

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Kommissarischer geschäftsführender Direktor:

Prof. Dr. Frank Czubayko

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur ligandenvermittelten
Regulation der Melanocortin-Rezeptor-Aktivität**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Katharina Wolff
aus Hamburg

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-
Universität Marburg am 26.02.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. Gudermann

Koreferent: Prof. Dr. Dr. Krieglstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	1
1.1.1	Funktionen innerhalb des humanen Organismus.....	1
1.1.2	G-Protein-vermittelte Signalwege	5
1.1.3	Die Desensibilisierung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion.....	9
1.2	Das Melanocortin-System.....	12
1.2.1	Lage, Struktur und Funktion des Melanocortin-Systems.....	12
1.2.2	Das Melanocortin-System als die Grundlage der Homöostase des Energiehaushalts	13
1.2.3	Expression der POMC-Neurone und ihre Peptidhormone.....	17
1.2.4	Melanocortin-Rezeptoren und ihre Bedeutung bei der Homöostase des Energiehaushalts	18
1.2.5	Desensibilisierung und Internalisierung des Melanocortin-4-Rezeptors.....	19
1.2.6	Das Agouti-Protein und das „Agouti-Related-Protein“ (AgRP) als endogene inverse Agonisten.....	22
1.2.7	MC4R-Gen-Mutationen und ihre physiologischen Bedeutungen für den humanen Organismus.....	22
1.3	Fragestellung	25
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Material	27
2.1.1	Geräte	27
2.1.2	Verbrauchskemikalien und Enzyme	28
2.1.3	Liganden.....	29
2.1.4	Expressionsvektoren	29
2.1.5	Antikörper	31
2.1.6	Lösungen / Puffer.....	31

2.1.7	Zelllinien	31
2.1.8	Zellkulturmaterialien	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Aufreinigung und Vervielfältigung der Plasmide mithilfe von DH5 α -E.-coli-Bakterien	33
2.2.2	Zellkultur	36
2.2.3	Rekombinante Expression von Proteinen.....	37
2.2.4	Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration	40
2.2.5	Enzymgebundener Immunosorbent-Assay (ELISA)	41
2.2.6	Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation	44
2.2.7	Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode.....	48
2.2.8	Messungen im FLUOstar-Lesegerät.....	49
3	Ergebnisse.....	51
3.1	AgRP als inverser Agonist der MCR-vermittelten Produktion von cAMP	51
3.2	α -MSH und AgRP induzieren die Endozytose von MCR	54
3.3	α -MSH und AgRP rekrutieren β -Arrestine zu den MCR.....	60
3.4	MCR endozytieren nur in der Anwesenheit von β -Arrestinen	63
3.5	AgRP induziert die MC4R-Endozytose auch in GT1-1-Hypothalamus-zellen	65
3.6	α -MSH induziert keine Endozytose der MC4R-D90N-Mutante.....	66
4	Diskussion.....	71
4.1	MCR werden durch α -MSH und AgRP unter Arrestinbeteiligung endozytiert	71
4.2	G α_s als essentielle Komponente der MC4R-Endozytose	81
5	Zusammenfassung	88
6	Literaturverzeichnis.....	90

7	Publikationsliste	106
8	Abkürzungsverzeichnis	107
9	Danksagung	110
11	Akademische Lehrer	111

1 Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

1.1.1 Funktionen innerhalb des humanen Organismus

Innerhalb unseres Organismus laufen ununterbrochen unwillkürliche Prozesse ab, die uns am Leben erhalten. Autonom gesteuert werden zum Beispiel unsere Körpertemperatur, unsere Atmung und unsere Herzfrequenz. Das steuernde Zentrum ist dabei das vegetative Nervensystem. Aber auch andere, neuronal regulierte Prozesse wie das Sehen, das Riechen, das Schmecken, die Verdauung oder die Schmerzempfindung sind wichtige Bestandteile unseres täglichen Lebens. Die Grundlage all dieser Funktionen ist unter anderem eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren. Sie ermöglichen den für den Ablauf dieser Prozesse benötigten Informationsaustausch. Das beinhaltet die Weiterleitung sowie die Integration von Informationen. Gleichzeitig kann mit ihrer Hilfe der Informationsaustausch reguliert werden. Eine Hauptgruppe stellen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) dar. Diese sehr große und in ihrer Funktionalität vielfältige Gruppe von Rezeptoren reguliert die Aktivität unterschiedlicher Effektorproteine. Hierzu zählen unter anderem die Adenylatzyklase (AZ) sowie verschiedene Lipasen. Mit einem Anteil von 1 % am menschlichen Genom bilden die GPCR eine der größten Proteinfamilien. Eine sehr wichtige Funktion kommt ihnen bei der Regulation der Nahrungsaufnahme sowie der vegetativen Kontrolle des Energieverbrauchs zu. Daher kann eine veränderte Signaleigenschaft oder eine veränderte Morphologie der GPCR eine fehlerhafte Regulation des Energiehaushaltes induzieren. Als Beispiel kann sich hieraus eine Adipositas entwickeln. Diese krankhafte Fettleibigkeit des einzelnen Organismus verursacht häufig Folgeerkrankungen. Hierbei stehen der Diabetes mellitus, die Hypercholesterinämie und die arterielle Hypertonie im Vordergrund. Sie stellen die wichtigsten Risikofaktoren für die koronare Herzkrankheit (KHK) dar,

welche zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland sowie den anderen Industriestaaten zählt.^{1 2}

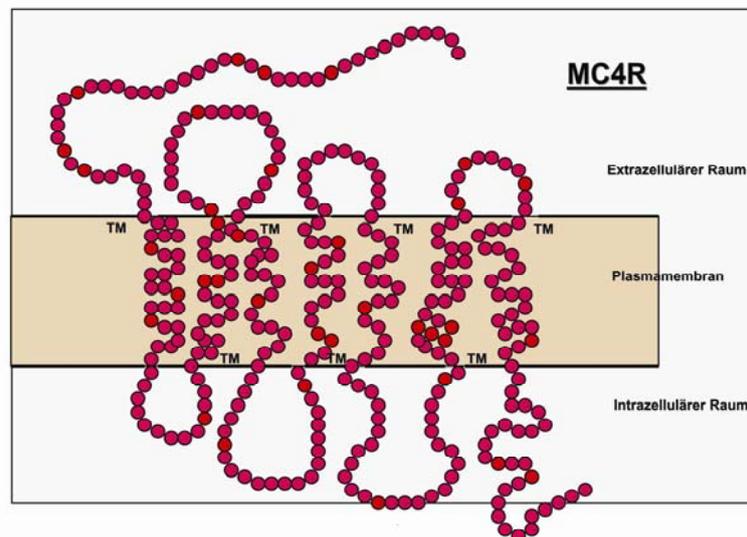


Abbildung 1: Beispiel eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors: der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R). Der Peptidkette des Rezeptors zieht sich in Form von α -Helices siebenmal durch die Zellmembran. Dabei kommt es zur Ausbildung von drei intra- sowie extrazellulären Schleifen, die u. a. an der Liganden-Bindung beteiligt sind. Das extrazelluläre Ende wird durch den Amino-Terminus, das intrazelluläre Ende hingegen durch den Carboxy-Terminus gebildet (nach Gantz et al., 1993, *J Bio Chem*, 268:15174-15179).

Ein membranständiges Rezeptorprotein besteht aus einem Peptidkette (ca. 500 Aminosäuren), der sich siebenmal in Form von α -Helices entgegen dem Uhrzeigersinn durch die Zellmembran zieht. Hierbei kommt es zur Bildung von drei intra- sowie drei extrazellulären Schleifen. Bedingt durch diese morphologische Eigenschaft bilden die GPCR die Gruppe der heptahelikalen Transmembranproteine. Die transmembranären α -Helices sind vermutlich kreisförmig angeordnet und bilden so eine Tasche innerhalb der Phospholipid-Doppelmembran. Diese dient als Bindungsstelle für hydrophobe Liganden der GPCR [68]. Hydrophile Liganden wie Peptidhormone binden hingegen an

¹ World Health Organization (WHO), o. V., http://www.who.int/whosis/mort/profiles/mort_euro_deu_germany.pdf, (Download vom 15.12.2007)

² Medline Plus, o. V., <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/coronaryarterydisease.html>, (Download vom 15.12.2007)

extrazellulären Komponenten des Rezeptors wie beispielsweise an den Amino-Terminus [178]. Das intrazelluläre Ende wird durch den Carboxy-Terminus gebildet [179]. Die Signaltransduktion erfolgt mithilfe von guanylnukleotid-bindenden Proteinen, sogenannten G-Proteinen. Diese befinden sich an der Innenseite der Phospholipid-Doppelmembran zwischen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife. Aktivitätsabhängig koppeln sie an den Rezeptor. Sie bestehen aus drei Untereinheiten, α , β und γ . Je nach Aktivierungszustand können sie Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) binden [180]. Nach den G-Proteinen sind die Rezeptoren benannt.

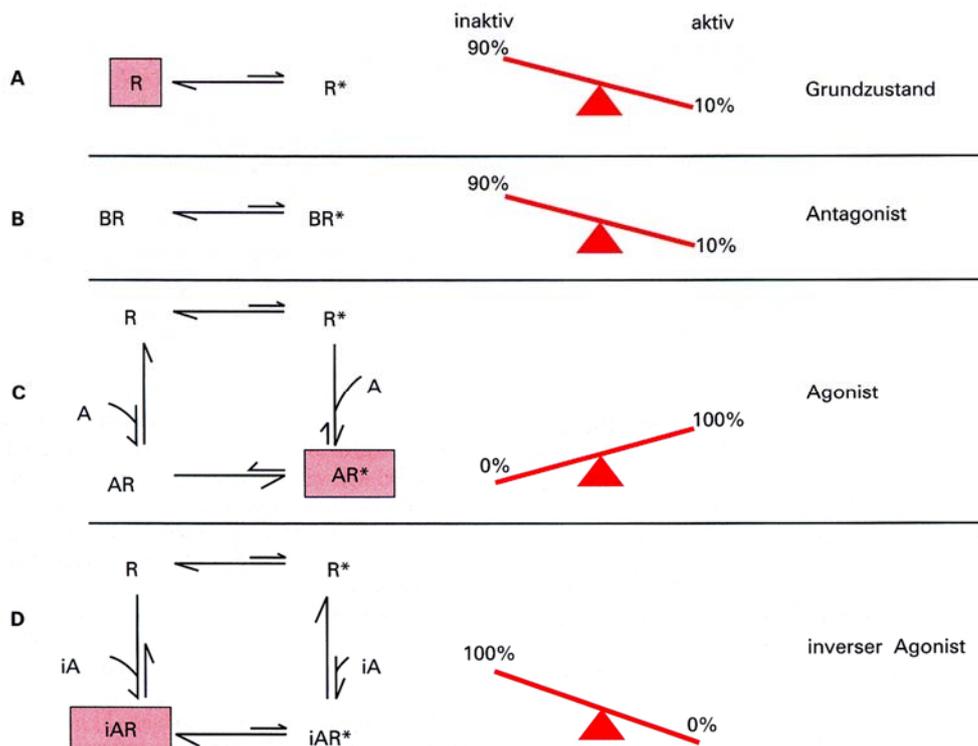
Das häufige Auftreten der GPCR macht sie zu einer zentralen Ursache für die Entstehung von Krankheiten. Beispielsweise können Mutationen innerhalb des für den Rezeptor kodierenden Gens zu einer veränderten Rezeptorstruktur und damit zu einer veränderten Bindungsaffinität zwischen dem Liganden und dem Rezeptor führen. Handelt es sich z. B. um eine verringerte Bindungsaffinität, so folgt hierauf eine Abschwächung bzw. ein Abbruch des weiterzuleitenden Signals [55,169]. Innerhalb bestimmter Regulationsprozesse, an denen die GPCR beteiligt sind, kann es hierdurch zu Folgeerscheinungen kommen. Beispielsweise können im Bereich der Regulation des Energiehaushalts Erkrankungen des Stoffwechsels, wie die Adipositas, die Folge sein [111,99]. Daraus entwickelt sich nicht selten u. a. eine arterielle Hypertonie, eine Arteriosklerose und/oder ein Diabetes mellitus. Folglich stellen die GPCR eine wichtige Angriffsmöglichkeit in der pharmakologischen Therapie dar. Aktuell wird der Wirkungseffekt von mehr als 30 % der verschriebenen Arzneimittel über GPCR vermittelt [88]. Als Beispiel seien hier die in der antihypertensiven Therapie weit verbreiteten Betablocker genannt. Die Substanz Metoprolol blockiert selektiv den β_1 -adrenergen Rezeptor, während Propranolol als unselektiver Betablocker den β_1 - und β_2 -adrenergen Rezeptor blockiert [158]. So kommt es über die Regulation dieser GPCR zu einer Reduktion der sympathischen Effekte wie Herzfrequenz und Schlagvolumen. Ein verringertes Schlagvolumen beinhaltet, dass bei jedem Herzschlag weniger Blut durch den Körper gepumpt wird. Erfolgen die Herzschläge in größeren Abständen aufeinander so ergibt sich hieraus ein Absinken des Blutdrucks. Weitere Wirkstoffe, deren therapeutischer Effekt über GPCR vermittelt wird, sind in der

Asthmatherapie eingesetzte β_2 -Sympathomimetika (Salbutamol, Fenoterol) [150]. Auch in der Schmerztherapie als Opiodrezeptoragonisten (Morphin, Fentanyl) [168] sowie in vielen weiteren Bereichen finden solche in die Signalkaskade von GPCR eingreifende Medikamente Anwendung. Als logische Konsequenz gehören Arzneimittel, deren therapeutische Wirkung über GPCR vermittelt wird, zu der am intensivsten untersuchten Gruppe pharmakologischer Therapeutika. Die Untersuchung ungeklärter GPCR-vermittelter Signalkaskaden sowie eine differenziertere Aufklärung von Fehlregulationen der GPCR ist ein wesentlicher Teil der aktuellen Forschung.³

Die Aktivität der GPCR wird durch Liganden reguliert. Dabei existieren für den jeweiligen GPCR oder eine Gruppe von morphologisch ähnlichen GPCR spezifische Liganden. Abhängig von der Eigenschaft des Liganden kann dieser den Rezeptor aktivieren oder die Aktivierung verhindern. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zur Weiterleitung eines Signals. Die Signaleigenschaft wird hierbei durch die Spezifität des Liganden-Rezeptor-Komplexes bestimmt. Liganden, die eine dem Rezeptor zugeordnete Funktion aktivieren, bezeichnet man als Agonisten. Hingegen handelt es sich bei Substanzen, die eine dem Rezeptor zugeordnete Funktion nicht aktivieren, jedoch die Bindung des Agonisten blockieren, um einen Antagonisten. Konkurriert dieser Antagonist mit dem Agonisten um die gleiche Bindungsstelle des Rezeptors, so handelt es sich um einen kompetitiven Antagonisten. Der Rezeptor existiert in zwei unterschiedlichen Konformationen, R und R*. Die R-Konformation ist inaktiv, während die R*-Konformation aktiv ist. Unabhängig von einer Rezeptoraktivierung durch einen Agonisten existiert demnach eine spontane Rezeptoraktivierung. Im aktiven Zustand, das heißt in der aktiven R*-Konformation, koppelt der Rezeptor an das G-Protein. Es kommt zum Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit des Proteins. Diese Eigenschaft der R*-Konformation bezeichnet man als intrinsische Aktivität des Rezeptors. Der Antagonist bindet mit gleicher Affinität an R sowie an R*. Hingegen bindet der Agonist mit höherer Affinität an R*. Neben den Agonisten und Antagonisten existiert eine weitere Gruppe von Liganden. Sie werden als

³ Filmore, David: It's a GPCR World, Modern Drug Discovery, S. 24–28, American Chemical Society, 11/2004

inverse Agonisten bezeichnet und binden mit höherer Affinität an R. So verschieben sie das Gleichgewicht stärker als im Grundzustand zur inaktiven Rezeptorform hin. Damit haben sie eine dem Agonisten entgegengesetzte Wirkung. Als Beispiel solcher inversen Agonisten sei hier der bereits genannte Betablocker Propranolol erwähnt [39,8,10].



© Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag,
 Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl. 2005

Abbildung 2: Modell der Rezeptor-Pharmakon-Interaktion. Die linke Seite zeigt die relative Besetzung des inaktiven Rezeptors (R) und des aktiven Rezeptors (R^{*}) (Teil **A**) durch einen Antagonisten (B für Blocker; Teil **B**), Agonisten (A; Teil **C**) und inversen Agonisten (iA; Teil **D**). Die Länge der Pfeile spiegelt die Größe der jeweiligen Geschwindigkeitskonstante wieder. Umrandet und rot hinterlegt ist jeweils der Komplex (in A die Konformation), der (die) im Gleichgewicht überwiegt. Auf der rechten Seite ist das relative Verhältnis des inaktiven und aktiven Rezeptors sowohl als Zahl als auch als Waage dargestellt.

1.1.2 G-Protein-vermittelte Signalwege

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterliegen einer Rezeptor-G-Protein-Selektivität. Das heißt, dass die meisten GPCR nach ihrer Aktivierung nur eine

bestimmte Anzahl verschiedener G-Proteine erkennen und aktivieren können [75,76]. Abhängig vom aktivierten G-Protein werden nachfolgend verschiedene Zielproteine reguliert. Die grundlegende Struktur der G-Proteine sowie ihrer Aktivierung ist die gleiche. Verschiedene $G\alpha$ -Untereinheiten führen jedoch zur Aktivierung verschiedener Effektorproteine. In der folgenden Tabelle sind einige häufig vorkommende $G\alpha$ -Untereinheiten und die durch sie regulierten Effektorproteine dargestellt.

