5 x 10<sup>4</sup> Zellen/well einer 96-well Mikrotiterplatte, 6 x 10<sup>4</sup> Zellen/well einer 24-well Mikrotiterplatte). Vor der Stimulation der Zellen wurden diese für 16 bis 20 h in serumfreiem Medium inkubiert. Für die Stimulation

selbst wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und 90  $\mu\text{l}$  (96-well Mikrotiterplatte) bzw. 450  $\mu\text{l}$  (24-well Mikrotiterplatte) frisches serumfreies Medium auf die Zellen gegeben. Bei der Verwendung von Inhibitoren wurde der Inhibitor im eben genannten frischen Medium verdünnt. Die Inkubationszeit für Inhibitoren betrug, falls nicht anders angegeben, 30 min. Anschließend wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{l}$  bzw. 50  $\mu\text{l}$  einer 10-fach konzentrierten Ligandenlösung stimuliert. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen für 4 h mit dem jeweiligen Liganden inkubiert, ausschließlich der 30 min Vorinkubation mit Inhibitor. Bei der Stimulation der Zellen wurde darauf geachtet, dass für jeden Inhibitor die passende Lösungsmittelkontrolle durchgeführt wurde. Alle Messungen wurden in Form von Quadruplikaten durchgeführt. Im Anschluss an die Stimulation wurde das Medium abgesaugt und 50  $\mu\text{l}$  (96-well Mikrotiterplatte) bzw. 200  $\mu\text{l}$  (24-well Mikrotiterplatte) Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Im Fall der 24-well Mikrotiterplatten wurden 180  $\mu\text{l}$  des Lysats auf eine 96-well Mikrotiterplatte überführt, da mit Hilfe des Plate Readers FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg) nur im 96-well-Format gemessen werden kann. Die Messung der Lumineszenz erfolgte über einen Zeitraum von 10 s, wobei nach 2 s automatisch 20  $\mu\text{l}$  des Firefly-Luziferasesubstrats injiziert wurden. Für die Auswertung der Experimente wurde der Mittelwert der Lumineszenz von 3 bis 10 s der gesamten Messzeit verwendet, also ab dem Zeitpunkt der Injektion des Substrats. Die Daten jeder Messung wurden vor der Normierung mit Hilfe geeigneter statistischer Tests auf ihre Signifikanz geprüft (Kapitel 4.2.4). Da aber verschiedene Faktoren wie Zellzahl, Qualität des Substrats oder Qualität der Hormone Einfluss auf die Messgröße nehmen können, wurden die Daten normiert. Für die Berechnung der prozentualen Inhibition eines Ligandensignals durch einen Inhibitor wurde zunächst die jeweilige basale Aktivität von der ligandeninduzierten Reporteraktivität abgezogen. Im Anschluss wurde die Differenz ohne Inhibitor als 100 % definiert und die inhibitorinduzierte Differenz auf diesen Wert normiert. Die berechnete Inhibition der stimulusinduzierten Reporteraktivität wurde anschließend von 100 % subtrahiert und als Inhibition in % angegeben. Dabei bedeuten 0 %, dass der Inhibitor keinen Effekt auf die Reporteraktivität des Stimulus hatte, wohingegen 100 % eine vollständige Inhibition des Signals bedeuten (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4 Auswertung der Verringerung der stimulusinduzierten Reporteraktivität durch einen Inhibitor**

(A) Für jeden Versuch wurden die Mittelwerte der Quadruplikate der einzelnen Bedingungen gebildet. Anschließend wurde der jeweilige Basalwert ohne Stimulus von der stimulusinduzierten Reporteraktivität (ohne oder mit Inhibitor) abgezogen. Die Differenz der Aktivität ohne Inhibitor wurde als 100 % definiert.

(B) Für die Darstellung der Inhibition der stimulusinduzierten Reporteraktivität wurde die berechnete Inhibition von 100 % subtrahiert und die Differenz als positive Prozentzahl dargestellt. Dabei entsprechen 100 % einer vollständigen Inhibition der Reporteraktivität durch den Inhibitor, während 0 % bedeuten, dass der Inhibitor keinen Effekt auf das Signal hatte.

#### Lysispuffer

25 mM Tris/HCl (pH 7,4)  
 4 mM EGTA  
 8 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM DTT  
 1% Triton X-100

#### 4.2.3.4.2 *Transiente Expression des CRE-Reportergenkonstrukts*

Für die Transfektion der HEK-MC4R- oder GT1-7-Zellen mit einem Reportergenkonstrukt wurden drei Tage vor der Messung 3–5 x 10<sup>4</sup> Zellen/well auf eine 24-well Mikrotiterplatte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 250 bis 500 ng der entsprechenden Plasmid-DNA/well mittels TurboFect® (Kapitel 4.2.1.4.1) transfiziert. Einen Tag später wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Die nachfolgenden Schritte sowie die Auswertung sind identisch zum Protokoll derjenigen Zellen, die das Reportergenkonstrukt stabil exprimieren (Kapitel 4.2.3.4.1).

#### 4.2.3.5 Messung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen mittels Fura-2-AM

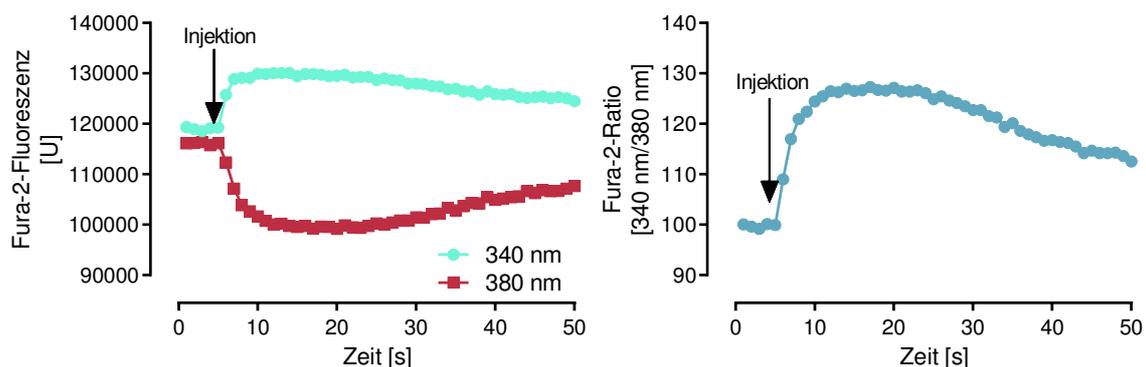
Um intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von Zellen zu bestimmen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM eingesetzt. Die Moleküle des Farbstoffs bilden selektiv einen Chelatkomplex mit freien Ca<sup>2+</sup>-Ionen. Bei einer Erhöhung der Calciumkonzentration reagiert

Fura-2 mit einer höheren Fluoreszenzintensität, sowie mit einer Verschiebung des Intensitätsmaximums der Fluoreszenz. Das Emissionmaximum von Fura-2 in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Lösung liegt bei 510 nm nach einer Anregung mit 380 nm, während sich das Emissionsmaximum bei vollständiger Sättigung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu einer Anregungswellenlänge von 340 nm verschiebt. Durch eine alternierende Anregung der Zellen mit 340 bzw. 380 nm kann eine Änderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels im Cytoplasma gemessen werden. Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist an einer erhöhten Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm und einer verminderten Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm erkennbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Fura-2-AM verwendet, ein membrangängiges Derivat von Fura-2. Dabei liegt Fura-2 als Acetoxymethylester (AM) vor, welcher in der Zelle durch Esterasen gespalten wird. Die Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden. Zum einen wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen mit dem Plate Reader FLUOstar Omega durchgeführt, diese Messmethode ist besonders geeignet um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung einer Vielzahl von Zellen zu bestimmen. Zum anderen wurden Zellen im  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht, eine sensitive Methode zur Einzelzellmessung.

#### 4.2.3.5.1 Bestimmung intrazellulärer $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Plate Reader)

Für die Bestimmung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurden zwei Tage vor der Messung  $1-3 \times 10^6$  Zellen auf eine 100 mm-Petrischale ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen in serumfreiem Medium für 16 bis 20 h inkubiert. Am Messtag wurden dem *HEPES-buffered saline* (HBS)-Puffer Glucose und  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt (Lösung 1) und anschließend wurde besagter Puffer mit Fura-2-AM und Pluronic versetzt (Lösung 2). Das zur Fura-2-AM-Lösung zugesetzte Poloxamer Pluronic verbessert die Aufnahme des Fura-2-AM-Moleküls. Das Medium wurde abgesaugt und 3 ml der Fura-2-AM-Lösung mit dem Inhibitor bzw. einer Lösungsmittelkontrolle auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C (und lichtgeschützt) wurde der Überstand abgesaugt und 2 ml einer vorgewärmten PBS/EDTA Lösung (2 mM EDTA) auf die Zellen gegeben, um diese vom Plattenboden abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden mit 10 ml der Lösung 1 in ein 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 800 x g und RT zentrifugiert. Der

Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in einer geeigneten Menge der Lösung 1 resuspendiert, damit je 80 µl der Zellsuspension in eine Vertiefung einer schwarzen 96-well Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden überführt werden konnten. Die Zellen einer 100 mm-Petrischale wurden auf 8–12 Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte aufgeteilt. Nach der Vorbereitung erfolgte die Messung mit Hilfe des Plate Readers FLUOstar Omega. Es wurde die Fluoreszenz nach alternierender Anregung mit 340 nm und 380 nm über die Zeit mit einer Frequenz von 0,86 Hz gemessen. 5 s nach Messbeginn wurden 20 µl einer 5-fach konzentrierten Ligandenlösung automatisch injiziert. Die Messungen erfolgten in Form von Quadruplikaten. Zur Auswertung wurde die Fura-2-Ratio ermittelt, indem der Quotient der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm/380 nm gebildet wurde. Die daraus resultierenden Quotienten wurden auf den ersten Messwert, der als 100 % definiert wurde, normiert und gegen die Zeit in s dargestellt (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5: Exemplarische Darstellung von Fura-2-AM-Fluoreszenzmessungen**

Die linke Abbildung zeigt die gemessene Fura-2-Fluoreszenz bei 340 nm (grüne Kurve) und bei 380 nm (rote Kurve) in Abhängigkeit von der Zeit. Nach 5 s wurde der Ligand injiziert. In der rechten Abbildung ist die Kurve des Quotienten 340 nm/380 nm der Daten der linken Abbildung gegen die Zeit dargestellt, wobei der Startpunkt der Messung als 100 % definiert wurde.

HBS-Puffer (pH 7,4)

10 mM HEPES  
5 mM KCl  
140 nM NaCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung 1

HBS-Puffer  
2 mM CaCl  
5,5 mM Glucose

Lösung 2

Lösung 1  
5 µM Fura-2-AM  
0,02 % Pluronic F-127 (w/v)

**4.2.3.5.2 Bestimmung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen (Calcium-Imaging)**

Zwei Tage vor dem Ca<sup>2+</sup>-Imaging wurden 6 x 10<sup>4</sup> Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen in 6-well Mikrotiterplatten ausgesät. Vor dem Experiment wurden die Zellen

für 16–20 h in serumfreiem Medium inkubiert. Für die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen mittels Calcium-Imaging wurden ebenfalls der HBS-Puffer, sowie Lösung 1 und 2 hergestellt (Kapitel 4.2.3.5.1). Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 1 ml Lösung 2 beschichtet und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Absaugen der Fura-2-AM-Lösung wurden die Zellen zweimal mit 2 ml HBS-Puffer gewaschen, um Überstände der Lösung 2 komplett zu entfernen, da diese die spätere Messung negativ beeinflussen. Bis zur Messung wurden die mit Fura-2-AM-markierten Zellen in HBS-Puffer bei RT lichtgeschützt aufbewahrt. Für die Messung selbst wurde jeweils ein Deckgläschen entnommen und in die Messkammer eingespannt, mit 200  $\mu\text{l}$  HBS-Puffer überschichtet und auf einem IX-71 (Olympus) invertierten Fluoreszenzmikroskop positioniert. Es wurde ein 40-fach vergrößerndes Ölimmersionsobjektiv und die Software Vision 5.0 (Till Photonics, Gräfelfing) verwendet. Durch einen Monochromator wurden die Zellen alternierend mit 340 nm und 380 nm mit einer Frequenz von 2 Hz angeregt. Durch eine iXON-Digitalkamera (Andor, Belfast, Nord-Irland) erfolgte die Aufzeichnung und Darstellung der Fura-2-Emission. Nach 50 s wurden 200  $\mu\text{l}$  einer 2-fach konzentrierten Ligandenlösung (verdünnt in HBS-Puffer) manuell zu den Zellen pipettiert. Beim Pipettieren der Ligandenlösung wurde darauf geachtet, dass der Vorgang gleichmäßig und möglichst am Rand der Messkammer erfolgte. Durch zu kräftiges Pipettieren direkt auf die Zellen ist es möglich, diese vom Deckgläschen abzulösen, zusätzlich entsteht ein Injektionsartefakt. Nach der Messung wurde mit Hilfe der Software der Messhintergrund in beiden Fluoreszenzkanälen subtrahiert. Zur Auswertung wurde der Quotient der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm zu 380 nm gebildet und der erste Messwert einer Zelle als 100 % definiert. Die berechneten Werte wurden gegen die Zeit dargestellt. In der Abbildungsbeschriftung ist die Gesamtzahl gemessener Zellen für jede Bedingung angegeben, welche sich aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen des Experiments zusammensetzte.

### 4.2.3.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine modifizierte Methode der PCR. Sie stellt eine in der Molekularbiologie weit verbreitete Methode für den Nachweis von Genexpression dar. Hierfür musste zunächst mRNA aus Zellen isoliert werden, was im Rahmen dieser Arbeit mittels

der sogenannten *single-step*-Methode erfolgte. Anschließend wurde die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA unterscheidet sich von genomischer DNA durch das Fehlen nicht-kodierender Intron-Sequenzen. Die Amplifizierung und Quantifizierung des DNA-Produkts erfolgte mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR).

### 4.2.3.6.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zunächst wurden zwei Tage vor der RNA-Isolation  $1 \times 10^6$  Zellen auf eine 100 mm-Petrischale ausgesät. Für 16 bis 20 h vor der Isolation wurden die Zellen mit Kulturmedium ohne Serum inkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte abhängig vom jeweiligen Versuchsansatz, indem 2,7 ml DMEM ohne Serum (mit Inhibitor oder Lösungsmittelkontrolle) für 30 min auf die Zellen gegeben wurden und anschließend die Zellen mit 300 µl einer 10-fach konzentrierten  $\alpha$ -MSH-Ligandenlösung für 20 min stimuliert wurden. Die eigentliche RNA-Isolation erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der *single-step*-Methode, welche bereits 1984 beschrieben wurde (CHOMCZYNSKI UND SACCHI 1987). Dafür wurde das Medium abgesaugt, 1 ml TRI-Reagenz auf die Zellen gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Das TRI-Reagenz enthält Guanidiniumthiocyanat, welches neben der Lyse der Zellen auch zu einer Inaktivierung von RNasen und weiteren Enzymen führt. Das ebenfalls im TRI-Reagenz enthaltene Phenol löst die RNA aus den Zellen. Nach der Inkubation wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Phasentrennung und die damit verbundene Trennung der RNA von den restlichen Zellbestandteilen erfolgte durch die Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließendem Vortexen für etwa 15 s. Nach 3 min Inkubationszeit bei RT wurde das Lysat für 15 min bei  $18.000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Interphase mit der DNA sowie die untere Phase, welche die Proteine enthielt, wurden verworfen. Um die RNA zu präzipitieren, wurden zu den 600 µl der oberen Phase 800 µl Isopropanol pipettiert, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei  $21400 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol (in nukleasefreiem Wasser) resuspendiert und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach einer

Zentrifugation für 5 min bei 21400 x g bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 5 bis 10 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Durch eine Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei 60 °C wurde die RNA vollständig gelöst und die Konzentration konnte bestimmt werden (Kapitel 4.2.2.4). Die isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 4.2.3.6.2 Reverse Transkription

Das Umschreiben der RNA in cDNA wird als reverse Transkription bezeichnet. Hierfür ist die RNA-abhängige DNA-Polymerase Reverse Transkriptase notwendig. Für die reverse Transkription im Rahmen dieser Arbeit wurde das *RevertAid H Minus First Strand cDNA-Synthesekit* der Firma Thermo Scientific™ (Dreieich) eingesetzt und nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

- 2 µg RNA-Template (RNA-Isolation aus Zellen)
- 1 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer
- ad 12 µl ddH<sub>2</sub>O → Inkubation für 5 min bei 65 °C
- 4 µl 5x Reaktionspuffer
- 1 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 2 µl 10 mM dNTP-Mix
- 1 µl H- Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Das Pipettieren der Ansätze erfolgte auf Eis. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 1 h bei 42 °C und für weitere 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert.

Die entstandene cDNA wurde für die nachfolgende qPCR 1:1000 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 4.2.3.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Im Vergleich zur qualitativen PCR, bei der das PCR-Produkt durch Größenauftrennung auf einem Agarosegel analysiert werden kann, so kann mit Hilfe der qPCR nicht nur untersucht werden, ob eine bestimmte mRNA in den Zellen vorhanden ist, sondern es kann eine Quantifizierung der Genexpression erfolgen. Die Quantifizierung der gewonnenen DNA-Produkte erfolgte durch den Einsatz des DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I, welcher erst nach Bindung an einen DNA-Doppelstrang ein Fluoreszenzsignal ab-

gibt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte nach jedem Elongationszyklus. Die qPCR-Messungen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit dem 96-well Mikrotiterplatten-basierenden LightCycler® 480 der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt, welcher ein Thermocycler und ein Fluorimeter in einem Gerät ist. Dadurch war in der exponentiellen Phase der Reaktion in Echtzeit die Menge an PCR-Produkten mittels Fluoreszenz bestimmbar. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals war proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts. Für die Auswertung der Daten wurde die sogenannte relative Quantifizierung angewandt, bei der die Mengen zweier Target-Sequenzen in einer einzigen Probe miteinander verglichen werden. TRH und c-Fos waren im Rahmen dieser Arbeit die sog. Zielgene, als Referenzgen (Housekeeping-Gen) wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. Bei  $\beta$ -Aktin handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Protein, welches nicht durch Stimulation der Zellen mit Liganden reguliert wird. Zur Berechnung der Genexpression des Zielgens auf mRNA-Ebene wurde die  $\Delta\Delta C_p$ -Methode angewandt. Dabei wurde vom  $C_p$ -Wert des Zielgens der  $C_p$ -Wert des zugehörigen  $\beta$ -Aktins abgezogen. Im Anschluss wurde dieser  $\Delta C_p$ -Wert von nicht stimulierten Zellen (entspricht der basalen Expression des Zielgens) vom  $\Delta C_p$ -Wert der stimulierten Zellen subtrahiert. Der  $\Delta\Delta C_p$ -Wert wurde als Exponent von 0,5 eingesetzt. Das Ergebnis stellte die Genexpression auf mRNA-Ebene im relativen Vergleich zur basalen Genexpression dar, ein Ergebnis von 1 bedeutete eine unveränderte Genexpression.

$$\text{mRNA-Expression} = 0,5^{(C_p\text{Zielgen} - C_p\beta\text{-Aktin})_{\text{stimuliert}} - (C_p\text{Zielgen} - C_p\beta\text{-Aktin})_{\text{basal}}}$$

Geeignete Primer für die qPCR wurden mit Hilfe des ‚Universal Probe Library Assay Design Centers‘ der Firma Roche konstruiert. Mit Hilfe dieser Internetanwendung wurden Intronumfassende (*intron spanning*) Primer generiert, wodurch verhindert wurde, dass durch eine mögliche Kontamination der Probe mit genomischer DNA diese und nicht die revers transkribierte cDNA amplifiziert wurde. Die Synthese eines Amplifikats mit einem kompletten Intron ist aufgrund der sehr kurzen Elongationszeit nicht möglich. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden für die Analyse muriner cDNA entworfen. Als Negativkontrolle wurde für jeden Primer in jedem Experiment eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Primerpaare für die quantitative Echtzeit-PCR

Zielgen	Accession-Nummer	Vorwärtsprimer (F)	Rückwärtsprimer (R)
β-Aktin	NM_007393.5	ggctcctagcaccatgaaga	atctgctggaaggtggacag
c-Fos	NM_010234.2	gggacagcctttcctactacc	gatctgcgcaaagtcctgt
TRH	NM_009426.3	tcgagagtctccaccttgc	ggggataccagtttagcacga

Ein Nachteil bei der Verwendung von SYBR Green I ist die geringe Spezifität des Farbstoffes. Der Farbstoff interkaliert neben der doppelsträngigen DNA auch mit unspezifischen PCR-Produkten oder Primerdimeren. Deshalb wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, wodurch die Spezifität der Amplifikate bestimmt werden kann. Bei der Erstellung der Schmelzkurve wird bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung die Temperatur der Proben langsam von 60 °C auf 95 °C erhöht, bis bei der Schmelztemperatur das doppelsträngige PCR-Produkt wieder in zwei DNA-Einzelstränge aufgetrennt wird. Die Schmelztemperatur ist für jedes Amplifikat spezifisch und charakteristisch. Durch die Auftrennung des DNA-Doppelstrangs wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzänderung detektiert. Die Schmelztemperatur spezifischer PCR-Produkte liegt deutlich oberhalb der Schmelztemperatur unspezifischer Nebenprodukte, wie z. B. kurzer Primerdimere und kann dadurch unterschieden werden. Vor der Auswertung der Cp-Werte wurde in dieser Arbeit nach jeder qPCR eine Analyse der Schmelzkurven durchgeführt.

Die nach der reversen Transkription entstandenen cDNA-Lösungen wurden für die qPCR 1:1000 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt (Kapitel 4.2.3.6.2). Pro qPCR-Ansatz wurden 8 µl der verdünnten cDNA, 10 µl 2-fach konzentrierter SYBR Green I-Mastermix und 2 µl einer 10 µM Lösung beider Primer auf Eis in spezielle qPCR-96-well Mikrotiterplatten pipettiert. Der SYBR Green I-Mastermix enthält neben SYBR Green I auch die DNA-Polymerase, Nukleotide und einen geeigneten Puffer. Das verwendete Thermocycler-Protokoll setzte sich wie folgt zusammen:

95 °C	15 Minuten	X 55
95 °C	10 Sekunden	
55 °C	10 Sekunden	
72 °C	10 Sekunden	
60–95 °C	kontinuierlich	

Für die Auswertung der qPCR-Daten nach der bereits beschriebenen  $\Delta\Delta C_p$ -Methode wurden die  $\alpha$ -MSH-induzierten Effekte in Relation zum korrespondierenden Basalwert gesetzt, wobei der Basalwert als 1 definiert wurde. Der korrespondierende Basalwert war entweder die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % oder 0,2 % DMSO) oder der verwendete Inhibitor alleine (KT5720 oder ESI-09).

### 4.2.4 Statistische Methoden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden alle Experimente mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die genaue Anzahl unabhängiger Versuche ist der jeweiligen Abbildungsbeschriftung zu entnehmen. Wenn innerhalb eines Versuches Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, so wurde der Mittelwert verwendet. Zusätzlich zum Mittelwert der Mehrfachbestimmung wurde auch der Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.) als Streuungsmaß angegeben und in geeigneter Weise dargestellt. Je nach Experimentaufbau und Fokus wurden verschiedene statistische Hypothesentests mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 6.0 durchgeführt. Für die Interpretation wurden drei Signifikanzniveaus verwendet und in geeigneter Weise dargestellt, wie z. B.: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten zweier Versuchsgruppen bzw. Bedingungen, wurde ein ungepaarter, zweiseitiger *Student's t-test* durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Bedingungen gegen eine Kontrollgruppe wurde zuerst eine einfaktorische Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) durchgeführt, anschließend ein Post-hoc-Test nach Dunnett. Zur Überprüfung, ob sich die prozentuale Inhibition oder Phosphorylierung von einem bestimmten Wert unterschied (z. B. von 0, 1 oder 100), wurde der Einstichproben-t-Test angewandt. Die Nullhypothese des Einstichproben-t-Tests besagt, dass es zwischen der zu testenden Gruppe und dem festgelegten, hypothetischen Wert keinen Unterschied gibt. Dieser statistische Test ist sinnvoll, wenn die basale Bedingung eines Versuchs z. B. auf 100 % normiert wird und stimulierte Bedingungen damit verglichen werden sollen. Die Daten der CRE-Reportermessungen (Kapitel 4.2.3.4) wurden vor ihrer Normierung auf Signifikanz geprüft.

## 5 Ergebnisse

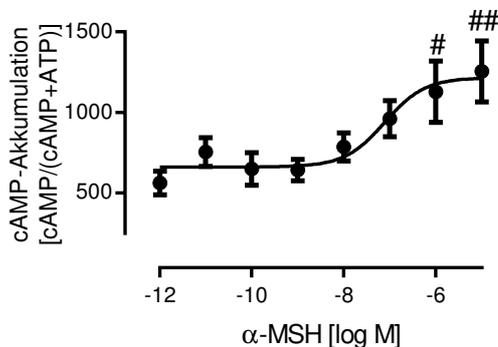
### 5.1 Charakterisierung einer hypothalamischen Zelllinie

Ein geeignetes Zellmodell bietet die Möglichkeit zu untersuchen, welche Hormone im PVN des Hypothalamus den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren und CRE aktivieren können. Somit kann sowohl die Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung unterschiedlicher Hormone untersucht werden als auch eine detaillierte Analyse der  $\alpha$ -MSH-induzierten Signalkaskade erfolgen. Deshalb wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst die hypothalamischen mHypoA-2/10-Zellen stabil mit einem 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukt transfiziert und selektioniert. Das Konstrukt wurde dauerhaft in das Genom der Zellen integriert. Anschließend wurde anhand charakteristischer Eigenschaften von PVN-Neuronen überprüft, ob es sich bei den mHypoA-2/10-CRE-Zellen um ein adäquates Zellsystem handelt.

#### 5.1.1 Funktioneller Nachweis des MCR und des YR

PVN-Neuronen zeichnen sich durch den Besitz von MCR sowie YR aus, womit sie Signale der POMC/CART- und NPY/AgRP-Neuronen des ARC verarbeiten können (GERALD *et al.* 1996; KIM *et al.* 2000; SHUKLA *et al.* 2012). Zunächst stellte sich die Frage, ob diese Rezeptoren in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen endogen exprimiert werden. Hierfür wurde die cAMP-Akkumulation nach Stimulation der Zellen mit  $\alpha$ -MSH oder NPY analysiert. Beim Vorhandensein von  $G_s$ -gekoppelten MCR würde man eine Zunahme der cAMP-Akkumulation nach Stimulation der Zellen mit  $\alpha$ -MSH erwarten. Durch die Stimulation  $G_{i/o}$ -gekoppelter YR mit NPY würde man eine Abnahme der cAMP-Akkumulation feststellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen  $\alpha$ -MSH (von 1 pM bis 10  $\mu$ M) stimuliert; anschließend wurde die cAMP-Akkumulation bestimmt. In Abbildung 5.1 ist die  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation als Quotient ( $cAMP/(cAMP+ATP)$ ) in Abhängigkeit von der Konzentration dargestellt. Die cAMP-Akkumulation der mit 1 oder 10  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimulierten Zellen unterschied sich signifikant von der cAMP-Akkumulation, welche von 1 pM  $\alpha$ -MSH induziert wurde. Der berechnete  $EC_{50}$  Wert, d. h. die Konzentration von  $\alpha$ -MSH mit halbmaximaler cAMP-Akkumulation, lag in mHypoA-2/10-CRE-Zellen bei  $77,9 \pm 31,7$

nM. Der  $EC_{50}$  für  $\alpha$ -MSH auf cAMP-Ebene lag bei einer höheren Konzentration als in vergleichbaren Zellsystemen (DAMM *et al.* 2012).

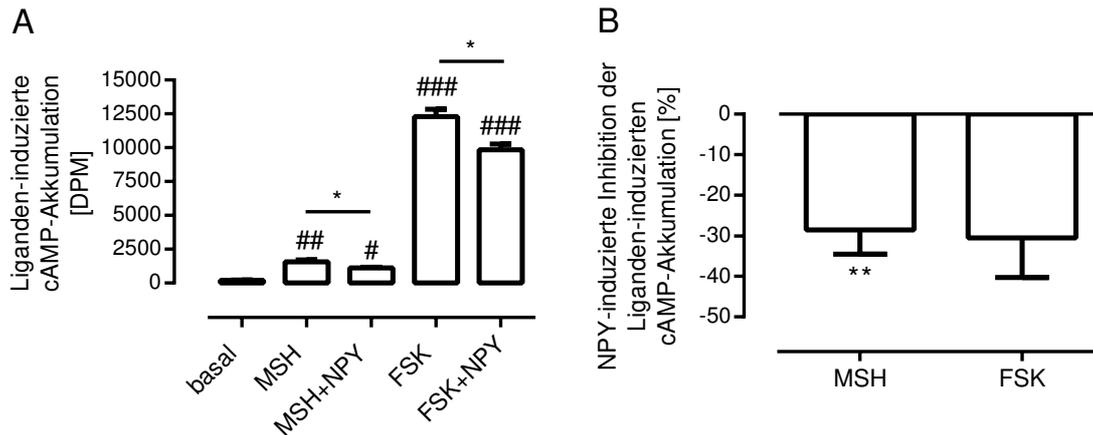


**Abbildung 5.1:  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen  $\alpha$ -MSH (1 pM bis 10  $\mu$ M) stimuliert. Der  $EC_{50}$  Wert für  $\alpha$ -MSH auf cAMP-Ebene lag bei  $77,9 \pm 31,7$  nM. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Im Gegensatz zu den  $G_s$ -gekoppelten Rezeptoren wird durch die Stimulation  $G_{i/o}$ -gekoppelter Rezeptoren, wie die YR, die Stimulation der AC und in Folge dessen auch die cAMP-Akkumulation inhibiert (WETTSCHURECK UND OFFERMANN 2005). Neben der Untersuchung, ob NPY die FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation inhibiert, stellte sich auch die Frage, ob NPY als funktioneller Gegenspieler zu  $\alpha$ -MSH im PVN einen direkten Effekt auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte cAMP-Akkumulation hat (COWLEY *et al.* 1999). Abbildung 5.2A zeigt ein Beispiel eines Experiments, wobei die basale sowie die Liganden-induzierte cAMP-Akkumulation durch  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH und NPY, FSK oder FSK und NPY bestimmt wurde. Der AC-Aktivator FSK diente dabei als Positivkontrolle. Die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation ließ sich signifikant durch die Anwesenheit von NPY inhibieren. Wie auch schon in Abbildung 5.1 dargestellt, führte die Stimulation von mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit  $\alpha$ -MSH zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Akkumulation. Durch die Stimulation in Gegenwart von NPY konnte das Signal signifikant unterdrückt werden. Die durch  $\alpha$ -MSH gebildete cAMP-Menge war im Vergleich zur FSK-induzierten cAMP-Akkumulation deutlich geringer, was im Falle eines endogen exprimierten Rezeptors auch so zu erwarten war. In Abbildung 5.2B ist dargestellt, um wie viel Prozent das  $\alpha$ -MSH- oder FSK-vermittelte

cAMP-Signal durch NPY inhibiert wurde. NPY inhibierte die  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation signifikant um  $29 \pm 6 \%$  und die FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation um  $31 \pm 10 \%$ . Die endogene Expression von MCR und YR in mHypoA-2/10-CRE-Zellen (Abbildung 5.1 und Abbildung 5.2) schuf gute Voraussetzungen, um diese Zelllinie als Zellmodell für PVN-Neurone nutzen zu können.

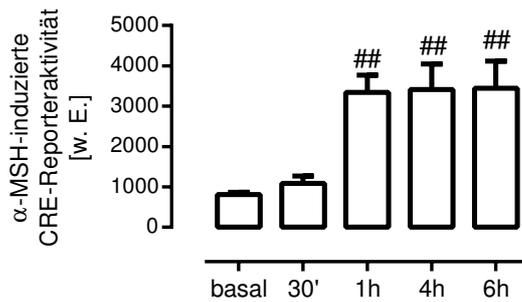


**Abbildung 5.2: Inhibitorischer Effekt von NPY auf die  $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation**

(A) Repräsentatives Beispiel für den Effekt von 100 nM NPY auf die durch 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH- und 10  $\mu$ M FSK-induzierte cAMP-Akkumulation. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

(B) Prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelten cAMP-Akkumulation in Anwesenheit von NPY. Das durch  $\alpha$ -MSH- oder FSK-induzierte cAMP-Signal wurde als 100 % definiert. Das Signal in Anwesenheit von NPY wurde dazu ins prozentuale Verhältnis gesetzt und von 100 subtrahiert. Es wurde die Inhibition der Liganden-induzierten cAMP-Akkumulation durch NPY aus acht ( $\alpha$ -MSH) und vier (FSK) unabhängigen Versuchen in % dargestellt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Zur Untersuchung, ob in mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine CRE-Reporteraktivität durch  $\alpha$ -MSH induziert werden kann und wie lange die Zellen dafür stimuliert werden müssen, wurde eine Kinetik erstellt. Hierfür wurden die Zellen für 30 min, 1 h, 4 h und 6 h mit  $\alpha$ -MSH stimuliert (Abbildung 5.3). Die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität unterschied sich nach 1 h, 4 h und 6 h signifikant von der basalen CRE-Aktivität der mHypoA-2/10-CRE-Zellen. Eine Stimulationszeit von 30 min war nicht ausreichend, um eine CRE-Reporteraktivierung zu bewirken. Für alle weiteren Versuche wurde eine Stimulationszeit von 4 h gewählt, da eine längere Stimulation nicht zu einer Erhöhung des Signals führte.

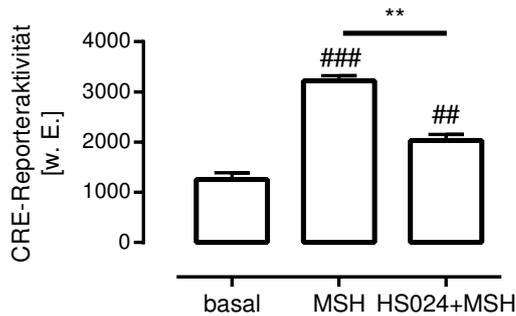


**Abbildung 5.3: Kinetik der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung in mHypocA-2/10-CRE-Zellen**

mHypocA-2/10-CRE-Zellen wurden für 30', 1 h, 4 h und 6 h mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. der CRE-Reporteraktivität aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Für die weitere Charakterisierung der mHypocA-2/10-CRE-Zellen war es von Interesse zu analysieren, ob das Signal MCR-spezifisch ist und welcher MCR-Subtyp endogen exprimiert wird.

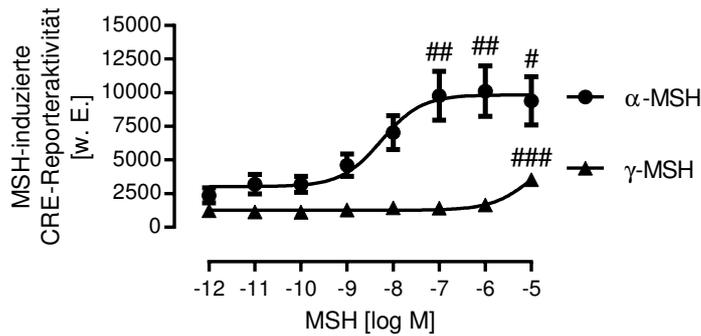
Durch die Verwendung von HS024 konnte der Nachweis erfolgen, dass es sich bei dem gemessenen CRE-Reportersignal aus Abbildung 5.3 um ein MCR-vermitteltes Signal handelt. Bei HS024 handelt es sich um einen MC4R-Antagonisten. Durch die Verwendung von 1  $\mu$ M HS024 war zu erwarten, dass alle MC1R, MC3R, MC4R und MC5R blockiert wurden, da der  $K_i$  für HS024 für diese Subtypen im Bereich zwischen 0,29 nM (MC4R) bis 18,6 nM (MC1R) liegt (KASK *et al.* 1998). Im PVN wurden jedoch nur MC3R und MC4R erwartet (KIM *et al.* 2000; WISSE UND SCHWARTZ 2001; SHUKLA *et al.* 2012). Für den Nachweis von MCR wurden mHypocA-2/10-CRE-Zellen mit 100 nM  $\alpha$ -MSH oder 100 nM  $\alpha$ -MSH in Gegenwart von 1  $\mu$ M HS024 stimuliert (Abbildung 5.4). In stimulierten Zellen war die CRE-Reporteraktivierung gegenüber der Ausgangssituation signifikant erhöht. In Anwesenheit von HS024 war die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Aktivität weniger stark erhöht und konnte als Bestätigung für das Vorhandensein von MCR angesehen werden.



**Abbildung 5.4:  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivität in Abhängigkeit des MC4R-Antagonisten HS024**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für 4 h mit 100 nM  $\alpha$ -MSH oder 100 nM  $\alpha$ -MSH und 1  $\mu$ M HS024 stimuliert. Es sind die Mittelwerte + S.E.M aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

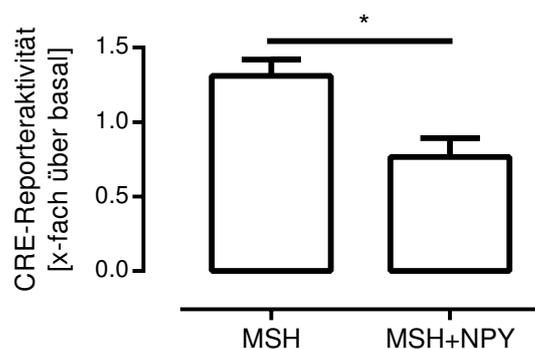
Da sowohl der MC3R als auch der MC4R im Hypothalamus exprimiert werden, wobei dem MC4R bei der Appetitregulation eine zentrale Bedeutung zugesprochen wird, bestand Interesse daran, den MCR-Subtyp zu bestimmen (KIM *et al.* 2000; WISSE UND SCHWARTZ 2001; SHUKLA *et al.* 2012). Diese Unterscheidung ist durch  $\alpha$ -MSH nicht möglich, da es sich um einen Agonisten für den MC3R und den MC4R handelt. Um zwischen dem MC3R und dem MC4R differenzieren zu können, bot sich die Stimulation der Zellen mit  $\gamma$ -MSH an.  $\gamma$ -MSH ist ein selektiver MC3R-Agonist, dessen  $EC_{50}$  Wert für den MC4R 50-fach höher ist als für den MC3R (MACNEIL *et al.* 2002). Daher wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für  $\alpha$ -MSH und  $\gamma$ -MSH erstellt (Abbildung 5.5). Für  $\alpha$ -MSH sah man einen deutlichen konzentrationsabhängigen Anstieg der CRE-Reporteraktivität, wobei der ermittelte  $EC_{50}$  Wert von  $5,6 \pm 1,4$  nM mit den in der Literatur beschriebenen Werten übereinstimmte (OOSTEROM *et al.* 1999; DAMM *et al.* 2012). Der  $EC_{50}$  Wert von  $\gamma$ -MSH lag für die CRE-Reporteraktivität bei  $10,5 \pm 8,8$   $\mu$ M. Da der  $EC_{50}$  Wert von  $\gamma$ -MSH für den MC3R laut Literatur bei etwa 6 nM liegt und für die mHypoA-2/10-CRE-Zellen deutlich höher war, konnte man davon ausgehen, dass das in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen gemessene CRE-Signal durch den MC4R vermittelt wurde (MACNEIL *et al.* 2002). Ab einer Konzentration von 100 nM  $\alpha$ -MSH und höher war eine signifikante Zunahme gegenüber der basalen CRE-Aktivität festzustellen.



**Abbildung 5.5: KWK der CRE-Reporteraktivität von  $\alpha$ -MSH und  $\gamma$ -MSH in mHypA-2/10-CRE-Zellen**

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1 pM bis 10  $\mu$ M)  $\alpha$ -MSH oder  $\gamma$ -MSH stimuliert. Die CRE-Reporteraktivität wurde in Abhängigkeit der Melanocortinkonzentration als Logarithmus aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus elf ( $\alpha$ -MSH) und drei ( $\gamma$ -MSH) unabhängigen Experimenten. Für  $\alpha$ -MSH wurde ein  $EC_{50}$  Wert von 5,6 nM  $\pm$  1,4 ermittelt, für  $\gamma$ -MSH von 10,5  $\mu$ M  $\pm$  8,8. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur niedrigsten Konzentration wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Die Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten cAMP-Akkumulation durch NPY wurde bereits in Abbildung 5.2 gezeigt. Um zu überprüfen, ob sich dieser antagonistische Effekt von NPY auf  $\alpha$ -MSH auch auf die Ebene der CRE-Reporteraktivierung übertragen lässt, wurden mHypA-2/10-CRE-Zellen mit NPY vorinkubiert und anschließend mit  $\alpha$ -MSH in Gegenwart von NPY stimuliert (Abbildung 5.6). Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivität wurde durch NPY signifikant inhibiert.



**Abbildung 5.6: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivität durch NPY**

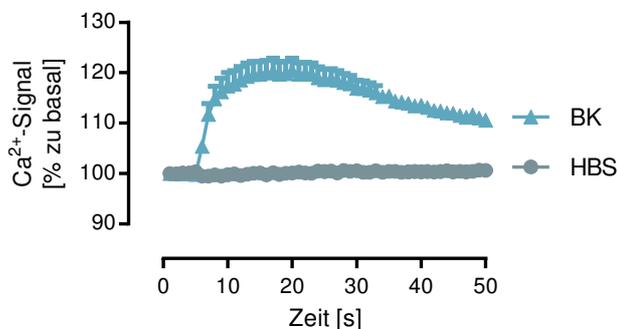
mHypA-2/10-CRE-Zellen wurden für 10 min mit 100 nM NPY vorinkubiert und anschließend für 4 h mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH in Gegenwart von NPY stimuliert. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten normiert und dargestellt als x-fach  $\pm$  S.E.M über der basalen Aktivität. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

### 5.1.2 Funktioneller Nachweis des BR

Zur Untersuchung der Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Reporteraktivierung im Rahmen dieser Arbeit wurden neben  $\alpha$ -MSH auch weitere potentielle

Hormone und Neurotransmitter in Betracht gezogen. Ausgewählt wurden die GPCR-Liganden BK und 5-HT, da ihnen neben der möglichen Modulation von CREB auch Rollen bei der Appetitregulation zugewiesen wurden (JOHANNESSEN *et al.* 2004; QADRI *et al.* 2004; YADAV *et al.* 2009).

Für den Expressionsnachweis des B2R in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurde der für BK charakteristische  $G_q$ -gekoppelte Signalweg, durch die Messung von  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen genauer untersucht (LEEB-LUNDBERG *et al.* 2005). Zellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM markiert, der als  $Ca^{2+}$ -Sensor fungiert. Abbildung 5.7 zeigt die BK-vermittelte Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Signals im Vergleich zur Pufferkontrolle HBS in Abhängigkeit zur Messzeit. Die Injektion der Ligandenlösung bzw. des HBS-Puffers erfolgte nach 5 s automatisch. Die Injektion des HBS-Puffers hatte keinen Effekt auf das  $Ca^{2+}$ -Signal in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen, im Vergleich dazu war nach der Injektion von BK eine deutliche Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Signals zu sehen. Dies lag in seinem Maximum etwa 20 % oberhalb der Pufferkontrolle und fiel im Laufe der Messung wieder langsam ab.



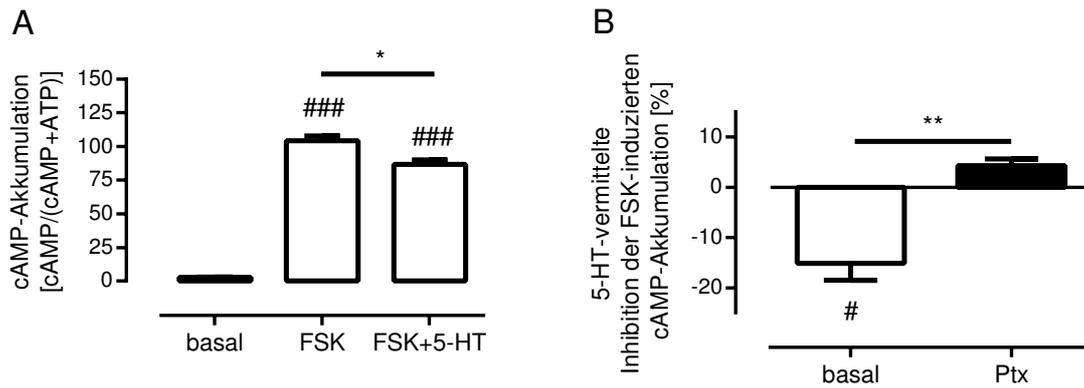
**Abbildung 5.7: BK-vermittelter Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**  
mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit HBS-Puffer oder 1  $\mu$ M BK stimuliert. Dargestellt ist das  $Ca^{2+}$ -Signal  $\pm$  S.E.M. in Prozent zu basal von vier unabhängigen Experimenten. Der Startpunkt der Messung wurde als 100 % definiert.

### 5.1.3 Funktioneller Nachweis des 5-HTR

Schon lange ist ein Augenmerk auf 5-HTR und die damit verbundenen Signalwege zur Entwicklung von Medikamenten gegen Adipositas gerichtet worden. Da bereits bekannt war, dass 5-HT über verschiedene 5-HTR CREB modulieren kann, wurde analysiert, ob 5-HT einen Einfluss auf CREB-abhängige Signalwege im PVN hat und wie diese gegebenenfalls reguliert werden (LUCAS *et al.* 2010; OURY *et al.* 2010; ISHIZUKA *et al.* 2014). Zunächst wurde

untersucht, ob 5-HTR in mHypA-2/10-CRE-Zellen endogen exprimiert werden. Besonders 5-HT<sub>2C</sub>R würden im PVN erwartet werden, da 5-HT-produzierende Neurone der Raphe-Kerne in verschiedene Regionen des Hypothalamus projizieren, darunter auch in den ARC und PVN (CURRIE *et al.* 2002; SOHN *et al.* 2011; DOSLIKOVA *et al.* 2013). Bislang war aber noch kein PVN-Neuronen-ähnliches Zellsystem mit endogener Expression von 5-HT<sub>2C</sub>R beschrieben.

Unter der 5-HTR-Familie gibt es sowohl Rezeptoren, die an G<sub>s</sub>-, G<sub>i/o</sub>- als auch G<sub>q</sub>-Proteine binden (LAM *et al.* 2010). Da der anorexigene Effekt von 5-HT, der verfügbaren Literatur zufolge, hauptsächlich dem 5-HT<sub>1B</sub>R, der zu den G<sub>i/o</sub>-gekoppelten Rezeptoren gehört, und dem 5-HT<sub>2C</sub>R, der G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelt ist, zuzuordnen ist, standen diese beiden Signalwege im Fokus (CURRIE *et al.* 2002; SOHN *et al.* 2011; DOSLIKOVA *et al.* 2013; BURKE *et al.* 2014). Durch die Bestimmung der 5-HT-vermittelten cAMP-Akkumulation wurde untersucht, ob 5-HT<sub>1</sub>R in den mHypA-2/10-CRE-Zellen exprimiert wurden. In Abbildung 5.8A ist ein exemplarisches Experiment dargestellt. Mit FSK-stimulierte Zellen und Zellen, die mit 5-HT in Gegenwart von FSK stimuliert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte cAMP-Akkumulation im Vergleich zur basalen cAMP-Akkumulation. Durch die Stimulation mit 5-HT wurde die FSK-induzierte cAMP-Akkumulation signifikant inhibiert. In weiteren Experimenten wurden die Zellen über Nacht mit dem G<sub>i/o</sub>-Protein-Inhibitor Pertussis-Toxin (Ptx) inkubiert und anschließend, wie zuvor mit FSK oder mit 5-HT, in Gegenwart von FSK stimuliert. In Abbildung 5.8B ist die 5-HT-vermittelte Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation in % dargestellt. In Zellen, welche nicht mit Ptx behandelt wurden, führte die Stimulation mit 5-HT in Gegenwart von FSK zu einer Abnahme der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation von durchschnittlich  $15 \pm 3$  %, während in mit Ptx behandelten Zellen das FSK-vermittelte cAMP-Signal nicht inhibiert wurde. Die Daten, der in Abbildung 5.8 dargestellten Experimente, sprachen dafür, dass in den mHypA-2/10-CRE-Zellen G<sub>i/o</sub>-gekoppelte 5-HTR exprimiert werden, wobei es sich um Subtypen der Klasse 5-HT<sub>1</sub>R handeln könnte (LAM *et al.* 2010).



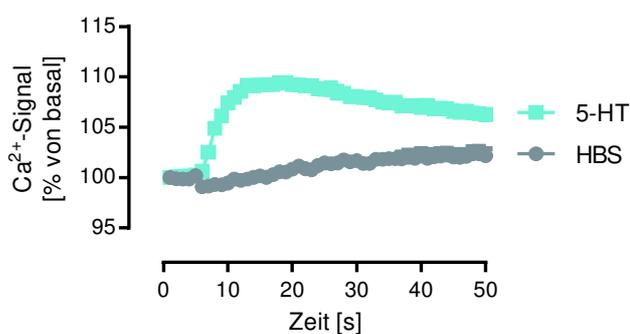
**Abbildung 5.8: Nachweis  $G_{i/o}$ -gekoppelter 5-HTR**

(A) mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  FSK oder 10  $\mu\text{M}$  FSK und 1  $\mu\text{M}$  5-HT inkubiert. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte + S.E.M. eines repräsentativen Beispiels eines Experiments.

(B) mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden gleichzeitig mit der radioaktiven Markierung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Pertussis-Toxin (Ptx) über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition + S.E.M. der FSK-vermittelten cAMP-Akkumulation durch 5-HT aus drei unabhängigen Experimenten.

Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

Für den Expressionsnachweis von  $G_q$ - und  $G_{i/o}$ -gekoppelten 5-HTR wurde die 5-HT-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Zellen mittels Fura-2-AM bestimmt (Abbildung 5.9). Die Stimulation der Zellen mit 5-HT führte zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von etwa 10 % im Vergleich zu der HBS-Kontrolle.

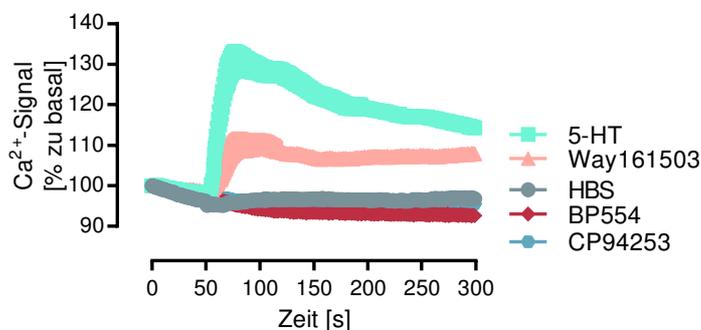


**Abbildung 5.9: 5-HT-vermittelter Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit HBS-Puffer oder 1  $\mu\text{M}$  5-HT stimuliert. Dargestellt ist das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal  $\pm$  S.E.M. in Prozent von basal aus sieben unabhängigen Experimenten. Der Startpunkt der Messung wurde als 100 % definiert.

Für weitere Untersuchungen wurde die Methode ‚ $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging‘ herangezogen. Diese Methode ist sensitiver und eignet sich besser für geringere Signalstärken. Mit Hilfe der Einzelmessung im  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging wurde studiert, ob man die Signalintensität erhöhen kann und

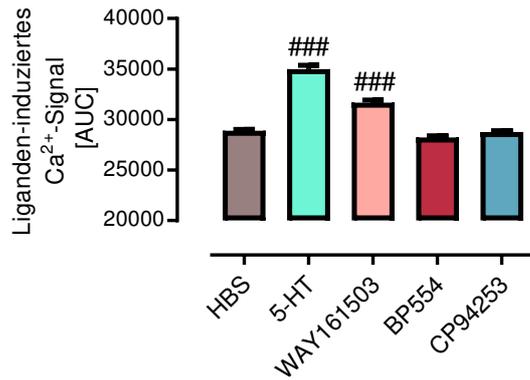
durch die Verwendung von selektiven 5-HT<sub>2C</sub>R-Agonisten den Rezeptorsubtyp charakterisieren kann. Der Fokus lag dabei auf dem 5-HT<sub>2C</sub>R, dem eine Rolle bei der Energiehomöostase und der Appetitregulation zugesprochen wurde (KITCHENER UND DOURISH 1994; TECOTT *et al.* 1995; KENNETT *et al.* 1997; NONOGAKI *et al.* 1998). Deswegen wurden Zellen neben 5-HT auch mit WAY161503 (5-HT<sub>2C</sub>R-Agonist), CP94253 (5-HT<sub>1B</sub>R-Agonist) und BP554 (5-HT<sub>1A</sub>R-Agonist) stimuliert (Abbildung 5.10). Durch die Stimulation der Zellen mit 5-HT wurde das Ca<sup>2+</sup>-Signal um bis zu 30 % gegenüber der HBS-Kontrolle erhöht. Diese Ergebnisse bestätigten, dass mHypoA-2/10-CRE-Zellen endogen 5-HT<sub>2C</sub>R exprimieren (Abbildung 5.9). Neben 5-HT führte auch die Stimulation der Zellen mit WAY161503 zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Im Vergleich zur 5-HT-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation wurde durch WAY161503 eine Erhöhung des Signals um bis zu 10 % gegenüber der Kontrolle erreicht. Die Stimulationen der Zellen mit den beiden selektiven Agonisten des 5-HT<sub>1B</sub>R (CP94253) und des 5-HT<sub>1A</sub>R (BP554) trugen nicht zu einer Erhöhung der Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei.



**Abbildung 5.10: Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch 5-HT und weitere selektive 5-HT<sub>2C</sub>R-Agonisten**

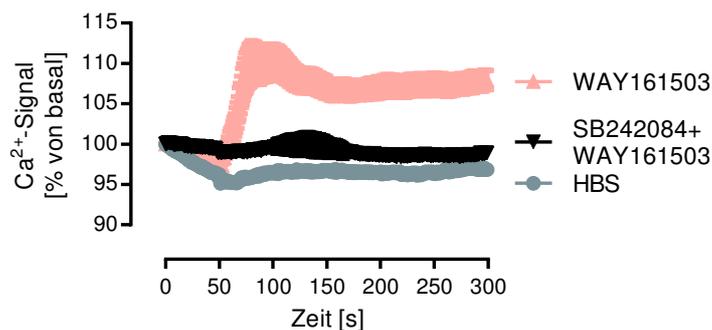
Es wurden HBS-Puffer, 1  $\mu$ M 5-HT, 100 nM WAY161503, 100 nM CP94253 oder 100 nM BP554 injiziert. Der Startpunkt jeder Messung wurde als 100 % definiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aller gemessener Zellen (HBS: 128, 5-HT: 177, WAY161503: 126, CP94253: 42, BP554: 119).

Die Daten der Kurven aus Abbildung 5.10 wurden durch die Berechnung der *area under the curve* (AUC) für jede gemessene Zelle analysiert und in Abbildung 5.11 dargestellt. Die berechneten AUCs des 5-HT- sowie des WAY161503-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Signals unterschieden sich signifikant von der AUC der HBS-Kontrolle, während die AUCs von BP554 sowie CP94253 keine Erhöhung aufwiesen.



**Abbildung 5.11: Quantifizierung der Liganden-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Signale von 5-HT und selektiven 5-HTR-Agonisten**  
Es wurden die AUCs + S.E.M. der Einzelzellmessungen, welche als Mittelwerte + S.E.M. in Abbildung 5.10 gezeigt sind, berechnet und als Balkendiagramm dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Um die Spezifität der WAY161503-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation nachzuweisen, wurde der 5-HT<sub>2C</sub>R-Antagonist SB242084 verwendet (Abbildung 5.12). Dieser Antagonist ist spezifisch für den 5-HT<sub>2C</sub>R und weist eine 100- bzw. 158-fach schwächere Affinität für den 5-HT<sub>2B</sub>R bzw. den 5-HT<sub>2A</sub>R auf (KENNETT *et al.* 1997). mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für diese Experimente mit SB242084 vorinkubiert, bevor WAY161503 injiziert wurde. Die Erhöhung des WAY161503-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Signals ließ sich durch die Vorinkubation der Zellen mit SB242084 deutlich inhibieren.



**Abbildung 5.12: Inhibition des WAY161503-vermittelten Ca<sup>2+</sup>-Signals durch den 5-HT<sub>2C</sub>R-Antagonisten SB242084**  
Zellen wurden mit 100 nM SB242084 für 5 min vorinkubiert, bevor 100 nM WAY161503 injiziert wurde. Außerdem wurden Zellen mit HBS oder WAY161503 ohne Vorstimulation stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelzellmessungen ± S.E.M., normiert auf 100 % (HBS: 128, WAY161503: 126, SB242084+WAY161503: 48).

In Tabelle 5.1 sind die Anzahl gemessener Zellen pro Agonist, die berechnete AUC ± S.E.M. und die auf die HBS-Kontrolle normierten AUC in % zusammengefasst. Die Zahlen ver-

deutlichen, dass sowohl 5-HT als auch WAY161503 die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in den Zellen erhöhten, während CP94253 und BP554 keinen Effekt hatten. Die Vorinkubation der Zellen mit SB242084 resultierte in einer Inhibition des WAY161503-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von ungefähr 73 %. Aufgrund dieser Daten konnte man davon ausgehen, dass die mHypoA-2/10-CRE-Zellen  $G_q$ -gekoppelte 5-HTR exprimierten, wobei es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um den 5-HT<sub>2C</sub>R handelte. Damit sind die mHypoA-2/10-CRE-Zellen die erste beschriebene neuronale Zelllinie, die endogen den 5-HT<sub>2C</sub>R exprimiert (LAUFFER *et al.* 2016).

**Tabelle 5.1: Liganden-induzierte Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration**

Dargestellt sind die Anzahl gemessener Zellen pro Versuchsbedingung, die berechneten AUC (für jede Einzelzellmessung)  $\pm$  S.E.M. der Abbildung 5.10 bis Abbildung 5.12 und die Normierung der AUC auf die HBS-Kontrolle. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Stimulus	Zellen (Anzahl)	AUC ( $\pm$ S.E.M.)	AUC (% zu HBS)
HBS	128	28904 $\pm$ 112	100
Sero	177	34992 $\pm$ 376***	121
WAY161503	126	31656 $\pm$ 261***	110
BP554	119	28261 $\pm$ 142	98
CP94253	42	28774 $\pm$ 132	100
SB242084+WAY161503	48	29649 $\pm$ 157	103

## 5.2 Liganden-induzierte CREB-Phosphorylierung

Ein Ziel dieser Arbeit, neben der Charakterisierung der mHypoA-2/10-CRE-Zellen als geeignetes Modell für die Untersuchung von Signalkaskaden im PVN, bestand darin, die Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivierung anhand unterschiedlicher Hormone zu analysieren. Mittels eines phospho-spezifischen Antikörpers gegen pCREB<sup>Ser133</sup> wurde die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB am Serin 133 untersucht, wobei es sich um die bekannteste Modifikation von CREB handelt und diese für eine Aktivierung von CREB verantwortlich gemacht wurde (JOHANNESSEN *et al.* 2004). Die Erstellung einer Kinetik für unterschiedliche Liganden in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Liganden in PVN-Neuronen-ähnlichen Zellen eine CREB-Phosphorylierung induzieren.

Für die Untersuchung der Kinetik wurden die Zellen für 0, 2,5, 5, 10, 20 und 30 min mit einem der folgenden Liganden stimuliert:  $\alpha$ -MSH, BK, 5-HT, EGF, IGF oder NGF

(Abbildung 5.13A–F). Es ist für jeden Liganden ein Beispiel eines Western Blots mit Ladekontrolle gezeigt, unterhalb davon ist die Quantifizierung aller Western Blots mit diesem Liganden zu sehen. Der Phosphorylierungsstatus ist als Quotient des Immunoblotsignals von pCREB und dem Signal der jeweiligen Ladekontrolle dargestellt. Die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung erfolgte ab einer Stimulationszeit von 2,5 min und nahm nach 20 min Stimulationszeit langsam ab (Abbildung 5.13A). Die maximale Phosphorylierung gegenüber nativen Zellen (Quotient pCREB/Tubulin von  $0,8 \pm 0,1$ ) war nach einer Stimulationszeit von 10 min (Quotient pCREB/Tubulin von  $1,3 \pm 0,1$ ) erreicht. Die Stimulation der Zellen mit BK zeigte eine ähnliche Kinetik (Abbildung 5.13B). Die CREB-Phosphorylierung erfolgte bereits nach 2,5 min und wurde nach 20 min Stimulationszeit schwächer. Der Phosphorylierungsstatus war nach 10 min Stimulationszeit ( $1,1 \pm 0,1$ ) gegenüber dem Basalwert ( $0,3 \pm 0,1$ ) maximal erhöht. Neben  $\alpha$ -MSH und BK wurde auch eine signifikante CREB-Phosphorylierung gezeigt, welche durch 5-HT induziert wurde (Abbildung 5.13C). Die Phosphorylierung erfolgte schneller und nahm bereits nach 10 min Stimulationszeit deutlich ab. Nach 5 min Stimulation ( $1,6 \pm 0,4$ ) mit 5-HT war die CREB-Phosphorylierung im Vergleich zu nativen Bedingungen ( $0,4 \pm 0,1$ ) signifikant erhöht. Auch die drei verwendeten Wachstumsfaktoren EGF, IGF und NGF induzierten eine Phosphorylierung von CREB am Serin 133 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen (Abbildung 5.13D–F). Die Stimulation der Zellen mit EGF führte zu einer maximalen Phosphorylierung von CREB nach 5 min (von  $0,3 \pm 0,1$  auf  $1,4 \pm 0,3$ ), welche bei längerer Stimulation langsam abfiel (Abbildung 5.13D). Mit IGF stimulierte Zellen erreichten nach 10 min Stimulation ( $1,3 \pm 0,1$ ) die maximale CREB-Phosphorylierung, verglichen mit unbehandelten Zellen ( $0,4 \pm 0,1$ ) (Abbildung 5.13E). Durch die Stimulation mit NGF war der native Phosphorylierungsstatus von CREB ( $0,4 \pm 0,1$ ) nach 5 min maximal erhöht ( $1,3 \pm 0,1$ ) (Abbildung 5.13F).

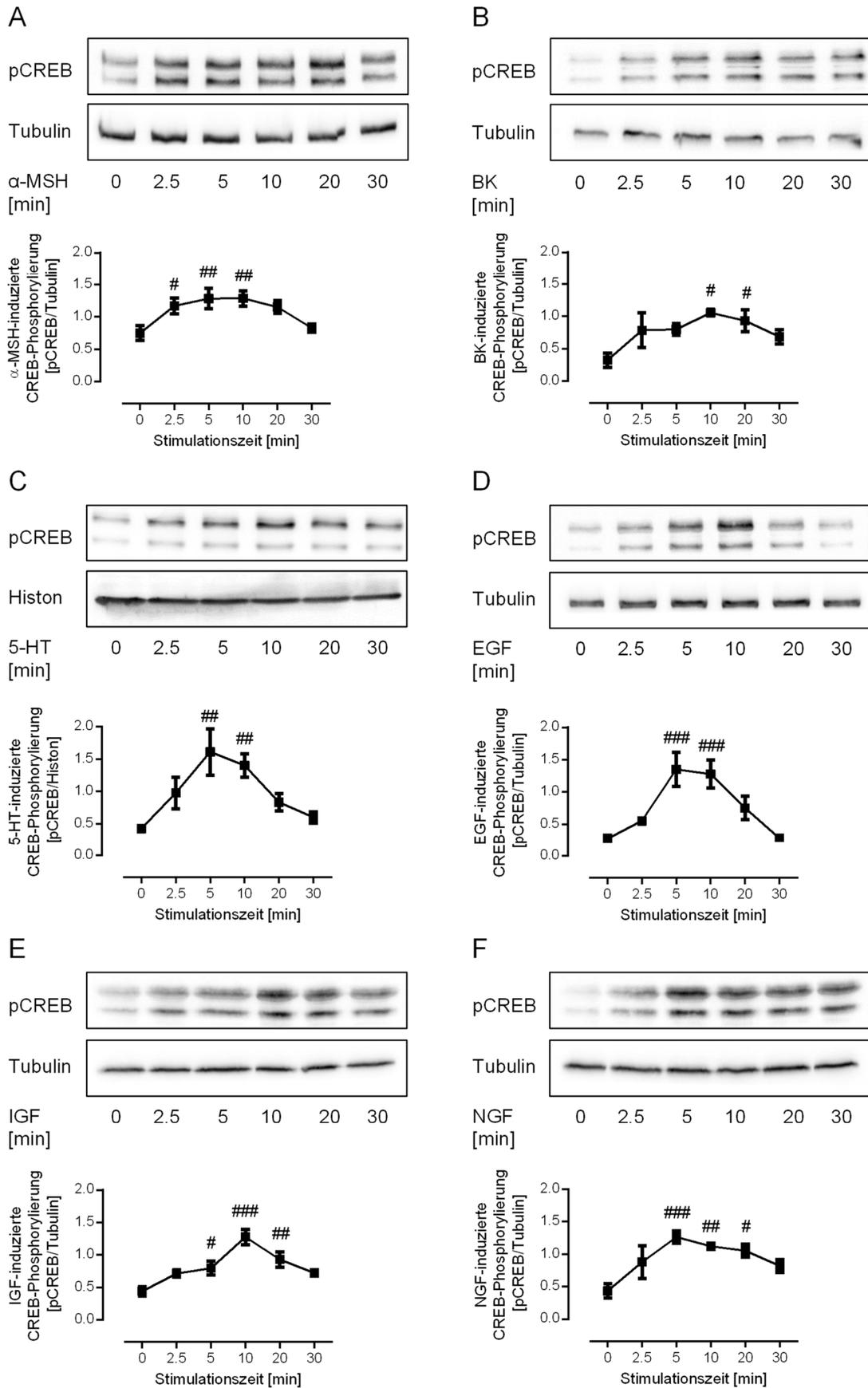


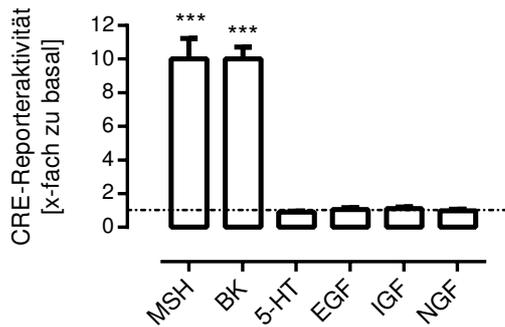
Abbildung 5.13: Quantifizierung der Liganden-induzierten CREB-Phosphorylierung mit repräsentativen Western Blot

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für 0, 2,5, 5, 10, 20 und 30 min mit (A) 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH, (B) 1  $\mu$ M BK, (C) 1  $\mu$ M 5-HT, (D) 10 ng/ml EGF, (E) 10 ng/ml IGF oder (F) 10 ng/ml NGF stimuliert. Für jeden Liganden ist ein repräsentativer Western Blot mit der zugehörigen Quantifizierung des Phosphorylierungsstatus (Quotient pCREB/Ladekontrolle  $\pm$  S.E.M.) aus zwölf ( $\alpha$ -MSH), vier (BK), sieben (5-HT), fünf (EGF), vier (IGF) und fünf (NGF) unabhängigen Experimenten dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Alle Liganden führten in mHypoA-2/10-CRE-Zellen zu einer CREB-Phosphorylierung am Serin 133, wobei das Maximum jeweils zwischen 5 und 10 min Stimulationszeit lag. Die Ergebnisse zeigen erstmals eine CREB-Phosphorylierung durch BK, 5-HT, EGF, IGF und NGF im PVN-Neuronen-ähnlichen Zellmodell, das die Rezeptoren für die genannten Liganden endogen exprimiert (Abbildung 5.13). Die  $\alpha$ -MSH-induzierte Modulation von CREB im Hypothalamus konnte hierdurch bestätigt werden (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002).

### 5.3 Liganden-induzierte CRE-Reporteraktivierung

Da die CREB-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH, BK, 5-HT, IGF, EGF und NGF CREB am Serin 133 in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen (Kapitel 5.2) gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese Modifikation in direkter Korrelation mit der CREB-abhängigen CRE-Reporteraktivierung steht. Um die Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Reporteraktivierung zu untersuchen, wurden die mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit den Liganden stimuliert und es wurde die Reporteraktivität bestimmt. In Abbildung 5.14 ist die Liganden-vermittelte CRE-Reporteraktivität als x-faches zur basalen Aktivität dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur  $\alpha$ -MSH und BK zu einer signifikanten Aktivierung des CRE-Reporters in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen führten. Beide Liganden erhöhten die CRE-Reporteraktivität um etwa ein 10-faches zur basalen Aktivität. Die Stimulation mit 5-HT und den drei verwendeten Wachstumsfaktoren EGF, IGF und NGF führte nicht zu einer Erhöhung der Reporteraktivität, obwohl alle vier Liganden eine CREB-Phosphorylierung am Serin 133 induzierten.

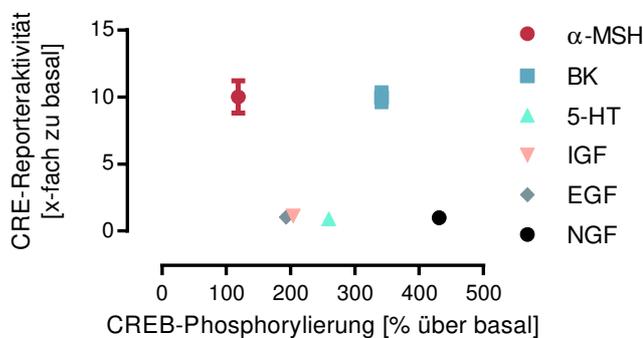


**Abbildung 5.14: Liganden-induzierte CRE-Reporteraktivierung**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für 4 h mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH, 1  $\mu$ M BK, 1  $\mu$ M 5-HT, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml IGF oder 10 ng/ml NGF stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. als x-faches zur basalen CRE-Reporteraktivität aus drei unabhängigen Experimenten. Die gestrichelte Linie symbolisiert die Höhe des Basalwerts von 1. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

#### 5.4 Korrelation zwischen CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivität

In Abbildung 5.15 ist zusammenfassend dargestellt, wie die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 mit der CRE-Reporteraktivität durch die Stimulation der mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit  $\alpha$ -MSH, BK, 5-HT, IGF, EGF und NGF korrelierte. Für diese Abbildung wurde die maximale CREB-Phosphorylierung der Liganden aus Abbildung 5.13 als prozentuale Phosphorylierung über dem jeweiligen Basalwert berechnet und in Abhängigkeit der CRE-Reporteraktivierung aus Abbildung 5.14 dargestellt.  $\alpha$ -MSH wies die schwächste CREB-Phosphorylierung unter den Liganden auf, bewirkte jedoch vergleichbar mit BK die Aktivierung von CRE. Obwohl 5-HT, EGF, IGF und NGF zu einer CREB-Phosphorylierung führten, hatten sie keinen Einfluss auf die Aktivierung von CRE.

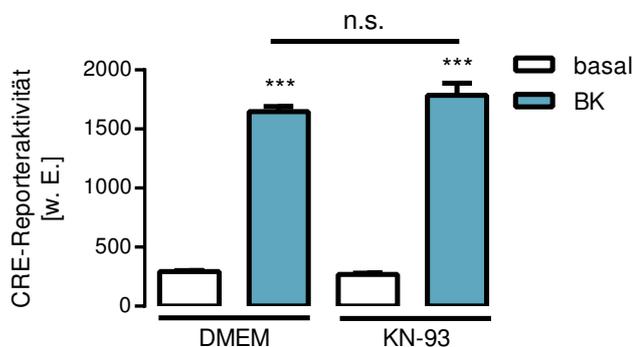


**Abbildung 5.15: Liganden-induzierte CREB-Phosphorylierung in Abhängigkeit der CRE-Reporteraktivität**

Dargestellt ist die Liganden-vermittelte CRE-Reporteraktivierung  $\pm$  S.E.M. aus Abbildung 5.14 in Abhängigkeit der maximalen Liganden-vermittelten CREB-Phosphorylierung, dargestellt als % über der basalen Phosphorylierung aus Abbildung 5.13.

## 5.5 Abhängigkeit der BK-induzierten CREB/CRE-Aktivierung von PKC

Um die BK-vermittelten Signalkaskaden in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen weiter zu analysieren, die bislang im Hypothalamus völlig unbekannt waren, stand die Frage im Fokus, über welche Kinase die BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivierung katalysiert wird. Aufgrund der verfügbaren Literatur war zu vermuten, dass es sich bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen CREB-modulierenden Kinase um die CaMKII oder die PKC handeln könnte (FLEMING *et al.* 2001; GRECO *et al.* 2004; CAI *et al.* 2008). Da Rosethorne *et al.* zeigten, dass nur die CaMKII-abhängige CREB-Phosphorylierung des  $G_q$ -gekoppelten  $M_3$  mACh-Rezeptors zu einer CRE-Reporteraktivität führte, wurde zunächst KN-93 als chemischer CaMKII-Inhibitor eingesetzt (ROSETHORNE *et al.* 2008). Unabhängig von der Vorinkubation mit KN-93 resultierte die Stimulation der Zellen mit BK in einer signifikanten Erhöhung der basalen CRE-Reporteraktivität (Abbildung 5.16). Die Vorinkubation mit KN-93 hatte keinen Einfluss auf die BK-vermittelte Signalstärke. Auch der Inhibitor alleine hatte keinen Effekt auf den Basalwert.

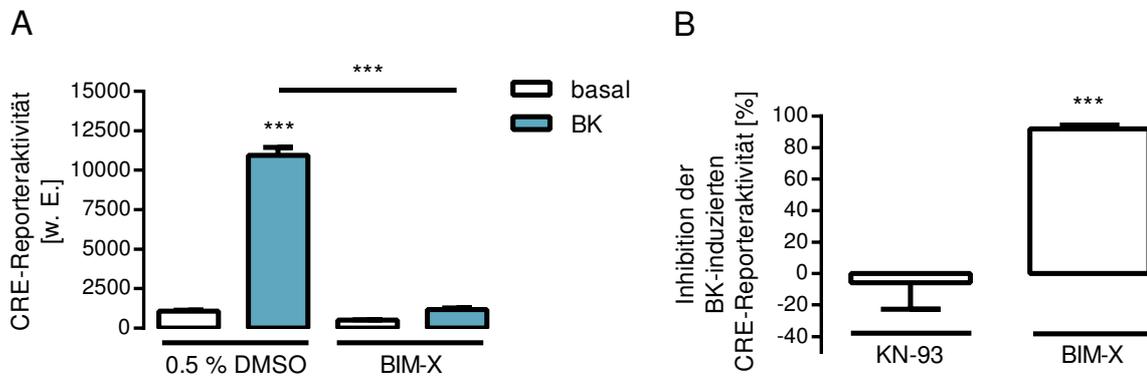


**Abbildung 5.16: Effekt des CaMKII Inhibitors KN-93 auf die BK-vermittelte CRE-Reporteraktivierung**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit DMEM-Medium oder 5  $\mu\text{M}$  KN-93 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu\text{M}$  BK stimuliert. Es sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Wenn man allerdings die Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM-X vorinkubierte, wurde das BK-induzierte CRE-Signal nahezu vollständig inhibiert (Abbildung 5.17A). Die in Abbildung 5.17B dargestellte Inhibitor-induzierte Verringerung der BK-vermittelten CRE-Reporteraktivierung wurde wie in Kapitel 4.2.3.4.1 beschrieben berechnet. In Gegenwart von KN-93 wurde das BK-induzierte CRE-Signal nicht verringert, während die Vorinkubation mit

BIM-X zu einer Inhibition von  $92 \pm 3 \%$  führte. Diese Ergebnisse zeigten deutlich, dass die PKC und nicht die CaMKII für die BK-induzierte CRE-Reporteraktivierung in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen verantwortlich war.

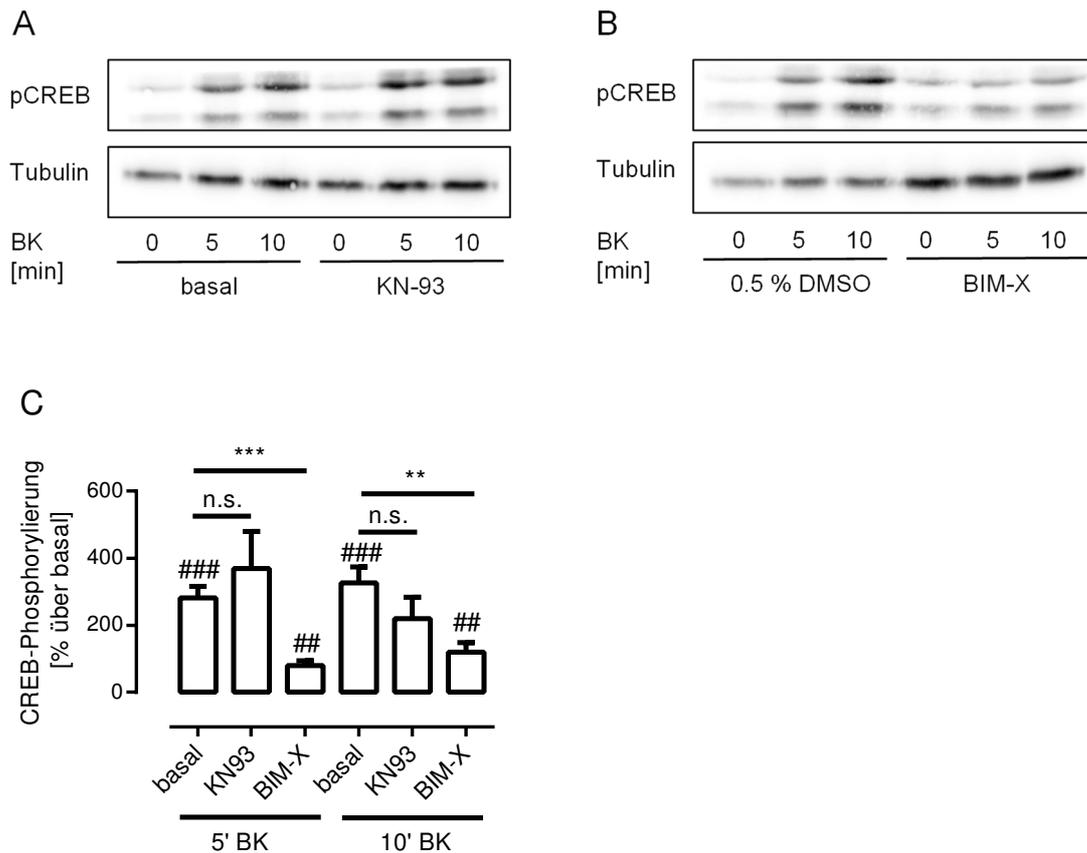


**Abbildung 5.17: Effekt des PKC- und CaMKII-Inhibitors auf die BK-vermittelte CRE-Reporteraktivierung**

(A) mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 0,5 % DMSO oder  $5 \mu\text{M}$  BIM-X vorinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$  BK stimuliert. Es sind die Daten aus vier unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

(B) Es ist der Mittelwert  $\pm$  S.E.M. der prozentualen Inhibition der BK-vermittelten CRE-Reporteraktivierung durch KN-93 oder BIM-X aus drei (KN-93) und vier (BIM-X) unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Ob die PKC auch für die BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung verantwortlich war, wurde mittels Western Blot untersucht. Hierfür wurden mHypoA-2/10-CRE-Zellen für 5 oder 10 min mit BK stimuliert, nachdem sie für 30 min mit DMEM (basal), KN-93 oder BIM-X vorinkubiert wurden. 5 und 10 min Stimulationszeit mit BK wurden aufgrund der Ergebnisse in Abbildung 5.13B gewählt, da zu diesen Zeitpunkten die maximale BK-vermittelte Phosphorylierung vorlag. Die BK-induzierte CREB-Phosphorylierung war im Vergleich zum basalen Phosphorylierungsstatus der Zellen nach 5 und 10 min erhöht (Abbildung 5.18A). Der CaMKII-Inhibitor KN-93 hatte keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von CREB. Im Vergleich dazu war durch BIM-X die BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung zu beiden Stimulationszeitpunkten schwächer (Abbildung 5.18B). Die Quantifizierung der Western Blots (Abbildung 5.18C) ergab, dass BIM-X die CREB-Phosphorylierung durch BK nach 5 min und 10 min signifikant inhibierte, KN-93 hatte keinen signifikanten, inhibitorischen Effekt. Neben der BK-induzierten CRE-Reporteraktivierung war auch die BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung PKC-abhängig und CaMKII-unabhängig.



#### Abbildung 5.18: BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist PKC-abhängig und CaMKII-unabhängig

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M KN-93 (A) oder 5  $\mu$ M BIM-X (B) bzw. der zugehörigen Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M BK stimuliert.

(A) und (B) Es ist ein repräsentativer Western Blot mit der Proteinbande von pCREB bei 42 kDa (oben) und Tubulin bei 55 kDa als Ladekontrolle (unten) gezeigt.

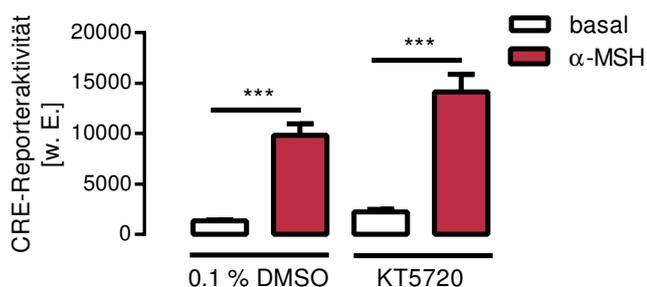
(C) Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung (beide Lösungsmittelkontrollen zusammengefasst). Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

### 5.6 $\alpha$ -MSH-induzierte CREB/CRE-Aktivierung

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit war die Analyse der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivierung, für die bislang aber der experimentelle Nachweis fehlte. Es wurde angenommen, dass die  $\alpha$ -MSH-induzierte Modifikation von CREB und die CRE-abhängige Genexpression im Hypothalamus über den MC4R durch PKA als zentrale Kinase stimuliert werden (SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO *et al.* 2012; CYR UND BOUKADOUM 2013; RAMIREZ *et al.* 2015).

### 5.6.1 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von PKA

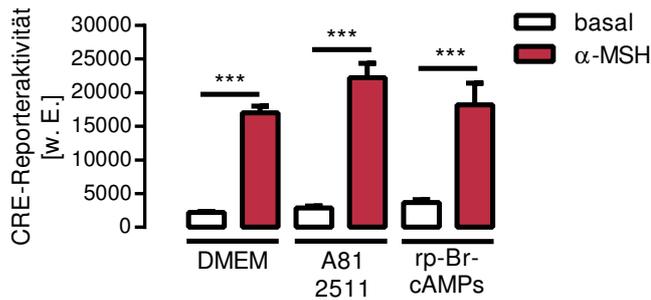
Zur Überprüfung der Hypothese, ob die PKA für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-induzierte Genexpression verantwortlich ist, wurden Zellen mit dem PKA-Inhibitor KT5720 vorinkubiert und anschließend in Gegenwart des Inhibitors mit  $\alpha$ -MSH stimuliert. In Abbildung 5.19 sind die Daten aller Einzelversuche ohne Normierung zusammengefasst. Überraschenderweise führte die Vorinkubation der Zellen mit KT5720 nicht zu einer Inhibition des  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reportersignals. Das durch  $\alpha$ -MSH-induzierte Signal war im Vergleich zum zugehörigen Basalwert (0,1 % DMSO oder KT5720) signifikant erhöht, beide  $\alpha$ -MSH-Signale unterschieden sich nicht signifikant voneinander.



**Abbildung 5.19: Effekt des PKA-Inhibitors KT5720 auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 0,1 % DMSO oder 5  $\mu$ M KT5720 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Es sind die Daten aus sechs unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

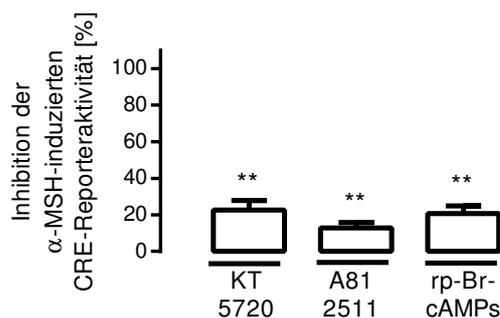
Aufgrund einiger Publikationen, in denen mit vergleichbaren Bedingungen des Inhibitors gearbeitet wurde, konnte man davon ausgehen, dass KT5720 in der eingesetzten Konzentration von 5  $\mu$ M und mit einer Vorinkubation von 30 min die PKA inhibierte und es sich nicht um ein Artefakt aufgrund inkorrektter Verwendung des Inhibitors handelte (GALLO *et al.* 2002; LIN *et al.* 2003; SUN *et al.* 2014). Da diese Ergebnisse unerwartet waren, wurden die gleichen Versuche mit den zwei weiteren PKA-Inhibitoren A812511 und rp-Br-cAMPs wiederholt. Abbildung 5.20 zeigt, dass wie auch KT5720, weder A812511 noch rp-Br-cAMPs einen inhibitorischen Effekt auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen hatten. Das durch  $\alpha$ -MSH aktivierte CRE-Signal unterschied sich unabhängig vom Inhibitor signifikant von der jeweiligen basalen Reporteraktivität.



**Abbildung 5.20: Effekt der PKA-Inhibitoren A812511 oder rp-Br-cAMPs auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit DMEM-Medium allein oder mit 10  $\mu$ M A812511 oder 50  $\mu$ M rp-Br-cAMPs vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Es sind die Daten aus elf (A812511) und fünf (rp-Br-cAMPs) unabhängigen Experimenten dargestellt als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Um die Messschwankungen zwischen den einzelnen Versuchstagen zu eliminieren, aber auch um den Effekt der Inhibitoren auf den Basalwert in die Auswertung einzuschließen, wurden die Daten für jeden einzelnen Versuchstag normalisiert und zusammengefasst. Die Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivität durch die PKA-Inhibitoren KT5720, A812511 und rp-Br-cAMPs ist in Abbildung 5.21 dargestellt. KT5720 inhibierte die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung um  $23 \pm 5$  %, A812511 um  $13 \pm 3$  % und rp-Br-cAMPs um  $21 \pm 4$  %. Die berechnete Inhibition durch die drei PKA-Inhibitoren war deutlich schwächer als erwartet, jedoch in allen drei Fällen signifikant.