<u>Subfamilie</u>	<u>$G\alpha$</u>	<u>regulierte(s) Effektorprotein(e)</u>
G_i	G_z	AZ↓ und andere ?
	G_{i1}	AZ↓
	G_{i2}	AZ↓
	G_{i3}	AZ↓
	G_{i0}	Calciumkanäle↓ und andere
	G_i	cGMP-PDE↑
	G_{gust}	PDE↑
G_s	G_s	AZ↑
	G_{olf}	AZ↑
G_{12}	G_{12}	Stimulation des Zellwachstums ?
	G_{13}	Stimulation des Zellwachstums ?
G_q	G_q	PLC↑
	G_{11}	PLC↑
	G_{14}	PLC↑
	G_{15}	PLC↑

Tabelle 1: Die verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten

Für die in dieser Arbeit genauer untersuchte Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der Melanocortin-Rezeptoren (MCR), sind vor allem die $G\alpha$ -

Untereinheiten $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$ von Bedeutung [115,64]. Die Proteine $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$ stimulieren (s) bzw. inhibieren (i) die Adenylatzyklase (AZ), ein Enzym, das aus Adenosintriphosphat (ATP) den intrazellulären Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) synthetisiert. Als sogenannter „second messenger“ aktiviert cAMP die Proteinkinase A (PKA). Dieses Enzym überträgt Phosphatreste auf Serin- oder Threoninreste bestimmter Proteine (z. B. Enzyme) und verändert somit deren Aktivität. Die PKA kann auf diesem Weg Proteine, Enzyme oder Ionenkanäle regulieren. Darüber hinaus hat sie das Potenzial, Rezeptoren zu phosphorylieren oder in den Zellkern zu translokieren und dort die Gentranskription zu beeinflussen. Welchen Signalweg die PKA reguliert, hängt davon ab, über welchen Rezeptor sie zuvor aktiviert wurde und welche Funktion er besitzt. Die Wirkung der Adenylatzyklase ist reversibel. cAMP wird durch das intrazelluläre Enzym Phosphodiesterase inaktiviert und die von der Proteinkinase übertragenen Phosphatreste werden durch Phosphatasen abgespalten.

Die Aktivierung der Untereinheit $G\alpha_q$ führt über die daran anschließende Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zur Freisetzung der intrazellulären Botenstoffe Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin [173,20]. IP_3 führt zur Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol [112]. In Verbindung mit dem freigesetzten Calcium aktiviert das DAG die calciumabhängige Proteinkinase C (PKC) [126]. Diese führt zur Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten diverser Proteine und hat somit vor allem einen Einfluss auf das Zellwachstum. Das in das Zytosol freigesetzte Calcium hat darüber hinaus auch einen direkten Einfluss auf diverse andere Mechanismen [21]. Zum Beispiel führt die über den $G\alpha_q$ -gekoppelten α_1 -adrenergen Rezeptor des Sympathikus vermittelte Calciumfreisetzung in Zellen der glatten Muskulatur hier zu einer Tonuserhöhung. Die so angeregte Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur resultiert in einer Vasokonstriktion. Dadurch erhöht sich der periphere Gefäßwiderstand und folglich der Blutdruck.

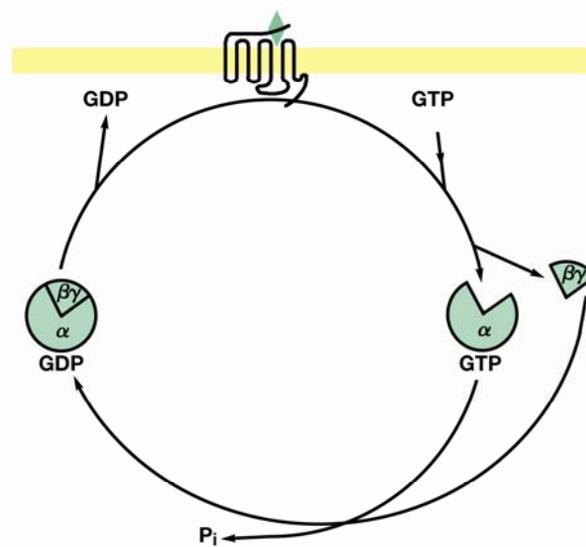


Abbildung 3: G-Protein-Zyklus. Wird ein membranständiger Rezeptor an seinem extrazellulären Ende von einem Agonisten gebunden, so kommt es zur Rekrutierung des G-Proteins an den Rezeptor. Parallel kommt es dabei zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit des G-Proteins. Gleichzeitig trennt sich die α - von der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Ist die Signaltransduktion beendet, so kommt es durch Abspaltung eines Phosphatrestes (P_i) zur Reassoziierung der beiden Untereinheiten.

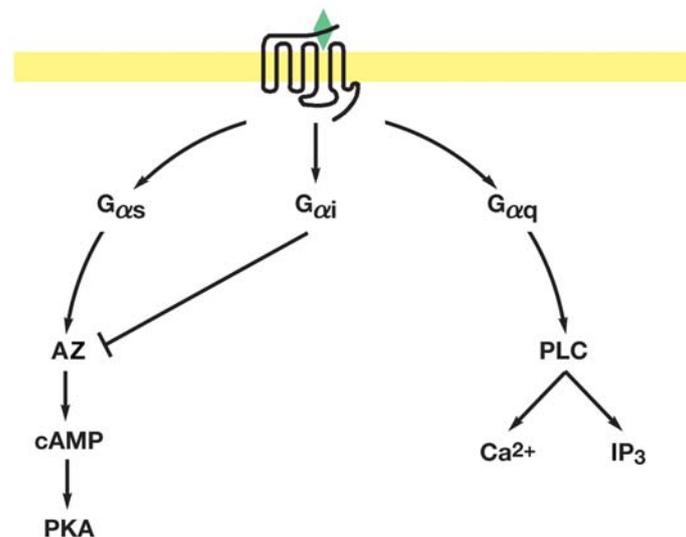


Abbildung 4: Die verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten und die durch sie aktivierten Effektorproteine. Für die Gruppe der rhodopsinähnlichen GPCR, zu der auch die Melanocortin-Rezeptoren zählen, unterscheidet man primär die $G\alpha$ -Untereinheiten $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$. $G\alpha_s$ wirkt dabei stimulierend auf die Adenylatzyklase (AZ) und führt so über den Botenstoff cAMP zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). $G\alpha_i$ wirkt hingegen inhibierend auf die AZ. Folglich bleibt eine cAMP-Produktion sowie eine PKA-Aktivierung aus. $G\alpha_q$ aktiviert die Phospholipase C (PLC) und führt so zur Freisetzung von Calcium und Inositoltrisphosphat (IP_3).

Nicht nur die $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins wirkt regulierend auf die Signaltransduktion. Auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit, die sich im Zuge der G-Proteinaktivierung von der $G\alpha$ -Untereinheit trennt, vermag weitere Effektorproteine zu regulieren. $G\beta\gamma$ kann zur Aktivierung von G-Proteingekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) führen [93]. Diese phosphorylieren den Rezeptor und es kommt zur Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein. Danach reassoziieren $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ und die Signaltransduktion ist inaktiviert.

1.1.3 Die Desensibilisierung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion

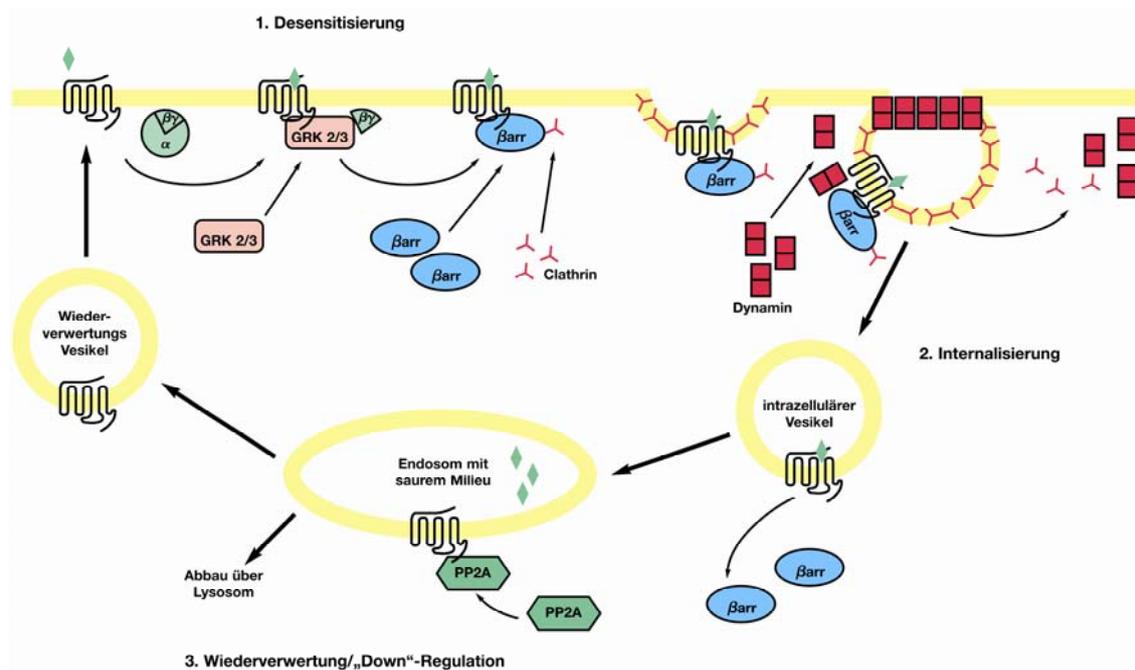
Bindet ein Ligand an einen GPCR und aktiviert selbigen, so kommt es zur Transduktion eines vom Rezeptor ausgehenden Signals. Daran sind verschiedene Effektor- sowie Adapterproteine beteiligt. Wiederum andere Proteine, sogenannte „Regulators of G-Protein Signalling“ (RGS), regulieren den Ablauf der Signalübermittlung. Nach dem Transfer des vom Liganden ausgehenden Signals erfolgen im Rahmen der Signaltransduktion die Desensibilisierung und die Internalisierung des Rezeptors. Darüber hinaus kann es weiterführend zu einer Rezeptoresensibilisierung kommen. Der genaue Ablauf der Rezeptordesensibilisierung wird im Folgenden erläutert.

Auf die Aktivierung des Rezeptors sowie die Kopplung an das G-Protein und die Regulation diverser Effektorproteine erfolgt sehr schnell eine Minderung bzw. das Ende der Signalübermittlung. Dieses geschieht entweder durch die „Wegnahme“ des Agonisten, beispielsweise durch Wiederaufnahme in die Zelle, oder durch die Desensibilisierung des Rezeptors [189]. Dabei erfolgt innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Agonistenbindung die Entkopplung des G-Proteins von dem Rezeptor. Man unterscheidet bei der Rezeptordesensibilisierung die homologe von der heterologen Desensibilisierung. Die homologe Desensibilisierung wird durch die oben bereits genannten GRK initiiert. Diese werden durch die Rezeptoraktivierung reguliert und führen zur Phosphorylierung des zuvor aktivierten Rezeptors. Die Phosphorylierung des Rezeptors führt dann zu dessen Desensibilisierung. Damit beschreibt die

homologe Desensibilisierung die Desensibilisierung eines Rezeptors, der zuvor durch einen Agonisten aktiviert wurde [157,160]. Bei der heterologen Desensibilisierung kommt es zu einer agonistenunabhängigen Phosphorylierung des Rezeptors. Wird ein beliebiger GPCR einer Zelle aktiviert, so folgt darauf eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) oder der Proteinkinase C (PKC). Beide Kinasen sind an diversen Signalkaskaden verschiedenster GPCR beteiligt. Nach ihrer Aktivierung führen sie nicht nur zur Phosphorylierung und damit zur Desensibilisierung des aktivierten Rezeptors, sondern haben einen ähnlichen Effekt auf andere, nicht agonistengebundene Rezeptoren innerhalb der Zelle. Wird ein Rezeptor demnach von einer PKA oder PKC phosphoryliert, die zuvor durch die Aktivierung eines anderen Rezeptors aktiviert wurde, spricht man von einer heterologen Desensibilisierung [84,100,28].

Für die in dieser Arbeit untersuchte Gruppe der Melanocortin-Rezeptoren kommt es im Rahmen der Signaltransduktion zu einer homologen Desensibilisierung. Hieran sind neben den GRK sogenannte Adapterproteine, die Arrestine, beteiligt [6]. Bis heute konnten vier verschiedene Arrestine kloniert werden [60,58]. Zwei der vier Arrestine werden ausschließlich in der Retina exprimiert, während die anderen beiden, auch als β -Arrestine bezeichnet, besonders im zentralen Nervensystem (ZNS) und der Milz, aber auch im restlichen Organismus zu finden sind [6]. Man unterscheidet demnach Arrestin 1 [153,154,188] und Arrestin 4 [117,45] von dem Arrestin 2 und dem Arrestin 3 (auch als β -Arrestin 1 und β -Arrestin 2 bezeichnet) [103,6]. Arrestin 1 spielt eine tragende Rolle bei der Desensibilisierung des Rhodopsinrezeptors, welcher als Prototyp der GPCR zu betrachten ist [183,19]. Bei den in dieser Arbeit untersuchten GPCR spielen hingegen die β -Arrestine die entscheidende Rolle bei der Rezeptordesensibilisierung [155]. Als Adapterproteine der GPCR binden sie mit hoher Affinität an Clathrin, ein Protein, das an der Einstülpung der Zellmembran und Vesikelbildung beteiligt ist. Clathrin agiert so als Bindeglied zwischen dem Rezeptor und der Zellmembran. Im Verlauf der Desensibilisierung kommt es demnach unter der Beteiligung von Clathrin zur Bildung von Vesikeln, deren Membran den internalisierten Rezeptor enthält. Mithilfe von Dynamin, ein Enzym, das durch die Hydrolyse von Guanintriphosphat (GTP) zur Abspaltung des Vesikels von der Zellmembran führt, gelangen diese in das Zytosol und

liegen dort als intrazellulärer Vesikel vor [104]. Dort treten sie vermutlich in ein Endosom über [135]. Dieser Schritt der Desensibilisierung wird als Rezeptorendozytose bzw. Rezeptorinternalisierung bezeichnet. Bevor der Rezeptor mit seinem Vesikel in das Endosom übertritt, dissoziiert das β -Arrestin vom Rezeptor zurück in das Zytosol [104]. Der sich im Endosom befindende Rezeptor wird entweder wiederverwertet und gelangt an die Zelloberfläche zurück (Resensibilisierung) oder er wird im Lysosom lysiert und somit abgebaut. Erfolgt der Abbau des Rezeptorproteins als Folge einer Langzeit-Exposition des Agonisten, so bezeichnet man diesen Prozess auch als „Down“-Regulation [104]. Erfolgt die Rezeptoresensibilisierung, so wird der Rezeptor zunächst in einem sauren Endosomenkompartiment dephosphoryliert und von seinem Liganden getrennt, bevor er an die Zelloberfläche zurückkehrt [136].



(modifiziert nach Luttrell et al., 2002, *Journal of Cell Science*, 115:455–465)

Abbildung 5: Die Desensibilisierung, Internalisierung und Resensibilisierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Die homologe Desensibilisierung (1) G-Protein-gekoppelter Rezeptoren erfolgt durch die Rekrutierung von β -Arrestin (β arr) an den, durch einen Liganden gebundenen, Rezeptor. Anschließend kommt es zur Phosphorylierung des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK). β -Arrestin agiert als Adapterprotein und bindet Clathrin, ein an der Einstülpung der Zellmembran beteiligtes Protein. Dynaminabhängig kommt es über die Bildung von intrazellulären Vesikeln zur Internalisierung (2) des Rezeptors. Es folgt die Dissoziation des β -Arrestins. Der Rezeptor tritt in ein Endosom über, wo es zur Dissoziation des Liganden sowie zur Dephosphorylierung des Rezeptors durch GPCR-spezifische Protein-Phosphatasen (PP2A) kommt. Anschließend wird der Rezeptor entweder abgebaut („Down“-Regulation) oder er wandert langsam zurück in die Zellmembran (Resensibilisierung) (3).

Neben diesem klassischen Weg der G-Protein-vermittelten Rezeptor-endozytose zeigt die Literatur, dass auch G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege zu einer Endozytose des jeweiligen Rezeptors führen können. Es sind mehrere Mutanten von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beschrieben, die trotz einer nachweislich fehlenden G-Protein-Aktivierung endozytieren. Über welche G-Protein-unabhängige Signalkaskade die Rezeptorendozytose dabei vermittelt wird, ist unklar [173,57,118].

1.2 Das Melanocortin-System

1.2.1 Lage, Struktur und Funktion des Melanocortin-Systems

Der humane Organismus verfügt über verschiedene physiologische Systeme, die es ihm ermöglichen, die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch in einem Gleichgewicht zu halten. So kann ein konstantes Körpergewicht aufrechterhalten werden. An der Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch sind verschiedene Zentren des ZNS beteiligt. Sie werden durch periphere Neurotransmitter und Hormone reguliert. Eines dieser Zentren ist das Melanocortin-System. Als Bestandteil des Hypothalamus und somit des ZNS ist es für die Homöostase des Körpergewichts besonders wichtig [42,32]. Primär setzt es sich aus den für die Nahrungsregulation entscheidenden Melanocortin-3- und Melanocortin-4-Rezeptoren (MC3R, MC4R) sowie aus Substanzen, die deren Signalaktivität regulieren, zusammen (*siehe 1.2.3*). Die Freisetzung dieser Regulatoren erfolgt durch periphere Hormone, sogenannte Adipositasignale. Diese gelangen über die Blutbahn in den Hypothalamus, wo sie vornehmlich im Nucleus arcuatus (ARC), der einen Großteil der Strukturen des Melanocortin-Systems beinhaltet, einen Einfluss auf selbiges nehmen [115,82,83].

Die Destruktion des ARC durch die systemische Gabe von Mononatriumglutamat führte bei Mäusen zu einer erheblichen Gewichtszunahme. Das zeigt, dass dem ARC und damit gleichzeitig dem Melanocortin-System eine Bedeutung oder eine Funktion bei der Regulation des Energiehaushaltes zugewiesen werden kann [131]. Jedoch ist es nicht die Expression verschiedener Neurone in bestimmten Hypothalamuskernen allein, die für die Homöostase entscheidend ist. Vielmehr spielen die neuronalen Verschaltungen der einzelnen Kerngebiete untereinander sowie ausgehende und ankommende Signale der Peripherie die tragende Rolle. So ist neben dem Melanocortin-System eine Vielzahl weiterer Systeme und Neurotransmitter an der Nahrungsregulation beteiligt. Dabei sind längst noch nicht alle beteiligten Komponenten und ihre Verbindungen untereinander entschlüsselt.

1.2.2 Das Melanocortin-System als die Grundlage der Homöostase des Energiehaushalts

Im Wesentlichen ist das Melanocortin-System an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt und bildet hier die zentrale Schaltstelle für die die Nahrungsregulation betreffende Impulse. Diese entstammen der Peripherie ebenso wie dem zentralen Nervensystem. Im Melanocortin-System werden sie integriert und bei Bedarf werden entsprechende Impulse initiiert, die einen Einfluss auf die aufgenommene Nahrungsmenge und/oder die Frequenz der Nahrungsaufnahme sowie den Energieverbrauch haben.

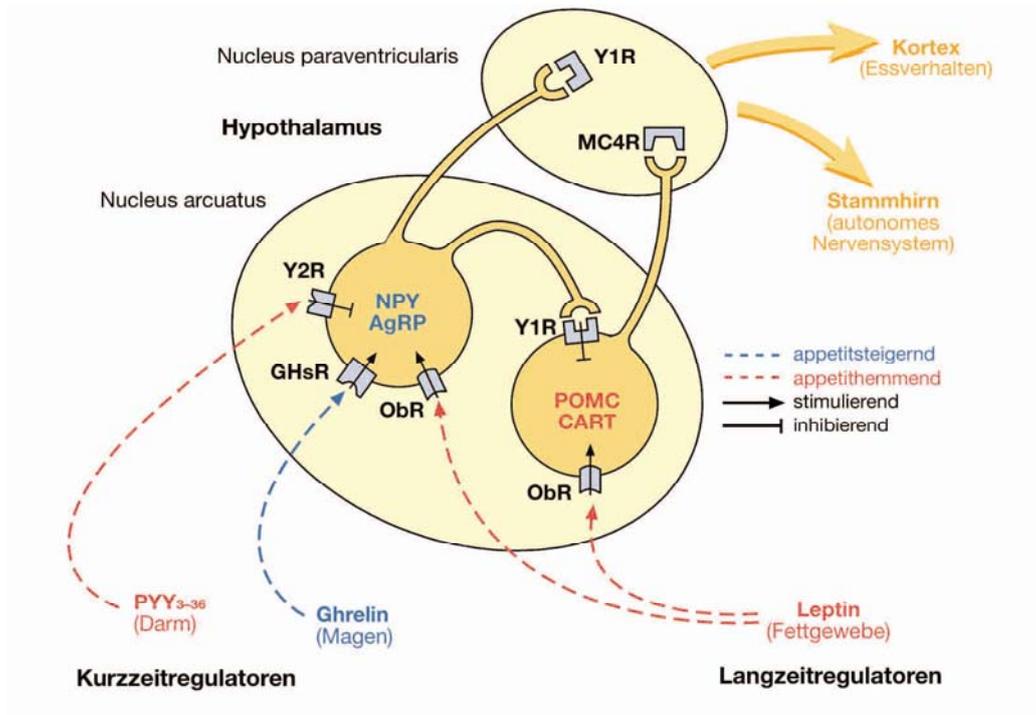
Bestimmte im Körper zirkulierende Hormone agieren als sogenannte Adipositasignale, indem sie dem Hypothalamus Informationen über den Energiestatus des Körpers liefern. Dieser entspricht der Anzahl an Körperfettzellen. Leptin kommt in diesem Zusammenhang die größte Bedeutung zu. Es handelt sich hierbei um ein Hormon, das von Adipozyten gebildet wird und das in Konzentrationen proportional zur Menge des Fettgewebes im Blut zirkuliert [190,106,61]. Leptin ist in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und im Hypothalamus mit spezifischen Rezeptoren

bestimmter Neuronengruppen zu interagieren [12,145,146]. Eine dieser Neuronengruppen exprimiert neben Proopiomelanocortin (POMC), eine Vorstufe des α -MSH, auch das anorexigene Peptid CART (Cocaine/Amphetamin Related Transcript). Diese POMC-Neurone (POMC/CART-Neurone) werden primär im ARC des Hypothalamus sowie im Nucleus tractus solitarius (NTS) des Hirnstamms exprimiert [133,25]. Sie verfügen an ihrer Oberfläche über Leptinrezeptoren (Ob-R) [38]. Kommt es zu einem erhöhten Leptinspiegel, führt das Leptin über seinen Rezeptor an den POMC-Neuronen zur Ausschüttung von α -MSH, welches über die MCR inhibierend auf die Nahrungsaufnahme wirkt [53,165]. Neben den POMC-Neuronen existiert im ARC eine weitere Gruppe von Neuronen, die AgRP-Neurone (AgRP/NPY-Neurone) [79]. Sie exprimieren das AgRP⁴ sowie das orexigene Neuropeptid Y (NPY) und verfügen ebenfalls über Leptinrezeptoren [184]. Die POMC-Neurone des ARC sind über eine GABAerge Synapse mit den AgRP-Neuronen verschaltet [43]. Leptin hat neben seiner depolarisierenden Eigenschaft auf die POMC-Neurone eine hyperpolarisierende Wirkung auf die AgRP-Neurone. Durch die Hyperpolarisation kommt es zu einer Enthemmung der GABAergen Synapse und folglich zusätzlich zu einer vermehrten α -MSH-Freisetzung [51] (*siehe Abb. 6*). Leptin führt weiterhin über unbekannte Mechanismen zu einer vermehrten POMC-Expression im ARC sowie parallel zu einer verminderten AgRP-Expression [147]. Da sich der Leptinspiegel aufgrund seiner Abhängigkeit von den Fettzellen nicht unmittelbar nach Nahrungsaufnahme ändert, konzentriert sich die regulierende Wirkung des Leptins somit auf die Langzeitregulation des Energiehaushaltes [106].

Insulin wird ebenfalls eine Langzeitwirkung bei der Regulation der Nahrungsaufnahme zugesprochen [15,187]. Die Freisetzung des Insulins, das in den Inselzellen des Pankreas gebildet wird, ist abhängig von der vorherrschenden Blutglukosekonzentration. Die basale Insulinkonzentration hingegen entspricht der Menge an Körperfett. Nimmt dieses zu, so steigt die basale Insulinmenge proportional mit an [137,138]. Insulin interagiert primär – analog zu Leptin, das an leptinsensitive Rezeptoren des ARC bindet – mit insulinsensitiven Rezeptoren des ARC [14,16,17]. Weitere Interaktionen mit den

⁴ AgRP und AgRP⁸⁶⁻¹³² werden in dieser Arbeit synonym verwendet.

verschiedensten ZNS-Strukturen werden derzeit diskutiert; die genauen Verschaltungen sind jedoch bisher nicht geklärt [148,186].



© Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag,
Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke: Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl. 2005

Abbildung 6: Regulation der Nahrungsaufnahme im Hypothalamus. Die Regulation des Energiehaushalts erfolgt vornehmlich im Nucleus Arcuatus (ARC) sowie im Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus. Vermittelt wird die Regulation dabei primär über die POMC/CART-Neurone und die AgRP/NPY-Neurone. Proopiomelanocortin (POMC), eine Vorstufe des α -MSH wirkt über die Aktivierung der Melanocortin-Rezeptoren (MCR) appetithemmend. AgRP, welches die Wirkung des α -MSH an den MCR blockiert wirkt hingegen appetitsteigernd. Beide Neuronenpopulationen sind untereinander verschaltet. So hemmen NPY/AgRP-Neurone über die Aktivierung von NPY-Y1-Rezeptoren an POMC/CART-Neuronen dieses anorexigene System, was ihre eigene orexigene Wirkung verstärkt. Die Stellgrößen für die Aktivierung des anorexigenen oder orexigenen Regulationsmechanismus sind vornehmlich Leptin in der Langzeitregulation und Ghrelin in der Kurzzeitregulation.

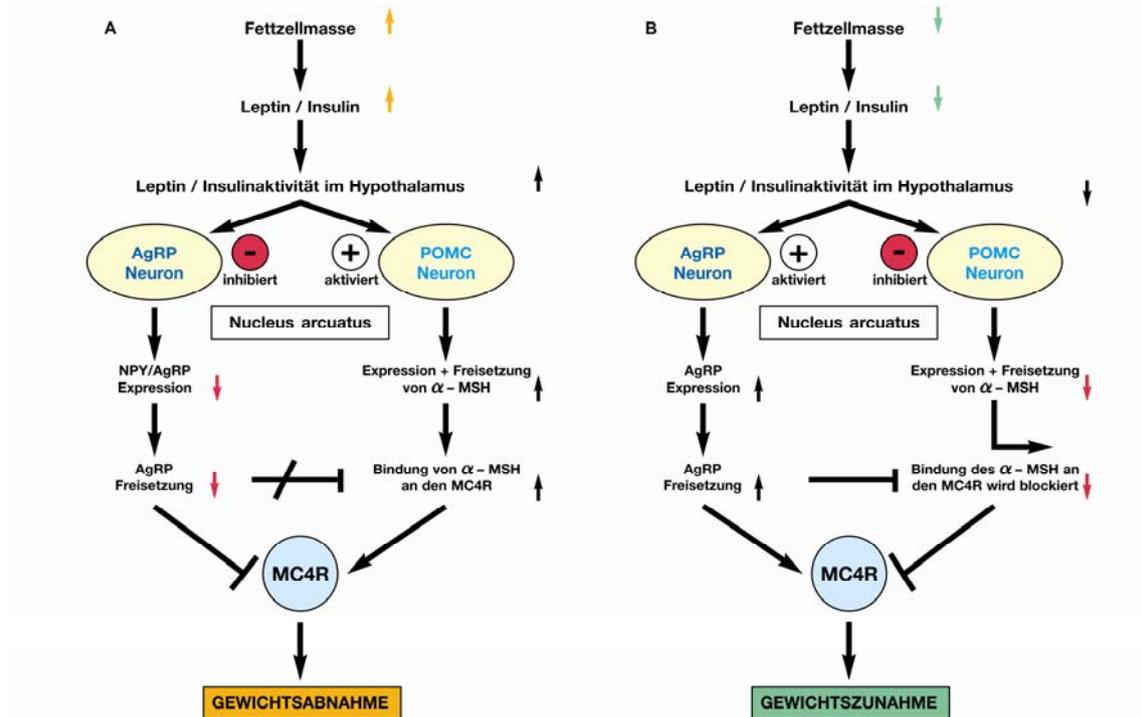


Abbildung 7: Die leptinvermittelte Regulation des Körpergewichts. *A: Gewichtsabnahme.* Eine erhöhte Fettzellmasse führt zu einer gesteigerten Leptin- bzw. Insulinausschüttung. Folglich kommt es zu einer verstärkten Leptin-/Insulinaktivität im Hypothalamus. Leptin bzw. Insulin aktivieren die anorexigenen POMC-Neurone und inhibieren gleichzeitig die orexigenen AgRP-Neurone im Nucleus arcuatus (ARC). Die Freisetzung von POMC führt parallel zu einer erhöhten α -MSH-Konzentration, die primär über die MC4R, aber auch über den MC3R zu einer Reduktion des Körpergewichts führt. *B: Gewichtszunahme.* Analog dazu kommt es bei einer geringen Menge an Körperfett zu einer verminderten Leptin-Aktivität im ARC. So entfällt der die Nahrungsaufnahme hemmende Effekt des α -MSH und es kommt folglich zu einer gesteigerten Expression von AgRP. Dieses orexigene Peptid führt über den MC4R und ggf. über den MC3R zu einer Gewichtszunahme (nach Schwartz et al., 1998, *Nature*, 404:661-673).

Eine ausschließlich kurzzeitige Wirkung hingegen hat das Sättigungshormon PYY₃₋₃₆. Dieses im Darm gebildete Hormon wird proportional zur verdauten Kalorienmenge in die Blutbahn freigesetzt und entfaltet seine Wirkung ebenfalls im ARC [134]. Hier wirkt es über den Y2-Rezeptor der AgRP-Neurone und über die weiter oben bereits erläuterte GABAerge Synapse an den POMC-Neuronen. So kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von α -MSH [18]. Für weitere Sättigungshormone wie das Cholezystokinin (CKK) [29] oder das Ghrelin [44] wurde ebenfalls eine Wirkung auf die kurzfristige Nahrungsregulation beschrieben. Ebenso spielen vagale Impulse eine Rolle [149]. Wichtiges Koordinationszentrum der Lang- und Kurzzeitregulation ist der Nucleus

paraventricularis des Hypothalamus, der die neuroendokrinen sowie autonomen Impulse verarbeitet und integriert [132].

1.2.3 Expression der POMC-Neurone und ihre Peptidhormone

Für die Regulation der Nahrungsaufnahme ist vor allem das α -MSH von großer Bedeutung. Dieses melanozytenstimulierende Hormon ist wie seine Verwandten, das β - und γ -MSH, ein Spaltprodukt des von Neuronen freigesetzten Proopiomelanocortins (POMC) [182,113]. POMC wird unter anderem in der Haut, im Gastrointestinaltrakt, in der Hypophyse und im Hodengewebe produziert. Posttranslational wird es durch die Enzyme Prohormonkonvertase 1 und/oder 2 in seine Spaltprodukte zerlegt [151]. Neben den drei Subtypen des MSH kommt es lokalisationsabhängig auch zur Abspaltung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Es wird in der Hypophyse synthetisiert, in die Blutbahn sezerniert und gelangt so in die Nebennierenrinde. Hier stimuliert es die Glukokortikoidfreisetzung [62].

Bedingt durch die Anwesenheit der Prohormonkonvertase 2 im Hypothalamus kommt es hier zu einer verstärkten Produktion von α -MSH. Besonders im Nucleus arcuatus sowie im Nucleus tractus solitarii ist eine erhöhte α -MSH-Konzentration zu finden [38]. Dem α -MSH kommt als Agonist der sich ebenfalls im ARC und in anderen Hirnarealen befindenden MC3R und MC4R eine entscheidende Rolle bei der Inhibition der Nahrungsaufnahme zu. Diesbezüglich zeigten *Fan et al.*, dass die zentrale Administration von α -MSH bei Mäusen zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme sowie zu einer signifikanten Gewichtsreduktion führt [53].

1.2.4 Melanocortin-Rezeptoren und ihre Bedeutung bei der Homöostase des Energiehaushalts

Die Gruppe der Melanocortin-Rezeptoren (MCR) gehört zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren. Insgesamt konnten bis heute fünf verschiedene Subtypen der MCR identifiziert werden. Während der MC1R ausschließlich in der Epidermis lokalisiert ist, wo er im Rahmen der Hautpigmentierung eine wichtige Rolle spielt, ist der MC2R als ACTH-Rezeptor in der Nebennierenrinde zu finden [116,65]. Bei dem MC3R [63,140] und dem MC4R [64,115] handelt es sich hauptsächlich um Melanocortin-Rezeptoren des ZNS. Weit verbreitet ist der MC3R im Hypothalamus und im limbischen System sowie im Magen und in der Plazenta. Die Expression des MC4R beschränkt sich auf das ZNS und hier besonders auf den Hypothalamus. Der MC5R [74,115] ist mit einer niedrigen Expressionsrate im ganzen Körper vertreten.

Entsprechend ihrer Funktion werden der MC3R sowie der MC4R vermehrt in Kerngebieten des Hypothalamus exprimiert, denen eine Bedeutung für die Regulation des Energiehaushalts zukommt. Dazu zählen der Nucleus arcuatus (ARC), der Nucleus ventromedialis (VMH) und der Nucleus paraventricularis (PVN) [115,82]. Die Beteiligung des MC3R sowie des MC4R wurde in mehreren Arbeiten kontrovers diskutiert. Einigkeit über die Beteiligung an der Regulation des Energiehaushalts besteht dabei für den MC4R [155]. *Huszar et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Eliminierung der für den MC4R kodierenden DNA-Sequenzen in Mäusen mithilfe eines Vektors zu einem adipösen Körperbau in Kombination mit einer Hyperphagie, einer Hyperinsulinämie und einer Hyperglykämie führt. Dabei bewirkt eine veränderte Nahrungszufuhr gleichzeitig eine Änderung der Dichte an MC4R in spezifischen ZNS-Regionen, jedoch keine Änderung der Dichte an MC3R [92]. Auch wenn diese Tatsache zunächst gegen eine Beteiligung des MC3R spricht, so existieren auch Arbeiten, die eine Beteiligung des MC3R für wahrscheinlich halten. Beispielsweise wird in der Arbeit von *Butler et al.* gezeigt, dass ein Verlust von MC3R zu einer gesteigerten Körperfettmasse führt [30]. Man geht demnach davon aus, dass beide MCR-Subtypen an der Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch beteiligt

sind. Dabei ist eine genaue Kenntnis ihrer Signaltransduktion wichtig, um ihre Funktion im Detail verstehen zu können. Hier ablaufende Fehlprozesse können zu einem gestörten Gleichgewicht im Energiehaushalt führen. Das Wissen über die einzelnen an der Signaltransduktion beteiligten Proteine und Signalkaskaden sowie das Erkennen solcher Fehlregulationen ermöglicht es, hier therapeutisch einzugreifen.

1.2.5 Desensibilisierung und Internalisierung des Melanocortin-4-Rezeptors

Der MC3R und der MC4R sowie die weiteren MCR gehören zur Gruppe der rhodopsinähnlichen GPCR. Wie bei anderen GPCR dieser Gruppe erfolgt auch ihre Signaltransduktion über die Kopplung des Rezeptors an ein G-Protein. Dabei ist die G-Proteinkopplung die Konsequenz der Aktivierung des Rezeptors. Diese erfolgt durch Bindung des endogenen Agonisten α -MSH an extrazelluläre Rezeptoranteile. Im Verlauf der Signaltransduktion kommt es parallel zur G-Protein-Kopplung zum Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha_s$ -Untereinheit und dadurch zur Dissoziation dieser von der $G\beta\gamma$ -Einheit [121,161]. $G\alpha_s$ führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase, wodurch es zu einer intrazellulären Anreicherung von cAMP kommt. cAMP aktiviert als sogenannter „second messenger“ weitere Effektoren. Hier spielt im Besonderen die Proteinkinase A eine entscheidende Rolle, welche unter anderem die Fähigkeit besitzt, diverse Proteine zu phosphorylieren (*siehe 1.1.3*). Ist die Aktivierung des MC4R erfolgt, kommt es bereits nach wenigen Sekunden bis Minuten nach Agonistenbindung zur Desensibilisierung des Rezeptors, welche mit einer Abschwächung der Signalvermittlung einhergeht. Für die Melanocortin-Rezeptoren wie auch für einige andere GPCR handelt es sich dabei primär um eine homologe Desensibilisierung, wie sie bereits unter 1.1.3 beschrieben wurde. Speziell für den MC4R konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die phosphorylierte Sequenz des Rezeptors mit der von GRK üblicherweise phosphorylierten Sequenz übereinstimmt. Demnach ist anzunehmen dass es im Fall des MC4R zu einer GRK-vermittelten Phosphorylierung und somit ebenfalls zu einer homologen Desensibilisierung kommt. Vor allem der GRK2/3 wird eine

Bedeutung für die MC4R-Desensibilisierung und -internalisierung zugesprochen. Sie translokieren an die Zellmembran und binden hier mit ihrem C-terminalen Ende an die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Phosphoryliert wird der Rezeptor dann an Serin- und Threoninresten der dritten intrazellulären Schleife sowie an seinen C-terminalen Domänen [155]. Fast gleichzeitig kommt es zur Rekrutierung von zytoplasmatischem β -Arrestin. Für GPCR im Allgemeinen geht man davon aus, dass die Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor die entscheidende Rolle im Desensibilisierungsprozess einnimmt, während die GRK-Phosphorylierung lediglich die Affinität des Rezeptors gegenüber β -Arrestin erhöht [104]. Neben der GRK-vermittelten Phosphorylierung des MC4R zeigten *Shinyama et al.* darüber hinaus, dass auch die PKA eine Phosphorylierung des MC4R induziert. Die PKA kann demnach den MC4R desensibilisieren. Zusätzlich konnte die Beteiligung der PKA an der MC4R-Endozytose durch den Einsatz des PKA-Inhibitors H89, der eine Endozytose des MC4R verhinderte, gezeigt werden. Die PKA-Aktivierung alleine, wie sie durch das aus der Wurzel von *Coleus forskohlii* stammende Forskolin, über die AZ-Aktivierung erfolgt führt jedoch zu keiner Endozytose des MC4R. Ohne Bindung eines Liganden befindet sich der Rezeptor vermutlich nicht in der für die Endozytose entscheidenden Konformation. Neben der homologen Desensibilisierung des MC4R scheint demnach auch die PKA an der für die Desensibilisierung entscheidenden Phosphorylierung des MC4R beteiligt zu sein. Eine Voraussetzung zur MC4R-Desensibilisierung sowie -Internalisierung ist nach *Shinyama et al.* neben der β -Arrestin-Rekrutierung zu dem Rezeptor auch die Beteiligung von Dynamin, ein Enzym, das zur Abspaltung des Vesikels von der Zellmembran führt [155].