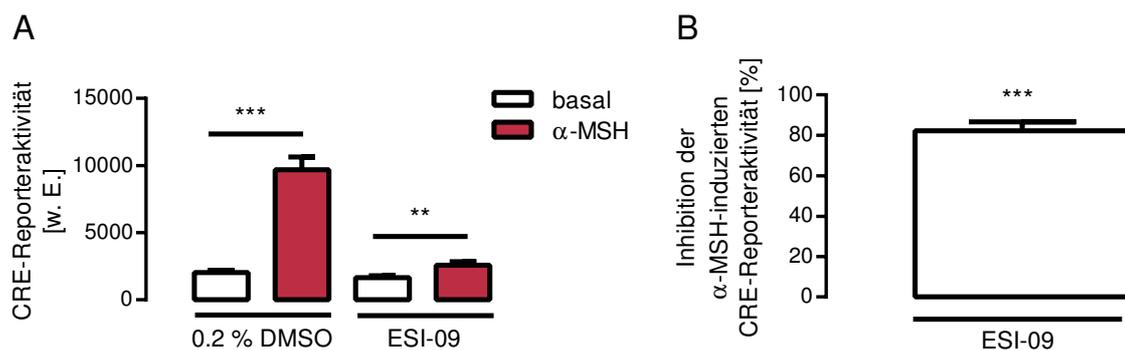


**Abbildung 5.21: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch PKA-Inhibitoren**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M KT5720, 10  $\mu$ M A812511 oder 50  $\mu$ M rp-Br-cAMPs vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Es ist der Mittelwert + S.E.M. der prozentualen Inhibition durch den jeweiligen PKA-Inhibitor aus sechs (KT5720), elf (A812511) und fünf (rp-Br-cAMPs) unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

### 5.6.2 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von EPAC

Da die PKA-Inhibitoren nur zu einer Inhibition von maximal  $23 \pm 5\%$  (KT5720) führten (Abbildung 5.21), wurde nachfolgend untersucht, welcher Faktor bei der CRE-abhängigen Genexpression über den MC4R die entscheidende Rolle spielte. Neben der PKA ist EPAC als intrazellulärer cAMP-Sensor bekannt, wurde bisher aber nicht in direkte Verbindung mit MC4R-induzierten Signalwegen gebracht. Erstmals wurde 2013 der EPAC-Antagonist ESI-09 publiziert, der ein nicht-selektiver Inhibitor von EPAC1 und EPAC2 ist (ALMAHARIQ *et al.* 2013), womit sich nun die Beteiligung von EPAC in Signalkaskaden besser untersuchen ließ. mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit ESI-09 oder 0,2 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle vorinkubiert und mit  $\alpha$ -MSH stimuliert. Die Inhibition von EPAC durch ESI-09 führte zu einer signifikanten Inhibition des  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Signals (Abbildung 5.22A). Das  $\alpha$ -MSH-Signal unterschied sich signifikant von der Lösungsmittelkontrolle, aber auch das  $\alpha$ -MSH-Signal in Gegenwart des Inhibitors war im Vergleich zur Inhibitor-Kontrolle signifikant erhöht. Der EPAC-Antagonist selbst hatte keinen Effekt auf die basale CRE-Reporteraktivierung (Abbildung 5.22A). Wird nun die Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch Analyse der Einzelerperimente ausgewertet, so stellt man fest, dass durch ESI-09 das Signal um  $82 \pm 4\%$  inhibiert wurde (Abbildung 5.22B).



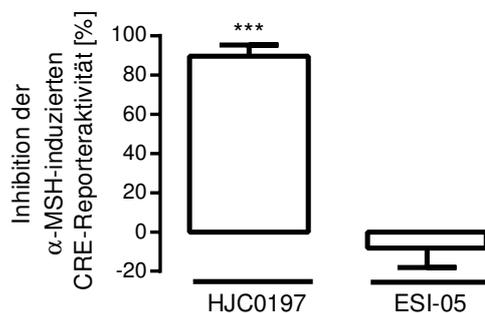
**Abbildung 5.22: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den EPAC-Inhibitor ESI-09**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $20 \mu\text{M}$  ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH stimuliert.

(A) Es ist die Summe der Daten aus 14 unabhängigen Experimenten als Mittelwert + S.E.M. dargestellt. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

(B) Prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung durch ESI-09 als Mittelwert + S.E.M aus 14 unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Um diese Effekte des EPAC-Inhibitors auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung abzusichern, wurde ein weiterer selektiver EPAC1- und EPAC2-Inhibitor (HJC0197) verwendet, der 2012 synthetisiert wurde (CHEN *et al.* 2012). Außerdem stand auch noch der EPAC2-selektive Inhibitor ESI-05 zur Verfügung, der im gleichen Jahr entwickelt wurde (TSALKOVA *et al.* 2012), um eine Auskunft über den EPAC-Subtyp zu treffen, der an diesem Signalweg in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen beteiligt war. Die Inhibition von EPAC durch den nicht selektiven Inhibitor HJC0197 führte zu einer hochsignifikanten Inhibition von  $90 \pm 6\%$  und bestärkte die Effekte von ESI-09 (Abbildung 5.23). Als Kontrast hierzu inhibierte der EPAC2-Inhibitor ESI-05 das  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Signal nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse (Abbildung 5.22 und Abbildung 5.23) konnte man davon ausgehen, dass EPAC und speziell der EPAC1-Subtyp eine zentrale und entscheidende Funktion bei der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung über den MC4R hatte, wohingegen PKA eine vergleichsweise untergeordnete Rolle zu spielen schien (Abbildung 5.21).



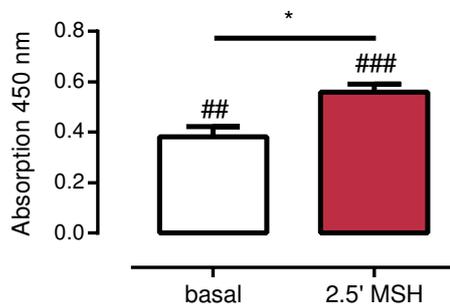
**Abbildung 5.23: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den nicht-selektiven EPAC-Inhibitor HJC0197 und den EPAC2-selektiven Inhibitor ESI-05**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $25 \mu\text{M}$  HJC0197 oder  $20 \mu\text{M}$  ESI-05 vorinkubiert und mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung  $\pm$  S.E.M. aus fünf (HJC0197) und zehn (ESI-05) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

## 5.7 Nachweis der $\alpha$ -MSH-vermittelten PKA-Aktivierung

Da die Beteiligung der PKA an der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung sehr gering war, folgte die Überprüfung, ob  $\alpha$ -MSH in mHypoA-2/10-CRE-Zellen die PKA aktivierte. Zur Ermittlung der PKA-Aktivität wurde ein spezifischer ELISA angewandt, wobei ein spezifisches PKA-Substrat und ein polyklonaler Antikörper, der die phosphorylierte Form des Substrats erkennt, eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der Absorptionmessungen

zeigten, dass  $\alpha$ -MSH nach 2,5 min Stimulationszeit zu einer signifikanten Aktivierung der PKA führte (Abbildung 5.24).

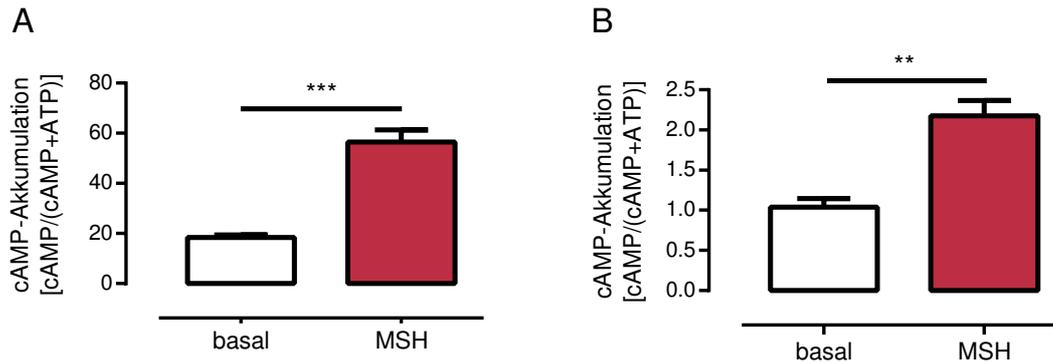


**Abbildung 5.24:  $\alpha$ -MSH-induzierte PKA-Aktivierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für 2,5 min mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH stimuliert und anschließend wurde mittels eines ELISA die  $\alpha$ -MSH-induzierte PKA-Aktivierung gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert der Absorption bei 450 nm + S.E.M. aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

## 5.8 Funktioneller Nachweis des MC4R in GT1-7 und HEK-293-Zellen

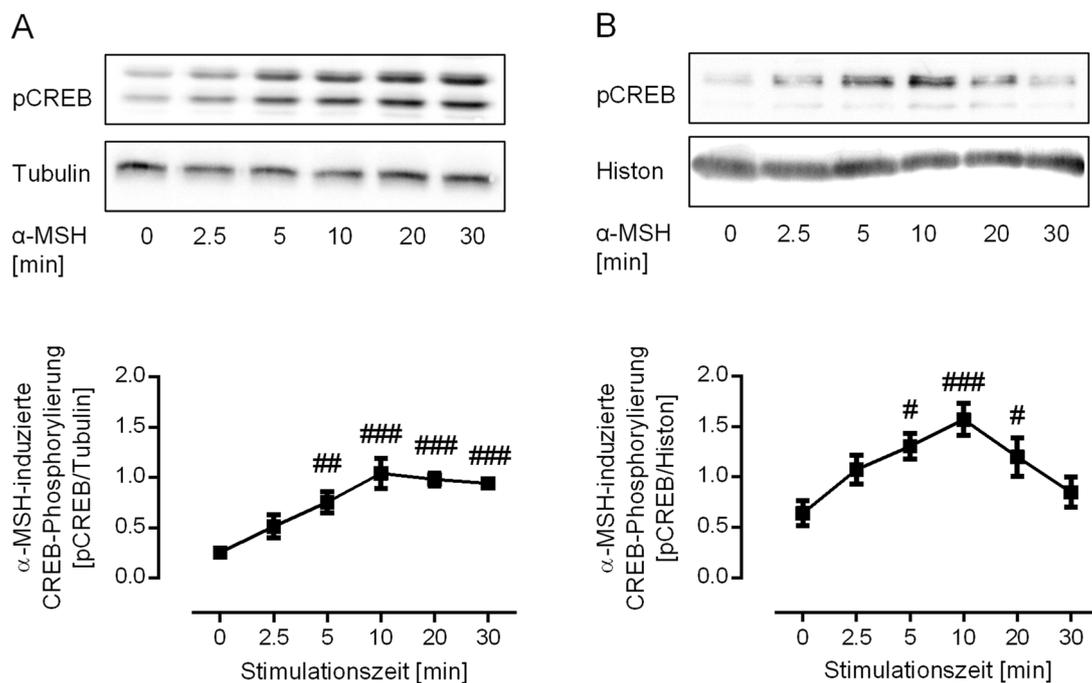
Mit Hilfe von zwei weiteren Zelllinien wurde überprüft, ob es sich um einen zelltypspezifischen Effekt der mHypoA-2/10-CRE-Zellen handelte, dass die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivierung EPAC-abhängig war und PKA nur einen geringen Einfluss hatte. Dafür wurden GT1-7-Zellen verwendet, wie auch die mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine hypothalamische Zelllinie der Maus (MELLON *et al.* 1990). Zusätzlich wurden noch HEK-293-Zellen verwendet, die den humanen MC4R stabil exprimieren (BREIT *et al.* 2006). Es wurde mittels der Messung der cAMP-Akkumulation untersucht, ob beide Zellsysteme auf die Stimulation mit  $\alpha$ -MSH reagieren. Die  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation in HEK-293-MC4R-Zellen war hochsignifikant von der basalen Akkumulation verschieden (Abbildung 5.25A). Auch in GT1-7-Zellen war durch die Stimulation mit  $\alpha$ -MSH die cAMP-Akkumulation gegenüber dem Basalwert signifikant erhöht (Abbildung 5.25B). Deutlich zu sehen war, dass die HEK-293-MC4R-Zellen, welche ein Überexpressionssystem für den MC4R darstellten, eine deutlich erhöhte cAMP-Akkumulation gegenüber den GT1-7-Zellen aufwiesen, welche den Rezeptor endogen in geringerer Menge exprimieren.



**Abbildung 5.25:  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation in HEK-293-MC4R und GT1-7-Zellen**

(A) HEK-293-MC4R-Zellen und (B) GT1-7-Zellen wurden mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert + S.E.M. aus (A) fünf und (B) drei (GT1-7) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Neben der Erhöhung der cAMP-Akkumulation führte die Stimulation der HEK-293-MC4R- (Abbildung 5.26A) und der GT1-7-Zellen (Abbildung 5.26B) mit  $\alpha$ -MSH zu einer signifikanten Phosphorylierung von CREB am Serin 133.



**Abbildung 5.26:  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung in HEK-293-MC4R- und GT1-7-Zellen**

(A) HEK-293-MC4R- und (B) GT1-7-Zellen wurden für verschiedene Zeitintervalle mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Abgebildet ist jeweils ein repräsentativer Western Blot mit der zugehörigen Quantifizierung des Phosphorylierungsstatus von (A) vier und (B) neun unabhängigen Experimenten, dargestellt als Quotient pCREB/Ladekontrolle  $\pm$  S.E.M. Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließend Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

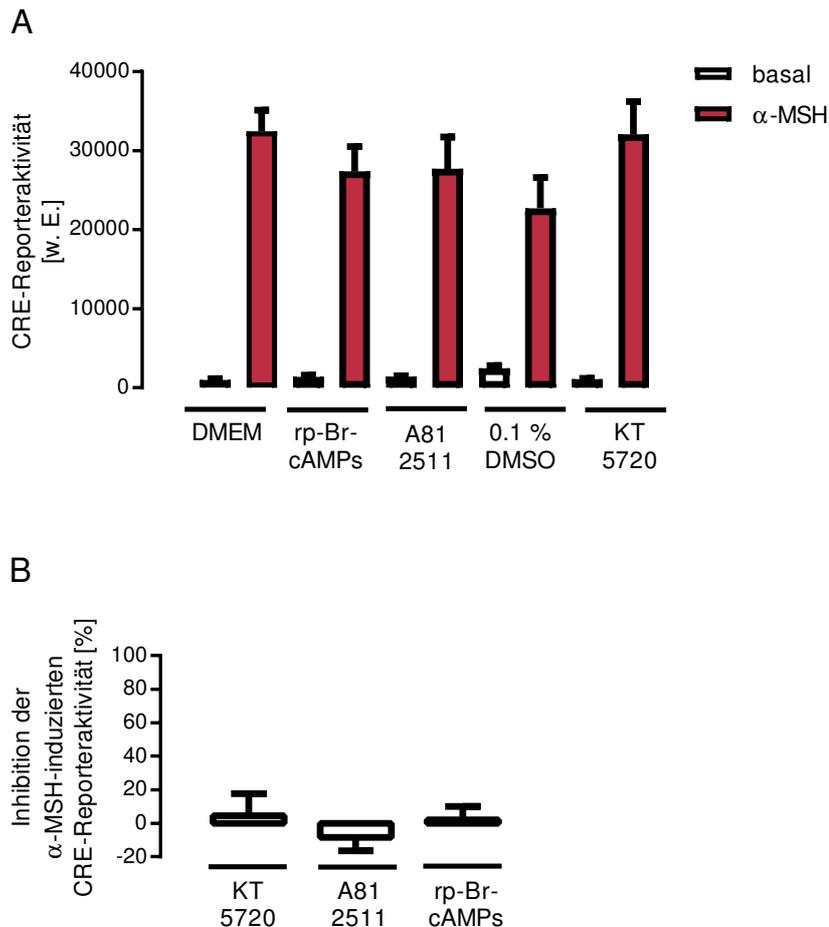
In beiden Zellsystemen konnte man bereits nach einer kurzen Stimulationszeit von 2,5 min eine signifikante CREB-Phosphorylierung detektieren. In den HEK-293-MC4R-Zellen war die CREB-Phosphorylierung lang anhaltend und erreichte bei 10 min ( $1,0 \pm 0,2$ ) ihr Maximum gegenüber der nativen Bedingung ( $0,3 \pm 0,1$ ). Die Phosphorylierung von CREB blieb bis zu einer Stimulationszeit von 30 min eher konstant (Abbildung 5.26A). In GT1-7-Zellen hatte der Phosphorylierungsstatus nach 10 min ( $1,6 \pm 0,2$ ) im Vergleich zur basalen Phosphorylierung ( $0,6 \pm 0,1$ ) seinen Maximalwert erreicht und fiel bei längerer Stimulationszeit deutlich ab (Abbildung 5.26B).

Abbildung 5.25 und Abbildung 5.26 zeigen, dass beide Zelllinien prinzipiell dafür geeignet waren, Signalwege von  $\alpha$ -MSH zu analysieren, wobei die GT1-7-Zellen einem physiologisch relevanten System näher kamen, da es sich um hypothalamische Zellen handelt, welche den zu untersuchenden MC4R endogen exprimiert.

## 5.9 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung von PKA und EPAC in GT1-7 und HEK-293-Zellen

### 5.9.1 HEK-293-MC4R-Zellen

In HEK-293-MC4R-Zellen wurde zunächst der Einfluss der PKA-Inhibitoren KT5720, A812511 und rp-Br-cAMPs auf die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität untersucht. Abbildung 5.27A zeigt ein Beispiel einer CRE-Reporterermessung und verdeutlicht, dass auch in den HEK-293-MC4R-Zellen alle drei PKA-Inhibitoren die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivierung nicht oder nur sehr geringfügig inhibierten. Durch die Quantifizierung aller durchgeführten Reporterermessungen ließ sich diese Aussage bestärken (Abbildung 5.27B). Weder KT5720 noch A812511 oder rp-Br-cAMPs führten zu einer signifikanten Inhibition des Signals von  $\alpha$ -MSH. KT5720 modifizierte das CRE-Signal um  $5 \pm 13$  %, A812511 um  $-8 \pm 8$  % und rp-Br-cAMPs um  $2 \pm 8$  %.



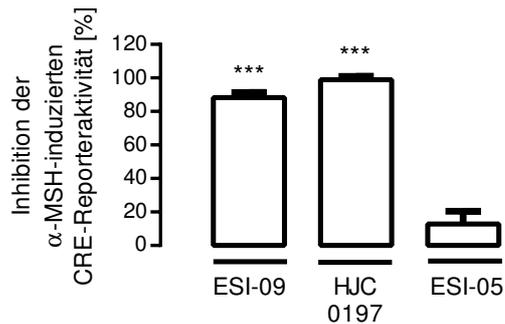
**Abbildung 5.27: Effekte der PKA-Inhibitoren auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung in HEK-293-MC4R-Zellen**

HEK-293-MC4R-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M KT5720, 10  $\mu$ M A812511 oder 50  $\mu$ M rp-Br-cAMPs vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert.

(A) Es ist ein repräsentatives Beispiel eines Versuchstages als Mittelwert + S.E.M. dargestellt.

(B) Dargestellt ist die prozentuale Inhibition  $\pm$  S.E.M. der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung aus sieben (KT5720), neun (A812511) und sechs (rp-Br-cAMPs) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Nachdem die Beteiligung von PKA an der CRE-Reporteraktivierung in HEK-293-MC4R-Zellen nicht signifikant war, wurden in weiteren Versuchen die EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197, aber auch der EPAC2-selektive Inhibitor ESI-05 verwendet. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mHypoA-2/10-CRE-Zellen inhibierten auch in den HEK-293-MC4R-Zellen ESI-09 und HJC0197 die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivierung signifikant (Abbildung 5.28). ESI-09 verminderte das Signal um  $88 \pm 3$  % und HJC0197 um  $99 \pm 2$  %. Durch den EPAC2-Inhibitor ESI-05 wurde die CRE-Reporteraktivität nur um  $13 \pm 8$  % inhibiert. Offenbar hatte der Subtyp EPAC2 in dieser Zelllinie nur eine geringe Funktion bei der CRE-Reporteraktivierung.



**Abbildung 5.28: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch die EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 und den EPAC2-selektiven Inhibitor ESI-05**

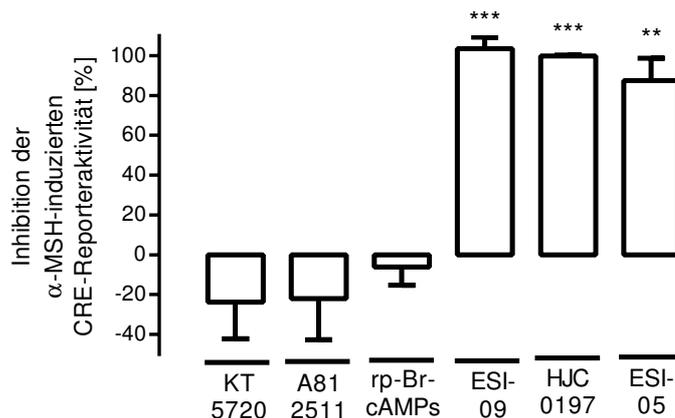
HEK-293-MC4R-Zellen wurden mit 20  $\mu$ M ESI-09, 25  $\mu$ M HJC0197 oder 20  $\mu$ M ESI-05 vorinkubiert und mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung + S.E.M. aus 14 (ESI-09), drei (HJC0197) und vier (ESI-05) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Für HEK-293-MC4R-Zellen lässt sich zusammenfassen, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung nicht PKA-abhängig ist. Dies wurde durch drei unterschiedliche PKA-Inhibitoren gezeigt. Wie auch in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen war die Aktivierung von CRE-abhängiger Genexpression durch  $\alpha$ -MSH abhängig von der EPAC-Aktivität, wobei man davon ausgehen konnte, dass EPAC1 relevanter als EPAC2 ist, da der EPAC2-Inhibitor das Signal nur um ca. 13 % inhibierte. Die Ergebnisse bestärkten die Annahme, dass die Notwendigkeit und Funktion von EPAC für die MC4R-vermittelte CRE-abhängige Genexpression kein zelltypspezifischer Einzelfall in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen ist, sondern auch auf andere Zellsysteme übertragbar ist.

### 5.9.2 GT1-7-Zellen

Als dritte Zelllinie wurde in GT1-7-Zellen die Abhängigkeit der CRE-Reporteraktivität, induziert durch  $\alpha$ -MSH, genauer untersucht. Übereinstimmend mit den Daten der mHypoA-2/10-CRE- und der HEK-293-MC4R-Zellen führte keiner der drei PKA-Inhibitoren zu einer Verminderung des  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Signals (Abbildung 5.29). Der Quantifizierung zufolge sah es sogar danach aus, als resultierte eine Inhibition von PKA in einer leichten Erhöhung des CRE-Signals. Ebenfalls vergleichbar mit den beiden anderen Zellsystemen wurde durch die EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 das  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Signal fast vollständig inhibiert. ESI-09 reduzierte die CRE-Reporteraktivierung um  $104 \pm 6$  % und

HJC0197 um  $100 \pm 1$  %. In den GT1-7-Zellen wies der EPAC2-Inhibitor ESI-05 eine Inhibition von  $88 \pm 11$  % auf, was für eine entscheidende Funktion von EPAC2 in den GT1-7-Zellen sprach. Diese Ergebnisse deuteten auf einen Unterschied in der Beteiligung der beiden EPAC-Subtypen in verschiedenen Zelllinien hin, da ESI-05 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen und in HEK-293-MC4R-Zellen keinen signifikanten Effekt auf die CRE-Reporteraktivierung hatte.



**Abbildung 5.29: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch PKA- und EPAC-Inhibitoren in GT1-7-Zellen**

GT1-7-Zellen wurden mit  $5 \mu\text{M}$  KT5720,  $10 \mu\text{M}$  A812511,  $50 \mu\text{M}$  rp-Br-cAMPs,  $20 \mu\text{M}$  ESI-09,  $25 \mu\text{M}$  HJC0197 oder  $20 \mu\text{M}$  ESI-05 vorinkubiert und mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung  $\pm$  S.E.M. aus fünf (KT5720, rp-Br-cAMPs, ESI-09, ESI-05), vier (A812511) und drei (HJC0197) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

## 5.10 Analyse der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197

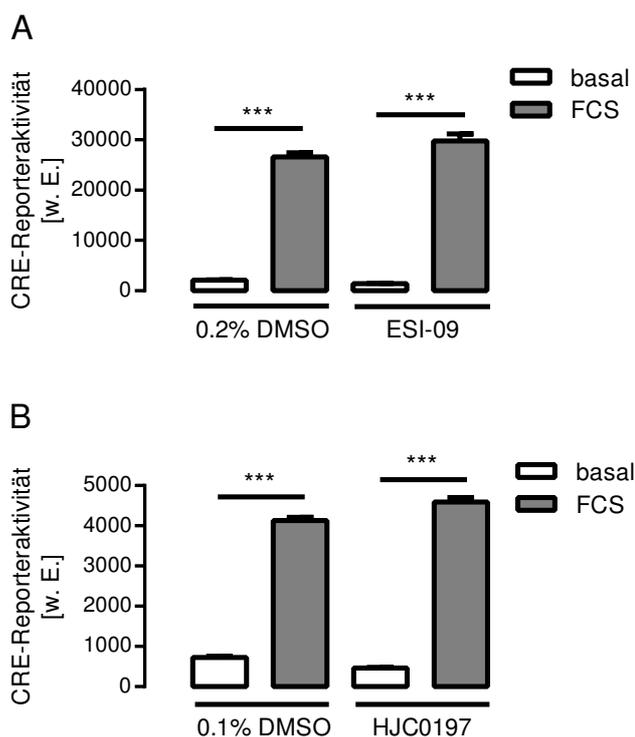
Die in Kapitel 5.6 und 5.9 erhobenen Daten wiesen deutlich auf eine essentielle Beteiligung von EPAC bei der MC4R-vermittelten CRE-Reporteraktivierung hin. Diese Rolle von EPAC war nicht zelltypspezifisch und schien vom murinen MC4R der mHypoA-2/10-CRE und GT1-7-Zellen auf den humanen Rezeptor in den HEK-MC4R-Zellen übertragbar zu sein.

2013 wurde von Rehmann publiziert, dass es sich bei den beiden EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 um chemische Inhibitoren mit proteindenaturierenden Eigenschaften handeln würde, welche nicht nur spezifisch EPAC inhibieren (REHMANN 2013). In einer nachfolgenden Publikation wurde diesen unspezifischen Effekten, beim Einsatz der EPAC-Inhibitoren in den hier eingesetzten Konzentrationen von  $20 \mu\text{M}$  für ESI-09 und  $25 \mu\text{M}$  für HJC0197, bereits widersprochen (ZHU *et al.* 2015). Da die Rolle von EPAC entscheidend für

den untersuchten Signalweg war und die verwendeten EPAC-Inhibitoren von zentraler Bedeutung für viele Experimente dieser Arbeit waren, wurde trotz der kontrastierenden Publikation der Frage nachgegangen, ob die Effekte beider Inhibitoren mit einer unspezifischen Proteindenaturierung einhergingen.

### 5.10.1 Abhängigkeit der Serum-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von ESI-09 und HJC0197

Falls die beschriebenen denaturierenden Effekte auf die Inhibitoren zuträfen, wäre zu erwarten, dass die induzierte CRE-Reporteraktivität unabhängig vom Liganden vollständig inhibiert wird. Da Serum (FCS) in mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine CRE-Reporteraktivität induzierte, wurde die Hypothese damit überprüft. Die Serum-induzierte CRE-Reporteraktivität unterschied sich signifikant von der basalen Bedingung und wurde weder in Gegenwart von ESI-09 (Abbildung 5.30A) noch von HJC0197 (Abbildung 5.30B) inhibiert.

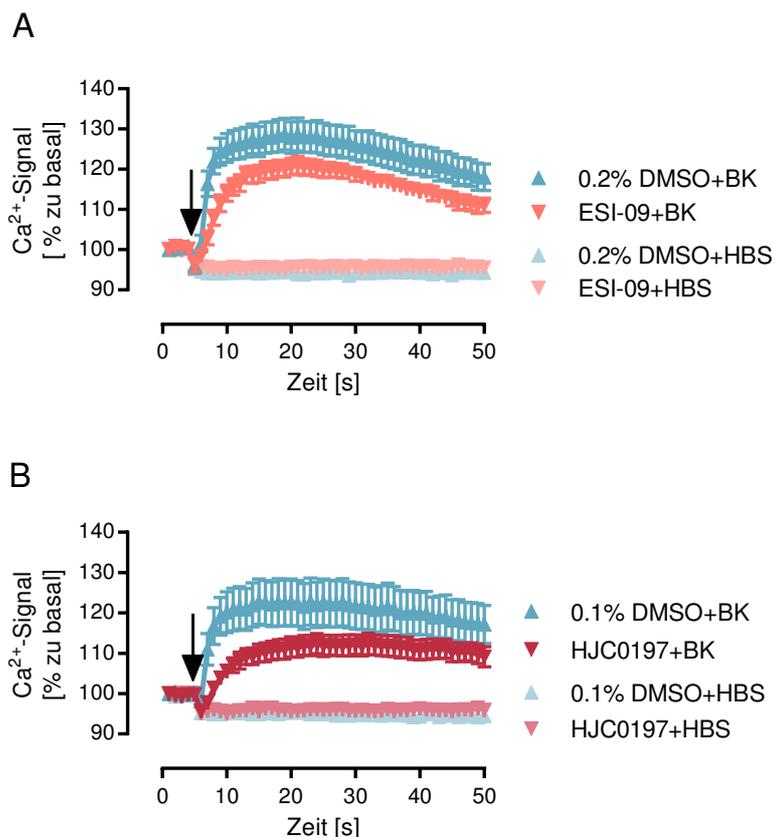


**Abbildung 5.30: Repräsentative Beispiele für die Effekte von ESI-09 oder HJC0197 auf die Serum-vermittelte CRE-Reporteraktivität**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit (A) 20  $\mu$ M ESI-09 oder (B) 25  $\mu$ M HJC0197 vorinkubiert und anschließend mit 20 % FCS stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte + S.E.M. der Daten eines repräsentativen Experiments. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

### 5.10.2 Effekte von ESI-09 und HJC0197 auf die BK-induzierte $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung

Um die Befunde zu bestärken, dass die EPAC-Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  (ESI-09) und 25  $\mu\text{M}$  (HJC0197) keinen denaturierenden Effekt auf Proteine hatten, wurde getestet, ob ein EPAC-unabhängiger Signalweg ebenfalls unverändert bleibt, wenn die Zellen zuvor mit den Inhibitoren inkubiert wurden. Dafür wurde die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gemessen, nachdem die Zellen zeitgleich zur Beladung mit Fura-2-AM mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert wurden. Die Vorinkubation der mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit 0,2 % DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder ESI-09 hatte keinen signifikanten Effekt auf das HBS- und BK-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abbildung 5.31A). Gleiche Versuche wurden auch mit HJC0197 durchgeführt (Abbildung 5.31B). Das BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal wurde durch die Inkubation der Zellen mit HJC0197 verringert, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Lösungsmittelkontrolle.

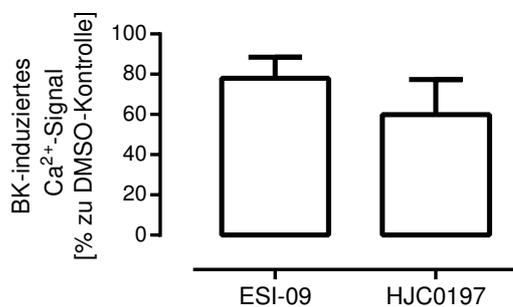


**Abbildung 5.31 Effekte der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 auf die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit (A) 20  $\mu\text{M}$  ESI-09 oder (B) 25  $\mu\text{M}$  HJC0197 inkubiert. Anschließend wurde die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung gemessen.

(A) Es sind die Mittelwerte  $\pm$  S.E.M. aus vier und (B) drei unabhängigen Experimenten dargestellt, wobei der Startwert zum Zeitpunkt 0 als 100 % definiert wurde.

Die Ergebnisse der Fura-2-AM-Messungen mit beiden Inhibitoren sprachen ebenfalls dafür, dass ESI-09 und HJC0197 keinen denaturierenden Effekt auf Proteine aufwiesen, da sonst eine Inhibition des BK-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in den Zellen zu erwarten gewesen wäre. Ausgewertet wurden die dargestellten Kurven der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen aus Abbildung 5.31A und B durch die Berechnung der AUCs und anschließende Normierung auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Weder die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nach Vorinkubation mit ESI-09 noch die mit HJC0197 unterschied sich signifikant von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung der Kontrolle (Abbildung 5.32).



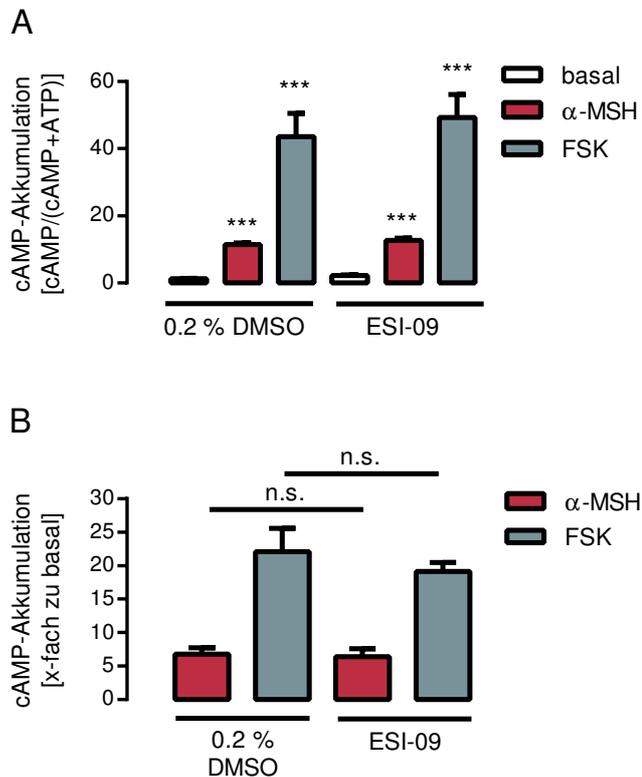
**Abbildung 5.32: Quantifizierung der Effekte der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 auf die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung**

Dargestellt ist die Auswertung der AUCs pro Versuchstag aus Abbildung 5.31, normiert auf die zugehörige Lösungsmittelkontrolle und dargestellt als Mittelwert + S.E.M. Der Einstichproben-t-Test zeigte keine Signifikanz.

### 5.10.3 Effekte von ESI-09 auf die $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation

Eine unspezifische Denaturierung von Proteinen durch ESI-09 hätte auch das Liganden-induzierte cAMP-Signal in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen betreffen müssen. Daher wurde in weiteren Experimenten zum Ausschluss unspezifischer Effekte von ESI-09 die  $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation gemessen, nachdem die Zellen mit ESI-09 vorinkubiert wurden. Die durch  $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation unterschied sich signifikant von der basalen Kontrolle (Lösungsmittelkontrolle oder ESI-09), unabhängig von der Vorinkubation mit ESI-09 (Abbildung 5.33A). Auch das FSK-vermittelte Signal wurde durch die Anwesenheit des Inhibitors nicht blockiert. Das Resultat des gezeigten Einzelexperiments spiegelte sich in der Zusammenfassung der Daten aller Experimente wider (Abbildung 5.33B). Die Vorinkubation der mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit ESI-09 hatte keinen Einfluss auf die  $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation. Die  $\alpha$ -MSH-

vermittelte cAMP-Akkumulation war ohne ESI-09  $7 \pm 1$ -fach gegenüber der basalen cAMP-Akkumulation erhöht, nach der Vorinkubation mit ESI-09  $6 \pm 1$ -fach. Nach der Stimulation der Zellen mit FSK war die cAMP-Akkumulation  $22 \pm 4$ -fach erhöht, nach der Behandlung mit dem EPAC-Inhibitor  $19 \pm 1$ -fach.



**Abbildung 5.33:  $\alpha$ -MSH- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation ist ESI-09 unabhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $20 \mu\text{M}$  ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH oder  $10 \mu\text{M}$  FSK stimuliert.

(A) Es ist ein repräsentatives Beispiel eines Experiments als Mittelwert + S.E.M. der gemessenen cAMP-Akkumulation (cAMP/(cAMP+ATP)) dargestellt. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

(B) Dargestellt ist die cAMP-Akkumulation (cAMP/(cAMP+ATP)) + S.E.M. als x-faches zur basalen Akkumulation aus drei unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

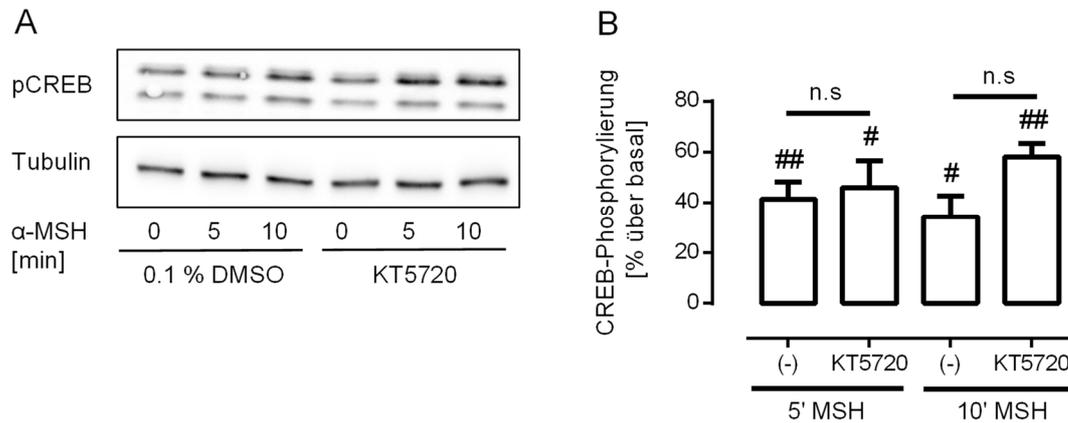
Weder ESI-09 noch HJC0197 hatten einen Effekt auf die Serum-vermittelte Aktivierung des CRE-Reporters und beide Inhibitoren beeinflussten die BK-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung nicht signifikant. Die  $\alpha$ -MSH- und die FSK-induzierte Akkumulation von cAMP in mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurde in Gegenwart von ESI-09 nicht signifikant inhibiert. Die Befunde sprachen dafür, dass beide Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen keinen denaturierenden Effekt auf Proteine hatten, da sonst gezeigte Signalwege hätten beeinflusst

werden müssen. EPAC-Inhibitoren wurden seit ihrer Entwicklung immer häufiger zur Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden eingesetzt (ALMAHARIQ *et al.* 2013; MEDIERO *et al.* 2014; PRATT *et al.* 2016; SINGHMAR *et al.* 2016).

## 5.11 $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung

### 5.11.1 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von PKA

Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 5.21, machten deutlich, dass der Einfluss der PKA-Inhibitoren KT5720, A812511 und rp-Br-cAMPs auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen deutlich geringer ausfiel als zu erwarten war. Daher war es von großem Interesse zu untersuchen, welche Rolle die PKA bei der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung spielte. Hierfür wurden mHypoA-2/10-CRE-Zellen mit KT5720 vorinkubiert und anschließend für 5 oder 10 min in Gegenwart des Inhibitors mit  $\alpha$ -MSH stimuliert. Der repräsentative Western Blot zeigt, dass die CREB-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH unabhängig von KT5720 bzw. der PKA war (Abbildung 5.34A). Wie auch bei den nur mit der Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) vorinkubierten Zellen sah man im Vergleich zum Basalwert eine deutliche Verstärkung der Proteinbande bei 5 und 10 min. Die Quantifizierung aller durchgeführten Western Blots unter der Verwendung von KT5720 machte deutlich, dass sich die CREB-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH in Gegenwart von KT5720 nicht signifikant von der Phosphorylierung unbehandelter Zellen unterschied (Abbildung 5.34B). Die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung lag nach 5 min  $41 \pm 7$  % und nach 10 min  $34 \pm 8$  % über der basalen Phosphorylierung. Im Vergleich dazu erreichte der Phosphorylierungsstatus durch  $\alpha$ -MSH in Anwesenheit des Inhibitors  $46 \pm 11$  % nach 5 min und  $58 \pm 5$  % nach 10 min über der KT5720-induzierten CREB-Phosphorylierung. Die CREB-Phosphorylierung aller Bedingungen war gegenüber den jeweiligen Basalwerten (0,1 % DMSO oder KT5720) signifikant erhöht.



**Abbildung 5.34:  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist von PKA unabhängig**

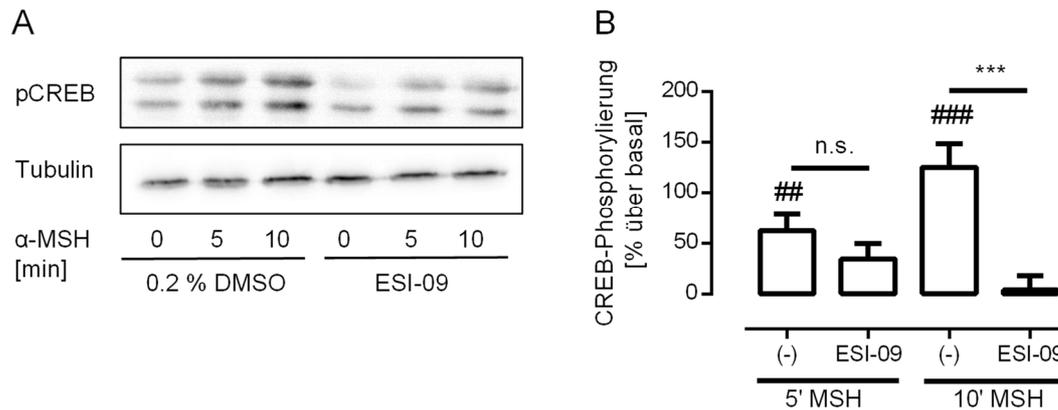
mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 5  $\mu$ M KT5720 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert.

(A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbande) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus vier unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* angewandt (n.s.).

### 5.11.2 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von EPAC

Da die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung unabhängig von PKA war, wurde anschließend untersucht, ob die Phosphorylierung EPAC-vermittelt war. Dafür wurden Zellen mit ESI-09 vorinkubiert und mit  $\alpha$ -MSH stimuliert. Ein repräsentativ dargestellter Western Blot zeigt eine zeitabhängige CREB-Phosphorylierung am Serin 133 nach der Stimulation der Zellen mit  $\alpha$ -MSH, im Vergleich dazu wiesen mit ESI-09 behandelte Zellen eine deutlich schwächere Phosphorylierung auf (Abbildung 5.35A). Die Proteinbanden nach 5 und 10 min Stimulationszeit mit  $\alpha$ -MSH in Gegenwart von ESI-09 unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Stärke, verglichen mit dem Basalwert der Zellen. Nach 5 min Stimulation mit  $\alpha$ -MSH lag die CREB-Phosphorylierung der Zellen bei  $62 \pm 16$  %, durch ESI-09 wurde diese Phosphorylierung auf  $34 \pm 15$  % inhibiert (Abbildung 5.35B). Deutlich stärker war der Effekt nach 10 min Stimulationszeit mit  $\alpha$ -MSH, da durch die Inhibition von EPAC der Phosphorylierungsstatus von  $126 \pm 23$  % signifikant auf  $4 \pm 14$  % inhibiert wurde und somit fast zu einer vollständigen Reduktion des Signals führte. Die Ergebnisse aus Abbildung 5.34 und Abbildung 5.35 zeigen zusammenfassend, dass die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung PKA-unabhängig, aber EPAC-abhängig war.



#### Abbildung 5.35: $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist von EPAC abhängig

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 20  $\mu$ M ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert.

(A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus acht unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

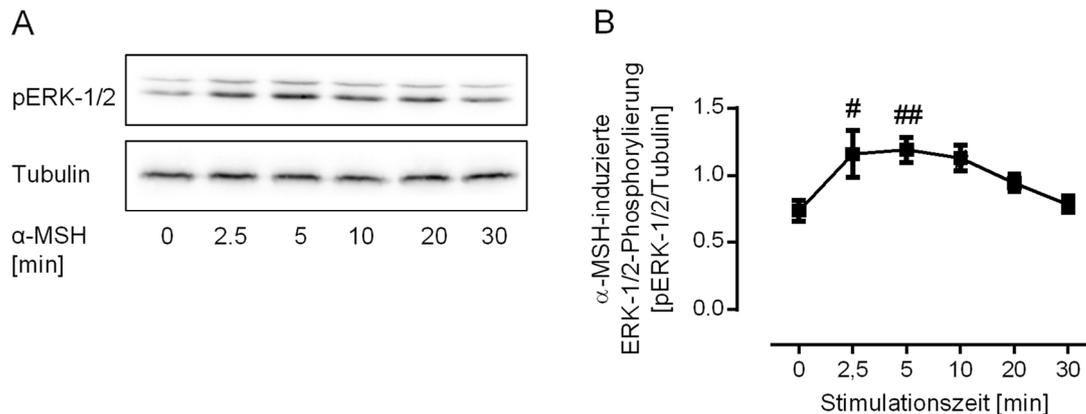
### 5.12 Rolle der ERK-1/2 bei der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung

Da die Rolle der PKA bei der CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivierung über den MC4R in mHypoA-2/10-CRE-Zellen entgegen bisheriger Annahmen eher gering ausfiel, wurde mittels weiterer Versuche geklärt, welche Kinase die molekulare Verbindung zwischen EPAC und CREB darstellen könnte. Für diese Funktion wurden die Kinasen ERK-1/2 in Betracht gezogen. Für ERK-1/2 wurde in diversen zellulären Prozessen eine Verbindung mit CREB beschrieben (OBRIETAN *et al.* 2002; SONG *et al.* 2005; HA UND REDMOND 2008). Zusätzlich gab es beschriebene Zusammenhänge zwischen ERK-1/2 und MC4R-vermittelten Signalwegen und/oder  $\alpha$ -MSH (SUTTON *et al.* 2005; DAMM *et al.* 2012).

#### 5.12.1 $\alpha$ -MSH-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung

Zur Untersuchung der potentiellen Funktion von ERK-1/2 in der MC4R/EPAC/CREB-Signalkaskade wurde geprüft, ob  $\alpha$ -MSH in mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine Phosphorylierung von ERK-1/2 am Tyrosin 204 induziert, welche mit einer Aktivierung der MEK-1/2 einhergeht (ROSKOSKI 2012). Hierfür wurde eine Kinetik erstellt und mittels Western Blot analysiert. Abbildung 5.36A zeigt einen repräsentativen Western Blot mit den Proteinbanden von pERK-1/2 (oben) und Tubulin als Ladekontrolle (unten). Nach nur 2,5 min Stimulationszeit unterschied sich die Proteinbande von pERK-1/2 in ihrer Stärke deutlich von der

Bande zum Zeitpunkt 0.  $\alpha$ -MSH führte zu einer ERK-1/2-Phosphorylierung im Intervall von 2,5 bis 20 min Stimulationszeit. Die Quantifizierung der Western Blots zeigt, dass der Phosphorylierungsstatus von ERK-1/2 nach 2,5 min ( $1,2 \pm 0,2$ ) und nach 5 min ( $1,2 \pm 0,1$ ) gegenüber der Phosphorylierung unter nativen Bedingungen ( $0,7 \pm 0,1$ ) signifikant erhöht war (Abbildung 5.36B).



**Abbildung 5.36:  $\alpha$ -MSH-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

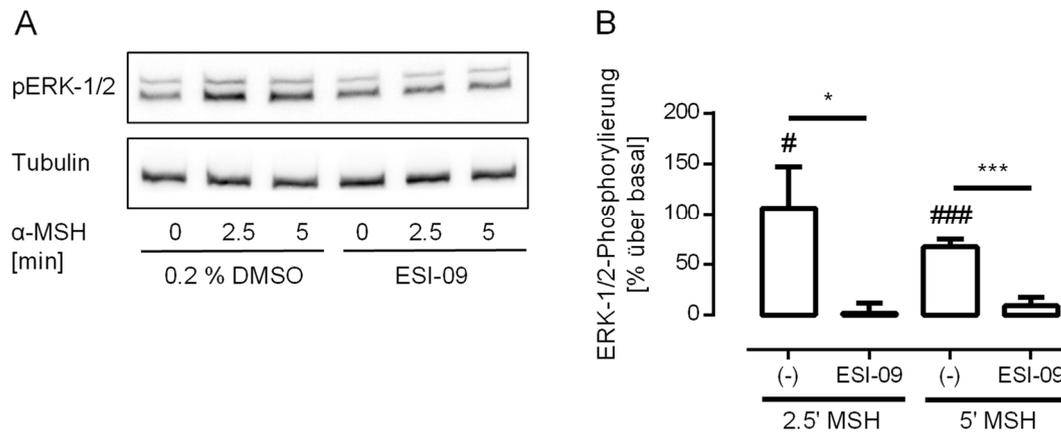
mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -MSH für 0, 2,5, 5, 10, 20 und 30 min stimuliert.

(A) Repräsentativer Western Blot für phosphorylierte ERK-1/2 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbanden).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus 13 unabhängigen Experimenten, dargestellt als Quotient  $\text{pERK-1/2/Tubulin} \pm \text{S.E.M.}$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

### 5.12.2 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung von EPAC

Zur Analyse, ob die ERK-1/2 in der Signalkaskade zwischen EPAC und CREB involviert sind, wurden Zellen in Gegenwart von ESI-09 bezüglich ihrer ERK-1/2-Phosphorylierung untersucht. Der repräsentativ abgebildete Western Blot zeigt, dass durch ESI-09 die  $\alpha$ -MSH-induzierte Phosphorylierung der ERK-1/2 nach 2,5 und 5 min Stimulationszeit schwächer war als ohne die Vorinkubation mit dem Inhibitor (Abbildung 5.37A). Die ERK-1/2-Phosphorylierung wurde nach 2,5 min von  $107 \pm 41 \%$  auf  $2 \pm 10 \%$  signifikant inhibiert, ebenso nach 5 min Stimulationszeit von  $67 \pm 8 \%$  auf  $9 \pm 9 \%$  über der basalen Phosphorylierung der Zellen (Abbildung 5.37B). Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Phosphorylierung der Kinasen ERK-1/2 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen war vollständig von EPAC abhängig.



**Abbildung 5.37:  $\alpha$ -MSH-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung ist EPAC-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 20  $\mu$ M ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert.

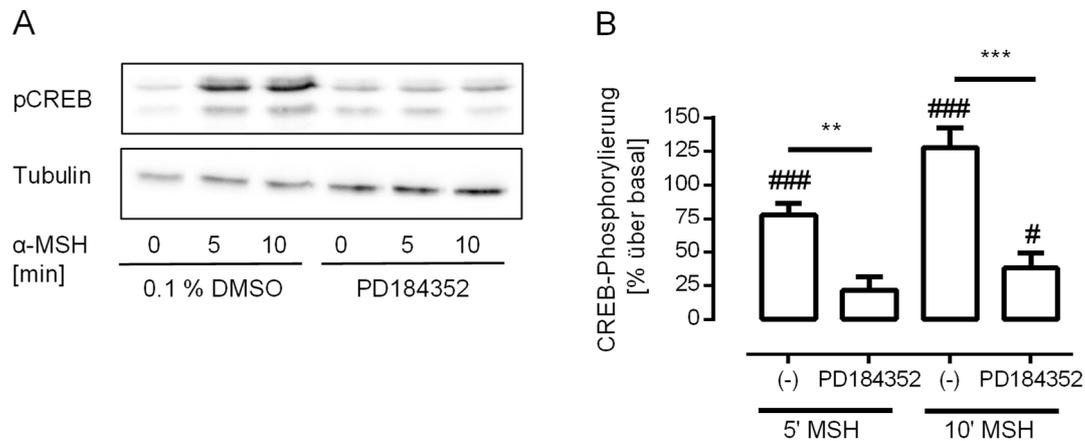
(A) Repräsentativer Western Blot für phosphorylierte ERK-1/2 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus sieben unabhängigen Experimenten, dargestellt als ERK-1/2-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

### 5.12.3 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2

Da die  $\alpha$ -MSH-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung EPAC-abhängig war, wurde der Frage nachgegangen, ob die ERK-1/2 die CREB-modulierende Kinase war und theoretisch als Verbindung zwischen EPAC und CREB fungieren konnte. Um dies zu untersuchen, wurde der MEK-1/2-Inhibitor PD184352 verwendet, der indirekt als ERK-1/2-Inhibitor dient, da die ERK-1/2 das einzige bekannte physiologische Substrat für die MEK-1/2 darstellt (ROSKOSKI 2012). Im Anschluss wurde der Effekt von PD184352 auf die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung untersucht. Die Inhibition der MEK-1/2 durch PD184352 führte dazu, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung nach 5 und 10 min schwächer war im Vergleich zur induzierten CREB-Phosphorylierung ohne Inhibitor (Abbildung 5.38A). Die Quantifizierung der Western Blots bestätigt diese Aussage (Abbildung 5.38B). Zellen, die nur mit der Lösungsmittelkontrolle behandelt wurden, zeigten nach 5 min Stimulation eine Phosphorylierung von CREB von  $78 \pm 9$  %. Diese Phosphorylierung wurde durch PD184352 auf  $22 \pm 10$  % signifikant inhibiert. Nach 10 min Stimulation fiel der Phosphorylierungsstatus durch die Inhibition von ERK-1/2 von  $128 \pm 15$  % auf  $38 \pm 11$  % über dem Basalwert ab. Somit war die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ERK-1/2-

abhängig und es bestand die Vermutung, dass die ERK-1/2 die verbindenden Kinasen zwischen EPAC und CREB darstellen könnten.



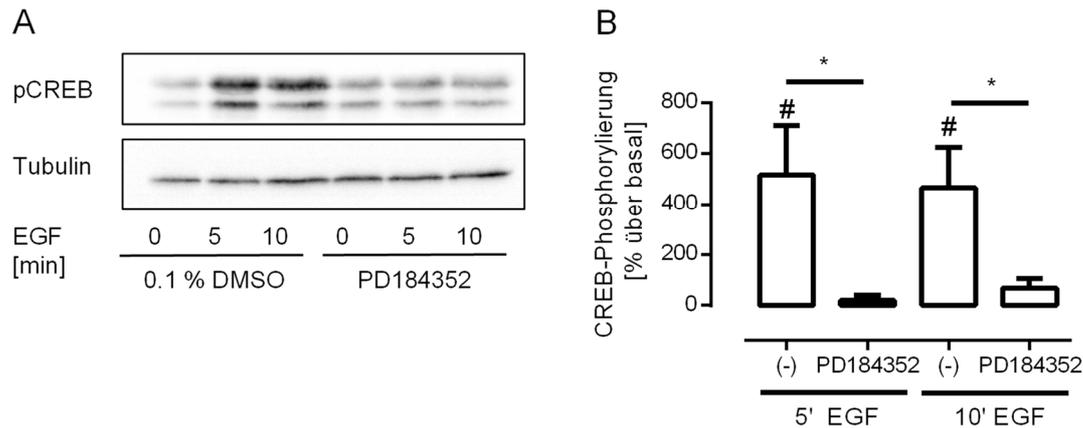
**Abbildung 5.38: α-MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10 μM PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 1 μM α-MSH stimuliert. (A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus sechs unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

#### 5.12.4 Abhängigkeit der EGF-, IGF- und NGF-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2

Sowohl EGF als auch IGF und NGF konnten in mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine Phosphorylierung von CREB induzieren (Abbildung 5.13D–F). Da es keine Befunde über eine CREB-Phosphorylierung durch Wachstumsfaktoren im PVN-Neuronen-ähnlichen Zellmodell gab, war es ein Ziel dieser Arbeit die zuständige Kinase zu identifizieren. In anderen untersuchten Systemen waren unterschiedliche Kinasen für die Phosphorylierung von CREB durch Wachstumsfaktoren verantwortlich, darunter auch die ERK-1/2 (XING *et al.* 1998; PUGAZHENTHI *et al.* 1999; SWARTHOUT *et al.* 2002; JOHANNESSEN *et al.* 2004). In Abbildung 5.39A ist zu sehen, dass die EGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung nach 5 und nach 10 min gegenüber der basalen Phosphorylierung deutlich verstärkt war und dass diese Phosphorylierung in Anwesenheit von PD184352 unterdrückt wurde. Die EGF-induzierte Phosphorylierung wurde nach 5 min von  $515 \pm 194$  % durch PD184352 auf  $20 \pm 20$  % signifikant inhibiert (Abbildung 5.39B). Nach 10 min Stimulation erfolgte eine signifikante Reduktion von  $467 \pm 158$  % auf  $69 \pm 38$  %.

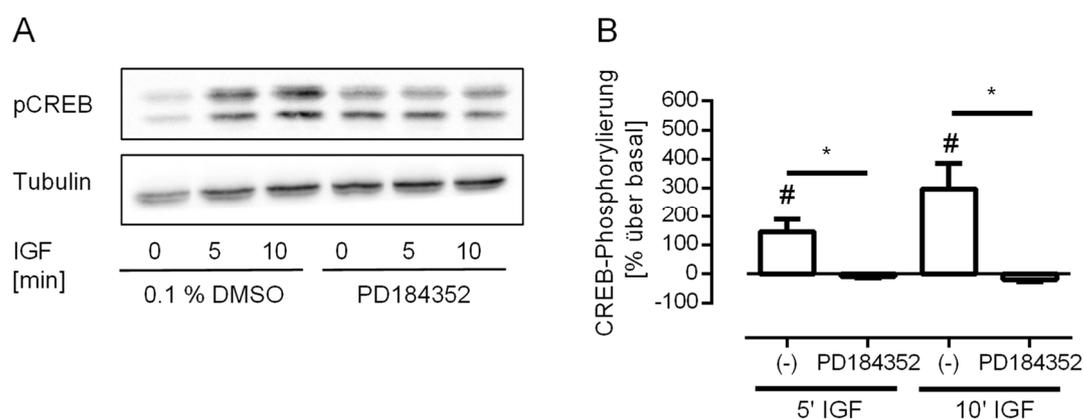


**Abbildung 5.39: EGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml EGF stimuliert. (A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus sieben unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass die ERK-1/2 auch für IGF und NGF die CREB-modulierenden Kinasen in mHypoA-2/10-CRE-Zellen waren. Die Phosphorylierung von CREB nach 5 und 10 min Stimulation mit IGF konnte durch PD184352 sichtbar abgeschwächt werden (Abbildung 5.40A). Die Phosphorylierung nach 5 min Stimulation mit IGF wurde durch PD184352 signifikant von  $147 \pm 45$  % auf  $-7 \pm 5$  % inhibiert und nach 10 min erfolgte eine signifikante Reduktion von  $297 \pm 88$  % auf  $-19 \pm 8$  % (Abbildung 5.40B).

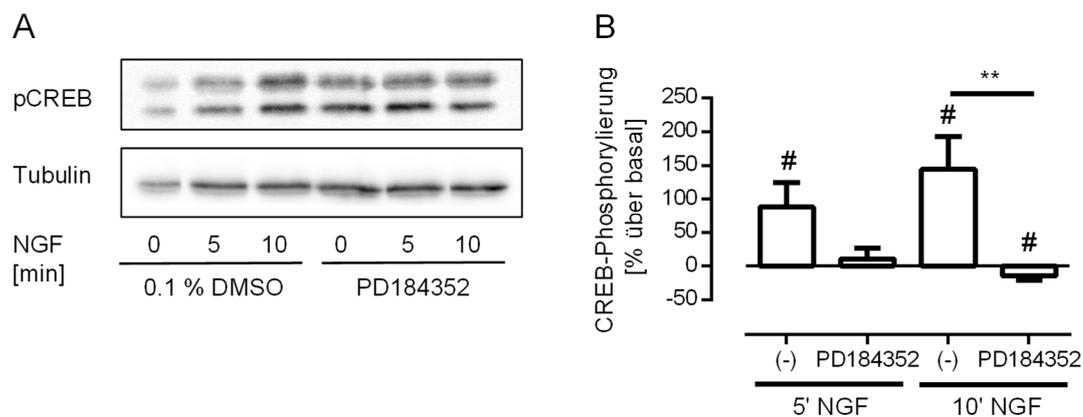


**Abbildung 5.40: IGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml IGF stimuliert. (A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus vier unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

Auch für den Wachstumsfaktor NGF ist ein repräsentativ ausgewählter Western Blot und die Quantifizierung der gesamten Western Blots aufgeführt (Abbildung 5.41). Die Proteinbanden von CREB waren nach der Vorinkubation mit PD184352 und der Stimulation mit NGF schwächer, wenn man diese mit den Proteinbanden der mit DMSO vorinkubierten Zellen vergleicht (Abbildung 5.41A). Die Phosphorylierung von CREB durch NGF nach 10 min Stimulation wurde durch PD184352 signifikant von  $145 \pm 48 \%$  auf  $-15 \pm 6 \%$  vermindert (Abbildung 5.41B).



**Abbildung 5.41: NGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig.**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  PD184352 vorinkubiert und anschließend mit  $10 \text{ ng/ml}$  NGF stimuliert. (A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

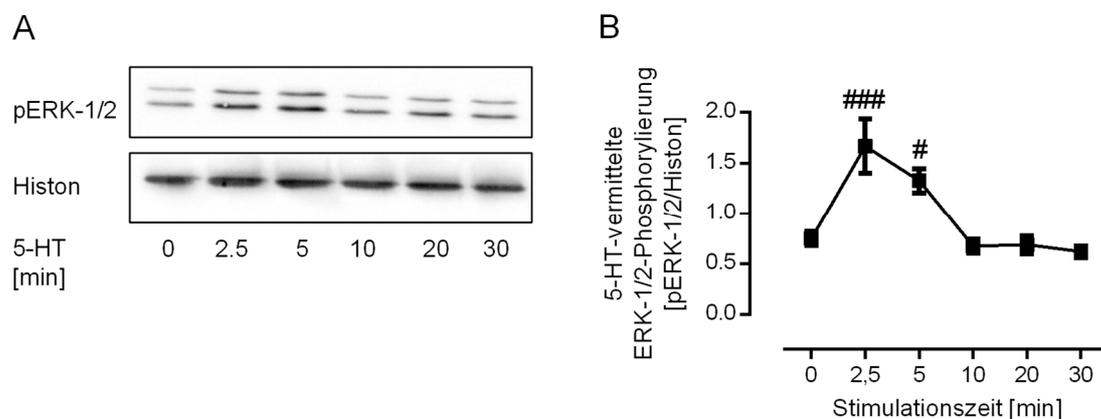
(B) Quantifizierung der Western Blots aus sieben unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

Mit Hilfe von Abbildung 5.39, Abbildung 5.40 und Abbildung 5.41 konnte gezeigt werden, dass ERK-1/2 für die EGF-, die IGF- und die NGF- ebenso wie für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung die regulierenden Kinasen darstellten. Obwohl die Phosphorylierung von CREB durch alle vier Liganden über ERK-1/2 moduliert wurde, wurde jedoch nur durch  $\alpha$ -MSH die CRE-Reporteraktivität erhöht (Abbildung 5.14).

### 5.12.5 Abhängigkeit der 5-HT-vermittelten CREB-Phosphorylierung von ERK-1/2

Auch durch den Neurotransmitter 5-HT wurde CREB in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen phosphoryliert, wobei aber keine CRE-Reporteraktivierung induziert wurde (Abbildung 5.13C und Abbildung 5.14). Als CREB-modulierte Kinasen der 5-HT Signalkaskade in mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurde ebenfalls ERK-1/2 in Betracht bezogen, da der ERK-1/2 bereits

bei der  $\alpha$ -MSH-, EGF-, IGF- und NGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung in diesem Zellsystem eine zentrale Bedeutung zukam und durch 5-HT die ERK-1/2 phosphoryliert wurde. Im dargestellten Western Blot waren nach 2,5 und 5 min Stimulationszeit die Proteinbanden von pERK-1/2 deutlich stärker, verglichen mit den Banden der anderen Zeitpunkte (Abbildung 5.42A). Die Quantifizierung bestätigte die signifikante Erhöhung der ERK-1/2-Phosphorylierung durch die Stimulation der Zellen mit 5-HT von  $0,8 \pm 0,1$  nach 2,5 min auf  $1,7 \pm 0,3$  und nach 5 min auf  $1,3 \pm 0,1$  (Abbildung 5.42B).



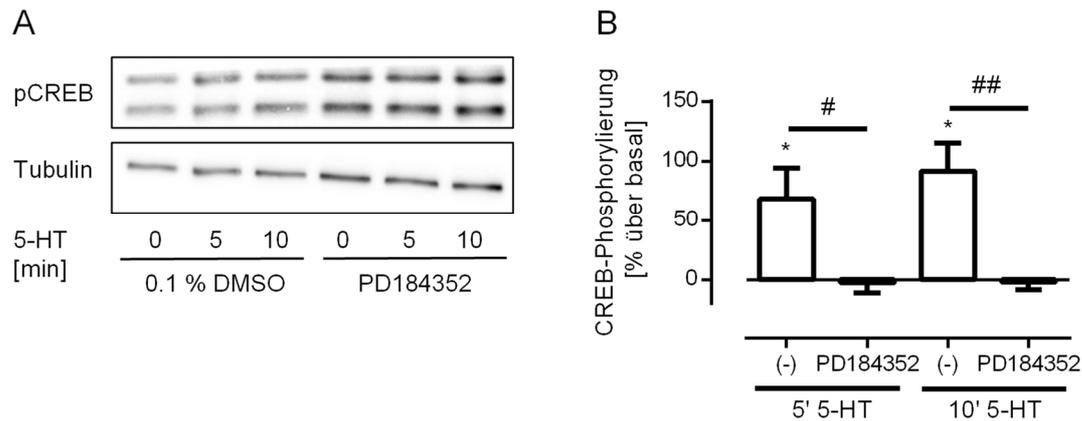
**Abbildung 5.42: 5-HT-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit  $1 \mu\text{M}$  5-HT für verschiedene Zeiten stimuliert.

(A) Repräsentativer Western Blot für phosphorylierte ERK-1/2 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Histon (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus fünf unabhängigen Experimenten, dargestellt als Quotient  $\text{pERK-1/2/Histon} \pm \text{S.E.M.}$ . Signifikante Unterschiede wurden mittels ANOVA und anschließendem Post-hoc-Test nach Dunnett ermittelt.

Wurde nun ERK-1/2 indirekt mittels PD184352 inhibiert, so war die 5-HT-induzierte Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle vermindert (Abbildung 5.43A). Durch die densitometrische Auswertung der Western Blots wurde bestätigt, dass die Erhöhung des Phosphorylierungsstatus von CREB durch 5-HT nach der Inhibition der ERK-1/2 signifikant reduziert war (Abbildung 5.43B). ERK-1/2 war demzufolge auch für die 5-HT-induzierte CREB-Phosphorylierung verantwortlich, was jedoch nicht in Korrelation mit einer Aktivierung von CRE-abhängiger Genexpression stand (Abbildung 5.15).



#### Abbildung 5.43: 5-HT-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig

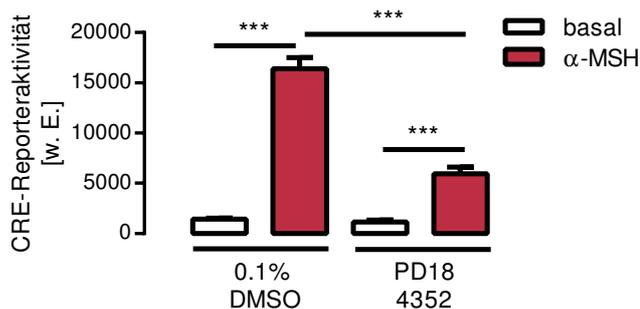
mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M 5-HT stimuliert.

(A) Repräsentativer Western Blot für phosphoryliertes CREB am Serin 133 (obere Proteinbanden) mit der Ladekontrolle Tubulin (untere Proteinbande).

(B) Quantifizierung der Western Blots aus fünf unabhängigen Experimenten, dargestellt als CREB-Phosphorylierung in Prozent über der basalen Phosphorylierung. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

#### 5.12.6 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von ERK-1/2

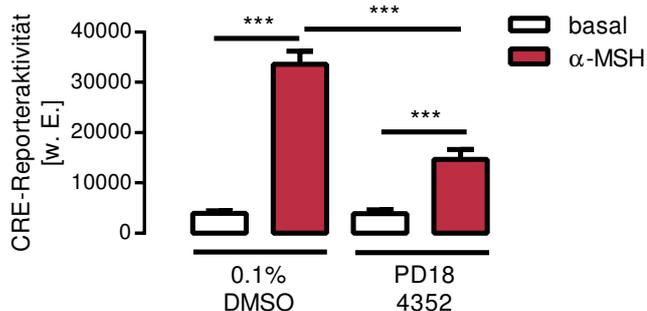
Aufgrund der zentralen Funktion von ERK-1/2 als regulierende Kinasen der CREB-Phosphorylierung von  $\alpha$ -MSH, 5-HT und den Wachstumsfaktoren, wurde analysiert, ob sich diese Rolle von ERK-1/2 bei der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung widerspiegelt. Dafür wurde die CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen nach Vorinkubation mit PD184352 und anschließender Stimulation mit  $\alpha$ -MSH gemessen (Abbildung 5.44). Die CRE-Reportermessungen zeigten zunächst, dass sich die Reporteraktivität der stimulierten Zellen signifikant von der Lösungsmittel- bzw. Inhibitorkontrolle unterschieden. In Gegenwart der Lösungsmittelkontrolle erhöhte sich die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivität vom Wert  $1455 \pm 77$  auf  $16374 \pm 1151$ , in Anwesenheit von PD184352 stieg die Reporteraktivität nach Stimulation mit  $\alpha$ -MSH von  $1166 \pm 158$  auf  $5948 \pm 675$  an. Das  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Signal wurde durch den MEK-Inhibitor von  $16374 \pm 1151$  auf  $5948 \pm 675$  hochsignifikant inhibiert.



**Abbildung 5.44: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die Summe der Daten aus zehn unabhängigen Experimenten als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Zur Feststellung, ob es sich um einen zelltypspezifischen Effekt handelte, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung ERK-1/2-abhängig war, wurde der gleiche Versuchsansatz mit HEK-293-MC4R-Zellen durchgeführt. Vergleichbar mit den mHypoA-2/10-CRE-Zellen war auch in den HEK-293-MC4R-Zellen die durch den Liganden  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität gegenüber der jeweiligen basalen Bedingung signifikant erhöht (Abbildung 5.45). Durch die Inhibition der ERK-1/2 durch PD184352 wurde das  $\alpha$ -MSH-induzierte Signal signifikant von  $33617 \pm 2596$  auf  $14631 \pm 2029$  reduziert.

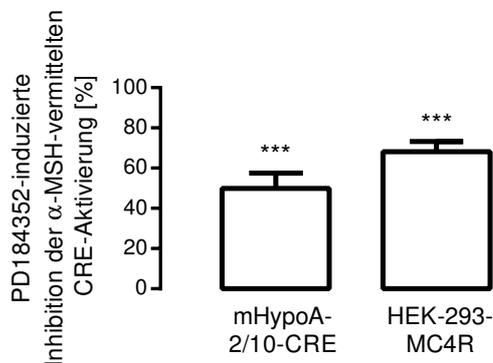


**Abbildung 5.45: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352 in HEK-293-MC4R-Zellen**

HEK-293-MC4R-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die Summe der Daten aus fünf unabhängigen Experimenten als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Die Quantifizierung der erhobenen Daten aus beiden Zelllinien (Abbildung 5.44 und Abbildung 5.45) ergab eine signifikante Inhibition des  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Signals durch PD184352 von  $50 \pm 8$  % in mHypoA-2/10-CRE-Zellen und von  $68 \pm 5$  % in HEK-293-

MC4R-Zellen (Abbildung 5.46). In beiden Zelllinien war die MC4R-vermittelte CRE-Reporteraktivierung von den Kinasen ERK-1/2 abhängig.



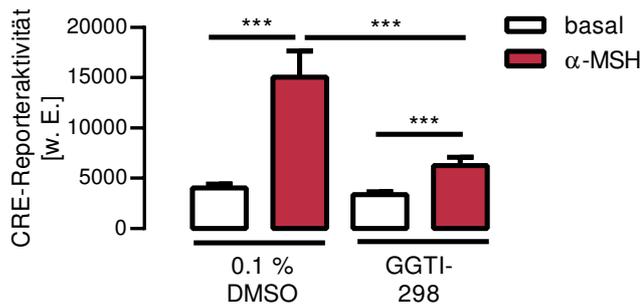
**Abbildung 5.46: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352 in mHypoA-2/10-CRE und HEK-293-MC4R-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE- und HEK-293-MC4R-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M PD184352 vorinkubiert und mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung + S.E.M. aus zehn (mHypoA-2/10-CRE) und fünf (HEK-293-MC4R) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten die ERK-1/2 als diejenigen Kinasen identifiziert werden, die als Verbindung zwischen EPAC und CREB sowie zwischen EPAC und CRE in der  $\alpha$ -MSH-induzierten Signalkaskade fungierten.

### 5.13 Abhängigkeit der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung von Rap1A

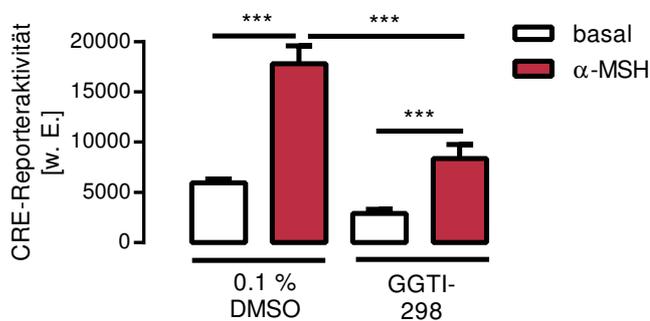
Die GTPase Rap1 gilt als Substrat von EPAC und wird durch den Austausch von GDP gegen GTP aktiviert (DE ROOIJ *et al.* 1998; KAWASAKI *et al.* 1998). Durch die Verwendung des Rap1A-Inhibitors GGTI-298 (MCGUIRE *et al.* 1996) wurde analysiert, ob Rap1A in mHypoA-2/10-CRE-Zellen durch  $\alpha$ -MSH aktiviert werden konnte und in diese Signalkaskade involviert war. Das  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Signal war gegenüber der jeweiligen basalen Reporteraktivität (Lösungsmittelkontrolle oder GGTI-298) signifikant erhöht. Die Inhibition von Rap1A durch GGTI-298 führte zu einer signifikant verminderten Signalstärke von  $\alpha$ -MSH in mHypoA-2/10-CRE-Zellen. Das Signal wurde von  $15066 \pm 2592$  auf  $6269 \pm 833$  vermindert.



**Abbildung 5.47: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A-Inhibitor GGTI-298 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M GGTI-298 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die Summe der Daten aus sechs unabhängigen Experimenten als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Die Inhibition von Rap1A resultierte auch in HEK-293-MC4R-Zellen in vergleichbaren Ergebnissen. Die  $\alpha$ -MSH-induzierte Reporteraktivität war in den HEK-293-MC4R-Zellen unabhängig von der jeweiligen Vorinkubation mit DMSO oder GGTI-298 gegenüber der basalen Kontrolle signifikant erhöht (Abbildung 5.48). Das  $\alpha$ -MSH-vermittelte Signal wurde durch GGTI-298 von  $17823 \pm 1761$  auf  $8394 \pm 1385$  signifikant inhibiert.

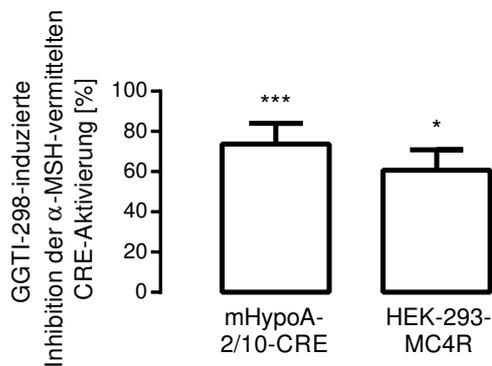


**Abbildung 5.48: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A-Inhibitor GGTI-298 in HEK-293-MC4R-Zellen**

HEK-293-MC4R-Zellen wurden für 48 h mit 10  $\mu$ M GGTI-298 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die Summe der Daten aus drei unabhängigen Experimenten als Mittelwert + S.E.M. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

In beiden Zelllinien resultierte die Inhibition von Rap1A durch GGTI-298 in einer signifikanten Inhibition des  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Signals. Die Quantifizierung der Reporter-messungen zeigt, dass das Signal durch GGTI-298 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen um  $74 \pm 10$  % und in HEK-MC4R-Zellen um  $61 \pm 10$  % reduziert wurde (Abbildung 5.49). Aus diesen

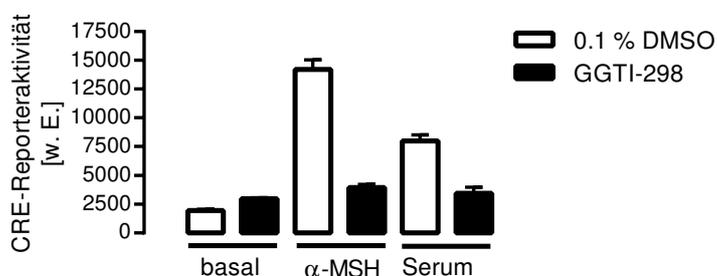
Ergebnissen hätte man darauf schließen können, dass in beiden untersuchten Zelllinien die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung Rap1A-abhängig war.



**Abbildung 5.49: Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A Inhibitor GGTI-298 in mHypoA-2/10-CRE- und HEK-293-MC4R-Zellen**

mHypoA-2/10-CRE- und HEK-293-MC4R-Zellen wurden mit 10  $\mu$ M GGTI-298 vorinkubiert und mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH stimuliert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung + S.E.M. aus mindestens sechs (mHypoA-2/10-CRE) und drei (HEK-293-MC4R) unabhängigen Experimenten. Die Prüfung der Werte auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels Einstichproben-t-Test.

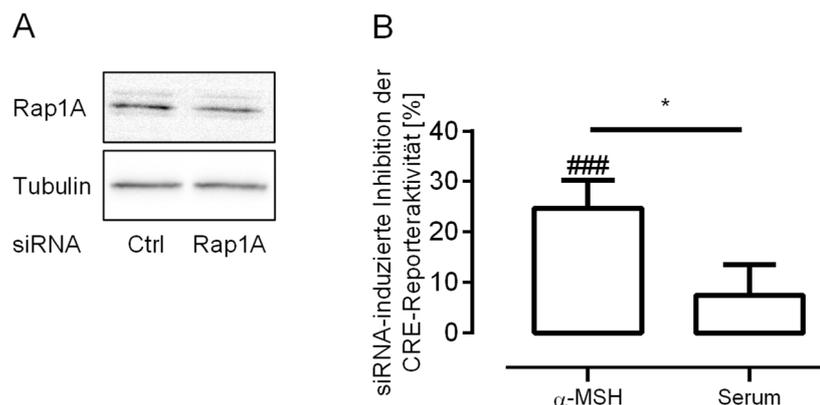
Die erhobenen Daten mit dem Rap1A-Inhibitor sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten (Abbildung 5.47 bis Abbildung 5.49). Anhand eines Beispiels wird deutlich, dass GGTI-298 nicht nur die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung inhibierte, sondern auch das Signal, welches durch Serum induziert wurde (Abbildung 5.50). Da die Serum-induzierte CRE-Reporteraktivierung zum Nachweis der spezifischen Wirkung von ESI-09 und HJC0197 (Abbildung 5.30) verwendet wurde und beide EPAC-Inhibitoren keinen Einfluss auf das Signal hatten, ließ sich für GGTI-298 nicht ausschließen, dass die Inhibition der CRE-Reporteraktivität auf unspezifischen Effekten beruhte.



**Abbildung 5.50: Repräsentatives Beispiel für die GGTI-298 vermittelte Inhibition der  $\alpha$ -MSH- und Serum-induzierten CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

Zellen wurden mit 10  $\mu$ M GGTI-298 vorinkubiert und anschließend mit 1  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH oder 20 % Serum stimuliert.

Neben der Verwendung chemischer Inhibitoren können Zielstrukturen durch die Transfektion von Zellen mit spezifischen siRNAs inhibiert werden (MEISTER UND TUSCHL 2004). Daher wurden mHypoA-2/10-CRE-Zellen mittels Elektroporation mit Rap1A- bzw. Kontroll-siRNA (Ctrl) transfiziert, um Effekte von Rap1A auf die  $\alpha$ -MSH- und Serum-vermittelte CRE-Reporteraktivität zu untersuchen. In einem repräsentativ abgebildeten Western Blot ist der Einfluss der siRNA auf die Proteinexpression von Rap1A sichtbar (Abbildung 5.51A). Die optische und densitometrische Auswertung zeigten eine Abnahme der Rap1A-Proteinexpression um etwa 20 % nach der Transfektion mit Rap1A-siRNA im Vergleich zur Kontroll-siRNA. Trotz Variation der Transfektionsmethode durch Veränderung der transfizierten siRNA-Menge, Zellzahl, Anzahl der Pulse und Pulsstärke konnte die Knock-Down-Effizienz nicht erhöht werden. Mit Rap1A- bzw. Kontroll-siRNA transfizierte Zellen wurden mit  $\alpha$ -MSH oder Serum stimuliert und die CRE-Reporteraktivität wurde gemessen. Es wurde die prozentuale Inhibition der CRE-Reporteraktivität der mit Rap1A-siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen berechnet (Abbildung 5.51B). Die  $\alpha$ -MSH-induzierte Reporteraktivität wurde signifikant um  $25 \pm 6$  % reduziert, das Serum-vermittelte Signal um  $8 \pm 6$  %. Die prozentualen Inhibitionen von  $\alpha$ -MSH und Serum unterschieden sich signifikant voneinander.



**Abbildung 5.51: Effekte von siRNA gegen Rap1A auf die  $\alpha$ -MSH- und Serum-induzierte CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen**

Zellen wurden mit 50 nM siRNA gegen Rap1A- oder mit Kontroll-siRNA (Ctrl) elektroporiert.

(A) Repräsentativer Rap1A-Proteinnachweis mittels Western Blot mit der Proteinbande von Rap1A (oben) und der Ladekontrolle Tubulin (unten).

(B) Durch Rap1A-siRNA-induzierte Inhibition der  $\alpha$ -MSH- und Serum-vermittelten CRE-Reporteraktivität, dargestellt als Mittelwert + S.E.M. aus vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

Die Reduktion der Rap1A-Proteinexpression durch siRNA um etwa 20 % (Abbildung 5.51A) spiegelte sich in einer Abnahme der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivität von etwa 25 % wider (Abbildung 5.51B). Die Daten in Abbildung 5.51 sprachen dafür, dass Rap1A in die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung involviert war, während die Serum-vermittelte CRE-Reporteraktivierung Rap1A-unabhängig war.

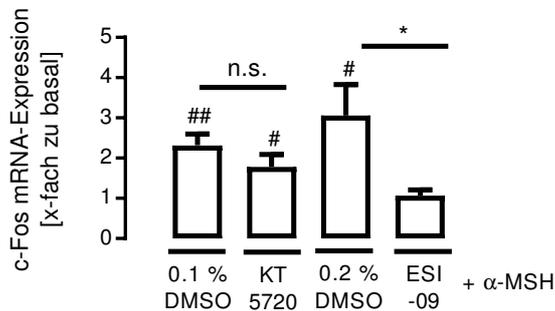
#### 5.14 Bedeutung von PKA und EPAC für die $\alpha$ -MSH-induzierte Genexpression in mHypoA-2/10-CRE-Zellen

Zur Einschätzung der physiologischen Relevanz der neu entschlüsselten MC4R-vermittelten CREB/CRE-Signalkaskade war ein weiterer Aspekt dieser Arbeit die Rolle von PKA und EPAC bei der Genexpression in hypothalamischen Zellen zu klären. Zur Untersuchung wurden zwei CREB-abhängige Gene ausgewählt, welche eine CRE-Sequenz in ihrem Promoter besitzen und für die bereits gezeigt wurde, dass ihre Expression durch MC4R induziert wird. Einerseits wurde der Fokus auf das Protoonkogen c-Fos gerichtet, andererseits auf das physiologisch relevantere TRH (BERKOWITZ *et al.* 1989; FISCH *et al.* 1989; HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002; RAMIREZ *et al.* 2015). Mittels spezifischer Primer für c-Fos, TRH und das Haushaltsgen Aktin wurde via qPCR die  $\alpha$ -MSH-induzierte Genexpression in mHypoA-2/10-CRE-Zellen analysiert.

##### 5.14.1 c-Fos-mRNA-Expression

Es ist die c-Fos-mRNA-Expression nach 20 min Stimulation mit  $\alpha$ -MSH als x-faches zur basalen Expression mit Lösungsmittelkontrolle dargestellt (Abbildung 5.52). Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte c-Fos-Induktion lag für 0,1 % DMSO bei  $2,3 \pm 0,3$  und für 0,2 % DMSO bei  $3,1 \pm 0,8$  im Vergleich zur basalen c-Fos-Expression, welche als 1 definiert wurde. Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Genexpression war im Gegensatz zur basalen Expression signifikant erhöht. Abbildung 5.52 zeigt zusätzlich, welche Effekte die Inhibition der PKA durch KT5720 und die Inhibition von EPAC durch ESI-09 auf die c-Fos-mRNA-Expression hatten. Durch KT5720 wurde die  $\alpha$ -MSH induzierte c-Fos-Expression nicht signifikant inhibiert und erreichte einen Wert von  $1,8 \pm 0,3$ . ESI-09 führte zu einer signifikanten Reduktion des Signals auf  $1,1 \pm 0,1$ , welches sich nicht mehr signifikant von der basalen Expression unterschied. Die  $\alpha$ -

MSH-induzierte Genexpression von c-Fos in mHypoA-2/10-CRE-Zellen war PKA-unabhängig und EPAC-abhängig.