Zusammenfassend erfolgt nach *Shinyama et al.* zunächst eine agonisteninduzierten Aktivierung von $G\alpha_s$ mit einer dadurch hervorgerufenen AZ-Aktivierung. Diese führt zu einer Anreicherung von cAMP das die PKA aktiviert. Parallel führt dabei, wie beispielsweise bei den β -adrenergen Rezeptoren die $G\beta\gamma$ -Untereinheit zur Aktivierung der GRK. Diese phosphorylieren den MC4R an spezifischen Aminosäuren seines C-Terminus und desensibilisieren den Rezeptor auf diesem Weg. Gleichzeitig kommt es zur Rekrutierung von β -Arrestin zu dem Rezeptor. Vermutlich spielt hierbei auch die

Phosphorylierung des MC4R durch die PKA eine Rolle. Das als Adapterprotein agierende β -Arrestin führt mit der Hilfe von Clathrin und dem Enzym Dynamin zur Endozytose des MC4R [155]. Nach dem der MC4R endozytiert ist, befindet er sich in einem intrazellulären Vesikel. Wie bereits unter 1.1.3 für GPCR im Allgemeinen erläutert wurde, so kann auch für den MC4R angenommen werden, dass mehrere Möglichkeiten in Bezug auf den weiteren Verbleib des den Rezeptor beinhaltenden Vesikels existieren. Entweder der intravesikuläre Rezeptor tritt in ein Lysosom über und das Rezeptorprotein wird dort abgebaut oder er gelangt nach Abspaltung des Liganden zurück an die Zelloberfläche. Den zuletzt genannten Mechanismus bezeichnet man auch als Rezeptorresensibilisierung. Darüber hinaus spielt der Abbau des Rezeptorproteins, welcher als Folge einer Langzeit-Exposition des Liganden auch als „Down“-Regulation bezeichnet wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Regulation des Energiehaushalts. So kommt es bei Mäusen, die unter einer nahrungsinduzierten Adipositas leiden, zu einer „Down“-Regulation der MC4R-Expression in den für die Regulation des Energiehaushalts entscheidenden Arealen des ZNS. Umgekehrt folgt auf eine Nahrungsrestriktion über zehn Tage hinweg, eine „Up“-Regulation [82].

Neben der PKA konnten für den MC4R andere Effektoren nachgewiesen werden, die bei der Signaltransduktion aktiviert werden und zur Regulation weiterer Effektorproteine führen können. Beispielsweise wird den extrazelluläre Signale regulierenden Kinasen (ERK) eine Rolle bei der Informationsweiterleitung zugeordnet [102,46,105]. Diese gehören zur Gruppe der Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Als eine Auswirkung der ERK-Aktivierung zeigten *Sutton et al.*, dass die Phosphorylierung von ERK einen wichtigen Schritt bei der von α -MSH vermittelten Restriktion der Nahrungsaufnahme darstellt. So konnte bei Experimenten mit Ratten die α -MSH-vermittelte Nahrungsrestriktion durch bestimmte, die ERK-Aktivierung blockierende Substanzen aufgehoben werden. Hierauf folgte eine gesteigerte Nahrungsaufnahme [162]. Wie es im Einzelnen mithilfe der PKA- und ERK-Aktivierung zu einer α -MSH-induzierten Nahrungsrestriktion sowie einem erhöhten Energieverbrauch des Organismus kommt, ist bisher jedoch nicht geklärt [191,162].

1.2.6 Das Agouti-Protein und das „Agouti-Related-Protein“ (AgRP) als endogene inverse Agonisten

α -MSH ist als endogener Agonist des MC3R und des MC4R im Wesentlichen für die Restriktion der Nahrungsaufnahme verantwortlich. Damit jedoch ein Gleichgewicht des Energiehaushalts gewährleistet werden kann, ist ein weiterer endogener Ligand notwendig, der im Gegensatz zum α -MSH stimulierend auf die Nahrungsaufnahme und inhibierend auf den Energieverbrauch wirkt. Hierbei handelt es sich um den endogenen inversen Agonisten, das „Agouti-Related-Protein“ (AgRP). Im Zuge seiner Entdeckung konnten zunächst *Bultman et al.* einen ersten Zusammenhang zwischen dem Agouti-Protein und der Fettleibigkeit von Mäusen herstellen [26]. Später entdeckten *Shutter et al.* das AgRP, welches in seiner Sequenz dem Agouti-Protein sehr ähnelt. AgRP wird primär in der Nebenniere sowie dem Hypothalamus exprimiert [130,156]. Es ist als endogener kompetitiver Antagonist des α -MSH bekannt und agiert somit als dessen Gegenregulator. In diesem Zusammenhang konnte von *Rossi et al.* gezeigt werden, dass die gezielte Injektion von AgRP in das ZNS von Mäusen die Nahrungsaufnahme steigert [141]. Dabei zeigt die größte antagonistische Aktivität das AgRP-Fragment mit den Aminosäuren 86–132 [130]. Neben seiner Funktion als Antagonist wird AgRP eine inverse agonistische Aktivität an den MCR zugeordnet. *Nijenhuis et al.* konnten zeigen, dass der MC3R sowie der MC4R über eine konstitutive Basalaktivität verfügen. Ferner beobachteten sie, dass AgRP diese basale Aktivität am MC4R herabsetzt und somit die cAMP-Produktion reduziert. Dem AgRP konnte somit eine vom α -MSH unabhängige Wirkung in Bezug auf die Regulation des MC3R und des MC4R nachgewiesen werden [125].

1.2.7 MC4R-Gen-Mutationen und ihre physiologischen Bedeutungen für den humanen Organismus

In den westlichen Ländern leiden heutzutage immer mehr Menschen an der Volkskrankheit Adipositas. Als Bemessungsgrundlage dieser krankhaft stark

ausgeprägten Fettleibigkeit wird nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Adipositas der Körpermassenindex (Body-Mass-Index, BMI) herangezogen. Der BMI ist der Quotient aus Gewicht und Körpergröße zum Quadrat (kg/m^2). Übergewicht ist definiert als $\text{BMI} \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$, Adipositas als $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$.⁵ Ein Überangebot an fettreicher Nahrung sowie Bewegungsmangel stehen als Ursache im Vordergrund und fördern dieses Krankheitsbild enorm. Mit der chronischen Zunahme des Körpergewichts assoziiert sind metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ II, Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck (Hypertonie) sowie Gerinnungsstörungen. Zusammenfassend bezeichnet man dieses Krankheitsbild als Metabolisches Syndrom, welches ein gehäuftes Auftreten von Atherosklerose bedingt. Die Folge sind kardiovaskuläre Erkrankungen, bei denen der Herzinfarkt sowie der Schlaganfall im Mittelpunkt stehen. In Deutschland erleiden jährlich ca. 300.000 Menschen einen Herzinfarkt. Über 170.000 davon sterben an den Folgen.⁶

Die Adipositas und damit einhergehende Herz-Kreislauf-Erkrankungen manifestieren sich nicht erst, wie man annehmen könnte, im höheren Alter, sondern sind bereits Bestandteil der Erkrankungen im Kindesalter. Immer mehr Kinder leiden schon in jungen Jahren unter starkem Übergewicht, welches sich in vielen Fällen zur Adipositas entwickelt. In Deutschland betrug die Verbreitung der Adipositas bei den 14- bis 17-Jährigen im Jahr 2006 8,5 %.⁷ Nicht nur für die Gesundheit des Einzelnen stellt die sich immer weiter ausbreitende Fettleibigkeit eine Gefahr dar, auch sozio-ökonomische Faktoren werden zu einem massiven Problem. So hat das Gesundheitssystem schon heute erhebliche Schwierigkeiten, genügend finanzielle Mittel zur Deckung der Folgekosten bereitzustellen. Die Tatsache, dass bereits heute mehr als 5.000 Kinder in Deutschland am Typ II Diabetes der früher einmal als Altersdiabetes bezeichnet wurde und eine Folge der Adipositas darstellt erkrankt sind, lässt erahnen welche Kosten in den kommenden Jahren auf das Gesundheitssystem

⁵ Deutsche Diabetes Gesellschaft, Hauner, H., http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/redaktion/mitteilungen/leitlinien/EBL_Adipositas_Update_2007.pdf (Download vom 18.12.2007)

⁶ Deutsche Herzsiftung e. V., o. V., <http://www.herzsiftung.de/rundumsherz.php> (Download vom 15.12.2007)

⁷ Adipositas Stiftung, o. V., <http://www.adipositas-stiftung.de/> (Download vom 18.12.2007)

zu kommen⁸. Schon jetzt zeigt eine Studie der PMV forschungsgruppe, dass Kinder mit einer Adipositasdiagnose gegenüber der Kontrollgruppe im Jahr 2002 um 20 % höhere ambulant-stationäre Pro-Kopf-Kosten verursachten.⁹

Auch wenn vor allem der Lebensstil, das heißt fettreiche Ernährung und Bewegungsmangel, für die Adipositas verantwortlich ist, konnte doch in einzelnen Fällen auch ein genetischer Defekt als Ursache der Adipositas nachgewiesen werden. Fehlfunktionen des Melanocortin-Systems führen in der Mehrzahl der Fälle zu einer Störung des Energiehaushalts und somit zu einem gestörten Gleichgewicht zwischen Nahrungsaufnahme und Energieverbrauch. Das Resultat ist eine frühkindliche Adipositas, welche sich unter anderem durch ein verstärktes Verlangen nach Nahrung, besonders zwischen dem sechsten und achten Lebensmonat, erkennbar macht. Als Ursache hierfür konnten bis heute über 70 Mutationen des MC4R-Gens definiert werden [55]. Erstmals wurde ein Zusammenhang zwischen der juvenilen Adipositas und Mutationen des MC4R-Gens 1998 publiziert. *Vaisse et al.* konnten zeigen, dass heterozygote Mutationen des MC4R in einzelnen Familien mit einer dominant vererbten frühkindlichen Adipositas einhergehen [170]. Mutationen des für den MC4R kodierenden Gens sind heute mit einem Anteil von 3–4 % die häufigste monogenetische Ursache juveniler Adipositas [54]. Bei der Mehrheit der Mutationen des MC4R-Gens handelt es sich um heterozygote Varianten. Träger dieser Gendefekte sind zumeist stark adipös. *Biebermann et al.* konnten eine Mutante des MC4R sequenzieren, bei der ein dominanter negativer Effekt der Mutante auf den Wildtyp die Ursache der Adipositas darstellt. Diese MC4R-D90N-Mutante ist charakterisiert durch eine Punktmutation der Aminosäure Asparaginsäure. In der Mutante befindet sich an neunzigster Stelle der Transmembrandomäne 2 (TMD 2) Asparagin anstelle von Asparaginsäure. Für die MC4R-D90N konnte im Hinblick auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber dem Agonisten, ebenso wie auf die Oberflächenexpression, im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor kein Unterschied festgestellt werden [22]. Charakteristisch ist für die Mutante jedoch, dass sie die ursprüngliche Fähigkeit des Wildtyp-

⁸ Diabetes-Kids, o. V., <http://www.diabetes-kids.de/artikel/2.html> (Download vom 28.05.2008)

⁹ PMV forschungsgruppe, Lappe, V, http://www.pmvforschungsgruppe.de/content/02_forschung/02_c_versorgungsf_06.htm (Download vom 18.12.2007)

Rezeptors, an $G\alpha_s$ zu koppeln, verloren hat. Diese Eigenschaft macht sie zur idealen Mutante, um die Bedeutung der $G\alpha_s$ -Kopplung für den von α -MSH am MC4R induzierten Signalweg zu untersuchen. Dazu gehört auch zu prüfen, ob möglicherweise G-Protein-unabhängige Signalkaskaden an der MC4R-Signaltransduktion beteiligt sind. Eine weiterführende Charakterisierung der α -MSH-vermittelten Signaltransduktion des MC4R aber auch die Auswirkungen des AgRP auf die Melanocortin-Rezeptoren generell könnten neue Erklärungsansätze hinsichtlich der Regulation der Homöostase des Energiehaushalts liefern.

1.3 Fragestellung

Die agonisteninduzierte Endozytose des Melanocortin-3-Rezeptors

Die agonisteninduzierte und β -Arrestin-vermittelte Rezeptorendozytose wird als wichtiger Schritt bei der Desensibilisierung von GPCR im Allgemeinen und speziell bei der Desensibilisierung von MC4R-vermittelten Signalwegen beschrieben. Bisher existieren keine Daten bezüglich der agonistenvermittelten MC3R-Endozytose. Daher liegt ein Schwerpunkt dieser Arbeit in der Untersuchung der agonistenvermittelten MC3R-Endozytose und deren molekularer Grundlagen.

Der Einfluss des „Agouti-Related Proteins“ auf die Endozytose von Melanocortin-Rezeptoren

Für nicht natürlich vorkommende inverse Agonisten der β -adrenergen Rezeptoren konnte eine Rekrutierung von β -Arrestin gezeigt werden. Allerdings führte die durch einen synthetischen Liganden vermittelte Arrestin-Rezeptor-Interaktion nicht zur Endozytose dieses Proteinkomplexes. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit zum einen untersucht, ob der natürlich vorkommende

inverse Agonist, AgRP, Interaktionen zwischen MCR und β -Arrestinen verstärkt, und zum anderen, inwiefern diese postulierte β -Arrestin-MCR-Interaktion zu einer AgRP-vermittelten Rezeptorendozytose führen kann.

Die Abhängigkeit der agonistenvermittelten MC4R-Endozytose von der Aktivierung des $G\alpha_s$ -Signalweges

Obwohl die Abhängigkeit der agonistenvermittelten MC4R-Endozytose von β -Arrestinen gezeigt werden konnte, besteht kein klares Bild der molekularen Grundlagen, die zur β -Arrestin-Aktivierung und damit zur MC4R-Endozytose führen. Eine natürlich vorkommende Variante des MC4R, die MC4R-D90N, hat selektiv die Fähigkeit verloren, den $G\alpha_s$ -Signalweg zu aktivieren, bindet aber weiterhin mit hoher Affinität Agonisten. Im Rahmen dieser Arbeit wird mithilfe der MC4R-D90N-Variante die Bedeutung des $G\alpha_s$ -Signalweges sowohl für die β -Arrestin-Rekrutierung als auch für die MC4R-Endozytose untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Brutschrank	HERAcell, Heraeus, Hanau
Zellkulturwerkbank	HERAsafe, Heraeus, Hanau
Pipetten	10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Eppendorf Pipetten
Mikroplatten-Lesegerät	FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech, Offenburg
Spektrometer	Urikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn
Ultra-Thurax	Janke und Kunkel, Ika Werk
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific industries, Inc. NY USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Heizplatte, Elektrorührer	RCTbasic, Ika Werke
Feinwaage	Sartorius 1264 MP, Steiner und Co. OHG, Giserfeld/Sieg
PH-Meter	Greisinger Electronic, Germany
Taumler	Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
PCR-Multicycler	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Schüttelinkubator	Forma Scientific Inc., Kobe, Marburg
<i>Zentrifugen</i>	
Ultracentrifuge L7-55	Beckman, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf
Sorvall RC-5	Sorvall RC-5 SuperSpeed Refrigerated, Sorvall Bad Nauheim

2.1.2 Verbrauchskemikalien und Enzyme

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HCL (32 %)	Riedel de Haen, Seelze
Natriumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
Trichloressigsäure	Riedel de Haen, Seelze
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
10 % Formalin in PBS	J.T. Baker, Deventer, Netherlands
Schwefelsäure konzentriert	Riedel de Haen, Seelze
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zeocin TM	Invitrogen, CA USA
DMEM	PAA, Cölbe, Marburg
Foetales Kälberserum (FBS)	PAA, Cölbe, Marburg
Trypsin	PAA, Cölbe, Marburg
PBS	1 x Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PAA, Österreich
Metafectene TM	Biontex Lab. GmbH, München
Colenterazine H	Biaffin, Kassel
1-Step Turbo TMB ELISA	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Forskolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Enzyme</i>	
DNA-T4-Ligase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Endonuklease	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Edinburgh, Schottland

2.1.3 Liganden

α -melanozytenstimulierendes Hormon (α -MSH)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
--	----------------------------

„Agouti-Related Protein“ Fragment 86-132 (AgRP ⁸⁶⁻¹³²)	Peptide Institut inc., Osaka, Japan
--	--

2.1.4 Expressionsvektoren

Zur Herstellung der notwendigen Rezeptorfusionsproteine und zur anschließenden rekombinanten Überexpression dieser Proteine wurde das pcDNA4/Ex-His-Max-Plasmid von Invitrogen, das pRLuz oder das pYFP-Plasmid von PerkinElmer verwendet. Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die codierende Sequenz des entsprechenden Rezeptorproteins unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotidpaare (MWG-Biotech AG, Ebersberg) amplifiziert und das Produkt dieser Reaktion in die durch Restriktionsenzyme vorbehandelten Plasmide subkloniert (*siehe Tab. 2*). Das pcDNA3.1-GABA_{BR2}-RLuz, das pcDNA3.1- β -Arrestin-2-YFP und das pcDNA3.1- β -Arrestin-2-RLuz-Plasmid wurden freundlicherweise von Dr. Michel Bouvier, University of Montréal (Montréal, Kanada) zur Verfügung gestellt und das pAD-CRE-FLuz-Plasmid für die Reporterstudie dankenswerterweise von Dr. Himmler, Bender GmbH (Wien, Österreich).