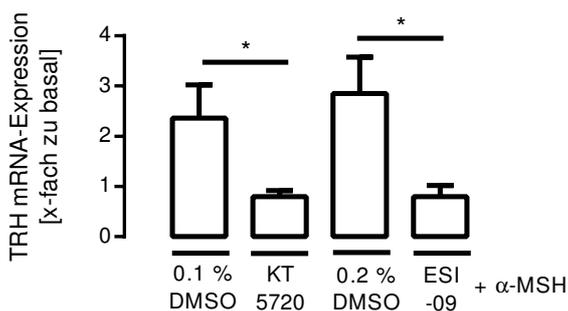


**Abbildung 5.52: α-MSH-induzierte mRNA-Expression von c-Fos ist PKA-unabhängig und EPAC-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 5 μM KT5720 oder 20 μM ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit α-MSH stimuliert. Dargestellt ist die α-MSH-induzierte c-Fos-mRNA-Expression als x-faches zur basalen Genexpression, die dem Wert 1 entspricht. Es wurden 5 unabhängige cDNAs (für jede Bedingung) zweimal in Form von Triplikaten analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mittels Einstichproben-t-Test (#) ermittelt, beim Vergleich zweier Bedingungen wurde ein ungepaarter *Student's t-test* (\*) angewandt.

#### 5.14.2 TRH-mRNA-Expression

Neben der c-Fos-mRNA-Expression wurde auch die Genexpression von TRH analysiert. Im Gegensatz zur c-Fos Induktion wurde die α-MSH-induzierte TRH-mRNA-Expression sowohl durch KT5720 von  $2,4 \pm 0,7$  auf  $0,8 \pm 0,1$  als auch durch ESI-09 von  $2,9 \pm 0,7$  auf  $0,8 \pm 0,2$  signifikant vermindert (Abbildung 5.53). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die α-MSH-vermittelte Expression von TRH sowohl von PKA als auch von EPAC abhängig war.



**Abbildung 5.53: α-MSH-induzierte mRNA-Expression von TRH ist PKA-abhängig und EPAC-abhängig**

mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurden mit 5 μM KT5720 oder 20 μM ESI-09 vorinkubiert und anschließend mit α-MSH stimuliert. Dargestellt ist die α-MSH-induzierte TRH-mRNA-Expression als x-faches zur basalen Genexpression, die dem Wert 1 entspricht. Es wurden 5 unabhängige cDNAs (für jede Bedingung) zweimal in Form von Triplikaten analysiert. Die Prüfung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede erfolgte durch einen ungepaarten *Student's t-test*.

Da die CRE-Reporteraktivierung über den MC4R von PKA unabhängig war, konnte man daraus schließen, dass bei der TRH-Expression auch CREB/CRE-unabhängige Signalwege

eine Rolle gespielt haben könnten. Da der TRH Promoter neben der CRE-Sequenzen auch Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren STAT-3 und SP-1 enthält, könnten diese möglicherweise über PKA aktiviert werden (HARRIS *et al.* 2001; DIAZ-GALLARDO *et al.* 2010).

## 6 Diskussion

### 6.1 $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus

Dem Peptidhormon  $\alpha$ -MSH wird bei der Regulation des Appetits und der Aufrechterhaltung der Energiehomöostase im Hypothalamus eine wichtige Rolle zugeordnet. Dabei steht die CREB-abhängige Genexpression im Fokus (FEKETE *et al.* 2000a; HARRIS *et al.* 2001). Für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-abhängige Genexpression wurde bislang folgende Signalkaskade suggeriert (Abbildung 3.6):  $\alpha$ -MSH aktiviert den MC4R und es kommt zu einer cAMP-abhängigen Aktivierung der PKA. Über die PKA wird CREB am Serin 133 phosphoryliert und die Expression CREB-abhängiger Gene wie TRH induziert (LECHAN UND FEKETE 2006). Obwohl dieser Signalkaskade eine wichtige physiologische Bedeutung bei der Appetitregulation zugeordnet wurde, fiel bei genauerer Analyse auf, dass nur bestimmte Abschnitte und Zusammenhänge des Signalwegs experimentell gezeigt wurden und für viele Annahmen jegliche experimentelle Bestätigung fehlte. Es wurde für den Hypothalamus in TRH-Neuronen und im rekombinanten Zellmodell gezeigt, dass  $\alpha$ -MSH eine CREB-Phosphorylierung induzierte (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003). Es fiel auf, dass zwischen der Phosphorylierung von CREB und einer Aktivierung von CREB und CRE oftmals nicht differenziert wurde, obwohl vielseitig diskutiert worden ist, ob eine CREB-Phosphorylierung für eine Aktivierung ausreichend ist (LONZE UND GINTY 2002; JOHANNESSEN *et al.* 2004; CARUSO *et al.* 2010). Überraschenderweise fehlen bislang jegliche Daten, die eine  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Aktivierung im PVN zeigen. Eine  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung über den MC4R wurde innerhalb der Arbeitsgruppe nur im Überexpressionssystem mit HEK-293-Zellen und in GT1-7-Zellen gezeigt (BREIT *et al.* 2006; DAMM *et al.* 2012). Es wurde jedoch postuliert, dass eine Phosphorylierung von CREB durch  $\alpha$ -MSH mit einer Expression von Genen, welche eine CRE-Sequenz in ihrem Promoter besitzen, einhergeht (LECHAN UND FEKETE 2006; CYR *et al.* 2013). Sehr häufig angenommen, aber durch keinerlei experimentellen Nachweis unterstützt wurde die Hypothese, dass die PKA für die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus verantwortlich ist (SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; LECHAN UND FEKETE 2006; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO

*et al.* 2012; CYR *et al.* 2013; RAMIREZ *et al.* 2015). Die Untersuchung der CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus gestaltete sich bislang als schwierig, da kein geeignetes Zellmodell zur Verfügung stand und die Analyse von CRE *in vivo* nur bedingt möglich war.

## 6.2 mHypoA-2/10-CRE-Zellen als geeignetes Zellsystem

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Aktivierung im Hypothalamus sollte im Rahmen dieser Arbeit ein geeignetes zelluläres Modellsystem charakterisiert werden. Bei den verwendeten mHypoA-2/10-Zellen handelt es sich um eine hypothalamische Zelllinie der Maus, welche von Belsham *et al.* generiert wurde (BELSHAM *et al.* 2009). Dabei ist es erstmals gelungen, Neuronen adulter Mäuse zu immortalisieren. Bis dahin war das nur bei embryonalen Mäusen möglich gewesen. Der Grund dafür ist, dass adulte Neuronen im Gegensatz zu den Neuronen in der Entwicklung nicht mehr proliferieren, was aber für die Immortalisierung mit Hilfe des SV40-T-Antigens notwendig ist. Durch den Einsatz von CNTF wurde der adulten Maus die Neurogenese der primären Neuronen des Hypothalamus induziert, woraufhin die Zellen immortalisiert und kultiviert werden konnten. Die entstandenen Klone wurden auf charakteristische Marker des Hypothalamus, wie Neuropeptide und Rezeptoren, untersucht (BELSHAM *et al.* 2009). Die Klone der mHypoA-Zellen ermöglichten erstmals die Untersuchung von Signalkaskaden in adulten Neuronen des Hypothalamus durch die Verwendung einer von Neuronen abstammenden Zelllinie. Bislang sind Experimente dieser Art nur in eingeschränkter Form *in vivo*, *ex vivo* oder *in situ* möglich gewesen (BELSHAM *et al.* 2004; BELSHAM *et al.* 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mHypoA-2/10-Zellen mit einem 6xCRE-Luc-Reporter-konstrukt transfiziert und selektioniert, um die Aktivierung und Rolle von CRE anhand eines Zellsystems untersuchen zu können. Erstmals publiziert wurde die daraus resultierende mHypoA-2/10-CRE-Zelllinie im Rahmen der Untersuchung der EGF-vermittelten Genexpression von SOCS-3 und TRH (BREIT *et al.* 2015). PVN-Neurone des Hypothalamus zeichnen sich durch den Besitz von MC3R, MC4R und YR aus (GERALD *et al.* 1996; KIM *et al.* 2000; SHUKLA *et al.* 2012). mHypoA-2/10-CRE-Zellen reagierten mit einer erhöhten cAMP-Akkumulation und einem Anstieg der CRE-Reporteraktivität auf die Stimulation mit  $\alpha$ -

MSH. Die Erhöhung der CRE-Reporteraktivität ließ sich durch den Einsatz von HS024 vermindern. In der eingesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  sprach die Inhibition durch HS024 für ein Vorhandensein von MCR in mHypoA-2/10-CRE-Zellen. Da die CRE-Aktivierung durch  $\gamma$ -MSH erst ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  signifikant war, ließen die Ergebnisse die Annahme zu, dass mHypoA-2/10-CRE-Zellen MC4R exprimieren. Die Stimulation der Zellen mit NPY führte zu einer Abnahme der FSK-vermittelten cAMP-Akkumulation, sowie zu einer Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten cAMP-Akkumulation und CRE-Reporteraktivität. Die Resultate sprechen für eine Expression von YR. Die untersuchte Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten cAMP-Akkumulation und CRE-Reporteraktivierung durch NPY trug dazu bei, weitere Mechanismen neben der NPY-induzierten Inhibition der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung aufzudecken, durch welche NPY den anorexigenen Stimulus  $\alpha$ -MSH im PVN regulieren kann (SARKAR UND LECHAN 2003). Durch die endogene Expression von MC4R und YR konnten die mHypoA-2/10-CRE-Zellen als PVN-Neuronen-ähnlich bezeichnet werden (GERALD *et al.* 1996; KIM *et al.* 2000; SHUKLA *et al.* 2012). Unterstützt wurde diese Annahme durch die gezeigte  $\alpha$ -MSH-induzierte Erhöhung der TRH-mRNA-Expression und durch die bereits publizierte Aktivierung eines TRH-Reportergenkonstrukts (BREIT *et al.* 2015). Dass mHypoA-2/10-CRE-Zellen eine gute Möglichkeit zur Untersuchung CREB/CRE-abhängiger Signalkaskaden im Hypothalamus darstellen, zeigte die Übereinstimmung mit Daten aus *in vivo* Studien. Die Stimulation der Zellen mit Glucose führte zu einer Erhöhung der CRE-Reporteraktivität, was mit einer Inhibition der Nahrungsaufnahme in Verbindung steht, dazu passend führte die intracerebroventrikuläre Gabe von Glucose zu einer verminderten Nahrungsaufnahme bei Mäusen (BADY *et al.* 2006; BREIT *et al.* 2016).

Neben der nachgewiesenen Expression von YR und MC4R in mHypoA-2/10-CRE-Zellen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ebenfalls  $G_q$ -gekoppelte B2R exprimiert werden. Der Nachweis erfolgte durch die Messung des Anstiegs der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit BK. Ebenso werden  $G_{i/o}$ -gekoppelte und  $G_q$ -gekoppelte 5-HTR endogen exprimiert. Mit Hilfe der mHypoA-2/10-CRE-Zellen konnten erstmals  $G_s$ -,  $G_{i/o}$ -

und G<sub>q</sub>-gekoppelte Rezeptoren im endogenen PVN-Neuronen-ähnlichen Zellmodell untersucht werden. Durch die Expression von zwei verschiedenen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren (B2R und 5-HT<sub>2c</sub>R) bot sich sogar die Möglichkeit, Signalkaskaden von unterschiedlichen G<sub>q</sub>-gekoppelten Rezeptoren miteinander zu vergleichen. Da mHypoA-2/10-CRE-Zellen sowohl G<sub>i/o</sub>- als auch G<sub>q</sub>-gekoppelte 5-HTR exprimieren, ergibt sich für weitere Experimente die Möglichkeit, die Interaktion und mögliche gegenseitige Regulation beider Rezeptorsubtypen im endogenen Zellsystem genauer zu analysieren.

Im Gegensatz zu BK stand 5-HT, und dabei besonders der 5-HT<sub>2c</sub>R, schon lange im Fokus der Appetitregulation (KENNETT UND CURZON 1988; KITCHENER UND DOURISH 1994; MARTIN *et al.* 1998; SCHREIBER UND DE VRY 2002; XU *et al.* 2008). Befunde, die zeigten, dass 5-HT<sub>2c</sub>R *knock-out* Mäuse an Hyperphagie, Hyperglykämie, Insulinresistenz und Adipositas erkrankten, verdeutlichen, welche Rolle der 5-HT<sub>2c</sub>R bei der Regulation des Appetits einnimmt (TECOTT *et al.* 1995; NONOGAKI *et al.* 1998). Der 5-HT<sub>2c</sub>R dient als Zielstruktur für den Wirkstoff Lorcaserin, der zur Behandlung von Adipositas eingesetzt wird (SMITH *et al.* 2009). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultierte unter anderem eine Publikation, worin mHypoA-2/10-CRE-Zellen als erste Zelllinie beschrieben wurde, die den 5-HT<sub>2c</sub>R endogen exprimiert (LAUFFER *et al.* 2016). Durch die endogene Expression des 5-HT<sub>2c</sub>R in mHypoA-2/10-CRE-Zellen ist die Untersuchung der direkten Wirkung von Lorcaserin auf appetitregulierende Signalkaskaden im Zellsystem möglich und kann maßgeblich zum Verständnis der intrazellulären Wirkmechanismen beitragen. Auf physiologischer Ebene wurde gezeigt, dass eine einjährige Behandlung mit Lorcaserin zu einer Gewichtsreduktion von 5,8 % führte, während die Probanden mit einer Placebobehandlung 2,5 % Gewicht verloren (ARONNE *et al.* 2014). Im Zeitraum dieser Arbeit war der Wirkstoff Lorcaserin leider nicht kommerziell erhältlich. Seitdem Lorcaserin aber für Experimente zur Verfügung steht, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe erste Daten erhoben, die zeigten, dass Lorcaserin in mHypoA-2/10-CRE-Zellen CREB-Phosphorylierung induziert. Durch die Verfügbarkeit von Lorcaserin besteht die Möglichkeit, durch die Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden

die anorexigene Wirkung besser zu verstehen. In der Vergangenheit gestaltete sich die Untersuchung von 5-HT<sub>2C</sub>R-abhängigen Signalwegen im ZNS, aufgrund des technischen Problems, primäre Zellen aus dem ZNS von Mäusen in große Mengen zu isolieren, als schwierig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, dass mHypoA-2/10-CRE-Zellen nicht nur den G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelten 5-HT<sub>2C</sub>R endogen exprimieren, sondern auch einen G<sub>i/o</sub>-gekoppelten 5-HTR. Dies wurde durch die Inhibition der FSK-vermittelten cAMP-Akkumulation durch 5-HT gezeigt.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass neben  $\alpha$ -MSH auch BK in mHypoA-2/10-CRE-Zellen den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert und CRE-Reporteraktivität stimuliert. Bislang beschränkte sich die Untersuchung der Liganden-vermittelten CREB-Phosphorylierung im Hypothalamus auf  $\alpha$ -MSH und den MC4R (SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; CYR *et al.* 2013). Die Erkenntnis, dass es neben  $\alpha$ -MSH mit BK noch ein weiteres Hormon gibt, das im PVN zur Aktivierung von CREB/CRE führen könnte, könnte dazu beitragen die Komplexität der Appetitregulation im Hypothalamus besser zu verstehen. Für die Analyse der Relevanz der neu entschlüsselten BK-vermittelten Signalkaskade im PVN wäre es interessant, CREB-abhängige Gene zu untersuchen. Ein besonderer Fokus sollte hierbei auf der möglichen BK-vermittelten Aktivierung von TRH liegen. So würde sich eventuell neben  $\alpha$ -MSH ein weiteres Hormon finden, das die TRH-Expression im Hypothalamus über CREB/CRE aktiviert. Die Analyse der Signalkaskade könnte außerdem neue Möglichkeiten für die medikamentöse Behandlung von Adipositas hervorbringen, da bislang weder BK und noch der B2R Zielstrukturen von Therapieansätzen bei Fettleibigkeit waren. B2R-Antagonisten finden hingegen Anwendung bei der Behandlung von hereditären Angioödemem (COLE UND LUNDQUIST 2013).

### 6.3 Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Reporteraktivierung

mHypoA-2/10-CRE-Zellen ermöglichen die Untersuchung der Korrelation zwischen CREB und CRE im von PVN-Neuronen abstammenden Zellsystem anhand endogen exprimierter

Rezeptoren. Dies kommt einem physiologisch relevanten System näher als die Untersuchung von Überexpressionssystemen. Der Transkriptionsfaktor CREB ist maßgeblich an einer Vielzahl zellulärer Signalkaskaden beteiligt. Es sind über 300 Stimuli bekannt, die CREB phosphorylieren können, und über 4000 Gene besitzen CRE-Sequenzen in ihren Promotoren (JOHANNESSEN *et al.* 2004; ZHANG *et al.* 2005). Besagte Gene sind in ihrer Funktion für diverse biologische Funktionen, wie dem Metabolismus, der Transkription, der DNA-Reparatur, aber auch bei der Regulation des Immunsystems oder der intrazellulären Signalweiterleitung von Bedeutung (MAYR UND MONTMINY 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob es neben  $\alpha$ -MSH noch weitere Hormone gibt, die in mHypoA-2/10-CRE-Zellen CREB phosphorylieren können. Dafür wurden Hormone und Wachstumsfaktoren ausgewählt, für die in anderen Zellsystemen oder im Zuge anderer Körperfunktionen neben der Appetitregulation schon demonstriert wurde, dass sie CREB phosphorylieren können (XING *et al.* 1998; LIU *et al.* 2002; SWARTHOUT *et al.* 2002; ZHAO *et al.* 2002; OURY *et al.* 2010; ISHIZUKA *et al.* 2014). Es wurde gezeigt, dass in mHypoA-2/10-CRE-Zellen sowohl  $\alpha$ -MSH als auch BK, 5-HT und die drei Wachstumsfaktoren EGF, IGF und NGF CREB phosphorylierten. Wenn man die Aktivierung des CREB-abhängigen CRE-Reporters betrachtet, so würde man erwarten, dass alle Liganden eine Reporteraktivität induzieren, weil z. B. für  $\alpha$ -MSH postuliert wurde, dass die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 mit einer CREB-abhängigen Genexpression einhergeht (LECHAN UND FEKETE 2006). Überraschenderweise zeigte sich, dass nur  $\alpha$ -MSH und BK CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen stimulieren konnten, während 5-HT, EGF, IGF und NGF keinen Effekt ausübten. Die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 korreliert nicht immer mit der Aktivierung von CRE und ist somit nicht ausreichend, um eine CREB-abhängige Genexpression zu induzieren (BONNI *et al.* 1995; THOMPSON *et al.* 1995; MAYR *et al.* 2001; ROSETHORNE *et al.* 2008). Dass es bei der Liganden-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung auch zelluläre Unterschiede geben kann, zeigten die Ergebnisse, dass BK in SH-SY5Y-Zellen über den B2R nur CREB phosphorylierte, jedoch nicht CRE aktivierte (ROSETHORNE *et al.* 2008). Im Gegensatz dazu führte BK in mHypoA-2/10-CRE-Zellen zu einer CREB-Phos-

phorylierung und einer CRE-Aktivierung. Bei der SH-SY5Y-Zelllinie handelt es sich um humane Neuroblastomzellen aus dem Knochenmark, welche ursprünglich 1973 generiert wurden und seither als *in vitro* Modell zur Untersuchung neuronaler Funktionen und der Differenzierung verwendet werden (BIEDLER *et al.* 1973).

Im Vergleich zu den publizierten Daten von Lauffer *et al.* war in den Experimenten dieser Arbeit keine 5-HT-vermittelte CRE-Reporteraktivierung festzustellen. Die, in der Publikation beschriebene 5-HT-induzierte CRE-Reporteraktivität, entsprach nur etwa der 1,2-fachen basalen Reporteraktivität. Im Vergleich dazu war die  $\alpha$ -MSH- und BK-vermittelte Aktivität des Reporters in dieser Arbeit etwa 10-fach erhöht. Es lag möglicherweise an der Sensitivität des Messsystems, weshalb im Rahmen dieser Arbeit keine 5-HT-vermittelte Reporteraktivität ermittelt werden konnte. In der Publikation wurde für die Reporter-messungen eine höhere Zellzahl verwendet und mehr Luziferase-Substrat injiziert (LAUFFER *et al.* 2016). Interessant wäre zu untersuchen, ob die geringe Aktivierung von CRE ausreichend ist, um die Expression von CREB-abhängigen Genen zu induzieren und ob 5-HT in mHypoA-2/10-Zellen grundsätzlich zur Induktion besagter Gene führt. Dabei wäre zum Beispiel die Analyse der CRH-Expression interessant, da bereits eine Erhöhung der CRH-Freisetzung über den 5-HT<sub>2C</sub>R im PVN demonstriert werden konnte und der CRH-Promoter eine Bindestelle für CREB enthält (LEGRADI *et al.* 1997b; HEISLER *et al.* 2007). Die 5-HT-vermittelte Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation von 15 %  $\pm$  3 sowie die Erhöhung der CREB-Phosphorylierung nach 5 min um 280 %  $\pm$  77 stimmten hingegen mit den publizierten Daten überein (LAUFFER *et al.* 2016). Wurden zur Interpretation die Daten dieser Arbeit und der Publikation zusammengefasst, so blieb die Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Aktivierung für 5-HT unverhältnismäßig. Während 5-HT zu einer CREB-Phosphorylierung von 280 %  $\pm$  77 über dem basalen Phosphorylierungsstatus führte, so war die Reporteraktivität nur um etwa 20 % erhöht (LAUFFER *et al.* 2016). Im Vergleich hierzu lag die CREB-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH 119 %  $\pm$  38 über dem Basalwert und die Reporteraktivität war um etwa 900 % erhöht. Für BK ergab sich neben der vergleichbaren Stärke der Reporteraktivierung sogar eine Phosphorylierung von 342 %  $\pm$  124 über dem

Phosphorylierungsstatus nativer Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte erwartet werden, dass die 5-HT-vermittelte CRE-Reporteraktivierung ähnlich stark ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde in einem Überexpressionssystem über die Aktivierung von G<sub>q</sub>-Proteinen durch das *gastrin releasing peptide* gezeigt, dass die CREB-Phosphorylierung über ERK-1/2 nicht in einer Aktivierung von CRE resultierte (FITZGERALD *et al.* 1999).

Der Vergleich der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Reporteraktivierung durch verschiedene Hormone zeigte, dass eine CREB-Phosphorylierung keinesfalls immer mit einer CRE-Reporteraktivierung einhergeht, sondern dass zwischen beiden Ereignissen differenziert werden und jedes Hormon gesondert betrachtet werden muss.

Im Folgenden werden mögliche Erklärungen erläutert, weshalb diese differenzierte Betrachtung der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Aktivierung notwendig ist und wie untersucht werden könnte, welches Ereignis zwischen einer CREB-Phosphorylierung und einer CRE-Aktivierung unterscheiden kann. Mit Hilfe einer dominant-negativen CREB-Mutante mit einer Punktmutation am Serin 133, die noch eine Dimerisierung von CREB und das Binden an die DNA-Sequenz ermöglicht, könnte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob die Phosphorylierung überhaupt für die Erhöhung der CRE-Reporteraktivität notwendig ist oder ob  $\alpha$ -MSH und BK auch unabhängig von dieser Modifikation agieren können (GONZALEZ UND MONTMINY 1989; KWOK *et al.* 1994). Es ist ein bereits bekanntes Phänomen, dass die Phosphorylierung von CREB nicht immer ausreichend ist, um eine CRE-Reporteraktivität oder Transkription eines CREB-abhängigen Zielgens zu induzieren (BONNI *et al.* 1995; THOMPSON *et al.* 1995; MAYR *et al.* 2001; ROSETHORNE *et al.* 2008).

Es wird vielseitig diskutiert, was für eine Aktivierung von CREB/CRE notwendig ist. Ein dafür notwendiges zelluläres ‚Event‘ stellt die Dimerisierung von CREB dar, sonst kann die Transkription des Zielgens nicht induziert werden (YAMAMOTO *et al.* 1988). Es wird sogar angenommen, dass die Bildung eines Homodimers nicht ausreichend ist, sondern ein Heterodimer über die bZIP-Region eines weiteren Proteins wie ATF-1 oder CREM geformt werden muss. Bisher gibt es für diese Liganden-induzierte Heterodimerisierung jedoch keinen

Nachweis (SHAYWITZ UND GREENBERG 1999). Weiterhin wird postuliert, dass die Bildung des KID-KIX-Komplexes notwendig ist, damit die Transkription des Zielgens erfolgen kann. Damit gemeint ist die Interaktion von CREB mit seinem Cofaktor CBP/p300. Viele Publikationen zeigten, dass eine Störung der Komplexbildung mit einer Inhibition der Genexpression verbunden ist (CARDINAUX *et al.* 2000; SHAYWITZ *et al.* 2000; BEST *et al.* 2004). Durch die Verwendung eines publizierten Antiserums gegen den CREB-CBP-Komplex könnte ermittelt werden, ob möglicherweise nur  $\alpha$ -MSH und BK und nicht 5-HT, EGF, IGF und NGF die Komplexbildung induzieren können (WAGNER *et al.* 2000). Die Annahme, dass möglicherweise die Stärke der Phosphorylierung von CREB durch die Liganden für die Komplexbildung maßgeblich ist, wurde durch die erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen. Sonst wäre einerseits die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität deutlich schwächer gewesen als die BK-induzierte Reporteraktivität, andererseits wäre die durch 5-HT und die Wachstumsfaktoren stimulierte Phosphorylierung deutlich schwächer ausgefallen, so dass es für die CRE-Aktivierung nicht ausgereicht hätte. Weitere Experimente sprechen aber dafür, dass der Phosphorylierungsstatus nicht entscheidend ist (MAYR UND MONTMINY 2001).

Neben der Dimerisierung und der Komplexbildung ist die DNA-Bindung von CREB möglicherweise der Grund, warum nicht alle Liganden, die CREB phosphorylieren können, auch CRE aktivieren können. Dass die Regulation von CREB komplex ist, zeigte sich auch an der DNA-Bindung selbst. Während die Phosphorylierung von CREB am Serin 133 die Affinität für CREB an die CRE-Sequenz des Promoters von Somatostatin zu binden nicht verstärkte, führte die Modulation von CREB aber zu einer erhöhten Affinität, an die CRE-Sequenz der Tyrosinaminotransferase zu binden (WEIH *et al.* 1990). Die DNA-Bindung scheint also genspezifisch reguliert zu werden. Andere Studien vermuten, dass die CREB-Phosphorylierung sich auf die Bindung von CREB sowohl an symmetrische als auch an asymmetrische CRE-Sequenzen verstärkend auswirkt (BULLOCK UND HABENER 1998). Ob die in dieser Arbeit untersuchten Liganden einen Effekt auf die DNA-Bindung von CREB hatten, wurde nicht analysiert. Da man davon ausgeht, dass die DNA-Bindung von CREB für die Transkription des Zielgens essentiell ist, wäre es möglich, dass  $\alpha$ -MSH und BK zu einer Bindung führen, weil

beide Liganden CRE-Reporteraktivität induzieren konnten und  $\alpha$ -MSH sowohl die Expression von TRH als auch von c-Fos induzieren konnte. Ob durch 5-HT und die drei Wachstumsfaktoren CREB an die DNA gebunden hat, wurde nicht untersucht, könnte aber eine weitere Erklärung dafür sein, warum diese vier Liganden eine sehr schwache oder keine CRE-Reporteraktivität induzieren konnten.

Neben der Interaktion mit CBP/p300 spielen auch die CRTC-Proteine, welche als Cofaktoren von CREB agieren, eine wichtige Rolle. CRTCs werden durch Dephosphorylierung aktiviert und können an die bZIP Domäne des CREB-Proteins binden, wodurch die Transkription des Zielgens aktiviert wird (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011; LUO *et al.* 2012). Es wird angenommen, dass bei der Transkription einiger Zielgene die Bindung von CRTC2 ein Defizit von CBP/p300 kompensieren kann. Dieser kompensatorische Effekt von CRTC2 ist allerdings nicht auf alle CREB-abhängigen Gene übertragbar (KASPER *et al.* 2010). Die Deletion von CBP und p300 führte teilweise aber auch zu einer Inhibition der Genexpression. Ob die Transkription des Zielgens durch CRTCs unabhängig von CBP/p300 induziert werden kann, hängt von der Menge gebundenen CREB, der endogenen Menge CRTC2 und der Anzahl an CRE-Sequenzen im Promoter des Gens ab (KASPER *et al.* 2010). Wie stark der Effekt von CRTC auf die CREB-vermittelte Genexpression ist, wird kontrovers diskutiert (SHAYWITZ UND GREENBERG 1999; MAYR UND MONTMINY 2001; ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Es steht jedoch fest, dass der *knock-out* von CRTC2 die Bindung von CREB an die Promotersequenz vermindert und dass dieser Effekt reversibel ist, wenn CRTC2 wieder exprimiert wird (WANG *et al.* 2010). Unklar ist, wie die Interaktion von CRTC an CREB die DNA-Bindung stärken kann. Es wird vermutet, dass entweder die Stabilisierung der bZIP-Struktur der Grund ist oder durch weitere Kontakte zur DNA die Bindung verstärkt wird (ALTAREJOS UND MONTMINY 2011). Versuchsergebnisse aus Überexpressionsmodellen suggerieren, dass CRTC keinen Einfluss auf die DNA-Bindung hat, sondern die Interaktion von CREB mit TAF<sub>II</sub>130, einer Komponente von TFIID, erhöht wird (CONKRIGHT *et al.* 2003).

Dass CRTCs für die Regulation des Appetits und des Energiehaushalts von funktioneller Bedeutung sind, ist bereits etabliert. CRTC1 *knock-out* Mäuse zeigten eine Resistenz gegenüber

Leptin, sind hyperphagisch und übergewichtig. Interessanterweise resultierte die Stimulation von Zellen des ARC mit Leptin in einer Dephosphorylierung von CRTC1 und einer Translokation in den Nukleus. Infolgedessen wurde die CREB-abhängige Expression des anorexigenen Peptids CART induziert (ALTAREJOS *et al.* 2008). Infolge des Anstiegs der Blutglucose nach Nahrungsaufnahme wurde CRTC2 in hypothalamischen Zellen über die AMPK dephosphoryliert und stellte einen essentiellen Bestandteil für die Antwort auf Glucose im Hypothalamus dar (LERNER *et al.* 2009).

Es wäre notwendig, in weiteren Experimenten zu untersuchen, ob nur  $\alpha$ -MSH und BK und nicht 5-HT, EGF, IGF und NGF die Dephosphorylierung der CRTC-Proteine stimulieren können und ob dies der Grund für die Effekte auf die CRE-Reporteraktivität ist. CRTCs konnten auch in einem CREB-Phosphorylierung-unabhängigen Mechanismus die Aktivität erhöhen (CONKRIGHT *et al.* 2003). Deshalb wäre es denkbar, dass 5-HT und die drei Wachstumsfaktoren trotz der starken Erhöhung des Phosphorylierungsstatus keinen dephosphorylierenden Effekt auf CRTC hatten und CRTC nicht an CREB binden konnte. Die Dephosphorylierung von CRTC nach Stimulation der Zellen könnte mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers gegen CRTC im Immunoblot analysiert werden. Da sowohl über cAMP als auch über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Calcineurin die Translokation von CRTC in den Kern erfolgen kann, haben  $\alpha$ -MSH und BK das Potential dafür (SCREATON *et al.* 2004; WANG *et al.* 2010). Nur für  $\alpha$ -MSH wurde bislang in GT1-7-Zellen gezeigt, dass über ERK-1/2 die als Energiesensor dienende AMPK inhibiert wurde (DAMM *et al.* 2012). Über die AMPK können CRTC-Proteine moduliert werden, welche als Cofaktoren von CREB agieren können (KOO *et al.* 2005). In mHypoA-2/10-Zellen konnte mittels spezifischer siRNA gegen CRTC2 bereits gezeigt werden, dass sowohl für die Glucose- als auch für die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität CRTC2 notwendig war, jedoch in einem individuellen Ausmaß (BREIT *et al.* 2016). In Neuronen des Hippocampus zeigte der *knock-down* von CRTC1 mittels spezifischer siRNA, dass CRTC1 für die Regulation einer Vielzahl CREB-abhängiger Gene notwendig ist (CH'NG *et al.* 2012). Bislang sind keine Verbindungen zwischen BK und CRTC bekannt. Mittels CRTC-spezifischer Antikörper sollte in der Immunfluoreszenz visualisiert

werden, welche Hormone die Translokation von CRTC in den Nucleus begünstigen – ein notwendiges Ereignis für die CREB-Aktivierung (BITTINGER *et al.* 2004).

Erstmals wurden auch CREB-defiziente PVN-Neurone in Mäusen *in vivo* untersucht (CHIAPPINI *et al.* 2011). Aufgrund der aktuellen Befunde aus der Literatur würde man erwarten, dass die Tiere adipös und hyperphagisch waren, vergleichbar mit MC4R-defizienten Mäusen, da die Vermittlung des anorexigenen Stimulus über den MC4R und CREB nicht mehr existierte (HUSZAR *et al.* 1997; VAISSE *et al.* 1998; YASWEN *et al.* 1999; CHALLIS *et al.* 2004). Interessanterweise waren CREB *knock-out* Mäuse zwar adipös, jedoch resultierte dieser Phänotyp nicht aus Hyperphagie, sondern aus einer Verminderung des Energieverbrauchs und einer Einschränkung beim Aufrechterhalten der Körpertemperatur (CHIAPPINI *et al.* 2011). Während gezeigt wurde, dass  $\alpha$ -MSH keinen Einfluss auf die gesunde Körpertemperatur von Ratten hatte, so hatte es aber einen antipyretischen Effekt und somit wiederum einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur (VILLAR *et al.* 1991). Die MC4R-vermittelten Signalwege im PVN blieben von dem CREB *knock-out* unbeeinflusst. Nach der Injektion eines MC4R-Agonisten nahm die Nahrungsaufnahme in *knock-out* Mäusen und Wildtyp-Mäusen ab. Außerdem blieb die HPT-Achse vom CREB-Defizit unbeeinflusst, die TRH-, T3- und T4-Level waren vergleichbar mit den Ergebnissen der Wildtyp-Tiere (CHIAPPINI *et al.* 2011). Die Erkenntnisse aus dieser Publikation suggerieren, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Signalkaskade in PVN-Neuronen über den MC4R unabhängig von CREB sein könnte. Mit Hilfe einer dominant-negativen CREB-Mutante sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob in mHypoA-2/10-CRE-Zellen die  $\alpha$ -MSH-induzierte TRH- und c-Fos-Expression durch den *knock-down* von CREB inhibiert werden kann.

#### 6.4 CREB- und CRE-regulierende Kinasen im PVN

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der detaillierten Untersuchung der  $\alpha$ -MSH-induzierten CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus, die zu einer CREB-abhängigen Genexpression führen sollte. Unterstützend konnte für bereits bekannte Daten bestätigt werden, dass  $\alpha$ -MSH im Hypothalamus CREB phosphoryliert (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR *et al.* 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch  $\alpha$ -MSH CRE-Reporteraktivität induziert wird,

dies war bislang nur im rekombinanten Zellsystem und in GT1-7-Zellen gezeigt worden (BREIT *et al.* 2006; DAMM *et al.* 2012). Dabei waren die Daten der GT1-7-Zellen mittels transgener Reporterassays erhoben worden und die Signalstärke war eher gering ausgefallen (DAMM *et al.* 2012). Ohne experimentelle Bestätigung wurde bislang davon ausgegangen, dass  $\alpha$ -MSH über den G<sub>s</sub>-gekoppelten MC4R im PVN durch die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA CREB phosphoryliert (SARKAR *et al.* 2002; SARKAR UND LECHAN 2003; LECHAN UND FEKETE 2006; CARUSO *et al.* 2010; CARUSO *et al.* 2012; CYR UND BOUKADOUM 2013; RAMIREZ *et al.* 2015). Die vorliegende Arbeit erbrachte mit Hilfe chemischer Inhibitoren erstmals den experimentellen Nachweis, ob PKA in die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB/CRE-Aktivierung involviert ist. Überraschenderweise war die Rolle der PKA dabei deutlich geringer als bisher angenommen. Mit Hilfe der drei strukturell unterschiedlichen PKA-Inhibitoren KT5720, A812511 und rp-Br-cAMPs konnte in mHypoA-2/10-CRE-Zellen nur eine Inhibition von durchschnittlich 20 % der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivität festgestellt werden. Zusätzlich konnte in hypothalamischen GT1-7- und in HEK-293-MC4R-Zellen durch die drei PKA-Inhibitoren gezeigt werden, dass die PKA bei der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung keine Rolle spielt. Durch den Einsatz von drei PKA-Inhibitoren und drei Zelllinien, wovon zwei endogen den murinen MC4R exprimieren und eine Zelllinie den humanen MC4R stabil exprimiert, lassen sich inhibitorspezifische und zelltypspezifische Effekte nahezu vollständig ausschließen. In mHypoA-2/10-CRE-Zellen wurde außerdem gezeigt, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung nicht von KT5720 blockiert wurde. Die Ergebnisse erlauben die Aussage, dass die Rolle von PKA bei der MC4R-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung gering ist und die PKA nicht die entscheidende Kinase dieser Signalkaskade sein kann.

Als mögliche Kinasen, die anstelle der PKA über  $\alpha$ -MSH die Phosphorylierung von CREB modulieren könnten, rückten ERK-1/2 in den Fokus, da bereits bekannt war, dass die Kinasen ERK-1/2 über den MC4R moduliert werden können (SUTTON *et al.* 2005; DAMM *et al.* 2012; RAMIREZ *et al.* 2015). Außerdem gehören ERK-1/2 zu den Kinasen, die auch den Transkriptionsfaktor CREB phosphorylieren können (SUTTON *et al.* 2004; SUTTON *et al.* 2005).

Hier konnte gezeigt werden, dass in mHypoA-2/10-CRE-Zellen die  $\alpha$ -MSH-induzierte Phosphorylierung von CREB durch den Einsatz des Inhibitors PD184352 blockierbar war und KT5720 keinen signifikanten Effekt hatte. Im Zuge dieser Arbeit hat sich herausgestellt, dass ERK-1/2 nicht nur in Bezug auf das Hormon  $\alpha$ -MSH eine zentrale Rolle bei der CREB-Phosphorylierung im PVN einnehmen, sondern es konnte auch gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch 5-HT, EGF, IGF und NGF in mHypoA-2/10-CRE-Zellen durch den Einsatz des MEK-1/2-Inhibitors PD184352 blockierbar war. Wenn man davon ausgeht, dass ERK-1/2 die einzigen bekannten physiologischen Substrate der MEK-1/2 sind, dann lassen die Ergebnisse auf eine ERK-1/2-Abhängigkeit der CREB-Phosphorylierung durch genannte Liganden schließen (ROSKOSKI 2012). Für  $\alpha$ -MSH konnte im Zuge dieser Arbeit für mHypoA-2/10-CRE- und für HEK-293-MC4R-Zellen demonstriert werden, dass auch die CRE-Reporteraktivität über die ERK-1/2 moduliert wurde. Besonders hervorzuheben ist dabei, dass nur die  $\alpha$ -MSH-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung neben der Modulation von CREB in einer Erhöhung der CRE-Reporteraktivität resultierte. ERK-1/2 können also in hypothalamischen Zellen über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren, in diesem Fall MC4R, über 5-HT<sub>1A</sub> ( $G_{i/o}$  und/oder  $G_q$ ) und über RTK aktiviert werden und CREB phosphorylieren. Die daraus hervorgehende Phosphorylierung von CREB führt aber nur im Fall von  $\alpha$ -MSH zu einer Aktivierung CRE-abhängiger Genexpression.

Um diese Diskrepanz zu klären, muss postuliert werden, dass ERK-1/2 zwischen den Hormonen unterscheiden können, die zu ihrer Aktivierung führen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Stärke der ERK-1/2-Phosphorylierung über den Effekt entscheidet. Da die 5-HT-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung (Abbildung 5.42) im Vergleich zur Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH (Abbildung 5.36) nach 2,5 min Stimulationszeit in mHypoA-2/10-CRE-Zellen stärker war, lässt sich die Stärke der Phosphorylierung wohl als Grund dafür ausschließen, dass nur die  $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung in einer Aktivierung von CRE resultiert.

Interessanter ist jedoch der Vergleich der Länge der ERK-1/2-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH und 5-HT. Es fällt auf, dass die Phosphorylierung von ERK-1/2 durch  $\alpha$ -MSH im Zeitraum der 30 min Stimulationszeit langsam abfiel, während die Phosphorylierung durch 5-HT transient und bereits nach 10 min Stimulation nicht mehr detektierbar war. Bei der CREB-Phosphorylierung war der Unterschied geringer, jedoch fällt auch hier auf, dass die 5-HT-vermittelte CREB-Phosphorylierung von 10 zu 20 min Stimulationszeit stark abgeschwächt wurde, während dieser Abfall bei  $\alpha$ -MSH sanfter war. Die unterschiedliche Kinetik, besonders bei der ERK-1/2-Phosphorylierung, könnte für eine Beteiligung von  $\beta$ -Arrestinen sprechen (REITER UND LEFKOWITZ 2006). Neben den G-Proteinen stellen  $\beta$ -Arrestine und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) bedeutende Proteinfamilien dar, die mit der aktiven Form von GPCRs interagieren (LEFKOWITZ UND SHENOY 2005). Während  $\beta$ -Arrestinen und GRKs zunächst nur eine Beteiligung bei der Desensibilisierung, Degradation und Internalisierung von GPCRs zugeordnet wurde, so wurden immer mehr Signalkaskaden entdeckt, in denen  $\beta$ -Arrestine und GRKs funktionell beteiligt sind (REITER UND LEFKOWITZ 2006). Sie fungieren dabei als *scaffold*-Proteine (Gerüstproteine) im Cytoplasma der Zelle und sorgen für die Vermittlung von Proteinkomplexen. Neben der Rekrutierung von Proteinen könnten *scaffold*-Proteine dazu beitragen, Proteinkomplexe zu stabilisieren und vor Phosphatasen zu schützen und sie bestimmen die Translokation von Komponenten der Signalkaskade (SHAUL UND SEGER 2007). Eine Vielzahl von Interaktionen zwischen  $\beta$ -Arrestin und ERK-1/2 und anderen Mitgliedern der MAPK ist bekannt (MORRISON UND DAVIS 2003; SHAUL UND SEGER 2007). Die Interaktion von ERK-1/2 mit *scaffold*-Proteinen wie  $\beta$ -Arrestin kann dazu beitragen eine Signalspezifität in Abhängigkeit des GPCR-Agonisten zu vermitteln (SHAUL UND SEGER 2007). Für die Stimulation des Angiotensin AT1a-Rezeptors wurde gezeigt, dass die Interaktion von  $\beta$ -Arrestin mit ERK-1/2 dazu führt, dass phosphorylierte ERK-1/2 weniger in den Kern translokalisieren und eher im Cytoplasma der Zelle verbleiben (TOHGO *et al.* 2002). Für den  $\beta$ 2-Adrenorezeptor ist im Gegensatz dazu bekannt, dass die Interaktion von  $\beta$ -Arrestin mit der  $\beta\gamma$ -Untereinheit des Rezeptors zu einer erhöhten Translokation von ERK-1/2 in den Nukleus beiträgt (KOBAYASHI *et al.* 2005). Da CREB vorwiegend im Nukleus lokalisiert ist (CARLEZON *et al.* 2005), wäre für die MC4R-vermittelte

CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung die verstärkte Translokation von ERK-1/2 mittels  $\beta$ -Arrestin denkbar. Charakteristisch für eine  $\beta$ -Arrestin-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung ist, dass sie im Vergleich zur G-Protein-vermittelten Phosphorylierung langsamer und langanhaltender ist (REITER UND LEFKOWITZ 2006). Dieses typische Merkmal könnte für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Phosphorylierung von ERK-1/2 Rückschlüsse auf eine Beteiligung von  $\beta$ -Arrestinen zulassen, da diese Phosphorylierung im Vergleich zur transienten Phosphorylierung durch 5-HT langanhaltend ist. Wenn  $\beta$ -Arrestin an der  $\alpha$ -MSH-vermittelten ERK-1/2-Phosphorylierung über EPAC beteiligt ist, dann könnte dies der Grund sein, warum trotz einer ERK-1/2- und CREB-Phosphorylierung nur  $\alpha$ -MSH und nicht 5-HT zu einer CRE-Aktivierung führten bzw. die CRE-Aktivierung durch 5-HT nur sehr schwach war.  $\beta$ -Arrestin wurde bei der Stimulation des  $\beta$ 1-Adrenorezeptors bereits als *scaffold*-Protein für EPAC identifiziert (MANGMOOL *et al.* 2010). Es wurde außerdem gezeigt, dass  $\beta$ -Arrestin an der Komplexbildung von p300 an CREB am Promoter der Gene *c-Fos* und *p27* nach Stimulation des  $\delta$ -Opiodrezeptors beteiligt war. Zusätzlich trug es zu einer Verstärkung der Acetylierung von Histon H4 bei und das resultierte in einer Erhöhung der Genexpression (KANG *et al.* 2005). In Kapitel 6.3 wurde bereits diskutiert, dass die Komplexbildung zwischen CREB und CBP/p300 für die Transkription des Zielgens notwendig ist (CARDINAUX *et al.* 2000; SHAYWITZ *et al.* 2000; BEST *et al.* 2004). In weiteren Experimenten könnte durch den Einsatz von siRNAs gegen  $\beta$ -Arrestin untersucht werden, ob das *scaffold*-Protein für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Aktivierung notwendig ist. Eine Verbindung zwischen dem MC4R und Arrestin im Hypothalamus ist bei der AgRP- und  $\alpha$ -MSH-induzierten Endozytose des Rezeptors bereits bekannt (BREIT *et al.* 2006). Zusätzlich wäre es interessant die Kinetik der ERK-1/2-Phosphorylierung von EGF, IGF und NGF zu analysieren, da diese Wachstumsfaktoren vergleichbar zu 5-HT zu einer starken CREB-Phosphorylierung führten, jedoch nicht zu CRE-Aktivierung.

Unter Beachtung der verschiedenen Ereignisse, die neben der Phosphorylierung von CREB für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors notwendig sind, wie die Dimerisierung, DNA-Bindung und Bindung von Cofaktoren wie CBP/p300 und CRTTC, so muss durch die ERK-

1/2 bestimmt werden können, welches Ereignis eintritt. Um signalspezifisch auf die GPCR-Aktivierung antworten zu können, können auch *cross-talks* mit anderen Signalkaskaden die Ursache sein, weshalb nur die  $\alpha$ -MSH-induzierte ERK-1/2-Phosphorylierung zu einer Aktivierung von CRE führte. So könnte z. B. die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Dephosphorylierung der AMPK und eine möglicherweise daraus resultierende Dephosphorylierung von CRTC eine Rolle spielen, zumal der *knock-down* von CRTC2 durch siRNA zu einer Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen führte (KOO *et al.* 2005; DAMM *et al.* 2012; BREIT *et al.* 2016). Wie vielseitig die ERK-1/2-vermittelte Regulation von CREB sein kann, zeigt die Tatsache, dass über ERK-1/2 CREB sowohl positiv als auch negativ stimuliert werden kann (WANG *et al.* 2003; XIA *et al.* 2015). Im Falle der Inhibition der CREB-Phosphorylierung handelt es sich um eine Folge langanhaltender ERK-1/2-Phosphorylierung in humanen Leberkarzinomzellen nach Stimulation mit einem Cdc25A-Phosphatase-Inhibitor (WANG *et al.* 2003).

Für das Hormon BK konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur eine CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung im hypothalamischen Zellsystem gezeigt werden, durch die Verwendung des chemischen Inhibitors BIM-X konnte die PKC als CREB-modulierende Kinase analysiert werden. Im Lungenperfusionsmodell, in Neuronen des Großhirns, in Neuroblastomzellen und Adipozyten wurde die PKC bereits als CREB-modulierende Kinase studiert (THONBERG *et al.* 2002; LI *et al.* 2006; MAO *et al.* 2007; ROSETHORNE *et al.* 2008). In Neuroblastomzellen resultierte die PKC-abhängige CREB-Phosphorylierung durch BK jedoch nicht in einer Induktion der CRE-Reporteraktivität (ROSETHORNE *et al.* 2008). Um die BK-vermittelte Signalkaskade zu vervollständigen, wäre es sinnvoll zu überprüfen, welche Rolle PLC $\beta$  bei der CREB/CRE-Aktivierung spielt. Dafür könnte der chemische PLC $\beta$ -Inhibitor U73122 eingesetzt werden. Ein Zusammenhang zwischen PLC $\beta$  und dem B2R wurde bereits in HeLa-Zellen beschrieben (CHOI *et al.* 2010). Für den Fall, dass die PLC $\beta$  und Ca<sup>2+</sup> als *second messenger* an der BK-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung über PKC beteiligt sind, ergibt sich das in Abbildung 6.1 dargestellte Modell. In dieser Arbeit wurde bereits un-

tersucht, dass die BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung nicht durch den ERK-1/2-Inhibitor blockierbar war und somit im Fall von BK ERK-1/2 nicht als verbindende Kinase zwischen PKC und CREB fungierte.

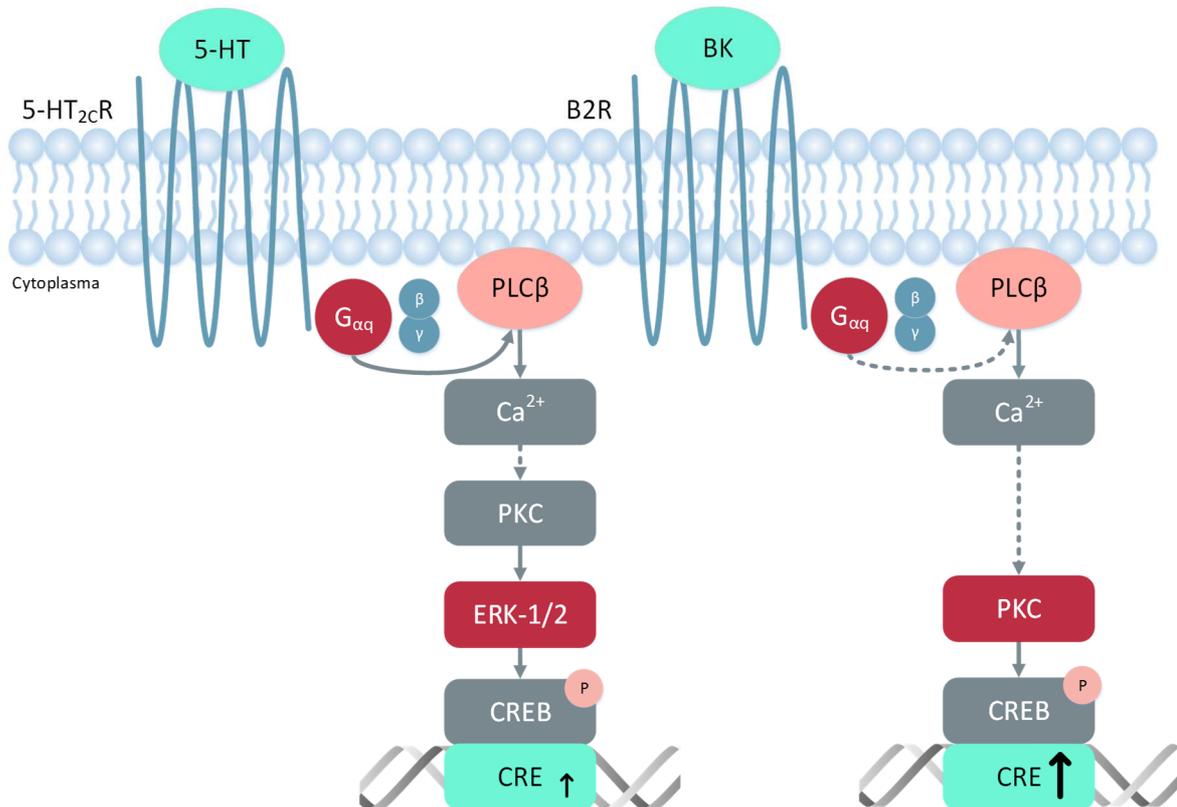


Abbildung 6.1: Modell der CRE-abhängigen Genexpression über den 5-HT<sub>2C</sub>R und B<sub>2</sub>R in mHypoA-2/10-CRE-Zellen

Passend dazu wurde zur Erweiterung der 5-HT-vermittelten Signalkaskade publiziert, dass in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen über den 5-HT<sub>2C</sub>R durch die PKC die Phosphorylierung von ERK-1/2 vermittelt wurde, was wiederum zur Phosphorylierung von CREB führte (LAUFFER *et al.* 2016). Außerdem wurde gezeigt, dass die 5-HT-vermittelte CRE-Reporteraktivierung über den 5-HT<sub>2C</sub>R PLCβ-abhängig war (LAUFFER *et al.* 2016). Diese Abhängigkeit sollte in weiteren Experimenten für die CREB-Phosphorylierung überprüft werden. Das Modell der 5-HT-vermittelten CRE-Aktivierung wird ebenfalls in Abbildung 6.1 ersichtlich. Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass die 5-HT-vermittelte CRE-Reporteraktivierung (LAUFFER *et al.* 2016) deutlich schwächer war, als die durch BK-induzierte Aktivierung. Bei der 5-HT-vermittelten Signalkaskade stand der 5-HT<sub>2C</sub>R im Fokus, obwohl auch der 5-HT<sub>1B</sub>R in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen endogen exprimiert wird. Jedoch konnte gezeigt werden, dass

nur der 5-HT<sub>2C</sub>R-Agonist WAY161503 und nicht der 5-HT<sub>1B</sub>R-Agonist CP94253 CRE-Reporteraktivität induzierte (LAUFFER *et al.* 2016).

## 6.5 EPAC als neues ‚Target‘ des MC4R

Erst 1998 wurde mit den EPAC-Proteinen eine neue Zielstruktur identifiziert, womit cAMP-abhängige und PKA-unabhängige Signalkaskaden erklärt werden konnten (DE ROOIJ *et al.* 1998; KAWASAKI *et al.* 1998). Da für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB/CRE-Aktivierung im Hypothalamus bislang angenommen wurde, dass der cAMP-abhängige Signalweg über PKA reguliert wird, war es überraschend, dass die PKA-Inhibitoren keinen Einfluss auf die CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung hatten und sich die ERK-1/2 als zentrale Kinasen für die CREB-Phosphorylierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen herausstellten. Durch die Verwendung der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 konnte in den drei Zelllinien mHypoA-2/10-CRE, GT1-7 und HEK-293-MC4R übereinstimmend gezeigt werden, dass die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität vollständig von EPAC abhängig war. In mHypoA-2/10-CRE-Zellen konnte durch ESI-09 außerdem die CREB- und die ERK-1/2-Phosphorylierung durch  $\alpha$ -MSH signifikant reduziert werden. Das lässt die Vermutung zu, dass es sich bei ERK-1/2 um die CREB-modulierende Kinase handelt, die über EPAC aktiviert wird. Diese Verbindung konnte bislang nur in nicht-hypothalamischen Zellsystemen gezeigt werden und hatte keinen Bezug zu  $\alpha$ -MSH (PARK *et al.* 2014; VITALI *et al.* 2014). Dass auch die  $\alpha$ -MSH-induzierte CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen durch EPAC- und ERK-1/2-Inhibitoren blockierbar war, ist ein unterstützender Befund für diese These, dass ERK-1/2 die Kinasen in der Signalkaskade *downstream* von EPAC und *upstream* von CREB darstellen könnten. Dabei handelt es sich um die erstmalige Verbindung von EPAC/ERK-1/2/CREB im Hypothalamus.

Kritisch einzuschätzen waren bei der Verwendung der EPAC-Inhibitoren die beschriebenen unspezifischen und denaturierenden Eigenschaften (REHMANN 2013). Um unspezifische Effekte der beiden EPAC-Inhibitoren auszuschließen wurde gezeigt, dass beide Inhibitoren weder die Serum-vermittelte CRE-Reporteraktivierung, noch die BK-vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Frei-

setzung signifikant modulierten. Außerdem wurde durch ESI-09 die  $\alpha$ -MSH- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation nicht beeinträchtigt. In einer weiteren Publikation wurde ebenfalls den unspezifischen Eigenschaften der Inhibitoren widersprochen, beim Einsatz von denen in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von ESI-09 und HJC0197-strukturverwandter Inhibitoren (ZHU *et al.* 2015). Besonders ESI-09 wird zunehmend häufiger zur Untersuchung der biologischen Rolle von EPAC eingesetzt (ALMAHARIQ *et al.* 2013; MEDIERO *et al.* 2014; PRATT *et al.* 2016; SINGHMAR *et al.* 2016). In den GT1-7-Zellen sprach die Inhibition der  $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivität durch ESI-05 dafür, dass der EPAC2-Subtyp am Signalweg beteiligt war, während das Signal in den mHypoA-2/10-CRE- und den HEK-293-MC4R-Zellen nicht signifikant beeinflusst wurde. Die Spezifität von ESI-05 für den EPAC2-Subtyp wurde untersucht (TSALKOVA *et al.* 2012). Die Erkenntnisse lassen die Vermutung zu, dass zwar die MC4R-vermittelte CRE-Aktivierung von EPAC abhängig ist, es jedoch zelltyp-spezifische Unterschiede des beteiligten EPAC-Subtyps gibt. Um das neu entwickelte Modell der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB/CRE-Aktivierung über den MC4R zu bestätigen, wäre die Verwendung von siRNAs gegen die EPAC-Subtypen eine Option für weitere Experimente und wurden bereits im Laufe dieser Arbeit getestet. Dafür wurden die gleichen Elektroporationsbedingungen gewählt, wie auch bei der Transfektion der siRNA gegen Rap1A, jedoch hatte die siRNA keinen Effekt auf die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivität. Die Ursache dafür könnte die geringe Transfektionseffizienz gewesen sein, da auch bei der Transfektion mit der Rap1A-siRNA nur eine schwache Inhibition der Proteinexpression erreicht wurde und diese möglicherweise im Fall von EPAC nicht für einen Effekt auf Ebene der CRE-Reporteraktivierung ausreichend war. Es sollte neben der Optimierung der siRNA-Transfektion mit Hilfe geeigneter Primer und qPCR untersucht werden, welcher EPAC-Subtyp vorkommt oder ob EPAC1 und EPAC2 in den jeweiligen Zellen exprimiert werden. Besonders für die mHypoA-2/10-CRE- und HEK-293-MC4R-Zellen wäre es interessant zu analysieren, ob der fehlende Effekt von ESI-05 darauf beruht, dass EPAC2 nicht exprimiert wird oder trotz Präsenz nicht beteiligt ist.

Die Funktionen von EPAC sind sehr vielseitig. Es gibt diverse Verbindungen zwischen EPAC und der Appetitregulation/Energiehomöostase, ein besonderer Fokus liegt dabei auf

der Regulation des Leptin- und Insulinhaushalts (CHEPURNY *et al.* 2009; KELLEY *et al.* 2009; YAN *et al.* 2013; ALMAHARIQ *et al.* 2014). EPAC1 *knock-out* Tiere zeigten ein vergleichbar mit MC4R *knock-out* Mäusen erhöhtes Körpergewicht aufgrund von vermehrter Nahrungsaufnahme und des metabolischen Syndroms (BALTHASAR *et al.* 2005; KAI *et al.* 2013). Interessanterweise wurde im Gegensatz dazu beschrieben, dass EPAC1-defiziente Mäuse gegenüber Adipositas aufgrund fettreicher Nahrung resistenter waren, ebenso gegenüber Hyperleptinämie und Glucoseintoleranz (YAN *et al.* 2013). Bislang wurde jedoch keinerlei Verbindung zwischen dem MC4R und EPAC gezeigt. Nimmt man an, dass die  $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung über den MC4R im PVN wie gezeigt EPAC-abhängig ist, so würde man erwarten, dass EPAC *knock-out* Tiere mehr Nahrung zu sich nehmen, da ihnen eine anorexigene Signalkaskade fehlt und sie deshalb übergewichtig bzw. adipös sind. Bei *knock-out* Modellen eines EPAC-Subtyps wäre es denkbar, dass der *knock-out* möglicherweise durch den anderen, noch intakten Subtyp, funktionell kompensiert wird. Die unterschiedlichen *in vivo* Phänotypen von EPAC1 *knock-out* Mäusen von Kai *et al.* und Yan *et al.* könnten durch die zelltypspezifischen Funktionen von EPAC erklärt werden. Im ARC resultiert aus der cAMP/EPAC-vermittelten Inhibition von Leptin eine orexigene Wirkung, während über den MC4R in Neuronen des PVN ein anorexigener Effekt vermittelt wird (KAI *et al.* 2013; YAN *et al.* 2013).

Diejenigen Signalkaskaden, in die EPAC involviert ist, können nicht nur zelltypspezifisch sein, sondern die Rolle der Subtypen kann sich unterscheiden, wie es beispielsweise bei der Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen ist. Inkretine wie GLP-1 initiieren über die PLC $\epsilon$  und EPAC2 die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Calciumspeichern, was zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Calciumfreisetzung führt (CICR) (KANG *et al.* 2003; HOLZ 2004; HATAKEYAMA *et al.* 2007). Durch die EPAC2-vermittelte Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  werden mitochondriale Dehydrogenasen aktiviert, welche die ATP-Konzentration im Cytoplasma erhöhen. Daraufhin werden ATP-sensitive  $\text{K}^+$ -Kanäle geschlossen, die Zellmembran depolarisiert und extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt in die Zelle. Dieser Einstrom triggert die Fusion von insulinhaltigen Vesikeln mit der Zellmembran und die Exozytose des Hormons (HOLZ 2004;

PARNELL *et al.* 2015). Im Gegensatz dazu ist EPAC1 nicht für die Inkretin-vermittelte Insulinsekretion notwendig, sondern für die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung (KAI *et al.* 2013; PARNELL *et al.* 2015).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten die Möglichkeit, EPAC als Zielstruktur für eine neue, medikamentöse Behandlung von Adipositas in Betracht zu ziehen, wenn sich die Rolle von EPAC im Zellsystem auf *in vivo* Experimente übertragen lässt. So könnte beispielsweise die spezifische Aktivierung von EPAC im Hypothalamus anorexigene Effekte zur Folge haben. EPAC im PVN könnte als direkte Zielstruktur dienen. Bislang wurden Therapien nur auf Ebene des MC4R getestet (FANI *et al.* 2014). Aufgrund unspezifischer Bindungen an weitere MCR und schwerer Nebenwirkungen waren die MC4R-Agonisten für den Einsatz als Medikament nicht erfolgreich (WESSELLS *et al.* 2000; HANSEN *et al.* 2005; KIEVIT *et al.* 2013; FANI *et al.* 2014). Es sollte bedacht werden, welcher EPAC-Subtyp als Zielstruktur relevant ist. Dies wird deutlich, wenn man beachtet, dass beim Einsatz von GLP-1-Analoga zur Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2 potentielle Nebenwirkungen und Folgeerkrankungen wie Pankreatitis oder Pankreaskarzinome auf der unspezifischen Aktivierung von EPAC1 und EPAC2 beruhen. Da gezeigt wurde, dass der EPAC2-selektive Inhibitor die Insulinfreisetzung in pankreatischen Zellen inhibieren kann, wäre es eventuell ausreichend, nur EPAC2 bei der medikamentösen Behandlung zu aktivieren, da die gleichzeitige Aktivierung von EPAC1 mit der Ausbildung pankreatischer Erkrankungen in Verbindung stehen könnte (LORENZ *et al.* 2008; HENQUIN UND NENQUIN 2014; PARNELL *et al.* 2015).

Die maßgebliche Rolle von EPAC scheint sich nicht nur auf den MC4R-Subtyp zu beschränken. Der MC1R ist sowohl bei der Pigmentierung der Haut als auch bei der Antwort von Melanozyten auf UV-Strahlung und bei der Entstehung von Melanomen beteiligt (IM *et al.* 1998; STURM 2002; GOLDSTEIN *et al.* 2005). In der, aus dieser Arbeit resultierenden Publikation, wurde untersucht, dass  $\alpha$ -MSH in B16F10-Zellen, wobei es sich um murine Melanomzellen mit endogenen MC1R handelt, EPAC-abhängig und PKA-unabhängig die CRE-Reporteraktivität erhöhte (GLAS *et al.* 2016).

Als wichtigstes Element zwischen EPAC und ERK-1/2 könnte Rap1A agieren. Für die Verbindung EPAC/Rap1A/ERK-1/2 spricht, dass es sich bei Rap1A um ein Substrat von EPAC handelt (MAILLET *et al.* 2003) und die chemische Inhibition sowie der *knock-down* von Rap1A mittels siRNA zu einer Abnahme der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen führten. Es sollte untersucht werden, ob neben der CRE-Aktivierung durch  $\alpha$ -MSH auch die ERK-1/2- und CREB-Phosphorylierung von Rap1A abhängig sind. Eine Abhängigkeit von Rap und ERK-1/2 konnte bereits in einigen Zellsystemen gezeigt werden, ein Zusammenhang mit EPAC oder im Hypothalamus wurde bislang aber nicht analysiert (VOSSLER *et al.* 1997; YORK *et al.* 1998; BOUSCHET *et al.* 2003; TRUMPER *et al.* 2005; WANG *et al.* 2006).

## 6.6 Rolle von EPAC bei der $\alpha$ -MSH-induzierten Genexpression

Um die physiologische Relevanz bei der Appetitregulation und Aufrechterhaltung der Energiehomöostase für die neu entschlüsselte Signalkaskade von  $\alpha$ -MSH im PVN einschätzen und bewerten zu können, wurde mittels qPCR der Effekt von  $\alpha$ -MSH auf die CREB-abhängigen Gene TRH und c-Fos in mHypoA-2/10-CRE-Zellen untersucht. Die  $\alpha$ -MSH-vermittelte TRH-Expression wurde bislang nur im rekombinanten Zellsystem und *in vivo* beschrieben (HARRIS *et al.* 2001; KIM *et al.* 2002). Die Erhöhung der TRH-Reporteraktivität durch  $\alpha$ -MSH mittels des endogen exprimierten MC4R in mHypoA-2/10-Zellen wurde bereits 2015 publiziert, die Untersuchung auf Ebene der Genexpression ist unbeschrieben (BREIT *et al.* 2015). Der Anstieg der TRH-mRNA-Expression durch  $\alpha$ -MSH in den mHypoA-2/10-CRE-Zellen korrelierte mit den Befunden, dass die Konzentration von TRH im Hypothalamus von POMC *knock-out* Mäusen reduziert war und somit deutlich wird, dass POMC und das daraus prozessierte  $\alpha$ -MSH für die TRH-Expression essentiell sind (MARTIN *et al.* 2004). Die Erhöhung der mRNA-Expression von c-Fos durch NDP-MSH wurde in Astrozyten gezeigt (RAMIREZ *et al.* 2015), c-Fos-Expression oder c-Fos-ähnliche Immunreaktivität nach intracerebroventrikulärer Injektion von  $\alpha$ -MSH wurden im PVN festgestellt (MCMINN *et al.* 2000; LADYMAN *et al.* 2016). Diese Arbeit zeigt erstmals die  $\alpha$ -MSH-induzierte Erhöhung der c-Fos-mRNA-Expression im endogenen, hypothalamischen Zellsystem.

Bei der Analyse der  $\alpha$ -MSH-induzierten TRH-Expression in mHypoA-2/10-CRE-Zellen hatte ESI-09 einen inhibitorischen Effekt. Die Inhibition spricht dafür, dass EPAC nicht nur bei der  $\alpha$ -MSH-vermittelten CREB-Phosphorylierung und CRE-Reporteraktivierung eine entscheidende Rolle spielt, sondern auch bei der Expression von TRH und somit direkt am thyreotropen Regelkreis beteiligt ist, der die Ausschüttung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 reguliert. Neben ESI-09 hatte aber auch KT5720 einen inhibitorischen Effekt auf die Expression von TRH durch  $\alpha$ -MSH. Der Promoter von TRH beinhaltet nicht nur Bindestellen für CREB, sondern auch für STAT-3 und Sp-1, wodurch die Genexpression nicht auf einen Transkriptionsfaktor beschränkt ist (REN *et al.* 1998; HARRIS *et al.* 2001; DIAZ-GALLARDO *et al.* 2010). Für die Leptin- und EGF-induzierte Expression von TRH wird STAT-3 verantwortlich gemacht (HARRIS *et al.* 2001; GUO *et al.* 2004; BREIT *et al.* 2015). Für die Transkription von TRH infolge einer Stimulation mit  $\alpha$ -MSH wurde bislang immer die CREB-Bindestelle in Betracht gezogen (HARRIS *et al.* 2001; SARKAR UND LECHAN 2003; CYR *et al.* 2013). Für die  $\alpha$ -MSH-induzierte Erhöhung der TRH-mRNA-Expression liefert diese Arbeit ein neues Modell, welches in Abbildung 6.2 schematisch dargestellt ist.

Es scheint zwei voneinander unabhängige Signalkaskaden zu geben, die zur TRH-Expression durch  $\alpha$ -MSH beitragen.  $\alpha$ -MSH könnte einerseits über cAMP nach der Aktivierung des MC4R EPAC und Rap1A aktivieren, woraufhin über ERK-1/2 CREB phosphoryliert wird. Durch die Bindung von phosphorylierten CREB an die CRE-Sequenz des TRH-Promoters könnte CRE aktiviert und die Transkription von TRH könnte initiiert werden. Da aber die TRH-mRNA-Expression in mHypoA-2/10-CRE-Zellen auch durch die Verwendung des PKA-Inhibitors signifikant reduziert wurde, ist auch ein CREB/CRE-unabhängiger Signalweg über PKA denkbar. Aus innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten in mHypoA-2/10-Zellen geht hervor, dass  $\alpha$ -MSH über den MC4R keine STAT-3-abhängige Reporteraktivität induzieren kann (BREIT *et al.* 2015). Daher besteht die Möglichkeit, dass Sp-1 die regulatorische Einheit der PKA-abhängigen TRH-Expression darstellen könnte. Sp-1 ist bereits als Substrat für PKA bei der transkriptionellen Regulation beschrieben (ROHLFF *et al.* 1997; AHLGREN *et al.* 1999). Speziell bei der MC4R-vermittelten Regulation von BDNF

in Astrozyten wurde gezeigt, dass es sich um einen PKA-abhängigen Signalweg handelt, der jedoch CREB- und CRE- unabhängig ist. Interessanterweise enthält der Promoter von BDNF ebenfalls eine Bindestelle für Sp-1 und könnte über diese reguliert werden (TAKEUCHI *et al.* 2002). Bei der Leptin-vermittelten TRH-Expression wird davon ausgegangen, dass STAT-3 für die Expression von TRH grundlegend ist, jedoch trotzdem etwa 20 % über Sp-1 vermittelt werden (HARRIS *et al.* 2001). Um die Stellung von Sp-1 bei der MC4R-induzierten TRH-Expression über die PKA im Hypothalamus zuordnen zu können, sollte nachfolgend analysiert werden, ob  $\alpha$ -MSH Sp-1-abhängige Reporteraktivität stimulieren kann oder ein Proteinnachweis mittels phosphospezifischer Antikörper im Immunoblot erfolgen.

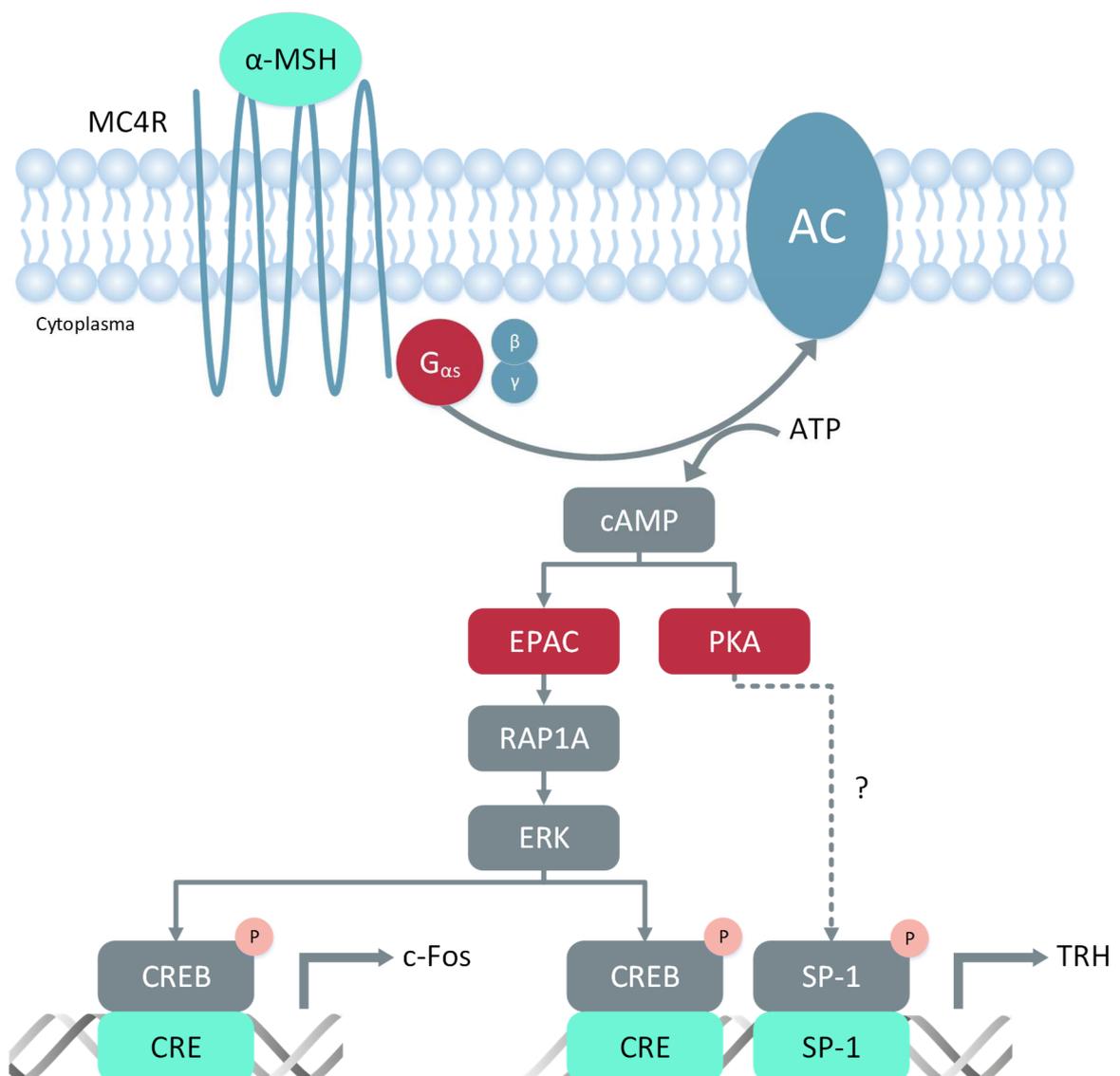


Abbildung 6.2: Modell der  $\alpha$ -MSH-vermittelten Genexpression von c-Fos und TRH über CREB/CRE in mHypoA-2/10-CRE-Zellen

Bei der EPAC-abhängigen transkriptionellen Regulation von TRH über den MC4R im Hypothalamus sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Modulation von CREB und CRE daran maßgeblich beteiligt ist. Es wurde jedoch nicht explizit gezeigt, dass die Bindung von phosphorylierten CREB an den Promoter von TRH für die Erhöhung der mRNA-Expression notwendig ist. Der Nachweis hierfür könnte durch die Deletion der CRE-Sequenz aus dem Promoter mit anschließendem Expressionsnachweis mittels qPCR erfolgen. Die PKA-abhängige Signalkaskade könnte dabei durch einen Inhibitor blockiert werden.

## 6.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben  $\alpha$ -MSH ein weiteres Hormon entdeckt werden, welches in hypothalamischen mHypoA-2/10-CRE-Zellen CREB phosphorylieren und CRE aktivieren kann. Es wäre interessant, Zielgene von BK im PVN zu identifizieren, welche in die Appetitregulation und Steuerung der Energiehomöostase involviert sind und zugehörige Signalkaskaden zu analysieren. Dies könnte dazu beitragen, B2R als neue Zielstruktur für die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Adipositas zu prüfen.

Die genaue Untersuchung der  $\alpha$ -MSH-induzierten TRH-Expression in PVN-Neuronen-ähnlichen Zellen ergab, dass PKA zwar eine wichtige Rolle bei der Genexpression von TRH spielt, diese Funktion jedoch nur zu geringen Anteilen über CREB und CRE generiert werden kann. Im Gegensatz dazu hatte die Erhöhung der cAMP-Konzentration über den  $G_s$ -gekoppelten MC4R nicht nur einen Effekt auf PKA, sondern resultierte auch in einer Aktivierung von EPAC. Die Erkenntnis, dass die Aktivierung des MC4R über EPAC/Rap1A und ERK-1/2 zu einer CREB-Phosphorylierung, CRE-Aktivierung und der Expression von TRH im Zellsystem führte, ist für das Verständnis der Appetitregulation durch  $\alpha$ -MSH im PVN wichtig. Obwohl die Rolle von EPAC und ERK-1/2 bei der MC4R-induzierten CREB/CRE-Aktivierung vom murinen auch auf den humanen Rezeptor im Zellsystem übertragbar war, wäre es ein nächster notwendiger Schritt, die Signalkaskade *in vivo* im Mausmodell und/oder *in situ* erneut zu charakterisieren. Es sollte untersucht werden, wie sich eine gezielte Aktivierung von EPAC oder ERK-1/2 im PVN auf die Nahrungsaufnahme und den Energiever-

brauch auswirkt und welche unerwünschten Wirkungen die Stimulation zur Folge hat. Sollten sich die hier vorgestellten Ergebnisse *in vivo* bestätigen, so könnten EPAC und die ERK-1/2 als Zielstrukturen für eine medikamentöse Adipositas therapie zum Einsatz kommen.

Zur weiteren Aufklärung der Korrelation zwischen der CREB-Phosphorylierung und der CRE-Aktivierung sollte untersucht werden, welches der Ereignisse, die für die Liganden-induzierte CREB-Aktivierung notwendig sind, durch 5-HT, EGF, IGF und NGF nicht stimuliert wird, jedoch durch  $\alpha$ -MSH und BK. Zur Aufklärung der Komplexität der CREB-Regulierung wäre es interessant zu wissen, ob der limitierende Faktor die Dimerisierung, die DNA-Bindung oder die Aktivierung von Cofaktoren wie CBP/p300 oder CRTC ist, weshalb die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors nicht für die CRE-Aktivierung ausreichend ist. Neben Cofaktoren von CREB selbst sollte auch die Interaktion von ERK-1/2 mit *scaffold*-Proteinen wie  $\beta$ -Arrestin in Betracht gezogen werden, die Signalspezifität vermitteln können. Die Aktivierung und Regulation von CREB ist nicht nur hinsichtlich der Appetitregulation im Hypothalamus interessant, sondern auch für eine Vielzahl weiterer zellulärer Funktionen, in denen CREB maßgeblich beteiligt ist.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbasi, F., B. W. Brown, Jr., C. Lamendola, T. McLaughlin und G. M. Reaven, 2002 Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol* 40: 937-943.
- Abe, K. C., M. A. Mori und J. B. Pesquero, 2007 Leptin deficiency leads to the regulation of kinin receptors expression in mice. *Regul Pept* 138: 56-58.
- Adan, R. A., M. van der Kraan, R. P. Doornbos, P. R. Bar, J. P. Burbach *et al.*, 1996 Melanocortin receptors mediate alpha-MSH-induced stimulation of neurite outgrowth in neuro 2A cells. *Brain Res Mol Brain Res* 36: 37-44.
- Ahlgren, R., G. Suske, M. R. Waterman und J. Lund, 1999 Role of Sp1 in cAMP-dependent transcriptional regulation of the bovine CYP11A gene. *J Biol Chem* 274: 19422-19428.
- Ahren, B., 2011 GLP-1 for type 2 diabetes. *Exp Cell Res* 317: 1239-1245.
- Air, E. L., S. C. Benoit, K. A. Blake Smith, D. J. Clegg und S. C. Woods, 2002 Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 72: 423-429.
- Alenina, N., D. Kikic, M. Todiras, V. Mosienko, F. Qadri *et al.*, 2009 Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10332-10337.
- Almahariq, M., F. C. Mei und X. Cheng, 2014 Cyclic AMP sensor EPAC proteins and energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 25: 60-71.
- Almahariq, M., T. Tsalkova, F. C. Mei, H. Chen, J. Zhou *et al.*, 2013 A novel EPAC-specific inhibitor suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion. *Mol Pharmacol* 83: 122-128.
- Altarejos, J. Y., N. Goebel, M. D. Conkright, H. Inoue, J. Xie *et al.*, 2008 The Creb1 coactivator Crtc1 is required for energy balance and fertility. *Nat Med* 14: 1112-1117.
- Altarejos, J. Y., und M. Montminy, 2011 CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 141-151.
- Alvarez, E., M. D. Martinez, I. Roncero, J. A. Chowen, B. Garcia-Cuartero *et al.*, 2005 The expression of GLP-1 receptor mRNA and protein allows the effect of GLP-1 on glucose metabolism in the human hypothalamus and brainstem. *J Neurochem* 92: 798-806.
- Aronne, L., W. Shanahan, R. Fain, A. Glicklich, W. Soliman *et al.*, 2014 Safety and efficacy of lorcaserin: a combined analysis of the BLOOM and BLOSSOM trials. *Postgrad Med* 126: 7-18.
- Asahara, H., B. Santoso, E. Guzman, K. Du, P. A. Cole *et al.*, 2001 Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB. *Mol Cell Biol* 21: 7892-7900.
- Bado, A., S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J.-P. Laigneau *et al.*, 1998 The stomach is a source of leptin. *Nature* 394: 790-793.
- Bady, I., N. Marty, M. Dallaporta, M. Emery, J. Gyger *et al.*, 2006 Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. *Diabetes* 55: 988-995.

- Baljinnyam, E., M. S. De Lorenzo, L. H. Xie, M. Iwatsubo, S. Chen *et al.*, 2010 Exchange protein directly activated by cyclic AMP increases melanoma cell migration by a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. *Cancer Res* 70: 5607-5617.
- Balthasar, N., L. T. Dalgard, C. E. Lee, J. Yu, H. Funahashi *et al.*, 2005 Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123: 493-505.
- Banks, W. A., 2006 The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. *Physiology & Behavior* 89: 472-476.
- Bannister, A. J., und T. Kouzarides, 1996 The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* 384: 641-643.
- Bates, S. H., W. H. Stearns, T. A. Dundon, M. Schubert, A. W. K. Tso *et al.*, 2003 STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 421: 856-859.
- Batterham, R. L., und S. R. Bloom, 2003 The gut hormone peptide YY regulates appetite. *Ann N Y Acad Sci* 994: 162-168.
- Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen *et al.*, 2002 Gut hormone PYY<sub>3-36</sub> physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650-654.
- Beck, B., M. Jhanwar-Uniyal, A. Bulet, M. Chapleur-Chateau, S. F. Leibowitz *et al.*, 1990 Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. *Brain Res* 528: 245-249.
- Belcheva, M. M., Z. Vogel, E. Ignatova, T. Avidor-Reiss, R. Zippel *et al.*, 1998 Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. *J Neurochem* 70: 635-645.
- Belsham, D. D., F. Cai, H. Cui, S. R. Smukler, A. M. Salapatek *et al.*, 2004 Generation of a phenotypic array of hypothalamic neuronal cell models to study complex neuroendocrine disorders. *Endocrinology* 145: 393-400.
- Belsham, D. D., L. J. Fick, P. S. Dalvi, M. L. Centeno, J. A. Chalmers *et al.*, 2009 Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons. *Faseb j* 23: 4256-4265.
- Benarroch, E. E., 2012 Insulin-like growth factors in the brain and their potential clinical implications. *Neurology* 79: 2148-2153.
- Berkowitz, L. A., K. T. Riabowol und M. Z. Gilman, 1989 Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse c-fos promoter. *Mol Cell Biol* 9: 4272-4281.
- Best, J. L., C. A. Amezcua, B. Mayr, L. Flechner, C. M. Murawsky *et al.*, 2004 Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17622-17627.
- Bewick, G. A., J. V. Gardiner, W. S. Dhillon, A. S. Kent, N. E. White *et al.*, 2005 Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *Faseb j* 19: 1680-1682.