Plasmid	Restriktionsschnittstellen	Template-DNA	Sense-Strang-Oligonukleotid	Anti-Sense-Strang-Oligonukleotid	resultierendes Plasmid
pcDNA4/Ex-HisMax	BamHI & EcoRV	Humaner MC4R	5'ACGGATCCATG TG- AACTCCACCCAC C-3'	5'GCAAGCTTGATA TCTG- CTAGACAAGTCAC -3'	pcDNA-Ex-MC4R
pcDNA4/Ex-HisMax	BamHI & EcoRV	Humaner MC3R	5'ACGGATCCATG AGCA- TCCAAAAGACGT ATC-3'	5'- AGCCTCGAGTCCC AA- GTTTCATGCCGTTG C-3'	pcDNA-Ex-MC3R
pcDNA4/Ex-HisMax	BamHI & EcoRV	Humaner MC4R-D90N	5'ACGGATCCATG GTG- AACTCCACCCAC C-3'	5'GCAAGCTTGATA TCTG- CTAGACAAGTCAC -3'	pcDNA-Ex-MC4R-D90N
pRLuz	EcoRI & EcoRV	Humaner MC4R	5'GAGAATTCAGT GAACTCC- ACCCACCGTGG- 3'	5'ATCATATCTGCT A-GACAAGTC-3'	pRLuz-MC4R
pRLuz	EcoRI & EcoRV	Humaner MC3R	5'AGAGAATTCAG CATCC- AAAAGACGTATCT GGAG -3'	5'ATCTCCCAAGTT CA- TGCCGTTGC-3'	pRLuz-MC3R
pRLuz	EcoRI & EcoRV	Humaner MC4R-D90N	5'GAGAATTCAGT AACTCC- ACCCACCGTGG- 3'	5'ATCATATCTGCT A-GACAAGTC-3'	pRLuz-MC4R-D90N
pYFP	EcoRI & EcoRV	Humaner MC4R	5'GAGAATTCAGT GAACTCC- ACCCACCGTGG- 3'	5'ATCATATCTGCT A-GACAAGTC-3'	pYFP-MC4R
pYFP	EcoRI & EcoRV	Humaner MC3R	5'AGAGAATTCAG CATCC- AAAAGACGTATCT GGAG -3'	5'ATCTCCCAAGTT CA- TGCCGTTGC-3'	pYFP-MC3R
pYFP	EcoRI & EcoRV	Humaner MC4R-D90N	5'GAGAATTCAGT AACTCC- ACCCACCGTGG- 3'	5'ATCATATCTGCT A-GACAAGTC-3'	pYFP-MC4R-D90N

Tabelle 2: Expressionsvektoren

2.1.5 Antikörper

Anti-Xpress, Maus	Invitrogen, CA USA
Anti-Maus Horseradish peroxidase-konjugierter Schaf-Antikörper	Amersham Bioscience, Freiburg
Anti-MC4R-Peptid-Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
Anti-Hase-POD-konjugierter Antikörper	Amersham Bioscience, Freiburg

2.1.6 Lösungen / Puffer

Bradford-Stammlösung	100 ml Ethanol (96 %), 200 ml Phosphorsäure (88 %), 350 mg Serva Blue G, bei RT abgedunkelt lagern
Bradford-Arbeitslösung	5 ml 85 % Phosphorsäure, 2 ml Bradford-Stammlösung, mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt
Polylysinlösung	Poly-L-Lysin (100 mg/ml), Sigma, Deisenhofen
Saccharoselösung (35 %)	8,75 g Saccharose in 25 ml PBS gelöst
Membranpuffer	Tris 5 mM pH 7,4 und 2 mM EDTA

2.1.7 Zelllinien

2.1.7.1 HEK-293-Zellen

HEK-293-Zellen entstammen humanen embryonalen Nierenzellen und wurden 1977 erstmals von *Graham et al.* beschrieben. Sie wachsen adhärent als einschichtiger Zellverband und haben eine durchschnittliche Verdopplungszeit von 18 Stunden [73].

2.1.7.2 COS-7-Zellen

Bei den COS-7-Zellen handelt es sich um eine von insgesamt drei Varianten einer Fibroblastenzelllinie. Sie stammen aus dem Nierengewebe grüner Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) und wurden erstmals 1981 von *Gluzman et al.* beschrieben. Ihre Verdopplungszeit beträgt 16 Stunden und sie wachsen als einschichtiger Zellverband [71].

2.1.7.3 GT-Hypothalamuszellen

GT-Zellen sind neuronale Zelllinien des Hypothalamus. Sie wurden 1990 von *Mellon et al.* im Zuge der genetisch gezielten Tumorgenese in transgenen Mäusen entwickelt. Man unterscheidet die GT1-1- von den GT1-7-Zelllinien. Beide exprimieren endogen den MC4-Rezeptor, dessen Bindungsaffinitäten für MSH sowie AgRP mit den Werten für den humanen MC4R übereinstimmen. Zusätzlich wurde für die GT1-7-Zelllinie eine endogene Expression des MC3-Rezeptors ermittelt [96,50]. Die Zelllinien verfügen beide über das Gonadotropin-releasing-Hormon(GnRH)-Gen sowie über das entsprechende Genprodukt [109].

2.1.8 Zellkulturmaterialien

Mit Poly-L-Lysin beschichtete 12-Loch-Platten

12-Loch-Platten der Firma Sarstedt (Nümbrecht) wurden für den Oberflächen-ELISA mit Poly-L-Lysin beschichtet. Das Poly-L-Lysin verbessert die Adhäsion der Zellen an den Böden der Vertiefungen (Löcher). Die Anzahl der im ELISA durch die Waschvorgänge vom Boden der Löcher abgelösten Zellen wird so auf ein Minimum reduziert.

Die Poly-L-Lysinlösung (100 mg/ml, gelagert bei -20 °C) wurde aufgetaut und anschließend 1 ml der Lösung auf jede Vertiefung einer 12-Loch-Platte gegeben. Nach einer halben Stunde wurde das Poly-L-Lysin vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein Aufbewahrungsröhrchen der Firma Sarstedt

(Nümbrecht) zurückgeführt. Die so beschichteten 12-Loch-Platten wurden dann mindestens 12 Stunden an der Raumluft getrocknet.

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung und Vervielfältigung der Plasmide mithilfe von DH5 α -E.-coli-Bakterien

Die Aufreinigung und Vervielfältigung der Plasmide erfolgte mithilfe des „Plasmid-DNA-Purification-Kit“ der Firma Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren.

2.2.1.1 Herstellung kompetenter DH5 α -E.-coli-Bakterien

Unter den Bedingungen einer niedrigen Wachstumstemperatur und der Behandlung mit Mangan- sowie Calciumchlorid synthetisiert das Bakterium E. coli eine fehlerhafte Zellwand. Dies ermöglicht die Aufnahme freier DNS aus dem Medium in das Bakterium [94].

Zunächst wurde eine Bakterienkolonie des E.-coli-Stammes DH5 α von einer LB-Agarplatte in SOB-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 7,0) überführt und so bei einer Temperatur von 17 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6 herangezüchtet. Dabei kam es zu einem logarithmischen Wachstum der Kolonie. Nach Kühlung der Probe auf Eis von 10 Minuten erfolgte die Sedimentation bei 2100 g, 4 °C und 10 Minuten. Die hierbei abzentrifugierten Bakterien wurden in 80 ml sehr kaltem Transformationspuffer (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, 55 mM MnCl₂, pH 6,7 eingestellt mit KOH) resuspendiert sowie weitere 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurden die Zellen mit 20 ml mit DMSO (7 %) versetztem Transformationspuffer aufgenommen. Die

Suspension wurde zu 50 µl in Mikroröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) aliquotiert, schockgefroren und anschließend bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation kompetenter DH5 α -E.-coli-Bakterien durch Hitzeschock

Mithilfe der Hitzeschock-Methode können Bakterien mit der gewünschten Plasmid-DNS transformiert werden. Durch das Erhitzen der Bakterien werden die Membranstrukturen aufgebrochen und die Plasmid-DNS, die sich ebenfalls in der Suspension befindet, kann so in das Bakterium diffundieren. Die anschließende Selektion der mit dem Plasmid transformierten Bakterien erfolgt mithilfe eines Antibiotika-Resistenz-Gens, das sich auf dem Plasmid befindet. Im Vordergrund steht hierbei die Produktion und Vervielfältigung kompetenter Zellen.

Im Einzelnen wurden 50 µl kompetente DH5 α -E.-coli-Bakterien mit 0,3–0,5 µg Plasmid-DNS versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte der Hitzeschock im Wasserbad (42 °C) für 35 Sekunden. Nach einer erneuten Inkubationszeit von 5 Minuten bei 4 °C wurden der Probe 250 µl SOG-Medium zugesetzt. Diese wurde dann für etwa 1 Stunde bei 37 °C inkubiert (Schüttelinkubator). Die Zellsuspension wurde auf einer LB-Agarplatte (1,5 % Agar und 0,1 mg/l Ampicillin in LB-Medium, pH 7,4) ausgestrichen und für mindestens 8 Stunden im Brutschrank (37 °C) bebrütet. Von den so gezüchteten Kolonien wurden Anteile in einen mit 10 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 0,1 mg/l Ampicillin in H₂O bidest., pH 7,4) befüllten Kolben überführt.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Im Rahmen der Plasmid-DNS-Vervielfältigung und Aufreinigung wurden die Plasmide nach ihrer Vermehrung in kompetenten sowie transformierten DH5 α -E.-coli-Bakterien isoliert. Hierbei bediente man sich eines alkalischen Lyseverfahrens [143]. Unterschieden wird nachfolgend eine Mini- von einer Midi-Präparation, wobei bei der Mini-Präparation im Wesentlichen nur eine geringere Menge Bakteriensuspension zum Einsatz kommt.

2.2.1.3.1 Mini-Präparation

Hierbei werden mithilfe einer Pipettenspitze Bakterienkolonien der zuvor angezüchteten E.-coli-Bakterien von einer Agarplatte entnommen und in ein mit 10 ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit Ampicillin, befülltes geeignetes Gefäß überführt. Dieses wurde über einen Mindestzeitraum von 8 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C bebrütet. Je 2 ml der Bakterien-Suspension wurden anschließend über einen Zeitraum von 3 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der entstandene Niederschlag in 200 µl des Puffers S1 (Resuspensionspuffer: 50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RhaseA, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl des Puffers S2 (Lysispuffer: 0,2M NaOH, 1 % SDS) wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis gelagert. Anschließend wurden 200 µl des Puffers S3 (Neutralisierungspuffer: 2,8 M KCl, pH 5,1) hinzugegeben. Die Proben wurden ein weiteres Mal bei 13.000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand wurde mit 1 ml 100 %igem Ethanol versetzt, bevor die Proben ein drittes Mal, wie oben bereits erläutert, zentrifugiert wurden. Der hierbei entstandene Niederschlag wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und anschließend an der Raumluft getrocknet. Hinterher wurde er in 30 µl destilliertem Wasser gelöst und dann im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.3.2 Midi-Präparation

Im Vergleich zur Mini-Präparation beinhaltet die Midi-Präparation einen weiteren Reinigungsschritt in Form einer Anionen-Austauscher-Säule.

Kompetente DH5 α -E.-coli-Bakterien wurden zunächst mithilfe der Hitzeschock-Methode und einem aus der Mini-Präparation gewonnenen Plasmid transformiert. Diese wurden in einen mit 100 ml LB-Flüssigmedium versetzt mit Ampicillin befüllten Kolben überführt. Inkubiert wurden sie anschließend bei 37 °C und 225 rpm über mindestens 8 Stunden in einem Schüttelinkubator. Danach erfolgte die Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 5000 g und 4 °C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgegossen und der Niederschlag in 8 ml des Puffers S1 mithilfe des Vortexgerätes resuspendiert. Hinzugefügt wurde dann der S2-Puffer und die Proben wurden 5 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 8 ml des kalten S3-Puffers erfolgte die Trennung der DNS von den denaturierten Bakterienproteinen mithilfe eines Papierfilters. Der hierbei entstandene klare Durchfluss wurde auf eine, zuvor mit 2,5 ml N2-Puffer (10 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM Triton – X – 100, pH 6,3 eingestellt mit H₃PO₄) äquilibrierte Nucleobond-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml des Puffers N3 (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3 eingestellt mit H₃PO₄) eluierte man die DNS mit 5 ml des Puffers N5 (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, pH 8,5 eingestellt mit H₃PO₄) und präzipitierte sie mit 3,5 ml Isopropanolol. Nach erneuter Zentrifugation von 30 Minuten bei 4 °C und 15.000 g wurde der Überstand abgegossen und die Proben mit Ethanol (70 %) aufgeschüttelt. Wieder folgte eine Zentrifugation der Proben (30 Minuten bei 11.000 g). Nach Abgießen des Überstands und der Trocknung an der Raumluft wurde der Niederschlag in einer angemessenen Menge TE-Lösung aufgenommen.

2.2.2 Zellkultur

Bei den in dieser Arbeit verwendeten HEK-293- und COS-7-Zellen handelt es sich um rekombinante Zellsysteme. Diese überexprimieren bestimmte Rezeptorproteine, nachdem sie zuvor mit der entsprechenden pcDNS transfiziert wurden. Im Folgenden wird die Kultivierung der HEK-293-Zellen exemplarisch für beide Zelllinien erläutert. Auch die weiter oben bereits erwähnten GT1-1-Zellen wurden analog den HEK-293-Zellen kultiviert.

2.2.2.1 Kultivierung von HEK-293-Zellen

Kultiviert wurde die Zelllinie in einem Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (95 % Luft / 5 % CO₂). Als Zellkulturgefäße fanden 250-ml-Kulturflaschen (75 cm², Polyethylen, mit Filterkappe), Zellkulturschalen (100 mm x 200 mm) oder 12-Loch-Platten (flacher Boden, mit Deckel) der Firma Sarstedt (Nümbrecht) Verwendung. Das eingesetzte Kulturmedium, Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) der Firma PAA (Pasching/Österreich) wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und vor der

Anwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Dem Zellkulturmedium DMEM wurde 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes, fötales Kälberserum (FBS) und Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) zugesetzt. Um eine dichteabhängige Proliferationshemmung (Kontaktinhibition) der Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen in reduzierter Anzahl in eine neue Flasche ausgesät (Neu-Aussaat). So bleiben die Zellen in einem proliferationsfähigen Zustand und sterben nicht infolge ausgeschiedener Stoffwechselprodukte oder eines Mangels an Nährstoffen ab. Zur Neu-Aussaat der Zellen wurde das Kulturmedium unter der Zellkulturwerkbank mit sterilen Pasteurpipetten (Hirschmann, Heilbronn) abgesaugt und die Kulturflasche mit 5 ml Phosphatpuffer (PBS) gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde mit sterilen Einwegpipetten (serologische Pipetten, Sarstedt, Nümbrecht) 2 ml Trypsin/EDTA (1xViralex™ Trypsin/EDTA: 0,5 g/l Trypsin, 1,2 g/l EDTA in PBS; PAA) hinzugegeben. Trypsin spaltet die Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin und führt somit zum Ablösen der Zellen vom Boden. EDTA chelatiert zweiwertige Ionen, wie Ca^{2+} und Mg^{2+} , welche normalerweise zellbindende Membranproteine stabilisieren. Da Serumproteine des Mediums die Wirkung des Trypsins hemmen, wurde, wie oben erwähnt, mit PBS gewaschen. Das verwendete PBS enthielt kein Calcium und kein Magnesium, um für den Ionen-Chelator EDTA optimale Bedingungen zu schaffen. Nach dem Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurden diese gut resuspendiert und anschließend mithilfe der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Die Konzentration der zur Aussaat bestimmten Suspension wurde mithilfe des DMEM-Mediums eingestellt und diese dann in eine neue Flasche überführt.

2.2.3 Rekombinante Expression von Proteinen

2.2.3.1 Transiente Expression

Damit die verwendeten Zellen das gewünschte Protein exprimieren, müssen diese zunächst mit der entsprechenden pcDNS transfiziert werden. Unter dem Begriff der Transfektion versteht man den Transfer proteinfreier Plasmid-DNS in

den Zellkern rekombinanter Zellsysteme. Das Prinzip der Transfektion beruht auf der Methode der „Repulsiven Membran-Azidolyse“-Technik (RMA). Hierfür wird zunächst ein Komplex aus zu transfizierender pcDNS und dem amphiphilen polykationischen Transfektionsreagenz Metafectene gebildet. Dieser sogenannte „Lipoplex“ kann dann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden und befindet sich anschließend in einem intrazellulären Endosom. Das durch Protonenpumpen verursachte saure Milieu des Endosoms sowie die Puffereigenschaft des kationischen Lipoplex verursachen einen hohen osmotischen Druck innerhalb des Endosoms. Hierdurch wird die Endosomstruktur zerstört und der DNS-Metafectene-Komplex wird in das Zytosol freigesetzt. Durch die abstoßenden Kräfte zwischen Endosom und Lipoplex wird der Vorgang erleichtert. Eine protonierbare basische Gruppe nahe den lipophilen Anteilen der kationischen Lipide führt zu der Entwicklung eines sauren Milieus im späten Endosom. Hierdurch werden die Strukturen des DNS-Metafectene-Komplexes gelockert und die DNS liegt frei im Zytosol. Diese wandert in den Kern der Zelle und kann dort transkribiert und das spezifische Protein kann translatiert werden.

In dieser Arbeit wurden den humanen MC3R und MC4R sowie dessen Mutante MC4R-D90N transient exprimierende HEK-293- oder COS-7-Zellen verwendet. Die Transfektion der HEK-293- und COS-7-Zellen mit der für den Rezeptor entsprechenden pcDNS wurde jeweils 2 Tage vor Versuchsbeginn durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die einzelnen Ansätze für die jeweilige DNS vorbereitet und je Ansatz zwei Mikroröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) mit je 100 µl serumfreiem DMEM befüllt. In eines der beiden Mikroröhrchen wurde dann die zu transfizierende DNS mittels einer Eppendorf-Pipette unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. In das zweite Mikroröhrchen wurde die dreifache Menge an Metafectene (DNA/Metafectene, 1:3) pipettiert. Bei den DNS-Mengen handelte es sich versuchsabhängig um Mengen zwischen 2 und 6 µg. Beide Ansätze wurden vereinigt und nachfolgend 30–60 Minuten bei Raumtemperatur bebrütet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Komplexe vorsichtig auf die Zellen gegeben. Diese kamen anschließend in den Wärmeschrank, wo sie 4–6 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Nach den 4–6 Stunden Inkubationszeit wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde das

Metafectene-Medium unter sterilen Bedingungen mittels einer Pasteur-Pipette abgesaugt und neues DMEM mit Serum hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 37 °C im Wärmeschrank bis zum Versuchsbeginn (meist 48 Stunden später) inkubiert.