- Bianco, A. C., und B. W. Kim, 2006 Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116: 2571-2579.
- Biedler, J. L., L. Helson und B. A. Spengler, 1973 Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33: 2643-2652.
- Bito, H., K. Deisseroth und R. W. Tsien, 1996 CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca(2+)- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell* 87: 1203-1214.
- Bittinger, M. A., E. McWhinnie, J. Meltzer, V. Iourgenko, B. Latario *et al.*, 2004 Activation of cAMP Response Element-Mediated Gene Expression by Regulated Nuclear Transport of TORC Proteins. *Current Biology* 14: 2156-2161.
- Blaukat, A., A. Barac, M. J. Cross, S. Offermanns und I. Dikic, 2000 G Protein-Coupled Receptor-Mediated Mitogen-Activated Protein Kinase Activation through Cooperation of G $\alpha$ (q) and G $\alpha$ (i) Signals. *Molecular and Cellular Biology* 20: 6837-6848.
- Blomqvist, A. G., und H. Herzog, 1997 Y-receptor subtypes—how many more? *Trends in Neurosciences* 20: 294-298.
- Blundell, J. E., 1977 Is there a role for serotonin (5-hydroxytryptamine) in feeding? *Int J Obes* 1: 15-42.
- Bonni, A., D. D. Ginty, H. Dudek und M. E. Greenberg, 1995 Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci* 6: 168-183.
- Boosalis, M. G., N. Gemayel, A. Lee, G. A. Bray, L. Laine *et al.*, 1992 Cholecystokinin and satiety: effect of hypothalamic obesity and gastric bubble insertion. *Am J Physiol* 262: R241-244.
- Borland, G., R. J. Bird, T. M. Palmer und S. J. Yarwood, 2009 Activation of protein kinase Calpha by EPAC1 is required for the ERK- and CCAAT/enhancer-binding protein beta-dependent induction of the SOCS-3 gene by cyclic AMP in COS1 cells. *J Biol Chem* 284: 17391-17403.
- Bos, J. L., 1989 ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689.
- Bos, J. L., 2006 Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci* 31: 680-686.
- Bothwell, M., 1995 Functional interactions of neurotrophins and neurotrophin receptors. *Annu Rev Neurosci* 18: 223-253.
- Bouschet, T., V. Perez, C. Fernandez, J. Bockaert, A. Eychene *et al.*, 2003 Stimulation of the ERK pathway by GTP-loaded Rap1 requires the concomitant activation of Ras, protein kinase C, and protein kinase A in neuronal cells. *J Biol Chem* 278: 4778-4785.
- Bouwknicht, J. A., J. van der Gugten, T. H. Hijzen, R. A. Maes, R. Hen *et al.*, 2001 Male and female 5-HT(1B) receptor knockout mice have higher body weights than wildtypes. *Physiol Behav* 74: 507-516.
- Breisch, S. T., F. P. Zelman und B. G. Hoebel, 1976 Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* 192: 382-385.
- Breit, A., V. Besik, H. J. Solinski, S. Muehlich, E. Glas *et al.*, 2015 Serine-727 Phosphorylation Activates Hypothalamic STAT-3 Independently From Tyrosine-705 Phosphorylation. *Molecular Endocrinology* 29: 445-459.

- Breit, A., K. Wicht, I. Boekhoff, E. Glas, L. Lauffer *et al.*, 2016 Glucose enhances basal or melanocortin-induced cAMP response element activity in hypothalamic cells. *Mol Endocrinol*: me20161001.
- Breit, A., K. Wolff, H. Kalwa, H. Jarry, T. Buch *et al.*, 2006 The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem* 281: 37447-37456.
- Brindle, P., S. Linke und M. Montminy, 1993 Protein-kinase-A-dependent activator in transcription factor CREB reveals new role for CREM repressors. *Nature* 364: 821-824.
- Brindle, P., T. Nakajima und M. Montminy, 1995 Multiple protein kinase A-regulated events are required for transcriptional induction by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10521-10525.
- Brunetti, A., B. A. Maddux, K. Y. Wong und I. D. Goldfine, 1989 Muscle cell differentiation is associated with increased insulin receptor biosynthesis and messenger RNA levels. *Journal of Clinical Investigation* 83: 192-198.
- Buch, T. R., D. Heling, E. Damm, T. Gudermann und A. Breit, 2009 Pertussis toxin-sensitive signaling of melanocortin-4 receptors in hypothalamic GT1-7 cells defines agouti-related protein as a biased agonist. *J Biol Chem* 284: 26411-26420.
- Bullo, M., M. R. Peeraully, P. Trayhurn, J. Folch und J. Salas-Salvado, 2007 Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. *Eur J Endocrinol* 157: 303-310.
- Bullock, B. P., und J. F. Habener, 1998 Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* 37: 3795-3809.
- Burke, L. K., B. Doslikova, G. D'Agostino, A. S. Garfield, G. Farooq *et al.*, 2014 5-HT obesity medication efficacy via POMC activation is maintained during aging. *Endocrinology* 155: 3732-3738.
- Butte, M. J., P. K. Hwang, W. C. Mobley und R. J. Fletterick, 1998 Crystal structure of neurotrophin-3 homodimer shows distinct regions are used to bind its receptors. *Biochemistry* 37: 16846-16852.
- Cai, H., D. Liu und J. G. N. Garcia, 2008 CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovascular Research* 77: 30-34.
- Campbell, D. J., 2001 The kallikrein-kinin system in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 1060-1065.
- Camps, M., A. Carozzi, P. Schnabel, A. Scheer, P. J. Parker *et al.*, 1992 Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature* 360: 684-686.
- Cardinaux, J.-R., J. C. Notis, Q. Zhang, N. Vo, J. C. Craig *et al.*, 2000 Recruitment of CREB Binding Protein Is Sufficient for CREB-Mediated Gene Activation. *Molecular and Cellular Biology* 20: 1546-1552.
- Carlezon, W. A., Jr., R. S. Duman und E. J. Nestler, 2005 The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28: 436-445.
- Carniglia, L., D. Durand, C. Caruso und M. Lasaga, 2013 Effect of NDP-alpha-MSH on PPAR-gamma and -beta expression and anti-inflammatory cytokine release in rat astrocytes and microglia. *PLoS One* 8: e57313.

- Caruso, C., L. Carniglia, D. Durand, P. V. Gonzalez, T. N. Scimonelli *et al.*, 2012 Melanocortin 4 receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes through cyclic AMP-protein kinase A pathway. *Mol Cell Endocrinol* 348: 47-54.
- Caruso, C., C. Mohn, A. L. Karara, V. Rettori, H. Watanobe *et al.*, 2004 Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats. *Neuroendocrinology* 79: 278-286.
- Caruso, C., M. Sanchez, D. Durand, L. Perez Mde, P. V. Gonzalez *et al.*, 2010 alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tumor necrosis factor-alpha expression but not tumor necrosis factor-alpha receptor expression in cultured hypothalamic neurons. *J Neuroimmunol* 227: 52-59.
- Ch'ng, Toh H., B. Uzgil, P. Lin, Nuraly K. Avliyakov, Thomas J. O'Dell *et al.*, 2012 Activity-Dependent Transport of the Transcriptional Coactivator CRTCL1 from Synapse to Nucleus. *Cell* 150: 207-221.
- Chai, B., J. Y. Li, W. Zhang, E. Newman, J. Ammori *et al.*, 2006 Melanocortin-4 receptor-mediated inhibition of apoptosis in immortalized hypothalamic neurons via mitogen-activated protein kinase. *Peptides* 27: 2846-2857.
- Chai, B., J. Y. Li, W. Zhang, H. Wang und M. W. Mulholland, 2009 Melanocortin-4 receptor activation inhibits c-Jun N-terminal kinase activity and promotes insulin signaling. *Peptides* 30: 1098-1104.
- Chaldakov, G. N., M. Fiore, I. S. Stankulov, L. Manni, M. G. Hristova *et al.*, 2004 Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome: a role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? *Prog Brain Res* 146: 279-289.
- Challis, B. G., A. P. Coll, G. S. Yeo, S. B. Pinnock, S. L. Dickson *et al.*, 2004 Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4695-4700.
- Chan, J. M., E. B. Rimm, G. A. Colditz, M. J. Stampfer und W. C. Willett, 1994 Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17: 961-969.
- Chen, H., T. Tsalkova, F. C. Mei, Y. Hu, X. Cheng *et al.*, 2012 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 4038-4043.
- Chen, J., und J. Stubbe, 2005 Bleomycins: towards better therapeutics. *Nat Rev Cancer* 5: 102-112.
- Chepurny, O. G., C. A. Leech, G. G. Kelley, I. Dzhura, E. Dzhura *et al.*, 2009 Enhanced Rap1 activation and insulin secretagogue properties of an acetoxymethyl ester of an Epac-selective cyclic AMP analog in rat INS-1 cells: studies with 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *J Biol Chem* 284: 10728-10736.
- Chey, W. Y., S. Hitanant, J. Hendricks und S. H. Lorber, 1970 Effect of Secretin and Cholecystokinin on Gastric Emptying and Gastric Secretion in Man. *Gastroenterology* 58: 820-827.
- Chiappini, F., L. L. Cunha, J. C. Harris und A. N. Hollenberg, 2011 Lack of cAMP-response Element-binding Protein 1 in the Hypothalamus Causes Obesity. *Journal of Biological Chemistry* 286: 8094-8105.
- Choi, J. W., S. Lim, Y. S. Oh, E. K. Kim, S. H. Kim *et al.*, 2010 Subtype-specific role of phospholipase C-beta in bradykinin and LPA signaling through differential binding of different PDZ scaffold proteins. *Cell Signal* 22: 1153-1161.

- Chomczynski, P., und N. Sacchi, 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede *et al.*, 2003 cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* 278: 35394-35402.
- Cohen, S., 1962 Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562.
- Cole, S. W., und L. M. Lundquist, 2013 Icatibant for the treatment of hereditary angioedema. *Ann Pharmacother* 47: 49-55.
- Cone, R. D., 2005 Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8: 571-578.
- Conkright, M. D., G. Canettieri, R. Screaton, E. Guzman, L. Miraglia *et al.*, 2003 TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell* 12: 413-423.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens *et al.*, 1996 Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334: 292-295.
- Cook, S. J., und F. McCormick, 1993 Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* 262: 1069-1072.
- Corredor, R. G., E. F. Trakhtenberg, W. Pita-Thomas, X. Jin, Y. Hu *et al.*, 2012 Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. *J Neurosci* 32: 7734-7744.
- Costes, S., C. Broca, G. Bertrand, A. D. Lajoix, D. Bataille *et al.*, 2006 ERK1/2 control phosphorylation and protein level of cAMP-responsive element-binding protein: a key role in glucose-mediated pancreatic beta-cell survival. *Diabetes* 55: 2220-2230.
- Cote-Vélez, A., A. Pérez-Maldonado, J. Osuna, B. Barrera, J.-L. Charli *et al.*, 2011 Creb and Sp/Krüppel response elements cooperate to control rat TRH gene transcription in response to cAMP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1809: 191-199.
- Cowley, M. A., N. Pronchuk, W. Fan, D. M. Dinulescu, W. F. Colmers *et al.*, 1999 Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24: 155-163.
- Cowley, M. A., R. G. Smith, S. Diano, M. Tschop, N. Pronchuk *et al.*, 2003 The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37: 649-661.
- Crespo, P., N. Xu, W. F. Simonds und J. S. Gutkind, 1994 Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 369: 418-420.
- Cuatrecasas, P., 1972 Isolation of the Insulin Receptor of Liver and Fat-Cell Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 318-322.
- Cummings, D. E., K. Clement, J. Q. Purnell, C. Vaisse, K. E. Foster *et al.*, 2002 Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 8: 643-644.

- Cummings, D. E., und M. W. Schwartz, 2000 Melanocortins and body weight: a tale of two receptors. *Nat Genet* 26: 8-9.
- Currie, P. J., C. D. Coiro, T. Niyomchai, A. Lira und F. Farahmand, 2002 Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 709-716.
- Cyr, A., und M. Boukadoum, 2013 Habituation: a non-associative learning rule design for spiking neurons and an autonomous mobile robots implementation. *Bioinspir Biomim* 8: 016007.
- Cyr, N. E., A. M. Toorie, J. S. Steger, M. M. Sochat, S. Hyner *et al.*, 2013 Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic alpha-MSH and TRH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: E640-650.
- Damm, E., T. R. Buech, T. Gudermann und A. Breit, 2012 Melanocortin-induced PKA activation inhibits AMPK activity via ERK-1/2 and LKB-1 in hypothalamic GT1-7 cells. *Mol Endocrinol* 26: 643-654.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins *et al.*, 2002 Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.
- De Cesare, D., S. Jacquot, A. Hanauer und P. Sassone-Corsi, 1998 Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12202-12207.
- de Rooij, J., F. J. Zwartkruis, M. H. Verheijen, R. H. Cool, S. M. Nijman *et al.*, 1998 Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474-477.
- De Silva, A., und S. R. Bloom, 2012 Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity. *Gut and Liver* 6: 10-20.
- Dentin, R., S. Hedrick, J. Xie, J. Yates, 3rd und M. Montminy, 2008 Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* 319: 1402-1405.
- Diaz-Gallardo, M. Y., A. Cote-Velez, J. L. Charli und P. Joseph-Bravo, 2010 A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signalling in hypothalamic neurones prevents binding of phosphorylated cAMP response element binding protein and glucocorticoid receptor at the CRE-Like and composite GRE sites of thyrotrophin-releasing hormone gene promoter. *J Neuroendocrinol* 22: 282-293.
- Dietrich, J. W., A. Tesche, C. R. Pickardt und U. Mitzdorf, 2004 Thyrotropic feedback control: evidence for an additional ultrashort feedback loop from fractal analysis. *Cybernetics and Systems* 35: 315-331.
- Dong, L., J. Wen, E. Pier, X. Zhang, B. Zhang *et al.*, 2010 Melanocyte-stimulating Hormone directly enhances UV-induced DNA repair in keratinocytes by an XPA-dependent mechanism. *Cancer research* 70: 3547-3556.
- Doslikova, B., A. S. Garfield, J. Shaw, M. L. Evans, D. Burdakov *et al.*, 2013 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist anorectic efficacy potentiated by 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist coapplication: an effect mediated via increased proportion of pro-opiomelanocortin neurons activated. *J Neurosci* 33: 9800-9804.
- Druce, M., und S. R. Bloom, 2006 The regulation of appetite. *Archives of Disease in Childhood* 91: 183-187.

- Drucker, D. J., J. Philippe, S. Mojsov, W. L. Chick und J. F. Habener, 1987 Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 3434-3438.
- Dumuis, A., R. Bouhelal, M. Sebben, R. Cory und J. Bockaert, 1988 A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* 34: 880-887.
- Dzhura, I., O. G. Chepurny, G. G. Kelley, C. A. Leech, M. W. Roe *et al.*, 2010 Epac2-dependent mobilization of intracellular Ca(2)+ by glucagon-like peptide-1 receptor agonist exendin-4 is disrupted in beta-cells of phospholipase C-epsilon knockout mice. *J Physiol* 588: 4871-4889.
- Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima *et al.*, 1998 Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21: 1375-1385.
- Erhardt, P., J. Troppmair, U. R. Rapp und G. M. Cooper, 1995 Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 15: 5524-5530.
- Esposito, D., P. Patel, R. M. Stephens, P. Perez, M. V. Chao *et al.*, 2001 The Cytoplasmic and Transmembrane Domains of the p75 and Trk A Receptors Regulate High Affinity Binding to Nerve Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* 276: 32687-32695.
- Fani, L., S. Bak, P. Delhanty, E. F. van Rossum und E. L. van den Akker, 2014 The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. *Int J Obes (Lond)* 38: 163-169.
- Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly, Q. H. Huang, J. B. Tatro *et al.*, 2000a alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci* 20: 1550-1558.
- Fekete, C., G. Legradi, E. Mihaly, J. B. Tatro, W. M. Rand *et al.*, 2000b alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 289: 152-156.
- Fekete, C., E. Mihaly, L. G. Luo, J. Kelly, J. T. Clausen *et al.*, 2000c Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci* 20: 9224-9234.
- Fernandez, A. M., und I. Torres-Aleman, 2012 The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* 13: 225-239.
- Ferreri, K., G. Gill und M. Montminy, 1994 The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 1210-1213.
- Ferrini, F., C. Salio, L. Lossi und A. Merighi, 2009 Ghrelin in Central Neurons. *Current Neuropharmacology* 7: 37-49.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver *et al.*, 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

- Fisch, T. M., R. Prywes, M. C. Simon und R. G. Roeder, 1989 Multiple sequence elements in the c-fos promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev* 3: 198-211.
- Fitzgerald, L. R., I. J. Mannan, G. M. Dytko, H.-L. Wu und P. Nambi, 1999 Measurement of Responses from Gi-, Gs-, or Gq-Coupled Receptors by a Multiple Response Element/cAMP Response Element-Directed Reporter Assay. *Analytical Biochemistry* 275: 54-61.
- Flegal, K. M., B. K. Kit, H. Orpana und B. I. Graubard, 2013 Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: a systematic review and meta-analysis. *Jama* 309: 71-82.
- Fleming, I., B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp und R. Busse, 2001 Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88: E68-75.
- Foster, L. A., N. K. Ames und R. S. Emery, 1991 Food intake and serum insulin responses to intraventricular infusions of insulin and IGF-I. *Physiology & Behavior* 50: 745-749.
- Freeland, K., Y. Z. Liu und D. S. Latchman, 2000 Distinct signalling pathways mediate the cAMP response element (CRE)-dependent activation of the calcitonin gene-related peptide gene promoter by cAMP and nerve growth factor. *Biochem J* 345 Pt 2: 233-238.
- Friedman, J. M., und J. L. Halaas, 1998 Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.
- Fu, L. Y., und A. N. van den Pol, 2008 Agouti-related peptide and MC3/4 receptor agonists both inhibit excitatory hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *J Neurosci* 28: 5433-5449.
- Fukuda, M., K. W. Williams, L. Gautron und J. K. Elmquist, 2011 Induction of leptin resistance by activation of cAMP-Epac signaling. *Cell Metab* 13: 331-339.
- Gallo, G., A. F. Ernst, S. C. McLoon und P. C. Letourneau, 2002 Transient PKA activity is required for initiation but not maintenance of BDNF-mediated protection from nitric oxide-induced growth-cone collapse. *J Neurosci* 22: 5016-5023.
- Gantz, I., H. Miwa, Y. Konda, Y. Shimoto, T. Tashiro *et al.*, 1993 Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 15174-15179.
- Gerald, C., M. W. Walker, L. Criscione, E. L. Gustafson, C. Batzl-Hartmann *et al.*, 1996 A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 382: 168-171.
- Gibbs, J., R. C. Young und G. P. Smith, 1973 Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245: 323-325.
- Gilman, A. G., 1987 G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649.
- Ginty, D. D., A. Bonni und M. E. Greenberg, 1994 Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 77: 713-725.
- Giuliani, D., C. Mioni, D. Altavilla, S. Leone, C. Bazzani *et al.*, 2006 Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology* 147: 1126-1135.

- Glas, E., H. Mückter, T. Gudermann und A. Breit, 2016 Exchange factors directly activated by cAMP mediate melanocortin 4 receptor-induced gene expression. *Sci Rep* 6: 32776.
- Gloerich, M., und J. L. Bos, 2010 Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 355-375.
- Goldstein, A. M., M. T. Landi, S. Tsang, M. C. Fraser, D. J. Munroe *et al.*, 2005 Association of MC1R variants and risk of melanoma in melanoma-prone families with CDKN2A mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 2208-2212.
- Gonzalez, G. A., und M. R. Montminy, 1989 Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59: 675-680.
- Gonzalez, P. V., H. B. Schiöth, M. Lasaga und T. N. Scimonelli, 2009 Memory impairment induced by IL-1 $\beta$  is reversed by  $\alpha$ -MSH through central melanocortin-4 receptors. *Brain, Behavior, and Immunity* 23: 817-822.
- Goran, M. I., G. D. Ball und M. L. Cruz, 2003 Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 1417-1427.
- Grahame-Smith, D. G., 1967 The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain. *Biochem J* 105: 351-360.
- Grandoch, M., S. S. Roscioni und M. Schmidt, 2010 The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br J Pharmacol* 159: 265-284.
- Greco, S., A. Muscella, M. G. Elia, S. Romano, C. Storelli *et al.*, 2004 Mitogenic signalling by B2 bradykinin receptor in epithelial breast cells. *J Cell Physiol* 201: 84-96.
- Greenberg, I., F. Perna, M. Kaplan und M. A. Sullivan, 2005 Behavioral and psychological factors in the assessment and treatment of obesity surgery patients. *Obes Res* 13: 244-249.
- Grider, J. R., 1994 Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J Nutr* 124: 1334s-1339s.
- Gropp, E., M. Shanabrough, E. Borok, A. W. Xu, R. Janoschek *et al.*, 2005 Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8: 1289-1291.
- Gudermann, T., R. Grosse und G. Schultz, 2000 Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361: 345-362.
- Guo, F., K. Bakal, Y. Minokoshi und A. N. Hollenberg, 2004 Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 145: 2221-2227.
- Ha, S., und L. Redmond, 2008 ERK mediates activity dependent neuronal complexity via sustained activity and CREB-mediated signaling. *Dev Neurobiol* 68: 1565-1579.
- Hahm, S., T. M. Mizuno, T. J. Wu, J. P. Wisor, C. A. Priest *et al.*, 1999 Targeted deletion of the Vgf gene indicates that the encoded secretory peptide precursor plays a novel role in the regulation of energy balance. *Neuron* 23: 537-548.
- Hanahan, D., 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580.

- Hansen, M. J., H. B. Schioth und M. J. Morris, 2005 Feeding responses to a melanocortin agonist and antagonist in obesity induced by a palatable high-fat diet. *Brain Res* 1039: 137-145.
- Harris, M., C. Aschkenasi, C. F. Elias, A. Chandrankunnel, E. A. Nillni *et al.*, 2001 Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest* 107: 111-120.
- Haskell-Luevano, C., P. Chen, C. Li, K. Chang, M. S. Smith *et al.*, 1999 Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology* 140: 1408-1415.
- Hatakeyama, H., N. Takahashi, T. Kishimoto, T. Nemoto und H. Kasai, 2007 Two cAMP-dependent pathways differentially regulate exocytosis of large dense-core and small vesicles in mouse beta-cells. *J Physiol* 582: 1087-1098.
- Hawley, R. J., R. J. Scheibe und J. A. Wagner, 1992 NGF induces the expression of the VGF gene through a cAMP response element. *J Neurosci* 12: 2573-2581.
- He, L., A. Sabet, S. Djedjos, R. Miller, X. Sun *et al.*, 2009 Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell* 137: 635-646.
- Heisler, L. K., N. Pronchuk, K. Nonogaki, L. Zhou, J. Raber *et al.*, 2007 Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *J Neurosci* 27: 6956-6964.
- Heitsch, H., 2000 Bradykinin B2 receptor as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 13: 213-225.
- Henquin, J. C., und M. Nenquin, 2014 Activators of PKA and Epac distinctly influence insulin secretion and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in female mouse islets stimulated by glucose and tolbutamide. *Endocrinology* 155: 3274-3287.
- Hepler, J. R., und A. G. Gilman, 1992 G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 17: 383-387.
- Herzig, S., F. Long, U. S. Jhala, S. Hedrick, R. Quinn *et al.*, 2001 CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413: 179-183.
- Himmler, A., C. Stratowa und A. P. Czernilofsky, 1993 Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines. *J Recept Res* 13: 79-94.
- Hinkle P.M., Shanshala E. D. und Y. Z., 1991 Epidermal Growth Factor Decreases the Concentration of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Receptors and TRH Responses in Pituitary GH4C1 Cells. *Endocrinology* 129: 1283-1288.
- Hochbaum, D., T. Tanos, F. Ribeiro-Neto, D. Altschuler und O. A. Coso, 2003 Activation of JNK by Epac is independent of its activity as a Rap guanine nucleotide exchanger. *J Biol Chem* 278: 33738-33746.
- Holz, G. G., 2004 Epac: A new cAMP-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes* 53: 5-13.
- Huang, K. P., 1989 The mechanism of protein kinase C activation. *Trends Neurosci* 12: 425-432.
- Huszar, D., C. A. Lynch, V. Fairchild-Huntress, J. H. Dunmore, Q. Fang *et al.*, 1997 Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell* 88: 131-141.

- Iguchi-Arigo, S. M., und W. Schaffner, 1989 CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3: 612-619.
- Iguchi, H., T. Mitsui, M. Ishida, S. Kanba und J. Arita, 2011 cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice. *Endocrine journal* 58: 747-759.
- Im, S., O. Moro, F. Peng, E. E. Medrano, J. Cornelius *et al.*, 1998 Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation. *Cancer Res* 58: 47-54.
- Imeryuz, N., B. C. Yegen, A. Bozkurt, T. Coskun, M. L. Villanueva-Penacarrillo *et al.*, 1997 Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol* 273: G920-927.
- Inoue, H., H. Nojima und H. Okayama, 1990 High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28.
- Iourgenko, V., W. Zhang, C. Mickanin, I. Daly, C. Jiang *et al.*, 2003 Identification of a family of cAMP response element-binding protein coactivators by genome-scale functional analysis in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12147-12152.
- Ishizuka, T., H. Goshima, A. Ozawa und Y. Watanabe, 2014 Stimulation of 5-HT<sub>4</sub> receptor enhances differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 41: 345-350.
- Jacoby, E., R. Bouhelal, M. Gerspacher und K. Seuwen, 2006 The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* 1: 761-782.
- Jarrard, R. E., Y. Wang, A. E. Salyer, E. P. Pratt, I. M. Soderling *et al.*, 2013 Potentiation of sulfonylurea action by an EPAC-selective cAMP analog in INS-1 cells: comparison of tolbutamide and gliclazide and a potential role for EPAC activation of a 2-APB-sensitive Ca<sup>2+</sup> influx. *Mol Pharmacol* 83: 191-205.
- Jelinek, T., P. Dent, T. W. Sturgill und M. J. Weber, 1996 Ras-induced activation of Raf-1 is dependent on tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 16: 1027-1034.
- Jethwa, P. H., und F. J. Ebling, 2008 Role of VGF-derived peptides in the control of food intake, body weight and reproduction. *Neuroendocrinology* 88: 80-87.
- Johannessen, M., M. P. Delghandi und U. Moens, 2004 What turns CREB on? *Cellular Signalling* 16: 1211-1227.
- Jorissen, R. N., F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward *et al.*, 2003 Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284: 31-53.
- Kai, A. K., A. K. Lam, Y. Chen, A. C. Tai, X. Zhang *et al.*, 2013 Exchange protein activated by cAMP 1 (Epac1)-deficient mice develop beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Faseb j* 27: 4122-4135.
- Kang, G., J. W. Joseph, O. G. Chepurny, M. Monaco, M. B. Wheeler *et al.*, 2003 Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 278: 8279-8285.

- Kang, J., Y. Shi, B. Xiang, B. Qu, W. Su *et al.*, 2005 A nuclear function of beta-arrestin1 in GPCR signaling: regulation of histone acetylation and gene transcription. *Cell* 123: 833-847.
- Kang, J. G., und C.-Y. Park, 2012 Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes & Metabolism Journal* 36: 13-25.
- Kaplan, D. R., und F. D. Miller, 1997 Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr Opin Cell Biol* 9: 213-221.
- Kask, A., F. Mutulis, R. Muceniece, R. Pahkla, I. Mutule *et al.*, 1998 Discovery of a novel superpotent and selective melanocortin-4 receptor antagonist (HS024): evaluation in vitro and in vivo. *Endocrinology* 139: 5006-5014.
- Kasper, L. H., S. Lerach, J. Wang, S. Wu, T. Jeevan *et al.*, 2010 CBP/p300 double null cells reveal effect of coactivator level and diversity on CREB transactivation. *Embo j* 29: 3660-3672.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya *et al.*, 1998 A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282: 2275-2279.
- Kee, B. L., J. Arias und M. R. Montminy, 1996 Adaptor-mediated recruitment of RNA polymerase II to a signal-dependent activator. *J Biol Chem* 271: 2373-2375.
- Kelley, G. G., O. G. Chepurny, F. Schwede, H. G. Genieser, C. A. Leech *et al.*, 2009 Glucose-dependent potentiation of mouse islet insulin secretion by Epac activator 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM. *Islets* 1: 260-265.
- Kennett, G. A., und G. Curzon, 1988 Evidence that hypophagia induced by mCPP and TFMPP requires 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors; hypophagia induced by RU 24969 only requires 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 96: 93-100.
- Kennett, G. A., M. D. Wood, F. Bright, B. Trail, G. Riley *et al.*, 1997 SB 242084, a selective and brain penetrant 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36: 609-620.
- Kiermayer, S., R. M. Biondi, J. Imig, G. Plotz, J. Haupenthal *et al.*, 2005 Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell* 16: 5639-5648.
- Kievit, P., H. Halem, D. L. Marks, J. Z. Dong, M. M. Glavas *et al.*, 2013 Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes* 62: 490-497.
- Kim, B. J., K. H. Park, C. Y. Yim, S. Takasawa, H. Okamoto *et al.*, 2008 Generation of nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose by glucagon-like peptide-1 evokes Ca<sup>2+</sup> signal that is essential for insulin secretion in mouse pancreatic islets. *Diabetes* 57: 868-878.
- Kim, M. S., M. Rossi, S. Abusnana, D. Sunter, D. G. Morgan *et al.*, 2000 Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49: 177-182.
- Kim, M. S., C. J. Small, S. H. Russell, D. G. A. Morgan, C. R. Abbott *et al.*, 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: 276-282.

- Kishi, T., C. J. Aschkenasi, B. J. Choi, M. E. Lopez, C. E. Lee *et al.*, 2005 Neuropeptide Y Y1 receptor mRNA in rodent brain: distribution and colocalization with melanocortin-4 receptor. *J Comp Neurol* 482: 217-243.
- Kitchener, S. J., und C. T. Dourish, 1994 An examination of the behavioural specificity of hypophagia induced by 5-HT1B, 5-HT1C and 5-HT2 receptor agonists using the post-prandial satiety sequence in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 113: 369-377.
- Kobayashi, H., Y. Narita, M. Nishida und H. Kurose, 2005 Beta-arrestin2 enhances beta2-adrenergic receptor-mediated nuclear translocation of ERK. *Cell Signal* 17: 1248-1253.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo *et al.*, 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- Koo, S. H., L. Flechner, L. Qi, X. Zhang, R. A. Screaton *et al.*, 2005 The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature* 437: 1109-1111.
- Krugmann, S., R. Williams, L. Stephens und P. T. Hawkins, 2004 ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol* 14: 1380-1384.
- Kwok, R. P. S., J. R. Lundblad, J. C. Chrivia, J. P. Richards, H. P. Bachinger *et al.*, 1994 Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370: 223-226.
- Ladyman, S. R., R. A. Augustine, E. Scherf, H. R. Phillipps, C. H. Brown *et al.*, 2016 Attenuated hypothalamic responses to alpha-melanocyte stimulating hormone during pregnancy in the rat. *J Physiol* 594: 1087-1101.
- Laemmli, U. K., 1970 Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam, D. D., A. S. Garfield, O. J. Marston, J. Shaw und L. K. Heisler, 2010 Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 84-91.
- Lapchak, P. A., und D. M. Araujo, 1994 NGF suppression of weight gain in adult female rats correlates with decreased hypothalamic cholecystokinin levels. *Brain Research* 655: 12-16.
- Lauffer, L., E. Glas, T. Gudermann und A. Breit, 2016 Endogenous 5-HT2C receptors phosphorylate the cAMP response element binding protein via protein kinase C-promoted activation of extracellular-regulated kinases-1/2 in hypothalamic mHypoA-2/10 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 358: 39-49.
- Lechan, R. M., und C. Fekete, 2006 Role of melanocortin signaling in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Peptides* 27: 310-325.
- Lecklin, A., I. Lundell, S. Salmela, P. T. Mannisto, A. G. Beck-Sickinger *et al.*, 2003 Agonists for neuropeptide Y receptors Y1 and Y5 stimulate different phases of feeding in guinea pigs. *Br J Pharmacol* 139: 1433-1440.
- Lee, E. J., S. H. Lee, J. W. Jung, W. Lee, B. J. Kim *et al.*, 2001 Differential regulation of cAMP-mediated gene transcription and ligand selectivity by MC3R and MC4R melanocortin receptors. *Eur J Biochem* 268: 582-591.

- Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone und B. L. Zuraw, 2005 International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27-77.
- Lefkowitz, R. J., und S. K. Shenoy, 2005 Transduction of Receptor Signals by  $\beta$ -Arrestins. *Science* 308: 512-517.
- Legradi, G., C. H. Emerson, R. S. Ahima, J. S. Flier und R. M. Lechan, 1997a Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 138: 2569-2576.
- Legradi, G., C. H. Emerson, R. S. Ahima, W. M. Rand, J. S. Flier *et al.*, 1998 Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 68: 89-97.
- Legradi, G., D. Holzer, L. P. Kapcala und R. M. Lechan, 1997b Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 66: 86-97.
- Lemmon, M. A., und J. Schlessinger, 2010 Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* 141: 1117-1134.
- Lerner, R. G., C. Depatie, G. A. Rutter, R. A. Screaton und N. Balthasar, 2009 A role for the CREB co-activator CRTC2 in the hypothalamic mechanisms linking glucose sensing with gene regulation. *EMBO Rep* 10: 1175-1181.
- Li, B., M. A. Kaetzel und J. R. Dedman, 2006 Signaling pathways regulating murine cardiac CREB phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 179-184.
- Li, P., H. J. Sun, L. L. Zhang, L. Ding, Y. Han *et al.*, 2013 Melanocortin 4 receptors in the paraventricular nucleus modulate the adipose afferent reflex in rat. *PLoS One* 8: e80295.
- Liddle, R. A., 1997 Cholecystokinin cells. *Annu Rev Physiol* 59: 221-242.
- Lin, H. C., und W. Y. Chey, 2003 Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regulatory Peptides* 114: 131-135.
- Lin, H. V., L. Plum, H. Ono, R. Gutierrez-Juarez, M. Shanabrough *et al.*, 2010 Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* 59: 337-346.
- Lin, S. L., N. N. Johnson-Farley, D. R. Lubinsky und D. S. Cowen, 2003 Coupling of neuronal 5-HT<sub>7</sub> receptors to activation of extracellular-regulated kinase through a protein kinase A-independent pathway that can utilize Epac. *Journal of Neurochemistry* 87: 1076-1085.
- Liu, F. C., und A. M. Graybiel, 1996 Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron* 17: 1133-1144.
- Liu, W., C. Chin-Chance, E.-J. Lee und W. L. Lowe, 2002 Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase Contributes to Insulin-Like Growth Factor I-Mediated Inhibition of Pancreatic  $\beta$ -Cell Death. *Endocrinology* 143: 3802-3812.
- Lonze, B. E., und D. D. Ginty, 2002 Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35: 605-623.

- Lopez De Jesus, M., M. B. Stope, P. A. Oude Weernink, Y. Mahlke, C. Borgermann *et al.*, 2006 Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation. *J Biol Chem* 281: 21837-21847.
- Lord, G. M., G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom *et al.*, 1998 Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394: 897-901.
- Lorenz, R., T. Aleksic, M. Wagner, G. Adler und C. K. Weber, 2008 The cAMP/Epac1/Rap1 pathway in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 37: 102-103.
- Lucas, G., J. Du, T. Romeas, O. Mnie-Filali, N. Haddjeri *et al.*, 2010 Selective serotonin reuptake inhibitors potentiate the rapid antidepressant-like effects of serotonin<sub>4</sub> receptor agonists in the rat. *PLoS One* 5: e9253.
- Lucas, J. J., A. Yamamoto, K. Scarce-Levie, F. Saudou und R. Hen, 1998 Absence of fenfluramine-induced anorexia and reduced c-Fos induction in the hypothalamus and central amygdaloid complex of serotonin 1B receptor knock-out mice. *J Neurosci* 18: 5537-5544.
- Lundberg, J. M., K. Tatemoto, L. Terenius, P. M. Hellstrom, V. Mutt *et al.*, 1982 Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4471-4475.
- Luo, Q., K. Viste, J. C. Urdy-Zaa, G. Senthil Kumar, W. W. Tsai *et al.*, 2012 Mechanism of CREB recognition and coactivation by the CREB-regulated transcriptional coactivator CRT2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 20865-20870.
- Luquet, S., F. A. Perez, T. S. Hnasko und R. D. Palmiter, 2005 NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310: 683-685.
- MacNeil, D. J., A. D. Howard, X. Guan, T. M. Fong, R. P. Nargund *et al.*, 2002 The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol* 450: 93-109.
- Maillet, M., S. J. Robert, M. Cacquevel, M. Gastineau, D. Vivien *et al.*, 2003 Crosstalk between Rap1 and Rac regulates secretion of sAPPalpha. *Nat Cell Biol* 5: 633-639.
- Mandolesi, G., S. Gargano, M. Pennuto, B. Illi, R. Molfetta *et al.*, 2002 NGF-dependent and tissue-specific transcription of *vgf* is regulated by a CREB-p300 and bHLH factor interaction. *FEBS Lett* 510: 50-56.
- Mangmool, S., A. K. Shukla und H. A. Rockman, 2010 beta-Arrestin-dependent activation of Ca(2+)/calmodulin kinase II after beta(1)-adrenergic receptor stimulation. *J Cell Biol* 189: 573-587.
- Mao, L. M., Q. Tang und J. Q. Wang, 2007 Protein kinase C-regulated cAMP response element-binding protein phosphorylation in cultured rat striatal neurons. *Brain Res Bull* 72: 302-308.
- Marceau, F., 1995 Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 30: 1-26.
- Margetic, S., C. Gazzola, G. G. Pegg und R. A. Hill, 2002 Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 1407-1433.
- Margolis, B., und E. Y. Skolnik, 1994 Activation of Ras by receptor tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 5: 1288-1299.

- Martin, J. R., M. Bos, F. Jenck, J. Moreau, V. Mutel *et al.*, 1998 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists: pharmacological characteristics and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 913-924.
- Martin, N. M., C. J. Small, A. Sajedi, X. H. Liao, R. E. Weiss *et al.*, 2004 Abnormalities of the hypothalamo-pituitary-thyroid axis in the pro-opiomelanocortin deficient mouse. *Regulatory Peptides* 122: 169-172.
- Matsumoto, K., T. Yamamoto, H. Kurachi, Y. Nishio, T. Takeda *et al.*, 1998 Human chorionic gonadotropin-alpha gene is transcriptionally activated by epidermal growth factor through cAMP response element in trophoblast cells. *J Biol Chem* 273: 7800-7806.
- Matthews, R. P., C. R. Guthrie, L. M. Wailes, X. Zhao, A. R. Means *et al.*, 1994 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol Cell Biol* 14: 6107-6116.
- Mayr, B., und M. Montminy, 2001 Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609.
- Mayr, B. M., G. Canettieri und M. R. Montminy, 2001 Distinct effects of cAMP and mitogenic signals on CREB-binding protein recruitment impart specificity to target gene activation via CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10936-10941.
- McAllister, A. K., 2001 Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 58: 1054-1060.
- McGuire, T. F., Y. Qian, A. Vogt, A. D. Hamilton und S. M. Sefti, 1996 Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. *J Biol Chem* 271: 27402-27407.
- McMinn, J. E., C. W. Wilkinson, P. J. Havel, S. C. Woods und M. W. Schwartz, 2000 Effect of intracerebroventricular  $\alpha$ -MSH on food intake, adiposity, c-Fos induction, and neuropeptide expression. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279: R695-R703.
- Mediero, A., M. Perez-Aso und B. N. Cronstein, 2014 Activation of EPAC1/2 is essential for osteoclast formation by modulating NF $\kappa$ B nuclear translocation and actin cytoskeleton rearrangements. *Faseb j* 28: 4901-4913.
- Meister, G., und T. Tuschl, 2004 Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349.
- Mellon, P. L., J. J. Windle, P. C. Goldsmith, C. A. Padula, J. L. Roberts *et al.*, 1990 Immortalization of hypothalamic GnRH by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 5: 1-10.
- Michael, M. D., R. N. Kulkarni, C. Postic, S. F. Previs, G. I. Shulman *et al.*, 2000 Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol Cell* 6: 87-97.
- Minokoshi, Y., T. Alquier, N. Furukawa, Y.-B. Kim, A. Lee *et al.*, 2004 AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428: 569-574.
- Mojsov, S., G. C. Weir und J. F. Habener, 1987 Insulinotropin: glucagon-like peptide I (7-37) co-encoded in the glucagon gene is a potent stimulator of insulin release in the perfused rat pancreas. *J Clin Invest* 79: 616-619.

- Mokdad, A. H., E. S. Ford, B. A. Bowman und et al., 2003 Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 289: 76-79.
- Monaghan, T. K., C. J. Mackenzie, R. Plevin und E. M. Lutz, 2008 PACAP-38 induces neuronal differentiation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells via cAMP-mediated activation of ERK and p38 MAP kinases. *J Neurochem* 104: 74-88.
- Monden, T., M. Yamada, S. Konaka, T. Satoh, H. Ezawa *et al.*, 1995 Transcriptional down-regulation by epidermal growth factor of TRH receptor mRNA in rat pituitary cells. *J Mol Endocrinol* 15: 73-79.
- Montminy, M. R., K. A. Sevarino, J. A. Wagner, G. Mandel und R. H. Goodman, 1986 Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 6682-6686.
- Morash, B., A. Li, P. R. Murphy, M. Wilkinson und E. Ur, 1999 Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140: 5995-5998.
- Mori, K., A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu *et al.*, 2000 Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin. *FEBS Letters* 486: 213-216.
- Mori, M. A., R. C. Araujo, F. C. Reis, D. G. Sgai, R. G. Fonseca *et al.*, 2008 Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* 57: 1491-1500.
- Morley, J. E., A. S. Levine, M. Grace und J. Kneip, 1985 Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent. *Brain Res* 341: 200-203.
- Morrison, D. K., und R. J. Davis, 2003 Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 91-118.
- Morton, G. J., und M. W. Schwartz, 2001 The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S56-62.
- Mountjoy, K. G., D. H. Willard und W. O. Wilkison, 1999 Agouti antagonism of melanocortin-4 receptor: greater effect with desacetyl-alpha-melanocyte-stimulating hormone (MSH) than with alpha-MSH. *Endocrinology* 140: 2167-2172.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang und P. H. Hofschneider, 1982 Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *The EMBO Journal* 1: 841-845.
- Newman, E. A., B. X. Chai, W. Zhang, J. Y. Li, J. B. Ammori *et al.*, 2006 Activation of the melanocortin-4 receptor mobilizes intracellular free calcium in immortalized hypothalamic neurons. *J Surg Res* 132: 201-207.
- Nichols, M., F. Weih, W. Schmid, C. DeVack, E. Kowenz-Leutz *et al.*, 1992 Phosphorylation of CREB affects its binding to high and low affinity sites: implications for cAMP induced gene transcription. *Embo j* 11: 3337-3346.
- Nie, M., L. Pang, H. Inoue und A. J. Knox, 2003 Transcriptional regulation of cyclooxygenase 2 by bradykinin and interleukin-1beta in human airway smooth muscle cells: involvement of different promoter elements, transcription factors, and histone h4 acetylation. *Mol Cell Biol* 23: 9233-9244.
- Nonogaki, K., A. M. Strack, M. F. Dallman und L. H. Tecott, 1998 Leptin-independent hyperphagia and type 2 diabetes in mice with a mutated serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nat Med* 4: 1152-1156.