2.2.3.2 Stabile Expression

Zur stabilen Expression eines mit einem Xpress-Epitop konjugierten humanen MC4-Rezeptors (Ex-MC4R) und seiner Mutante MC4R-D90N (Ex-MC4R-D90N) wurden HEK-293-Zellen mit der entsprechenden pcDNS, wie oben beschrieben, transfiziert und anschließend mittels Zeozin-Selektion herangezüchtet. Zeozin, ein Phleomycin-D1-Derivat, ist ein wasserlösliches, kupfer-chalatiertes Glykopeptid, welches aus *Streptomyces verticillus* gewonnen wird. Bei der chelatierten Form handelt es sich um die inaktive Variante des Zeozins, welche bei der Aufnahme in die Zelle durch Reduktion des Kupfers in die aktive Form überführt wird. Das von der Zelle aufgenommene Zeozin bindet an die DNS und spaltet diese, wodurch es zum Zelltod kommt. Zur Selektion bestimmte Zellen verfügen über ein Zeozin-Resistenz-Gen. Dabei handelt es sich um das für ein Resistenzprotein kodierende Sh-ble-Gen (*Streptoalloteichus hindustanus bleomycin Gen*). Nach der Translation bindet und inaktiviert es das Zeozin [49].

Die für die Arbeit benötigten, den Ex-MC4R sowie den Ex-MC4R-D90N stabil exprimierenden HEK-293-Zellen wurden zunächst nach dem unter 2.2.3.1 beschriebenen Verfahren transfiziert. Um stabile Zelllinien zu gewinnen, wurde am Ende des Vorgangs beim Mediumwechsel statt reinem DMEM ein Zeozin-Medium (400 µg/ml) verwendet. Die Kulturen wurden anschließend 2–6 Wochen im Zeozin-Medium herangezüchtet. Kolonien, die über kein Zeozin-Resistenzgen verfügten, starben hierbei ab. So entstanden homogene, nur den Ex-MC4- oder den Ex-MC4-D90N-Rezeptor exprimierende Zellkolonien.

2.2.4 Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Zur Bestimmung des durch Melanocortin-Rezeptoren freigesetzten zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) wurde ein Reportergenassay durchgeführt, indem der zu untersuchende Melanocortin-Rezeptor mit einer Plasmid-DNS co-transfiziert wurde, welche die codierende Sequenz der Luziferase aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) beinhaltet. Die Transkription dieses Luziferase-Gens steht unter der Kontrolle des Cre(„cAMP-responsive-elements“)-Promotors und ist somit linear abhängig von der cAMP-Konzentration in der Zelle. Zwangsläufig führte somit eine durch die Aktivierung der Melanocortin-Rezeptor induzierte cAMP-Produktion zur erhöhten Expression der Luziferase, die durch die enzymatische Aktivität des Proteins nach Zugabe des Substrates (Luziferin) in Form der freigesetzten Lichtquanten bestimmt werden konnte (Chemolumineszenzreaktion Abb. 8). Hierfür wurden fertige Lösungen der Firma Promega („Dual-Luciferase Reporter Assay System“) strikt nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Die Bestimmung der totalen Biolumineszenz erfolgte in dem oben schon erwähnten FLUOstar OPTIMA der Firma BMG, Offenburg.

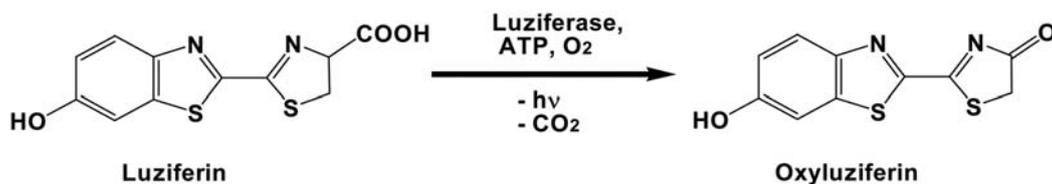


Abbildung 8: Chemolumineszenzreaktion. Durch die Zugabe des Enzyms Luziferase kommt es zur Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin. Dabei wird Energie in Form von Lichtquanten freigesetzt. Diese wird mithilfe des FLUOstar OPTIMA quantifiziert und entspricht der vom Melanocortin-Rezeptor produzierten cAMP-Menge.

2.2.5 Enzymgebundener Immunosorbent-Assay (ELISA)

2.2.5.1 ELISA mit HEK-293-Zellen

Mithilfe dieses Verfahrens können MCR auf eine ligandeninduzierte Endozytose hin untersucht werden. Verwendet werden beim ELISA mit dem Xpress-Epitop konjugierte Rezeptoren (Ex-MC3R und Ex-MC4R). Das Xpress-Epitop ist an das N-terminale Peptid des Rezeptors gekoppelt und beinhaltet eine Polyhistidinsequenz. Ein Anti-Xpress-Antikörper (Anti-Xpress-AK) erkennt und bindet die Epitopsequenz -Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-. Da der Antikörper nicht die Zellmembran durchwandern kann, werden nur oberflächliche Epitope bzw. Rezeptoren erkannt und gebunden. Ein zweiter Antikörper erkennt und bindet den ersten Antikörper (*siehe Abb. 9*). Dieser ist mit einem Enzym, der „Horseradish Peroxidase“, konjugiert. Unter Zusatz des entsprechenden Substrats kommt es zu einem reaktionsbedingten Farbumschlag. Die Reaktion wird mithilfe von Schwefelsäure (H₂SO₄) nach einigen Minuten abgestoppt. Die Intensität des Farbumschlags korreliert mit der Anzahl der vorhandenen Antigen-Antikörper-Zweitantikörper-Komplexe und damit ebenfalls mit der Anzahl oberflächlicher Rezeptoren. Proben, in denen aufgrund von Stimulation mit einem Liganden Endozytose stattgefunden hat, entwickeln demnach gegenüber ihren Basalwerten geringere Farbindensitäten, da weniger membranständige Rezeptoren zur AK-Bindung zur Verfügung stehen.

Die vor Versuchsbeginn angefertigten transient oder stabil die MCR exprimierenden HEK-293-Zellen (*siehe 2.2.2*) wurden 24 Stunden vor Beginn des Verfahrens auf 12-Loch-Polylysinplatten in einer Konzentration von 250.000 Zellen pro Loch ausgesät. Die Polylysinplatten wurden mehrere Tage zuvor angefertigt, wobei das Polylysin für eine bessere Haftung der Zellen auf dem Boden der 12-Loch-Platte sorgt (*siehe 2.1.8*). Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellen der jeweiligen Löcher mit dem Liganden für 30–45 Minuten bei 37 °C stimuliert. Hierbei wurde eine Dreifachbestimmung mit 1 µM α-MSH und 100 nM AgRP durchgeführt. Ebenso wurde für jeden Rezeptorsubtyp eine dreifache Basalwertbestimmung durchgeführt und eine Negativkontrolle mit untransfizierten HEK-293 bestimmt. Während der Stimulation wurden die

benötigten Lösungen, wie kaltes PBS und kaltes PBS/1 % BSA, bereitgestellt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die 12-Loch-Platten auf Eis gestellt und zunächst alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt, um eine Re-Integration der endozytierten Rezeptoren in die Zellmembran zu verhindern. Das Medium der einzelnen Vertiefungen wurde mittels einer Wasserstrahl-Saug-Pumpe abgesaugt und mit einer Multipette wurden jeweils 2 ml PBS/1 % BSA vorsichtig in die Vertiefungen hinzugegeben. Anschließend wurde das PBS/1 % BSA ebenfalls abgesaugt und es wurde erneut PBS/1 % BSA auf die Zellen gegeben, dieses Mal 1 ml je Vertiefung. Die Zellen wurden so 10 Minuten inkubiert. Dieser Waschgang diente der Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der Zellen durch das BSA.

Im nächsten Schritt wurden 500 µl des ersten Antikörpers aus der Maus (0,2 µg/ml anti-Express-Epitop-Tag, Invitrogen) in PBS/1 % BSA jeweils auf die Zellen in den Vertiefungen gegeben. Die Proben wurden anschließend unter Gebrauch eines Taumlers (Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH) im Kühlraum 1 Stunde inkubiert. In dieser Phase kam es zur Bindung von Antigen und Antikörper. Es folgte ein weiterer Waschgang mit PBS, die anschließende Fixierung der Zellen mit Formalin (10 % für 10 Minuten) sowie ein erneuter Waschgang mit PBS/1 % BSA. Im weiteren Verlauf wurden dann in jede Vertiefung 500 µl des zweiten Antikörpers (anti Maus, HRP-konjugierter, Invitrogen) 1:1000 in PBS/1 % BSA hinzugegeben. Die Zellen wurden unter langsamer, stetiger Rotation durch den oben bereits erwähnten Taumler für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten vier Waschvorgänge: zwei mit PBS für zwei Minuten und zwei mit PBS/1 % BSA für jeweils 20 Minuten.

Zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Zweitantikörper-Komplexe wurden abschließend je Vertiefung 750 µl Substratlösung (1-Step™ Turbo TMB-ELISA, Pierce) dazugegeben. Das in der Lösung enthaltene TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidin) zeigt, nach der Oxidation durch Wasserstoffperoxid, nach 5–10 Minuten eine Blaufärbung mit einem Absorptionsmaximum zwischen 370 und 692 nm. Katalysiert wird diese Reaktion durch die Horseradish Peroxidase (HRP), welche mit dem zweiten Antikörper konjugiert ist. Die Proben, in denen keine Endozytose stattgefunden hat, zeigen einen intensiveren Farbumschlag

gegenüber denen, in denen die Rezeptoren endozytiert sind und nicht mehr zur AK-Bindung zur Verfügung standen. Nach Eintritt des bläulichen Farbumschlags wurde die Oxidation des Chromogens durch Zugabe von 250 μl H_2SO_4 abgebrochen und es kam zu einem gelblichen Farbumschlag. Das Gesamtvolumen der einzelnen Vertiefungen von einem Milliliter wurde dann in Mikroküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) umgefüllt und die Intensität des Farbumschlags bei 450 nm photometrisch (Spektrometer Urikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn) bestimmt.

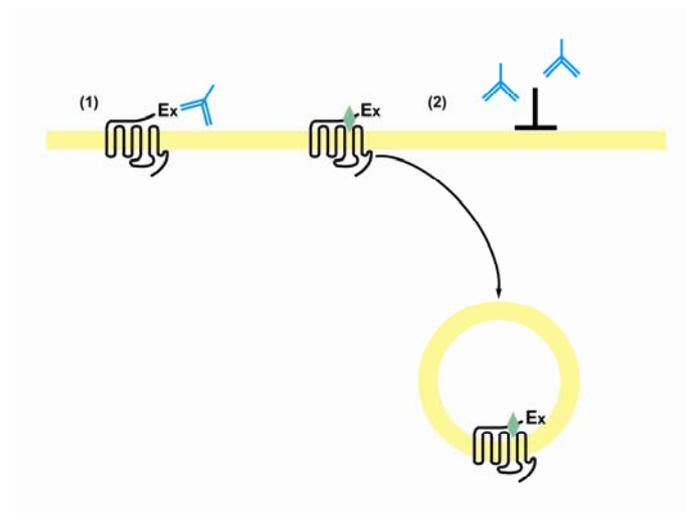


Abbildung 9: Antikörper-Bindung des Rezeptors. Der Anti-Xpress-Antikörper kann die Zellmembran nicht durchdringen und erkennt und bindet daher nur das Xpress-Epitop (Ex) membranständiger Rezeptoren (1). Wird ein Rezeptor demnach von einem Agonisten gebunden und endozytiert, ist er für den Antikörper nicht mehr zugänglich (2).

2.2.5.2 ELISA mit GT1-1-Hypothalamuszellen

Der ELISA mit GT1-1-Hypothalamuszellen wurde in Bezug auf den Ablauf wie oben erläutert durchgeführt. Leichte Änderungen gab es im Bereich der Chemikalien und Antikörper sowie der Inkubationszeit. Diese wurde für den ersten AK auf 2 Stunden erhöht. Bei den Chemikalien wurde PBS/1 % BSA durch PBS/0,1 % BSA ersetzt. Bei den Antikörpern handelte es sich um Anti-Peptid-Antikörper der Firma abcam, die eine für den N-Terminus des murinen MC4R charakteristische Aminosäuresequenz erkennen. Zur Bestimmung der

Antigen-Antikörper-Zweitantikörper-Komplexe wurde eine Lösung verwendet, die sich wie nachfolgend erläutert zusammensetzt: In 15 ml PBS wurden 3 Substrattabletten (5 mg o-Phenylendiamine Dihydrochlorid, Sigma, Deisenhofen) aufgelöst und anschließend 12 μl H_2O_2 hinzugegeben. Die Absorption wurde dann bei einer OD_{490} im Photometer (Spektrometer Urikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn) gemessen. Ein Abstoppen der Reaktion hätte zu einem Verlust an Sensitivität des Signals geführt und wurde daher ausgelassen. Insgesamt wurde mit einer Vierfachbestimmung gearbeitet.

2.2.6 Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation

Die in der Zellmembran integrierten MCR können aktivationsabhängig, durch Bindung eines Agonisten, internalisieren. Sie wandern so nach ihrer Aktivierung von der Zellmembran ausgehend in das Zellinnere, wo sie sich dann in intrazellulären Endosomen befinden. Eine Hauptaufgabe der Arbeit lag in der Untersuchung dieses Endozytoseverhaltens des MC3R, des MC4R sowie der Mutante MC4R-D90N. Durchgeführt wurde hierfür eine Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation. Nach Zerstörung der Zellstruktur folgte durch Ultrazentrifugation der Zelltrümmer durch ein Saccharosekissen die Aufteilung der einzelnen Membranfraktionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Der Dichteunterschied der einzelnen Fragmente und die damit einhergehende unterschiedliche Gravitation während des Zentrifugierens bedingt die Trennung der verschiedenen Membranfragmente. Zellbestandteile mit einer größeren Dichte fanden sich nach der Zentrifugation demnach am Grund des Zentrifugenröhrchens. Hingegen waren Zellpartikel mit einer geringeren Dichte auf dem Saccharosekissen zu finden. Die bei der Zentrifugation entstehenden Membranfraktionen bestehen zum einen aus leichten Bestandteilen wie den Endosomen (leichte Membranen) sowie aus schweren Fragmenten wie Anteilen der Zellmembran (schwere Membranen). Endozytierte Rezeptoren sind somit in der Fraktion der leichten Membranen zu finden, während nicht endozytierte Rezeptoren in der Fraktion der schweren Membranen aufzufinden sind (*siehe Abb. 10*). Da in diesem Teil der Arbeit, wie auch in anderen, Renilla-

Luziferasekonstrukte (RLuz-Konstrukte) der Rezeptoren verwendet wurden, konnte mithilfe des Biolumineszenzverfahrens (*siehe* 2.2.8.2) die quantitative Menge der MCR in den jeweiligen Membranen bestimmt werden. So wurde die Endozytose der Rezeptoren, die gleichbedeutend mit der Internalisierung der Rezeptoren ist, durch eine höhere Anzahl in den leichten Membranen bei einer gleichzeitigen Abnahme der schweren Fraktion bestätigt.

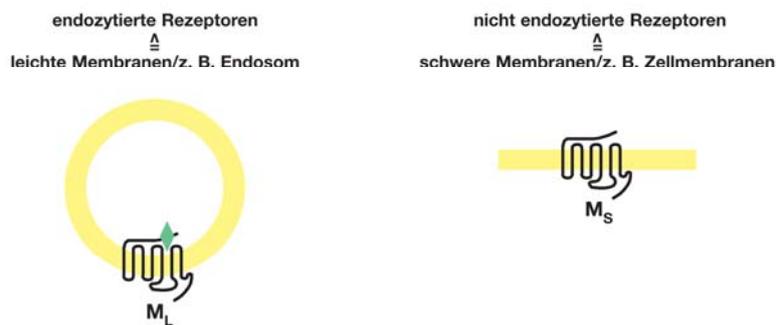


Abbildung 10: Fraktionierung der endozytierten und nicht endozytierten Rezeptoren. Ist ein Rezeptor endozytiert, so befindet er sich in einem intrazellulären Vesikel oder beispielsweise in einem Endosom. Diese Zellbestandteile gehören, im Gegensatz z. B. zur Zellmembran, zu den leichteren zellulären Anteilen. Daher werden sie als leichte Membranen bezeichnet (M_L). Nicht endozytierte Rezeptoren verbleiben in der Zellmembran. Anteile der Zellmembran zählen zu den schwereren Zellfragmenten und werden daher als schwere Membranen bezeichnet (M_S).

Für die Methode wurden zuvor, wie unter 2.2.3 beschrieben, HEK-293- sowie COS-7-Zellen mit der jeweiligen für das bestimmte Rezeptorprotein kodierenden pcDNS transfiziert. So erfolgte eine stabile sowie transiente Expression der entsprechenden Rezeptorproteine Ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die Zellpopulationen auf Schalen von 10 cm Durchmesser ausgesät. Mit Versuchsbeginn wurden diese mit dem jeweiligen Liganden 45 Minuten bei 37 °C im Brutschrank stimuliert. Eine Schale von 10 cm Durchmesser erhielt kein den Liganden enthaltendes Medium, sondern wurde mit reinem Medium als Basalwert ebenfalls im Brutschrank inkubiert und im weiteren Verfahren wie die anderen Proben behandelt. Stimuliert wurde in Einfachbestimmung mit 1 µM α-MSH und 100 nM AgRP. Während der Inkubationszeit kam es gegebenenfalls durch Bindung des Liganden zur Internalisierung des Rezeptors. Am Ende der Inkubationszeit wurden die

Schalen von 10 cm Durchmesser sofort auf Eis gesetzt. Die Kühlung der Proben verhinderte die bereits unter 2.2.5.1 erwähnte Rezeptor-Re-Integration. Das Medium wurde mithilfe der Wasserstrahl-Saug-Pumpe abgesaugt, und zu den Schalen wurden jeweils 2 ml kaltes PBS/2 mM EDTA hinzugefügt. Das EDTA bindet zweiwertige Metallionen, wie Mg^{2+} und Ca^{2+} , die normalerweise zellbindende Membranproteine stabilisieren. Somit kam es zum Ablösen der Zellen vom Schalenboden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen der einzelnen Schalen mithilfe einer Pipette gut resuspendiert und jeweils in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Dieses wurde dann 20–30 Sekunden mit dem Ultrathurax behandelt. Hierbei wurden die Zellen zerstört und die Membranfragmente lagen anschließend einzeln in der Suspension.

Im ersten Zentrifugationsschritt wurden die Röhrchen mit Zellsuspension bei 1000 rpm und 5 Minuten Laufzeit zentrifugiert. Hier wurden zunächst die Zellkerne durch ihre hohe Dichte abgetrennt. Der zellkernlose Überstand der Proben wurde in neue Röhrchen überführt und dort auf ein Saccharosekissen geschichtet. Im zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Zellsuspensionen der einzelnen Röhrchen bei 30.000 rpm, 4 °C und 90 Minuten Laufzeit durch ein 35%-Saccharosekissen zentrifugiert. Das Saccharosekissen und die hohe Zentrifugationskraft ermöglichen die Trennung von Membranfragmenten unterschiedlicher Größe. Diese wandern, abhängig von ihrer Dichte, durch das Saccharosekissen und bleiben an unterschiedlichen Stellen stehen. Fragmente der Zellmembranen setzen sich als schwerste Fraktion am Boden des Röhrchens in Form eines Niederschlags ab. Leichtere Membranen, wie z. B. die des Endosoms, befinden sich nach diesem Zentrifugationsschritt auf dem Saccharosekissen. Der Niederschlag am Röhrchenboden wird als Fraktion der schweren Membranen bezeichnet und wurde in 400 µl Membranpuffer resuspendiert. Die Proben wurden in einer Dreifachbestimmung auf ihren Rezeptoranteil hin untersucht. Dafür wurde zunächst die Proteinmenge jedes Röhrchens mithilfe der Proteinbestimmung nach Bradford (*siehe 2.2.7*) ermittelt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Rezeptormenge der einzelnen Proben mithilfe der Biolumineszenzmessung. Die Berechnung der prozentualen Endozytose der Rezeptorsubtypen erfolgt weiter unten gemeinsam mit den Daten aus dem weiteren Zentrifugationsschritt.

In einem dritten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand der Röhren erneut, dieses Mal bei 35.000 rpm, 4 °C und 60 Minuten zentrifugiert. Dabei wurden die leichten Zellfragmente, wie unter anderem die Endosomen, gewonnen. Diese setzten sich als kaum sichtbarer Niederschlag am Boden des Röhrchens ab und wurden in 400 µl Membranpuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde auch für diese, als leichte Membranen bezeichneten Zellbestandteile zunächst eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Dann folgte in einer Dreifachbestimmung die Mengenbestimmung der Rezeptoren der einzelnen Proben mithilfe der Biolumineszenzmessung.

Die prozentuale Endozytose wurde mithilfe der Messergebnisse aus der Biolumineszenzmessung für den jeweiligen Rezeptorsubtyp aus den beiden Zentrifugationsschritten ermittelt. Die gemessenen Werte korrelieren positiv mit der vorhandenen Menge an Rezeptoren in den jeweiligen Membranen. So lässt sich aus den Werten für die leichten sowie für die schweren Membranen mithilfe der unten angeführten Gleichung die prozentuale Endozytose des Rezeptors berechnen. $RLuz_S$ steht hierbei für den gemessenen Mittelwert der Dreifachbestimmung der schweren Membranen. Als $RLuz_L$ ist der Mittelwert der Dreifachbestimmung der leichten Membranen definiert. R steht hierbei für den jeweiligen Rezeptorsubtyp. Es wird zunächst der prozentuale Anteil der Rezeptoren in den schweren Membranen unter basalen Bedingungen berechnet. Anschließend wird der Prozentsatz an Rezeptoren der schweren Membranen nach Ligandenstimulation ermittelt. Die Differenz aus beiden Berechnungen ergibt die prozentuale Endozytose des Rezeptors:

$$[RLuz_S / (RLuz_S + RLuz_L) \times 100]_{\text{basal}} - [RLuz_S / (RLuz_S + RLuz_L) \times 100]_{\text{Ligand}}$$

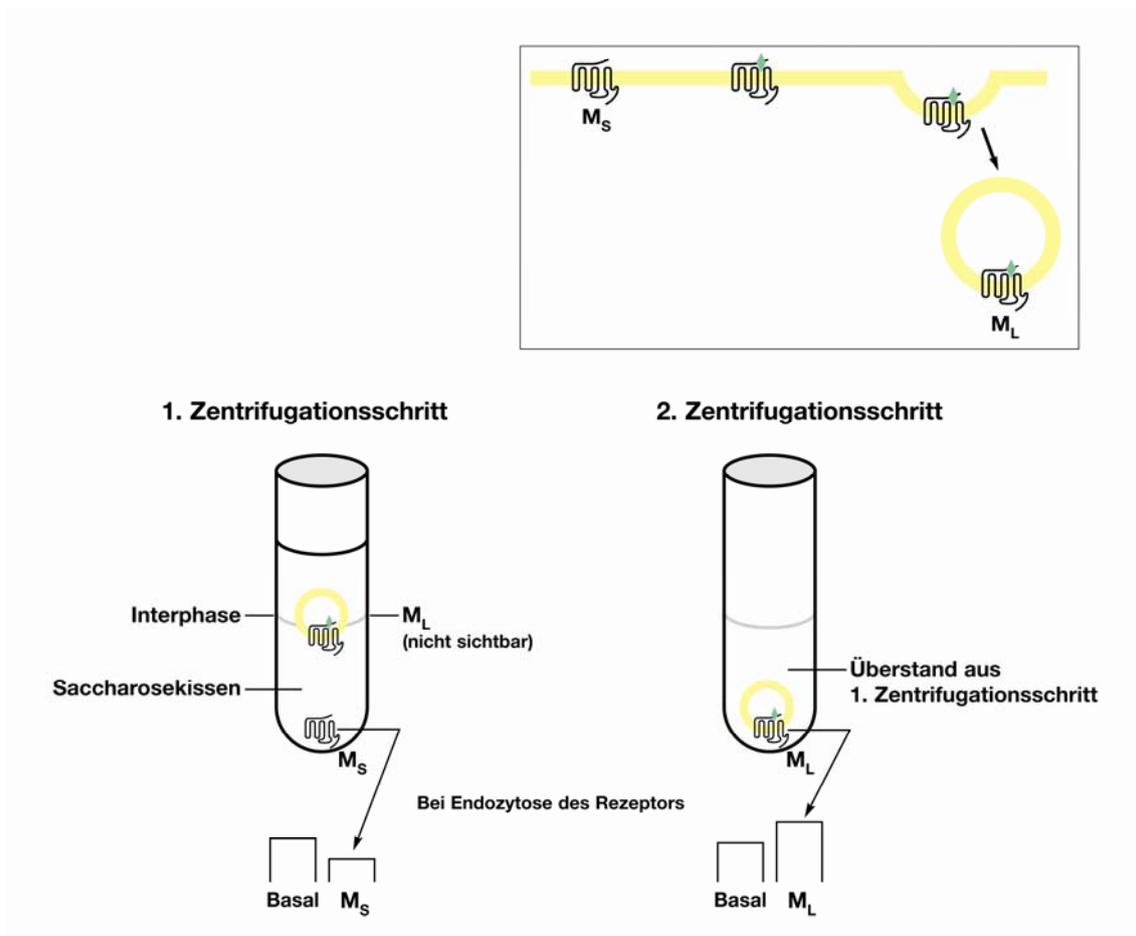


Abbildung 11: Trennung der endozytierten von den nicht endozytierten Rezeptoren bzw. der leichten von den schweren Membranen. Im ersten Zentrifugationsschritt wird die Zellsuspension durch ein Saccharosekissen zentrifugiert. Dabei sammeln sich aufgrund des unterschiedlichen Dichteverhältnisses die intrazellulären Vesikel bzw. Endosomen als leichte Membranen (M_L) in der Interphase. Die nicht endozytierten und in der Zellmembran verbliebenen Rezeptoren (schwere Membranen/ M_S) wandern während der Zentrifugation aufgrund ihres höheren Molekulargewichts durch das Saccharosekissen hindurch und sammeln sich am Boden des Zentrifugenröhrchens. Unterzieht man diesen Bodensatz der Biolumineszenzmessung, so erhält man für den Fall einer Rezeptorendozytose im Vergleich zum Basalwert einen niedrigeren Wert für die schweren Membranen. In diesem Fall ist die Mehrheit der Rezeptoren endozytiert und befindet sich in der Fraktion der leichten Membranen. Im zweiten Zentrifugationsschritt wird der Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes erneut zentrifugiert. Hier sammeln sich die Fragmente der leichten Membranen am Boden des Röhrchens. In der Biolumineszenzmessung ergibt sich im Vergleich zum Basalwert ein höherer Messwert für die leichten Membranen, da der Anteil der endozytierten Rezeptoren überwiegt.

2.2.7 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Zur Ermittlung der Endozytoserate des jeweiligen Rezeptors muss zuvor die in den Proben enthaltene Proteinmenge bestimmt werden. Anschließend sind alle Proben derjenigen mit dem geringsten Proteingehalt anzugleichen. Ein

äquivalenter Proteingehalt der Proben untereinander ist eine entscheidende Voraussetzung für die weitere Bestimmung der prozentualen Endozytose des jeweiligen Rezeptors. In dieser Arbeit wurde dafür die Proteinbestimmung nach Bradford herangezogen. Hier kommt es zur Reaktion des in der Bradfordlösung enthaltenen Farbstoffes Coomassie-Blau (Serva Blau G) mit basischen Aminosäuren (AS). Im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum hin zu 595 nm. Bei Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge kann die Konzentrationsbestimmung der zu prüfenden Proteinmenge erfolgen.

Zunächst wurde eine Eichkurve mit verschiedenen Konzentrationen des bovinen Serumalbumins (BSA) hergestellt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der BSA-Lösung mit Endkonzentrationen von 250–2000 µg BSA/ml hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden jeweils 100 µl der Lösung in ein Mikroröhrchen überführt, in das zuvor 900 µl der Bradford-Arbeitslösung vorgelegt worden waren. Die Gesamtlösung wurde gut vermennt und anschließend in eine Messküvette überführt. Die Proben wurden dann photometrisch (Spektrometer Urikon 930, Kontron Instruments, Neufahrn) bei einer Absorption von 595 nm gemessen. Die zu prüfenden aus der Membranfraktionierung stammenden Proben wurden analog gemessen. Aus jeder Probe wurden 100 µl entnommen, zu 900 µl Bradford-Arbeitslösung hinzugegeben, vermennt und anschließend gemessen. Mithilfe der Eichkurve konnte so die Gesamtproteinmenge der jeweiligen Proben ermittelt werden.

2.2.8 Messungen im FLUOstar-Lesegerät

Mit dem FLUOstar (BMG Labtech, Offenburg), einem Mikrotiterplatten-Lesegerät, wurden sowohl Fluoreszenz- und Biolumineszenz- als auch BRET-Messungen durchgeführt.

2.2.8.1 Fluoreszenzmessung

Nach der Proteinmengen-Bestimmung nach Bradford (*siehe 2.2.7*) der einzelnen Proben wurden zunächst alle Proben an den Wert der Probe mit dem

geringsten Proteinanteil durch Verdünnung angeglichen. Aus jeder Probe wurden dann 3-mal 100 μ l entnommen und in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte gegeben. Gemessen wurde die Fluoreszenz der Probe bei 530 ± 20 nm nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 480 ± 20 nm.

2.2.8.2 Biolumineszenzmessung

Wie oben bei der Fluoreszenzmessung beschrieben, wurden zunächst alle Proben dem geringsten Proteinanteil einer Probe angeglichen. Je Probe wurden dann 3-mal 90 μ l in je eine Vertiefung überführt. Direkt vor der Messung wurde das Substrat, Colenterazine H (5 μ M) hinzugegeben und nach 5–10 Minuten die Lichtemission bei 480 ± 20 nm gemessen.

2.2.8.3 BRET-Messung

Die BRET („bioluminescence resonance energy transfer“)-Messung wurde ähnlich der unter 2.2.8.2 beschriebenen Biolumineszenzmessung durchgeführt, mit dem Unterschied, dass nun simultan die Lichtemission bei 480 ± 20 nm und 530 ± 20 nm gemessen wurde. Der Quotient der Lichtemission bei 530 nm durch die Emission bei 480 nm ergibt den BRET-Quotienten oder das BRET-Signal. Das BRET-Signal wird erhöht, wenn es zwischen dem Energiedonor, der Luziferase und dem Energieakzeptor, dem YFP, durch einen strahlungsfreien Energietransfer zur Anregung des YFP kommt. Da dieser Energietransfer nur zustande kommt, wenn Energiedonor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sind (weniger als 100 Å), kann man mithilfe der BRET-Methode Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Fusionsproteinen untersuchen. In der Natur konnte dieses Phänomen unter anderem bei der Koralle *Renilla reniformis* beobachtet werden, was dazu führte, dass auch heute als Donor-Fusionsprotein die Renilla-Luziferase zum Einsatz kommt.

3 Ergebnisse

3.1 AgRP als inverser Agonist der MCR-vermittelten Produktion von cAMP

Die agonistenvermittelte Aktivierung eines $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptors führt durch die Aktivierung der Adenylatzyklase (AZ) zur Produktion von intrazellulärem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Dieser zwischengeschaltete Botenstoff erhöht seinerseits die enzymatische Aktivität der Proteinkinase A (PKA) im Zytosol und aktiviert spezifisch, nach seiner Translokation in den Kern der Zelle, die Transkription von Gensequenzen, die unter der Kontrolle von cAMP-bindenden Promotorsequenzen liegen. Solche Sequenzen werden als CRE („cAMP-responsive-element“)-Promotoren bezeichnet.

Um verschiedene MCR-Fusions-Proteine auf ihre Fähigkeit hin zu überprüfen, cAMP zu produzieren, wurde die ligandenabhängige cAMP-Produktion nach transienter Co-Transfektion eines CRE-Promotorgens verifiziert. Dieses Plasmid enthält die codierende DNS-Sequenz des Enzyms Luziferase, welches aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* isoliert wurde [185]. Durch die erhöhte Produktion von cAMP wird der CRE-Promotor aktiviert und die Transkription des Luziferase-Gens initiiert. Die Menge der exprimierten Luziferase ist somit abhängig von der Menge des vorhandenen cAMP und kann durch eine, für die Luziferase spezifische, enzymatische Reaktion nachgewiesen werden. Diese Reaktion katalysiert die Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin. Gleichzeitig wird Energie in Form einer Lichtemission freigesetzt, welche mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Die gemessene Lichtemission entspricht der Aktivität der Luziferase und damit der produzierten Menge an cAMP. Der genaue Vorgang dieser Biolumineszenzmessung ist unter 2.2.4 bzw. 2.2.8.2 im Material- und Methoden-Teil genauer erläutert.

Untersucht wurden Fusionsproteine des Melanocortin-3- und -4-Rezeptors (MC3R und MC4R), einschließlich der Mutante MC4R-D90N. Die Rezeptoren wurden entweder mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) oder der Luziferase *Renilla reniformis* (RLuz) konjugiert. Die Herstellung dieser MCR-

Fusionsproteine erlaubte in späteren Versuchen zum einen den quantitativen Nachweis und die Lokalisation des jeweiligen Rezeptors in der Zelle, zum anderen konnten mithilfe dieser Fusionsproteine Interaktionspartner der MCR durch die „bioluminescence resonance energy transfer“ (BRET)-Technik nachgewiesen werden (siehe 2.2.8.3).

In Abbildung 12 ist die agonisteninduzierte cAMP-Produktion in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven dargestellt. Es ergibt sich aus Abbildung 12A für den Agonisten α -MSH ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Menge in Zellen, die sowohl das MC3R-RLuz- als auch das MC3R-YFP-Rezeptorkonstrukt exprimieren. Die halbmaximale cAMP-Produktion wurde bei einer α -MSH-Konzentration von 0.86 ± 0.29 nM (MC3-RLuz) oder 0.20 ± 0.02 nM (MC3-YFP) erreicht. Diese EC_{50} -Werte erlauben eine Aussage über die Fähigkeit („potency“) eines Liganden, den jeweiligen Rezeptor zu aktivieren, und ermöglichen einen qualitativen Vergleich der α -MSH-vermittelten cAMP-Produktion. Die in der Literatur vorhandenen EC_{50} -Werte für das MC3R-Wildtyp-Protein liegen im Vergleich zu den für die Fusionsproteine ermittelten Werten auf gleichem Niveau [140,63]. Für den inversen Agonisten, AgRP, kann in beiden Fällen, wie es für einen inversen Agonisten zu erwarten ist, ein Rückgang der cAMP-Konzentration beobachtet werden. Es zeigen sich EC_{50} -Werte von 0.09 ± 0.03 nM (MC3R-RLuz) oder 0.26 ± 0.04 nM (MC3R-YFP), die sich ebenfalls in dem zu erwartenden Rahmen bewegen. Betrachtet man Abbildung 12B, so wird ersichtlich, dass die Kurvenverläufe für Zellen, die den MC4R exprimieren, denen des MC3R sehr ähneln. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt ebenfalls unter α -MSH-Einwirkung an (EC_{50} -Werte für MC4R-RLuz: 0.42 ± 0.05 nM und für MC4R-YFP 0.21 ± 0.07 nM). Durch die Bindung von AgRP kommt es in den gleichen Zellen zu einer Reduktion der cAMP-Konzentration (EC_{50} -Werte für MC4R-RLuz: 0.14 ± 0.03 nM und für MC4R-YFP 0.26 ± 0.04 nM). In Abbildung 12C ist für die MC4R-D90N-Mutante unter α -MSH-Einwirkung im Vergleich zum MC4R-Wildtyp-Protein eine stark verringerte intrazelluläre cAMP-Produktion zu erkennen. Es zeigt sich ebenso nur ein sehr geringer AgRP-induzierter Abfall des cAMP-Spiegels.