- Normanno, N., A. De Luca, C. Bianco, L. Strizzi, M. Mancino *et al.*, 2006 Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366: 2-16.
- Norum, J. H., K. Hart und F. O. Levy, 2003 Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT<sub>4</sub>(b) and 5-HT<sub>7</sub>(a). *J Biol Chem* 278: 3098-3104.
- O'Halloran, D. J., G. C. Nikou, B. Kreymann, M. A. Ghatei und S. R. Bloom, 1990 Glucagon-like peptide-1 (7-36)-NH<sub>2</sub>: a physiological inhibitor of gastric acid secretion in man. *J Endocrinol* 126: 169-173.
- Obici, S., B. B. Zhang, G. Karkanias und L. Rossetti, 2002 Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8: 1376-1382.
- Obrietan, K., X. B. Gao und A. N. Van Den Pol, 2002 Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism--a positive feedback circuit in developing neurons. *J Neurophysiol* 88: 1005-1015.
- Oishi, M., und S. D. Cosloy, 1972 The genetic and biochemical basis of the transformability of *Escherichia coli* K12. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 49: 1568-1572.
- Oosterom, J., W. A. Nijenhuis, W. M. Schaaper, J. Slootstra, R. H. Meloen *et al.*, 1999 Conformation of the core sequence in melanocortin peptides directs selectivity for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem* 274: 16853-16860.
- Oury, F., V. K. Yadav, Y. Wang, B. Zhou, X. S. Liu *et al.*, 2010 CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons. *Genes Dev* 24: 2330-2342.
- Pabo, C. O., und R. T. Sauer, 1992 Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annual review of biochemistry* 61: 1053-1095.
- Padwal, R. S., und S. R. Majumdar, 2009 Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant. *The Lancet* 369: 71-77.
- Palmiter, R. D., J. C. Erickson, G. Hloppeter, S. C. Baraban und M. W. Schwartz, 1998 Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53: 163-199.
- Park, K. H., H. J. Park, K. S. Shin und M. K. Lee, 2014 Multiple treatments with L-3,4-dihydroxyphenylalanine modulate dopamine biosynthesis and neurotoxicity through the protein kinase A-transient extracellular signal-regulated kinase and exchange protein activation by cyclic AMP-sustained extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *J Neurosci Res* 92: 1746-1756.
- Parnell, E., T. M. Palmer und S. J. Yarwood, 2015 The future of EPAC-targeted therapies: agonism versus antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 36: 203-214.
- Patten, C. S., D. Daniels, A. Suzuki, S. J. Fluharty und D. K. Yee, 2007 Structural and signaling requirements of the human melanocortin 4 receptor for MAP kinase activation. *Regul Pept* 142: 111-122.
- Peeraully, M. R., J. R. Jenkins und P. Trayhurn, 2004 NGF gene expression and secretion in white adipose tissue: regulation in 3T3-L1 adipocytes by hormones and inflammatory cytokines. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 287: E331-E339.
- Perello, M., R. C. Stuart und E. A. Nillni, 2006 The Role of Intracerebroventricular Administration of Leptin in the Stimulation of Prothyrotropin Releasing Hormone Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Endocrinology* 147: 3296-3306.

- Pilkis, S. J., und D. K. Granner, 1992 Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909.
- Plata-Salaman, C. R., 1988 Food intake suppression by growth factors and platelet peptides by direct action in the central nervous system. *Neurosci Lett* 94: 161-166.
- Pratt, E. P., A. E. Salyer, M. L. Guerra und G. H. Hockerman, 2016 Ca<sup>2+</sup> influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels and Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release regulate cAMP accumulation and Epac1-dependent ERK 1/2 activation in INS-1 cells. *Mol Cell Endocrinol* 419: 60-71.
- Pugazhenthii, S., T. Boras, D. O'Connor, M. K. Meintzer, K. A. Heidenreich *et al.*, 1999 Insulin-like Growth Factor I-mediated Activation of the Transcription Factor cAMP Response Element-binding Protein in PC12 Cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase-mediated pathway. *Journal of Biological Chemistry* 274: 2829-2837.
- Pumiglia, K. M., H. LeVine, T. Haske, T. Habib, R. Jove *et al.*, 1995 A direct interaction between G-protein beta gamma subunits and the Raf-1 protein kinase. *J Biol Chem* 270: 14251-14254.
- Qadri, F., E. Stark, W. Hauser, O. Jöhren, A. Dendorfer *et al.*, 2004 Expression of kinin receptor mRNA in the HPA axis of type 1 and type 2 diabetic rats. *Int Immunopharmacol* 4: 571-576.
- Qatanani, M., und M. A. Lazar, 2007 Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21: 1443-1455.
- Qian, S., H. Chen, D. Weingarh, M. E. Trumbauer, D. E. Novi *et al.*, 2002 Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice. *Mol Cell Biol* 22: 5027-5035.
- Quinn, P. G., 1993 Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J Biol Chem* 268: 16999-17009.
- Quinn, P. G., und D. K. Granner, 1990 Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. *Mol Cell Biol* 10: 3357-3364.
- Raidoo, D. M., und K. D. Bhoola, 1997 Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol* 77: 39-44.
- Ramirez, D., J. Saba, L. Carniglia, D. Durand, M. Lasaga *et al.*, 2015 Melanocortin 4 receptor activates ERK-cFos pathway to increase brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 411: 28-37.
- Raybould, H. E., 2007 Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol* 7: 570-574.
- Rehfeld, J. F., 1981 Cholecystokinin as satiety signal. *Int J Obes* 5: 465-469.
- Rehmann, H., 2013 Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep* 3: 3032.
- Reiter, E., und R. J. Lefkowitz, 2006 GRKs and  $\beta$ -arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17: 159-165.
- Ren, Y., T. Satoh, M. Yamada, K. Hashimoto, S. Konaka *et al.*, 1998 Stimulation of the preprothyrotropin-releasing hormone gene by epidermal growth factor. *Endocrinology* 139: 195-203.

- Richard, D., Q. Huang und E. Timofeeva, 2000 The corticotropin-releasing hormone system in the regulation of energy balance in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24 Suppl 2: S36-39.
- Rohlf, C., S. Ahmad, F. Borellini, J. Lei und R. I. Glazer, 1997 Modulation of transcription factor Sp1 by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272: 21137-21141.
- Rosethorne, E. M., S. R. Nahorski und R. A. J. Challiss, 2008 Regulation of cyclic AMP response-element binding-protein (CREB) by G(q/11)-protein-coupled receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology* 75: 942-955.
- Roskoski, R., Jr., 2012 ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66: 105-143.
- Ru, Y., Y. Huang, H. Liu, J. Du, Z. Meng *et al.*, 2015  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone ameliorates ocular surface dysfunctions and lesions in a scopolamine-induced dry eye model via PKA-CREB and MEK-Erk pathways. *Scientific Reports* 5: 18619.
- Russo, V. C., P. D. Gluckman, E. L. Feldman und G. A. Werther, 2005 The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 26: 916-943.
- Salomon, Y., C. Londos und M. Rodbell, 1974 A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Analytical Biochemistry* 58: 541-548.
- Saltiel, A. R., 2016 New therapeutic approaches for the treatment of obesity. *Science Translational Medicine* 8: 323rv322-323rv322.
- Sandhu, M. S., A. H. Heald, J. M. Gibson, J. K. Cruickshank, D. B. Dunger *et al.*, 2002 Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet* 359: 1740-1745.
- Sandoval, D. A., D. Bagnol, S. C. Woods, D. A. D'Alessio und R. J. Seeley, 2008 Arcuate Glucagon-Like Peptide 1 Receptors Regulate Glucose Homeostasis but Not Food Intake. *Diabetes* 57: 2046-2054.
- Sarkar, S., und R. M. Lechan, 2003 Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 144: 281-291.
- Sarkar, S., G. Legradi und R. M. Lechan, 2002 Intracerebroventricular administration of alpha-melanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 945: 50-59.
- Sato, T., Y. Fukue, H. Teranishi, Y. Yoshida und M. Kojima, 2005 Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-d-glucose administration. *Endocrinology* 146: 2510-2516.
- Savelieva, K. V., S. Zhao, V. M. Pogorelov, I. Rajan, Q. Yang *et al.*, 2008 Genetic Disruption of Both Tryptophan Hydroxylase Genes Dramatically Reduces Serotonin and Affects Behavior in Models Sensitive to Antidepressants. *PLoS ONE* 3.
- Schiöth, H. B., M. C. Lagerström, H. Watanobe, L. Jonsson, A. V. Vergoni *et al.*, 2003 Functional Role, Structure, and Evolution of the Melanocortin-4 Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 994: 74-83.

- Schmidt, M., F. J. Dekker und H. Maarsingh, 2013 Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev* 65: 670-709.
- Schreiber, R., und J. De Vry, 2002 Role of 5-HT<sub>2C</sub> receptors in the hypophagic effect of m-CPP, ORG 37684 and CP-94,253 in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 441-449.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield *et al.*, 1997 Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-2123.
- Screaton, R. A., M. D. Conkright, Y. Katoh, J. L. Best, G. Canettieri *et al.*, 2004 The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119: 61-74.
- Sehrawat, S., X. Cullere, S. Patel, J. Italiano, Jr. und T. N. Mayadas, 2008 Role of Epac1, an exchange factor for Rap GTPases, in endothelial microtubule dynamics and barrier function. *Mol Biol Cell* 19: 1261-1270.
- Seufert, J., 2004 Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 53 Suppl 1: S152-158.
- Shaul, Y. D., und R. Seger, 2007 The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773: 1213-1226.
- Shaywitz, A. J., S. L. Dove, J. M. Kornhauser, A. Hochschild und M. E. Greenberg, 2000 Magnitude of the CREB-dependent transcriptional response is determined by the strength of the interaction between the kinase-inducible domain of CREB and the KIX domain of CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* 20: 9409-9422.
- Shaywitz, A. J., und M. E. Greenberg, 1999 CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68: 821-861.
- Shen, Y., W. Y. Fu, E. Y. Cheng, A. K. Fu und N. Y. Ip, 2013 Melanocortin-4 receptor regulates hippocampal synaptic plasticity through a protein kinase A-dependent mechanism. *J Neurosci* 33: 464-472.
- Shukla, C., S. L. Britton, L. G. Koch und C. M. Novak, 2012 Region-Specific Differences in Brain Melanocortin Receptors in Rats of the Lean Phenotype. *Neuroreport* 23: 10.1097/WNR.1090b1013e328354f328355c328351.
- Singhmar, P., X. Huo, N. Eijkelkamp, S. R. Berciano, F. Baameur *et al.*, 2016 Critical role for Epac1 in inflammatory pain controlled by GRK2-mediated phosphorylation of Epac1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sinnett-Smith, J., E. Zhukova, N. Hsieh, X. Jiang und E. Rozengurt, 2004 Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 279: 16883-16893.
- Smart, J. L., V. Tolle und M. J. Low, 2006 Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest* 116: 495-505.
- Smith, S. R., W. A. Prosser, D. J. Donahue, M. E. Morgan, C. M. Anderson *et al.*, 2009 Lorcaserin (APD356), a selective 5-HT<sub>2C</sub> agonist, reduces body weight in obese men and women. *Obesity (Silver Spring)* 17: 494-503.

- Sofroniew, M. V., C. L. Howe und W. C. Mobley, 2001 Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* 24: 1217-1281.
- Sohn, J. W., Y. Xu, J. E. Jones, K. Wickman, K. W. Williams *et al.*, 2011 Serotonin 2C receptor activates a distinct population of arcuate pro-opiomelanocortin neurons via TRPC channels. *Neuron* 71: 488-497.
- Song, W. J., P. Mondal, Y. Li, S. E. Lee und M. A. Hussain, 2013 Pancreatic beta-cell response to increased metabolic demand and to pharmacologic secretagogues requires EPAC2A. *Diabetes* 62: 2796-2807.
- Song, X. S., J. L. Cao, Y. B. Xu, J. H. He, L. C. Zhang *et al.*, 2005 Activation of ERK/CREB pathway in spinal cord contributes to chronic constrictive injury-induced neuropathic pain in rats. *Acta Pharmacol Sin* 26: 789-798.
- Sonobe, K., T. Sakai, M. Satoh, N. Haga und Z. Itoh, 1995 Control of gallbladder contractions by cholecystokinin through cholecystokinin-A receptors in the vagal pathway and gallbladder in the dog. *Regul Pept* 60: 33-46.
- Spitz, F., und E. E. M. Furlong, 2012 Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. *Nat Rev Genet* 13: 613-626.
- Stanley, B. G., D. R. Daniel, A. S. Chin und S. F. Leibowitz, 1985 Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 6: 1205-1211.
- Stevens, R. C., V. Cherezov, V. Katritch, R. Abagyan, P. Kuhn *et al.*, 2013 The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat Rev Drug Discov* 12: 25-34.
- Sturm, R. A., 2002 Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res* 12: 405-416.
- Sun, Y., N. Shi, H. Li, K. Liu, Y. Zhang *et al.*, 2014 Ghrelin suppresses Purkinje neuron P-type Ca(2+) channels via growth hormone secretagogue type 1a receptor, the betagamma subunits of Go-protein, and protein kinase a pathway. *Cell Signal* 26: 2530-2538.
- Sutton, G. M., B. Duos, L. M. Patterson und H. R. Berthoud, 2005 Melanocortinergic modulation of cholecystokinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus. *Endocrinology* 146: 3739-3747.
- Sutton, G. M., L. M. Patterson und H. R. Berthoud, 2004 Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystokinin-induced suppression of food intake in rats. *J Neurosci* 24: 10240-10247.
- Swarthout, J. T., D. R. Tyson, S. C. Jefcoat und N. C. Partridge, 2002 Induction of Transcriptional Activity of the Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein by Parathyroid Hormone and Epidermal Growth Factor in Osteoblastic Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 17: 1401-1407.
- Takeuchi, Y., E. Miyamoto und K. Fukunaga, 2002 Analysis on the promoter region of exon IV brain-derived neurotrophic factor in NG108-15 cells. *J Neurochem* 83: 67-79.
- Tecott, L. H., L. M. Sun, S. F. Akana, A. M. Strack, D. H. Lowenstein *et al.*, 1995 Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT<sub>2c</sub> serotonin receptors. *Nature* 374: 542-546.
- Thompson, M. A., D. D. Ginty, A. Bonni und M. E. Greenberg, 1995 L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel activation regulates c-fos transcription at multiple levels. *J Biol Chem* 270: 4224-4235.

- Thonberg, H., J. M. Fredriksson, J. Nedergaard und B. Cannon, 2002 A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via  $\alpha$ 1-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochemical Journal* 364: 73-79.
- Thorens, B., 1992 Expression cloning of the pancreatic beta cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8641-8645.
- Tohgo, A., K. L. Pierce, E. W. Choy, R. J. Lefkowitz und L. M. Luttrell, 2002 beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem* 277: 9429-9436.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon, 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- Trumper, J., D. Ross, H. Jahr, M. D. Brendel, R. Goke *et al.*, 2005 The Rap-B-Raf signalling pathway is activated by glucose and glucagon-like peptide-1 in human islet cells. *Diabetologia* 48: 1534-1540.
- Tsalkova, T., F. C. Mei, S. Li, O. G. Chepurny, C. A. Leech *et al.*, 2012 Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 18613-18618.
- Tsatmali, M., J. Ancans und A. J. Thody, 2002 Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 50: 125-133.
- Turton, M. D., D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards *et al.*, 1996 A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379: 69-72.
- Ueyama, E., Y. Morikawa, T. Yasuda und E. Senba, 2004 Attenuation of fasting-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (ERK/p38) in the mouse hypothalamus in response to refeeding. *Neurosci Lett* 371: 40-44.
- Vaisse, C., K. Clement, B. Guy-Grand und P. Froguel, 1998 A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-114.
- van Biesen, T., L. M. Luttrell, B. E. Hawes und R. J. Lefkowitz, 1996 Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 17: 698-714.
- Van Kolen, K., F. M. Dautzenberg, K. Verstraeten, I. Royaux, R. De Hoogt *et al.*, 2010 Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology* 58: 135-144.
- Villar, M., N. Perassi und M. E. Celis, 1991 Central and peripheral actions of  $\alpha$ -MSH in the thermoregulation of rats. *Peptides* 12: 1441-1443.
- Vitali, E., E. Peverelli, E. Giardino, M. Locatelli, G. B. Lasio *et al.*, 2014 Cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate (cAMP) exerts proliferative and anti-proliferative effects in pituitary cells of different types by activating both cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and exchange proteins directly activated by cAMP (Epac). *Mol Cell Endocrinol* 383: 193-202.
- Vongs, A., N. M. Lynn und C. I. Rosenblum, 2004 Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul Pept* 120: 113-118.

- Vossler, M. R., H. Yao, R. D. York, M. G. Pan, C. S. Rim *et al.*, 1997 cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89: 73-82.
- Vrang, N., P. J. Larsen, J. T. Clausen und P. Kristensen, 1999 Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19: Rc5.
- Wagner, B. L., A. Bauer, G. Schutz und M. Montminy, 2000 Stimulus-specific interaction between activator-coactivator cognates revealed with a novel complex-specific antiserum. *J Biol Chem* 275: 8263-8266.
- Wang, Y., H. Inoue, K. Ravnskjaer, K. Viste, N. Miller *et al.*, 2010 Targeted disruption of the CREB coactivator *Crtc2* increases insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3087-3092.
- Wang, Z., T. J. Dillon, V. Pokala, S. Mishra, K. Labudda *et al.*, 2006 Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol Cell Biol* 26: 2130-2145.
- Wang, Z., B. Zhang, M. Wang und B. I. Carr, 2003 Persistent ERK phosphorylation negatively regulates cAMP response element-binding protein (CREB) activity via recruitment of CREB-binding protein to pp90RSK. *J Biol Chem* 278: 11138-11144.
- Watson, E., S. Hahm, T. M. Mizuno, J. Windsor, C. Montgomery *et al.*, 2005 VGF ablation blocks the development of hyperinsulinemia and hyperglycemia in several mouse models of obesity. *Endocrinology* 146: 5151-5163.
- Wei, Y., und S. Mojsov, 1995 Tissue-specific expression of the human receptor for glucagon-like peptide-I: brain, heart and pancreatic forms have the same deduced amino acid sequences. *FEBS Lett* 358: 219-224.
- Weih, F., A. F. Stewart, M. Boshart, D. Nitsch und G. Schutz, 1990 In vivo monitoring of a cAMP-stimulated DNA-binding activity. *Genes Dev* 4: 1437-1449.
- Wen, A. Y., K. M. Sakamoto und L. S. Miller, 2010 The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol* 185: 6413-6419.
- Werther, G. A., A. Hogg, B. J. Oldfield, M. J. McKinley, R. Figdor *et al.*, 1987 Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121: 1562-1570.
- Wessells, H., D. Gralnek, R. Dorr, V. J. Hruby, M. E. Hadley *et al.*, 2000 Effect of an alpha-melanocyte stimulating hormone analog on penile erection and sexual desire in men with organic erectile dysfunction. *Urology* 56: 641-646.
- Wettschureck, N., und S. Offermanns, 2005 Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204.
- WHO, 1995 *Physical status : the use and interpretation of anthropometry : report of a WHO Expert Committee*. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2000 Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253.
- WHO, 2014 Global status report on noncommunicable diseases 2014, pp.

- Wiedmer, P., R. Nogueiras, F. Broglio, D. D'Alessio und M. H. Tschop, 2007 Ghrelin, obesity and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3: 705-712.
- Willesen, M. G., P. Kristensen und J. Romer, 1999 Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 70: 306-316.
- Williams, J. J., und T. M. Palmer, 2012 Unbiased identification of substrates for the Epac1-inducible E3 ubiquitin ligase component SOCS-3. *Biochem Soc Trans* 40: 215-218.
- Williams, R., X. Zou und G. W. Hoyle, 2007 Tachykinin-1 receptor stimulates proinflammatory gene expression in lung epithelial cells through activation of NF-kappaB via a G(q)-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L430-437.
- Wilson, P. F., R. B. D'Agostino, L. Sullivan, H. Parise und W. B. Kannel, 2002 Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: The framingham experience. *Archives of Internal Medicine* 162: 1867-1872.
- Wirth, A., M. Wabitsch und H. Hauner, 2014 Prävention und Therapie der Adipositas. *Deutsches Ärzteblatt* 111: 705-713.
- Wisse, B. E., und M. W. Schwartz, 2001 Role of melanocortins in control of obesity. *Lancet* 358: 857-859.
- Wolak, M. L., M. R. DeJoseph, A. D. Cator, A. S. Mokashi, M. S. Brownfield *et al.*, 2003 Comparative distribution of neuropeptide Y Y1 and Y5 receptors in the rat brain by using immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 464: 285-311.
- Wong, R. W., und L. Guillaud, 2004 The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine Growth Factor Rev* 15: 147-156.
- Wortzel, I., und R. Seger, 2011 The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer* 2: 195-209.
- Wu, X., und C. T. McMurray, 2001 Calmodulin kinase II attenuation of gene transcription by preventing cAMP response element-binding protein (CREB) dimerization and binding of the CREB-binding protein. *J Biol Chem* 276: 1735-1741.
- Wu, X., C. Spiro, W. G. Owen und C. T. McMurray, 1998 cAMP response element-binding protein monomers cooperatively assemble to form dimers on DNA. *J Biol Chem* 273: 20820-20827.
- Wynshaw-Boris, A., J. M. Short, D. S. Loose und R. W. Hanson, 1986 Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. I. Multiple hormone regulatory elements and the effects of enhancers. *J Biol Chem* 261: 9714-9720.
- Xia, T., Q. Zhang, Y. Xiao, C. Wang, J. Yu *et al.*, 2015 CREB/TRH pathway in the central nervous system regulates energy expenditure in response to deprivation of an essential amino acid. *Int J Obes (Lond)* 39: 105-113.
- Xing, J., D. D. Ginty und M. E. Greenberg, 1996 Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273: 959-963.
- Xing, J., J. M. Kornhauser, Z. Xia, E. A. Thiele und M. E. Greenberg, 1998 Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate CREB serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 18: 1946-1955.

- Xu, Y., J. E. Jones, D. Kohno, K. W. Williams, C. E. Lee *et al.*, 2008 5-HT<sub>2</sub>CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. *Neuron* 60: 582-589.
- Yadav, V. K., F. Oury, N. Suda, Z. W. Liu, X. B. Gao *et al.*, 2009 A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 138: 976-989.
- Yamada, M., T. Ikeuchi und H. Hatanaka, 1997a The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Prog Neurobiol* 51: 19-37.
- Yamada, M., Y. Saga, N. Shibusawa, J. Hirato, M. Murakami *et al.*, 1997b Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10862-10867.
- Yamagishi, T., und H. T. Debas, 1978 Cholecystokinin inhibits gastric emptying by acting on both proximal stomach and pylorus. *Am J Physiol* 234: E375-378.
- Yamamoto, K. K., G. A. Gonzalez, W. H. Biggs und M. R. Montminy, 1988 Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 334: 494-498.
- Yamazaki, M., K. Nakamura, H. Kobayashi, M. Matsubara, Y. Hayashi *et al.*, 2002 Regulatory effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 14: 156-162.
- Yan, J., F. C. Mei, H. Cheng, D. H. Lao, Y. Hu *et al.*, 2013 Enhanced Leptin Sensitivity, Reduced Adiposity, and Improved Glucose Homeostasis in Mice Lacking Exchange Protein Directly Activated by Cyclic AMP Isoform 1. *Molecular and Cellular Biology* 33: 918-926.
- Yang, Y., 2011 Structure, function and regulation of the melanocortin receptors. *Eur J Pharmacol* 660: 125-130.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan und U. Hochgeschwender, 1999 Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5: 1066-1070.
- Yehuda-Shnaidman, E., B. Kalderon und J. Bar-Tana, 2014 Thyroid hormone, thyromimetics, and metabolic efficiency. *Endocr Rev* 35: 35-58.
- Yeo, G. S., und L. K. Heisler, 2012 Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat Neurosci* 15: 1343-1349.
- Yoon, S., und R. Seger, 2006 The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24: 21-44.
- York, R. D., H. Yao, T. Dillon, C. L. Ellig, S. P. Eckert *et al.*, 1998 Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392: 622-626.
- Zeng, F., und R. C. Harris, 2014 Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 28: 2-11.
- Zhang, X., D. T. Odom, S.-H. Koo, M. D. Conkright, G. Canettieri *et al.*, 2005 Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 4459-4464.

- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold *et al.*, 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432.
- Zhao, W.-Q., L. Ravindranath, A. S. Mohamed, O. Zohar, G. H. Chen *et al.*, 2002 MAP Kinase Signaling Cascade Dysfunction Specific to Alzheimer's Disease in Fibroblasts. *Neurobiology of Disease* 11: 166-183.
- Zhou, X. Y., N. Shibusawa, K. Naik, D. Porras, K. Temple *et al.*, 2004 Insulin regulation of hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nat Med* 10: 633-637.
- Zhu, Y., H. Chen, S. Boulton, F. Mei, N. Ye *et al.*, 2015 Biochemical and pharmacological characterizations of ESI-09 based EPAC inhibitors: defining the ESI-09 "therapeutic window". *Sci Rep* 5: 9344.

## 8 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Appetitregulation durch Sättigungssignale aus der Peripherie und deren Verarbeitung im ARC und PVN des Hypothalamus.....	11
Abbildung 3.2: Thyreotroper Regelkreis .....	12
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der G-Protein-Aktivierung .....	14
Abbildung 3.4: Darstellung der charakteristischen Signalkaskaden der 4 Subtypen von $G\alpha$ -Untereinheiten..	15
Abbildung 3.5: Funktioneller Aufbau des Transkriptionsfaktors CREB .....	17
Abbildung 3.6: Bisheriges Modell zur $\alpha$ -MSH-induzierten TRH-Expression im Hypothalamus .....	24
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase durch einen Agonisten.....	35
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des verwendeten 6xCRE-Luc-Reportergenkonstrukts (HIMMLER <i>et al.</i> 1993) .....	46
Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau eines Western Blots.....	57
Abbildung 4.3: Exemplarische Darstellung der densitometrischen Quantifizierung eines Western Blots .....	58
Abbildung 4.4 Auswertung der Verringerung der stimulusinduzierten Reporteraktivität durch einen Inhibitor.....	64
Abbildung 4.5: Exemplarische Darstellung von Fura-2-AM-Fluoreszenzmessungen .....	66
Abbildung 5.1: $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	74
Abbildung 5.2: Inhibitorischer Effekt von NPY auf die $\alpha$ -MSH- und FSK-vermittelte cAMP-Akkumulation	75
Abbildung 5.3: Kinetik der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen...	76
Abbildung 5.4: $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivität in Abhängigkeit des MC4R-Antagonisten HS024 .....	77
Abbildung 5.5: KWK der CRE-Reporteraktivität von $\alpha$ -MSH und $\gamma$ -MSH in mHypoA-2/10-CRE-Zellen.....	78
Abbildung 5.6: Inhibition der $\alpha$ -MSH-vermittelten CRE-Reporteraktivität durch NPY .....	78
Abbildung 5.7: BK-vermittelter Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	79
Abbildung 5.8: Nachweis $G_{i/o}$ -gekoppelter 5-HTR .....	81
Abbildung 5.9: 5-HT-vermittelter Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration in mHypoA-2/10-CRE-Zellen.....	81
Abbildung 5.10: Anstieg der zytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration durch 5-HT und weitere selektive 5-HTR-Agonisten.....	82
Abbildung 5.11: Quantifizierung der Liganden-vermittelten $Ca^{2+}$ -Signale von 5-HT und selektiven 5-HTR-Agonisten.....	83
Abbildung 5.12: Inhibition des WAY161503-vermittelten $Ca^{2+}$ -Signals durch den 5-HT <sub>2C</sub> R-Antagonisten SB242084 .....	83
Abbildung 5.13: Quantifizierung der Liganden-induzierten CREB-Phosphorylierung mit repräsentativen Western Blot .....	86
Abbildung 5.14: Liganden-induzierte CRE-Reporteraktivierung.....	88
Abbildung 5.15: Liganden-induzierte CREB-Phosphorylierung in Abhängigkeit der CRE-Reporteraktivität	88
Abbildung 5.16: Effekt des CaMKII Inhibitors KN-93 auf die BK-vermittelte CRE-Reporteraktivierung .....	89
Abbildung 5.17: Effekt des PKC- und CaMKII-Inhibitors auf die BK-vermittelte CRE-Reporteraktivierung	90
Abbildung 5.18: BK-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist PKC-abhängig und CaMKII-unabhängig.....	91
Abbildung 5.19: Effekt des PKA-Inhibitors KT5720 auf die $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung...	92
Abbildung 5.20: Effekt der PKA-Inhibitoren A812511 oder rp-Br-cAMPs auf die $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung.....	93

Abbildung 5.21: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch PKA-Inhibitoren .....	93
Abbildung 5.22: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den EPAC-Inhibitor ESI-09 .....	94
Abbildung 5.23: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den nicht-selektiven EPAC-Inhibitor HJC0197 und den EPAC2-selektiven Inhibitor ESI-05 .....	95
Abbildung 5.24: $\alpha$ -MSH-induzierte PKA-Aktivierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	96
Abbildung 5.25: $\alpha$ -MSH-induzierte cAMP-Akkumulation in HEK-293-MC4R und GT1-7-Zellen .....	97
Abbildung 5.26: $\alpha$ -MSH-induzierte CREB-Phosphorylierung in HEK-293-MC4R- und GT1-7-Zellen .....	97
Abbildung 5.27: Effekte der PKA-Inhibitoren auf die $\alpha$ -MSH-vermittelte CRE-Reporteraktivierung in HEK- 293-MC4R-Zellen .....	99
Abbildung 5.28: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch die EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 und den EPAC2-selektiven Inhibitor ESI-05 .....	100
Abbildung 5.29: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch PKA- und EPAC- Inhibitoren in GT1-7-Zellen .....	101
Abbildung 5.30: Repräsentative Beispiele für die Effekte von ESI-09 oder HJC0197 auf die Serum-vermittelte CRE-Reporteraktivität .....	102
Abbildung 5.31 Effekte der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 auf die BK-vermittelte $Ca^{2+}$ -Freisetzung .....	103
Abbildung 5.32: Quantifizierung der Effekte der EPAC-Inhibitoren ESI-09 und HJC0197 auf die BK- vermittelte $Ca^{2+}$ -Freisetzung .....	104
Abbildung 5.33: $\alpha$ -MSH- und FSK-induzierte cAMP-Akkumulation ist ESI-09 unabhängig .....	105
Abbildung 5.34: $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist von PKA unabhängig .....	107
Abbildung 5.35: $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist von EPAC abhängig .....	108
Abbildung 5.36: $\alpha$ -MSH-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	109
Abbildung 5.37: $\alpha$ -MSH-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung ist EPAC-abhängig .....	110
Abbildung 5.38: $\alpha$ -MSH-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig .....	111
Abbildung 5.39: EGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig .....	112
Abbildung 5.40: IGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig .....	112
Abbildung 5.41: NGF-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig .....	113
Abbildung 5.42: 5-HT-vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	114
Abbildung 5.43: 5-HT-vermittelte CREB-Phosphorylierung ist ERK-1/2-abhängig .....	115
Abbildung 5.44: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352 .....	116
Abbildung 5.45: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352 in HEK-293-MC4R-Zellen .....	116
Abbildung 5.46: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den ERK-1/2-Inhibitor PD184352 in mHypoA-2/10-CRE und HEK-293-MC4R-Zellen .....	117
Abbildung 5.47: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A-Inhibitor GGTI-298 in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	118
Abbildung 5.48: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A-Inhibitor GGTI-298 in HEK-293-MC4R-Zellen .....	118
Abbildung 5.49: Inhibition der $\alpha$ -MSH-induzierten CRE-Reporteraktivierung durch den Rap1A Inhibitor GGTI-298 in mHypoA-2/10-CRE- und HEK-293-MC4R-Zellen .....	119
Abbildung 5.50: Repräsentatives Beispiel für die GGTI-298 vermittelte Inhibition der $\alpha$ -MSH- und Serum- induzierten CRE-Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	119
Abbildung 5.51: Effekte von siRNA gegen Rap1A auf die $\alpha$ -MSH- und Serum-induzierte CRE- Reporteraktivität in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	120

Abbildung 5.52: $\alpha$ -MSH-induzierte mRNA-Expression von c-Fos ist PKA-unabhängig und EPAC-abhängig .....	122
Abbildung 5.53: $\alpha$ -MSH-induzierte mRNA-Expression von TRH ist PKA-abhängig und EPAC-abhängig..	122
Abbildung 6.1: Modell der CRE-abhängigen Genexpression über den 5-HT <sub>2</sub> CR und B <sub>2</sub> R in mHypoA-2/10-CRE-Zellen .....	141
Abbildung 6.2: Modell der $\alpha$ -MSH-vermittelten Genexpression von c-Fos und TRH über CREB/CRE in mHypoA-2/10-CRE-Zellen.....	148

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Übersicht der verwendeten Primerpaare für die quantitative Echtzeit-PCR .....	71
Tabelle 5.1: Liganden-induzierte Erhöhung der intrazellulären Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	84

## Abkürzungsverzeichnis

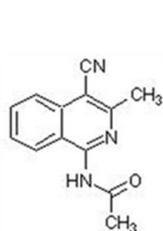
<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
%	Prozent
5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HTR	5-HT-Rezeptor
AC	Adenylylzyklasen
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
AgRP	<i>agouti-related protein</i>
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ARC	Nucleus arcuatus
ATF-1	<i>activating transcription factor 1</i>
ATP	Adenosintriophosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
B2R	Bradykinin-2-Rezeptor
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BK	Bradykinin
BMI	Body-Mass-Index
BSA	bovines Serumalbumin
bZIP	<i>carboxy-terminal basic Leu zipper</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	<i>Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase</i>
CaMKK	CaMK Kinase
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CART	<i>cocaine and amphetamine regulated transcript</i>
CBD	CREB-Bindedomäne
CBP	CREB-binding protein
CCK	Cholecystokinin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CNTF	ziliärer neurotropher Faktor
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CREM	<i>cAMP response element modulator</i>
CRH	<i>corticotropin-releasing hormone</i>
CRTC	<i>cAMP-regulated transcriptional co-activators</i>
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	EGF-Rezeptor
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPAC	<i>exchange factor directly activated by cAMP</i>
ERK-1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase-1/2</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSK	Forskolin
g	Gramm
GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanin nucleotide exchange factors</i>
GHS	<i>growth hormone secretagogue</i>
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
GLUT4	<i>glucose transporter type 4</i>
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPT	<i>hypothalamic-pituitary-thyroid</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IBMX	1-Isobutyl-1-methylxanthin
IGF	Insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IGF1R	IGF-1-Rezeptor
IGF2R	IGF-2-Rezeptor
IGFR	IGF-Rezeptor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IR	Insulin-Rezeptor
JAK	Januskinase
kg	Kilogramm
KID	<i>central kinase-inducible domain</i>
l	Liter
Luc	Luziferase
m	Masse
M	Molar
mAch	muskarinischen Acetylcholinrezeptor
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>

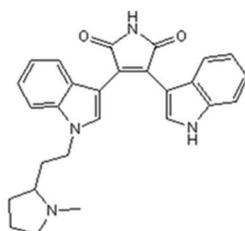
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPK kinase kinase</i>
MC3R	Melanocortin-3-Rezeptor
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCR	Melanocortin-Rezeptor
min	Minute
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MT-II	Melanotan-II
n.s.	nicht signifikant
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NPY	Neuropeptid Y
NTR	Neurotrophinrezeptor
Ob-R	Leptin-Rezeptor
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PI3K	Phosphoinositidkinase-3
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POMC	Pro-Opiomelanocortin
Ptx	Pertussis-Toxin
PVN	Nucleus paraventricularis
PYY	Peptid YY
Q2	<i>constitutive activation domain</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
Rap	<i>ras-related protein</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rho	<i>ras homologue</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RSK	ribosomale S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwerts
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	<i>src-homology 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SOCS-3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
Sp-1	<i>specificity protein 1</i>
STAT-3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
SV40	<i>Simian Vacuolating Virus 40 Tag</i>
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TAD	<i>amino-terminal transactivation domain</i>
TAF4	<i>TBP-associated factor 4</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFIID	Transkriptionsfaktor IID
Tph	Tryptophanhydroxylase
TRH	Thyreotropin-releasing Hormon
TRHR	TRH-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrKAR	<i>tropomyosin receptor kinase A Rezeptor</i>
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
u. a.	unter anderem
V	Volt
VGF	<i>VGF nerve growth factor inducible</i>
w. E.	Willkürliche Einheit
WHO	Weltgesundheitsorganisation
YR	NPY-Rezeptor
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

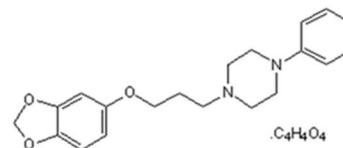
## Strukturformeln der chemischen Inhibitoren, Agonisten und Antagonisten



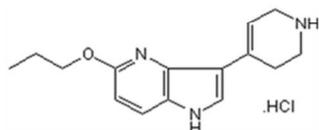
A812511



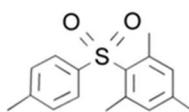
BIM-X



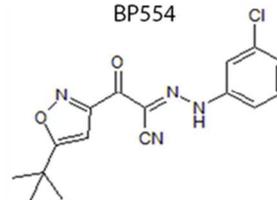
BP554



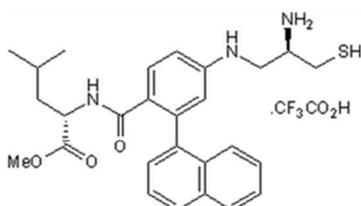
CP94253



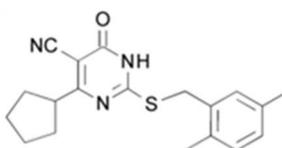
ESI-05



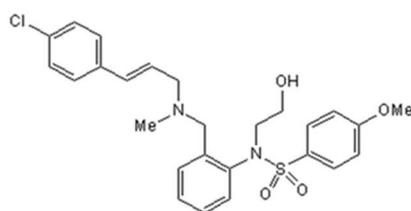
ESI-09



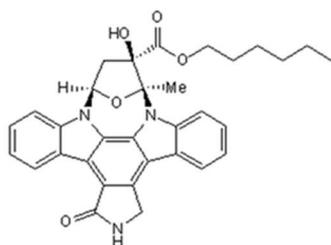
GGTI-298



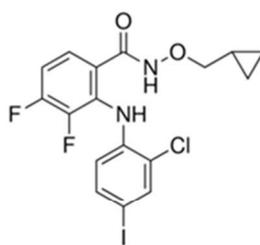
HJC0197



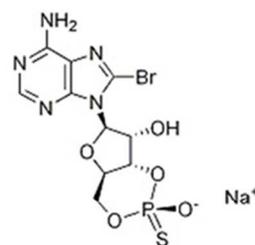
KN-93



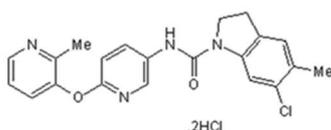
KT5720



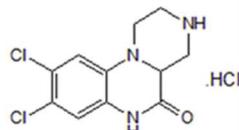
PD184352



Rp-Br-cAMPs



SB242084



WAY161503

Die Strukturformeln wurden von verschiedenen Herstellerseiten (Abcam, Cambridge, UK; Tocris, Bristol, UK; Biolog, Bremen; Sigma-Aldrich, Deisenhofen; Enzo, Lörrach) entnommen.

## Publikationsverzeichnis

- Breit, A., V. Besik, H. J. Solinski, S. Muehlich, E. **Glas** *et al.*, 2015 Serine-727 Phosphorylation Activates Hypothalamic STAT-3 Independently From Tyrosine-705 Phosphorylation. *Molecular Endocrinology* 29: 445-459.
- Breit, A., K. Wicht, I. Boekhoff, E. **Glas**, L. Lauffer *et al.*, 2016 Glucose enhances basal or melanocortin-induced cAMP response element activity in hypothalamic cells. *Mol Endocrinol*: me20161001.
- Glas, E.**, H. Mückter, T. Gudermann und A. Breit, 2016 Exchange factors directly activated by cAMP mediate melanocortin 4 receptor-induced gene expression. *Sci Rep* 6: 32776.
- Lauffer, L., E. **Glas**, T. Gudermann und A. Breit, 2016 Endogenous 5-HT<sub>2C</sub> receptors phosphorylate the cAMP response element binding protein via protein kinase C-promoted activation of extracellular-regulated kinases-1/2 in hypothalamic mHypoA-2/10 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 358: 39-49.

## Eidesstattliche Versicherung

**Glas, Evi**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**„CREB-Phosphorylierung und CRE-Aktivierung in murinen Hypothalamuszellen“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 22.02.2017

Evi Glas

## Danksagung

Ich möchte mich gerne bei Herrn Professor Dr. Thomas Gudermann bedanken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe, am Walther-Straub-Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu können.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Doktorvater PD Dr. Dr. Harald Mückter: Lieber Harald, es war mir eine Ehre, dass du meine Arbeit mit großem Interesse und sehr vielen hilfreichen Ratschlägen unterstützt und betreut hast.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Andreas Breit: Lieber Andreas, ich bin wirklich froh und stolz, dass ich mit deiner herausragenden Unterstützung diese Arbeit anfertigen konnte. Dankeschön für alle Hilfestellungen, Ideen, Diskussionen und auch für die Geduld beim Anfertigen der berühmt-berüchtigten ‚Pläne‘. Von der ziemlich guten Flasche Wein, der Pizza und dem Grillen bis hin zu Fußball und Football – ich habe die Zeit hier sehr geschätzt und unfassbar viel von dir gelernt!

Die Zeit am Institut wäre nicht halb so schön gewesen, wenn ich nicht die besten Kolleginnen gehabt hätte: Andrea und Elli. Es ist so toll zu erleben, wenn aus Kolleginnen gute Freundinnen werden. Danke für eure Unterstützung, das gemeinsame Frühstück, die Biergartenbesuche, das sinnvolle und sinnlose Quatschen über alle Themen, die die Welt bewegen oder eben auch nicht, und für so vieles mehr. Ich wünsche euch nur das Beste.

Liebe Andrea, unsere gemeinsame Leidenschaft für das Baden und kurze Hosen im Sommer war wohl nur ein Grund, warum wir uns so gut verstehen. Du bist so ein toller und herzlicher Mensch, bitte bleibe einfach so, wie du bist!

Liebe Elli, auch bei uns geht die Freundschaft weit über den Laboralltag, die gemeinsame Mittagszeit und die Liebe für schöne Dirndl hinaus. Es war sehr schön, dass wir die komplette Zeit meiner Arbeit hier zusammen verbringen konnten! Du bist wirklich großartig!

Ein großes Dankeschön geht auch an Lisa. Unsere gemeinsame Zeit war leider deutlich zu kurz, dafür aber äußerst toll! Ich freue mich sehr, dass ich dich kennenlernen durfte und bin froh, dass sich unsere Wege nicht nur an der Eisdiele auf unserem Heimweg kreuzen!

Vielen lieben Dank an Jürgen! Unsere Zeit im Keller hat sich leider nur noch ein Jahr überschritten, aber du warst ein toller Kollege und ich konnte noch richtig viel von dir lernen! Danke dafür und für die Übergabe des besten Platzes im Kellerbüro!

Ein weiterer Dank ist Ute gewidmet, für die schönen Gespräche über sämtliche Länder dieser Welt, die Western Blots und den täglichen Laborwahnsinn.

Danke an alle anderen Mitarbeiter des Walther-Straub-Instituts, die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Freude bereitet und ich habe hier viele nette Menschen kennengelernt.

Auch für die liebe Unterstützung von außerhalb bin ich sehr dankbar. Stephi, Corina, Lena und Anna – damit seid besonders ihr gemeint!

Lieber Tom, wir hatten immer das gleiche Ziel vor Augen und du warst mir bei allerhand Fragen immer eine riesengroße Hilfe! Daher ein Dankeschön von Herzen!

Der größte Dank geht an meine wundervollen Eltern. Liebe Mama, lieber Papa, es ist fantastisch so eine Unterstützung zu haben, in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre das hier alles und so vieles weitere nicht möglich gewesen! Ihr seid die Besten!

Mein abschließender Dank geht an den tollsten Menschen der Welt: Toni! Ich brauche und kann nicht alles niederschreiben, wofür ich dir außer unserer Liebe dankbar bin. Deswegen, kurz und knapp, DANKE!