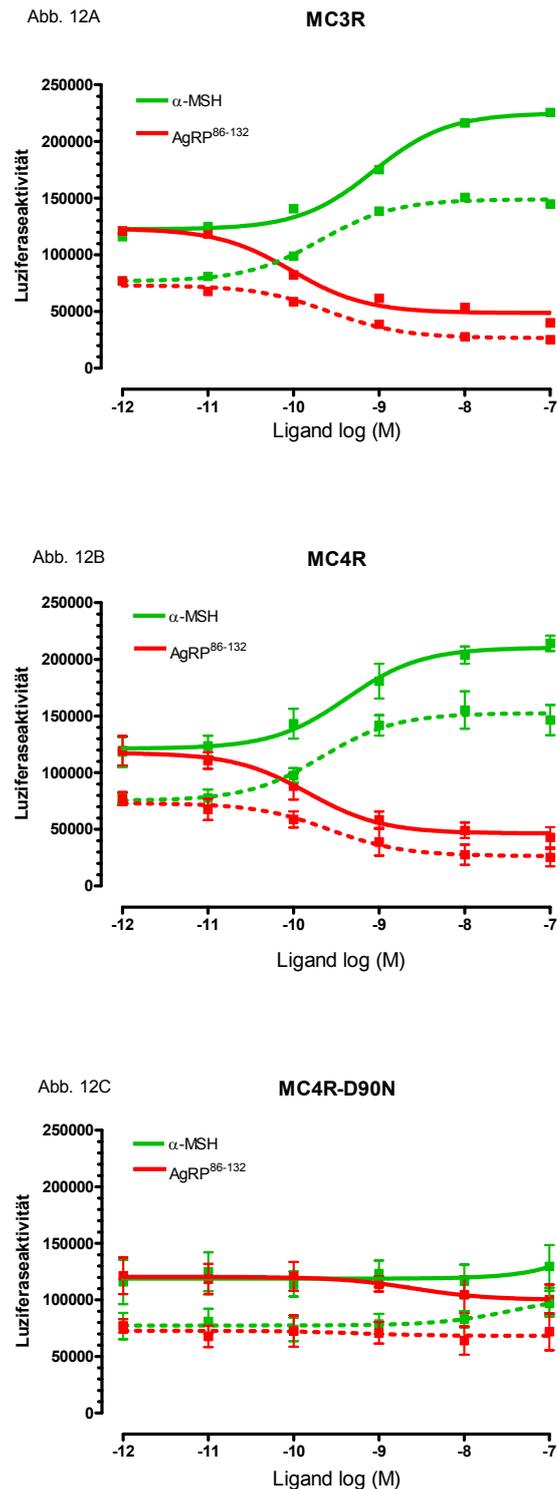


Abbildung 12: Messung der cAMP-Produktion von RLuz- und YFP-Fusionsproteinen des Melanocortin-3- und -4-Rezeptors (Abb. 12A,12B) sowie der Mutante MC4R-D90N (Abb. 12C) in HEK-293-Zellen. Dargestellt sind die von α -MSH oder AgRP^{86-132} induzierten cAMP-Produktionen. HEK-293-Zellen wurden mit den entsprechenden Fusionsproteinen sowie einem Plasmid mit der cDNA der aus der Leuchtfliege stammenden Luziferase unter der Kontrolle des CRE-Promoters co-transfiziert. Die Luziferaseaktivität wird durch die Umwandlung von Luziferin in Oxyluziferin und die dabei entstehende Lichtemission nachgewiesen. Die RLuz-Konstrukte sind durch gerade Linien gekennzeichnet. Die YFP-Konstrukte durch Punkte. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt $N=3$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die oben gezeigten Werte der ligandenregulierten cAMP-Produktion an beiden MCR-Konstrukten mit denjenigen übereinstimmen, die in der Literatur für die jeweiligen Wildtyp-Varianten bereits beschrieben wurden [63,64,115]. Die für die Konstrukte der MC4R-D90N-Mutante gezeigten minimalen Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Ligandenstimulation entspricht den von *Biebermann et al.* für die Mutante, die nicht an das $G\alpha_s$ -Protein koppelt, gemachten Beobachtungen [22]. Folglich konnte belegt werden, dass die RLuz- sowie YFP-Fusionsproteine der MCR sowie der Mutante MC4R-D90N zur weiteren Charakterisierung der MCR und der Mutante verwendet werden können.

3.2 α -MSH und AgRP induzieren die Endozytose von MCR

Membranständige Rezeptoren, wie der MC3R und der MC4R, spielen bei der Informationsverarbeitung eine entscheidende Rolle. Aktiviert durch den Agonisten α -MSH leiten sie unter Kopplung an ein G-Protein das Signal in das Zellinnere weiter. Im weiteren Verlauf umfasst dieser Prozess der Signaltransduktion die Desensibilisierung mit Internalisierung des Rezeptors. Durch die Internalisierung bzw. Endozytose des Rezeptors kommt es zu einer verminderten Oberflächen-Rezeptorexpression [155]. Mithilfe verschiedenster Techniken kann diese gemessen werden. Die Differenz zwischen der gemessenen oberflächlichen Rezeptormenge des Basalwerts und nach der Agonistenstimulation ermöglicht eine Aussage über das Endozytoseverhalten der zu untersuchenden Rezeptoren.

Der Oberflächen-ELISA

Mithilfe des Oberflächen-ELISA kann, wie bereits unter 2.2.5 beschrieben wurde, die Expression der membranständigen Rezeptoren über den Gebrauch zweier Antikörper bestimmt werden. Der erste Antikörper bindet nicht direkt den Rezeptor, sondern ein zuvor mit dem Rezeptor fusioniertes Peptid. Hierbei

handelt es sich um das Xpress-Epitop. Für den Versuch wurden daher mit dem Xpress-Epitop fusionierte Rezeptoren (Ex-MC3R und Ex-MC4R) verwendet.

Abb. 13A

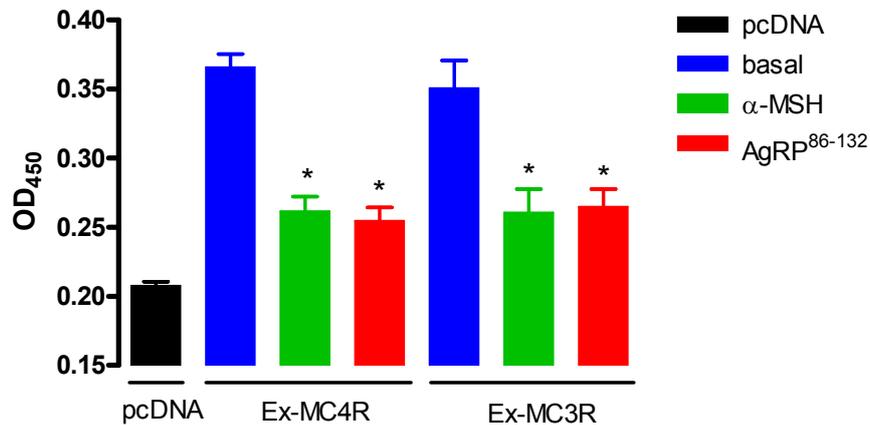


Abb. 13B

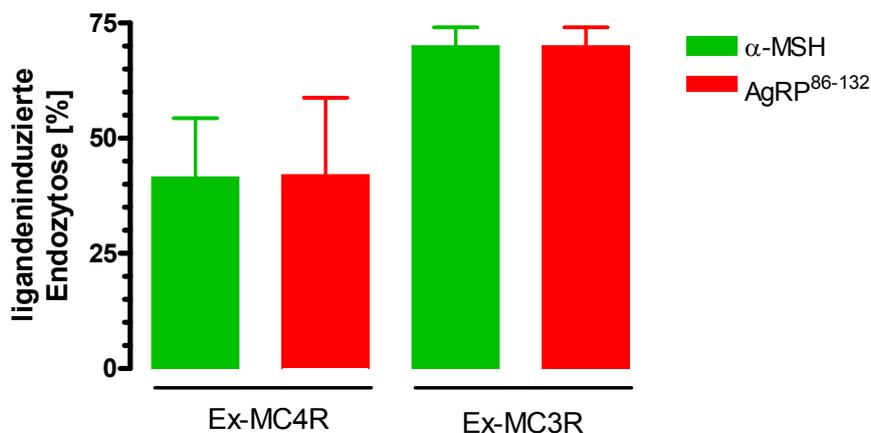


Abbildung 13: Messung der ligandeninduzierten Endozytose des mit dem Xpress-Epitop konjugierten Melanocortin-3- und -4-Rezeptors (Ex-MC3R, Ex-MC4R) in HEK-293-Zellen. Mithilfe des Oberflächen-ELISA wurde die Menge an transient exprimierten Rezeptor-Fusions-Proteinen quantifiziert, die durch ihre Lokalisation an der Zelloberfläche für den gegen das Xpress-Epitop gerichteten Antikörper zugänglich waren. Stimuliert wurden die Zellen zuvor für 45 Minuten entweder mit α -MSH (1 μ M) oder AgRP (100 nM). Für die Messungen zur Ex-MC4R-Endozytose gilt N=8, für die Messungen zur Ex-MC3R-Endozytose N=7. **Abb. 13A:** Die mit dem pcDNA4-Plasmid transfizierten HEK-293-Zellen stellen den Basalwert für mock-transfizierte Zellen dar. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Vierfachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Das Sternchen indiziert eine signifikante Differenz (*, $p < 0,05$) zwischen den gemessenen Werten für die Zellen, die mit einem Liganden stimuliert wurden, und den Zellen, die nicht stimuliert wurden. **Abb. 13B:** Dargestellt sind die aus Abb. 13A hervorgehenden Daten zur Endozytose des jeweiligen Melanocortin-Rezeptors in Prozentangaben. 100 % entsprechen dabei dem gemessenen Basalwert minus dem gemessenen Wert für die mock-transfizierten HEK-293-Zellen.

Abbildung 13A zeigt die für die α -MSH- und AgRP-induzierte Endozytose des Ex-MC3R und des Ex-MC4R gewonnenen Ergebnisse. Die Rezeptoren, die sich auch nach der Stimulation durch ihren Liganden weiterhin an der Zelloberfläche befinden, also nicht endozytiert sind, werden von einem Antikörper gebunden. Dieser wiederum wird von einem zweiten Antikörper gebunden, der an ein Enzym gekoppelt ist. Gibt man zu den einzelnen Proben ein Substrat hinzu, wird dieses durch das Enzym katalysiert, wodurch es zu einem Farbumschlag der Probenlösung kommt. Dieser kann dann in Form der OD gemessen werden. Je mehr Rezeptoren in einer Probe vorhanden sind, desto stärker ist demnach die Farbintensität bzw. die OD der Probe (*siehe* 2.2.5). Um bei den Messungen der OD sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um die gemessenen oberflächlichen Rezeptoren handelt, wurde die OD des DNS-leeren Vektors ermittelt. Die OD des pcDNA4-Vektors von 0.2 macht eine Angabe zu Quantität der unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Da die für den Basalwert des jeweiligen Rezeptors gemessene OD größer als 0.2 ist, handelt es sich dabei nicht um unspezifische Bindungen des Antikörpers, sondern um das Rezeptorprotein. In Bezug auf die OD-Messungen des Ex-MC3R und des Ex-MC4R im ELISA zeigt sich Folgendes: Die gemessene OD fällt für beide Rezeptoren nach α -MSH-Stimulation im Vergleich zu der jeweiligen basal gemessenen OD niedriger aus. Das heißt, dass nach der Stimulation mit α -MSH weniger Rezeptoren zur Antikörperbindung an der Zelloberfläche zur Verfügung standen. Anders formuliert endozytiert α -MSH den MC4R sowie den MC3R. Während für den MC4R in der Literatur bereits eine durch α -MSH-induzierte Endozytose beschrieben wurde [155], ist vor allem die Endozytose des MC3R neu und interessant. In Abbildung 2A lässt sich für die Stimulation der beiden MCR-Subtypen mit AgRP ebenfalls eine im Vergleich zum Basalwert niedrigere OD messen. Das zeigt, dass auch AgRP den MC3R sowie den MC4R endozytiert. Zur Verifizierung der gemessenen Endozytosewerte sind die erzielten Ergebnisse in Abbildung 13B in Form von Prozentangaben dargestellt. Es ergibt sich eine absolute Endozytose des Ex-MC3R unter α -MSH- und AgRP-Stimulation von jeweils 70 %. Für den Ex-MC4R kommt es für die α -MSH- sowie die AgRP-Stimulation zu einer Endozytose von jeweils 42 %.

AgRP senkt also nicht nur, wie weiter oben gezeigt, die basale cAMP-Produktion der MCR, sondern endozytiert erstaunlicherweise als endogener inverser Agonist ebenfalls den MC3R sowie den MC4R. Demnach ist eine Endozytose also auch ohne vorherigen intrazellulären cAMP-Anstieg, wie er unter 3.1 von α -MSH induziert wird, möglich. Die Fähigkeit des endogenen inversen Agonisten AgRP, MCR-Subtypen zu endozytieren, ist dabei genauso stark ausgeprägt wie die des Agonisten α -MSH.

Die Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen ELISA ermöglicht die Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation nicht nur die Bestimmung der Oberflächenexpression der Rezeptoren. Vielmehr liefert sie auch Angaben über den Verbleib der endozytierten MCR-Fusionsproteine. Diese befinden sich nach ihrer Internalisierung in der Membran intrazellulärer Vesikel. Aufgrund der unterschiedlichen Dichte zwischen den intrazellulären Vesikeln und Fragmenten der Zellmembran lassen sich diese mithilfe der Zentrifugation durch ein Saccharosekissen gut voneinander trennen. Die Biolumineszenzmessung, welche unter 2.2.8.2 eingehend erläutert ist, ermöglicht anschließend eine Quantifizierung der Rezeptoranteile in den jeweiligen Fraktionen. Dabei bedient sich das Messverfahren der Eigenschaft der mit dem Rezeptor fusionierten Luziferase, das Substrat Colenterazine H zu katalysieren. Hierbei kommt es zur Freisetzung von Licht einer bestimmten Wellenlänge, die mithilfe eines Luminometers gemessen werden kann. Die emittierte Lichtmenge entspricht demnach der Menge an Rezeptoren in einer Probe. Dabei befinden sich für den Fall der Rezeptorendozytose mehr Rezeptoren in der Membran von intrazellulären Vesikeln und weniger in der Zellmembran. Findet keine Endozytose statt, so verbleiben die Rezeptoren in der Zellmembran. Als Negativkontrolle wurde parallel zu den MCR-RLuz-Fusionsproteinen der, ebenfalls mit Luziferase konjugierte, γ -Aminobuttersäure-B-Rezeptor-2 ($\text{GABA}_{\text{BR}2}$) auf sein Endozytoseverhalten hin untersucht und unter denselben Bedingungen wie die MCR dem Verfahren unterzogen. Da es unter natürlichen Bedingungen zu keiner Bindung des α -MSH am $\text{GABA}_{\text{BR}2}$ kommt, wird dieser nicht stimuliert und eine Internalisierung des Rezeptors bleibt aus [108]. So

kommt es nach α -MSH-Stimulation des $GABA_{BR2}$ nicht zu einem Absinken der Luziferaseaktivität der schweren Membranen (Abb. 14A).

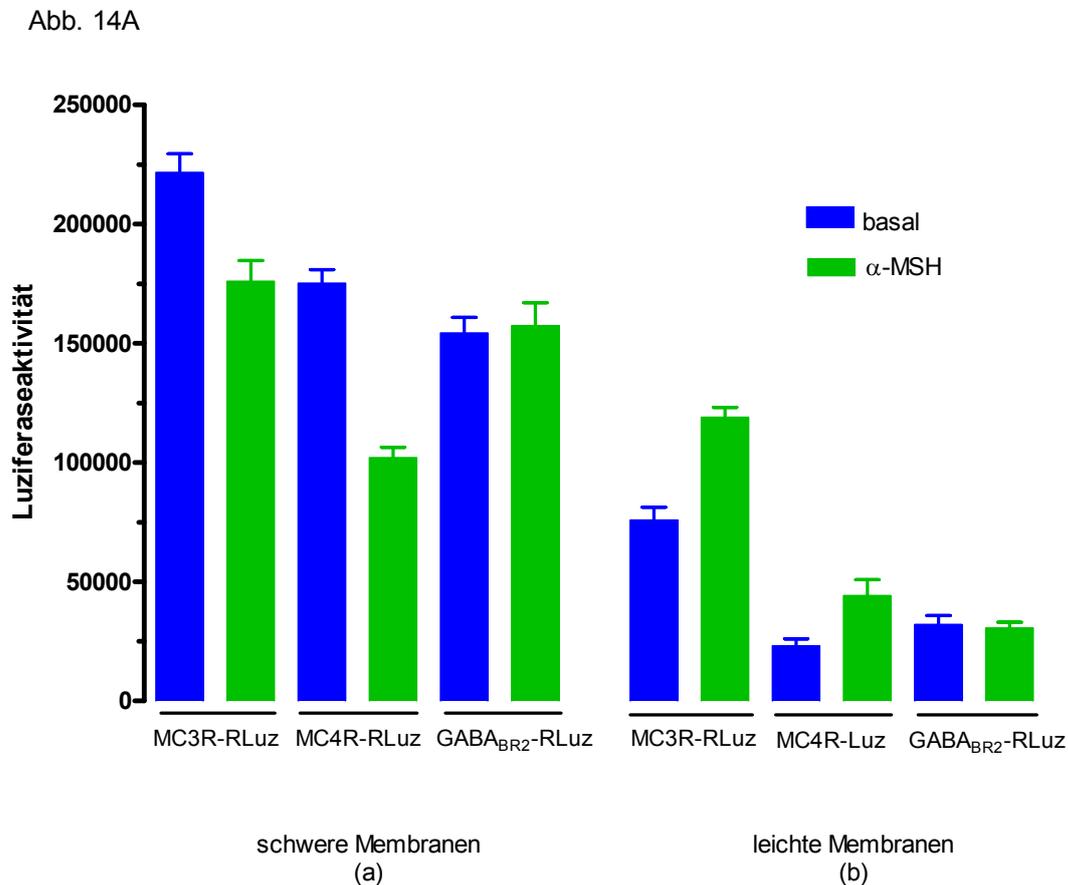


Abbildung 14A: Messung der Rezeptordichte des Melanocortin-3- und -4-Rezeptors sowie des γ -Aminobuttersäure-Rezeptors in der Fraktion schwere Membranen (a) und leichte Membranen (b) vor und nach Stimulation mit α -MSH (1 μ M). Zunächst wurden 48 Stunden vor Versuchsdurchführung HEK-293-Zellen entweder mit Fusionsproteinen des MC3R, des MC4R oder des $GABA_{BR2}$ transfiziert. So erfolgte die transiente Expression der Rezeptoren. Nach Durchführung der ersten Zentrifugation (30.000 rpm, 4 °C, 90 Min.) durch ein 35%-Saccharosekissen wurde die Rezeptormenge der unstimulierten und stimulierten schweren Membranen (a) gemessen. Dabei entspricht die Rezeptormenge der nach Zugabe Colenterazin H im FLUOstar OPTIMA gemessenen emittierten Lichtmenge (Luziferaseaktivität). Zuvor wurden die Proben in Bezug auf ihren Proteingehalt aneinander angeglichen. Der Überstand der Zentrifugation wurde erneut zentrifugiert (35.000 rpm, 4 °C, 60 Min.). Die so gewonnenen leichten Membranen (b) wurden in Bezug auf ihren Proteingehalt ebenfalls aneinander angeglichen und die jeweilige Rezeptormenge wie für die schweren Membranen mittels FLUOstar OPTIMA gemessen. Jede Messung wurde in einer Dreifachbestimmung durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt N=3.

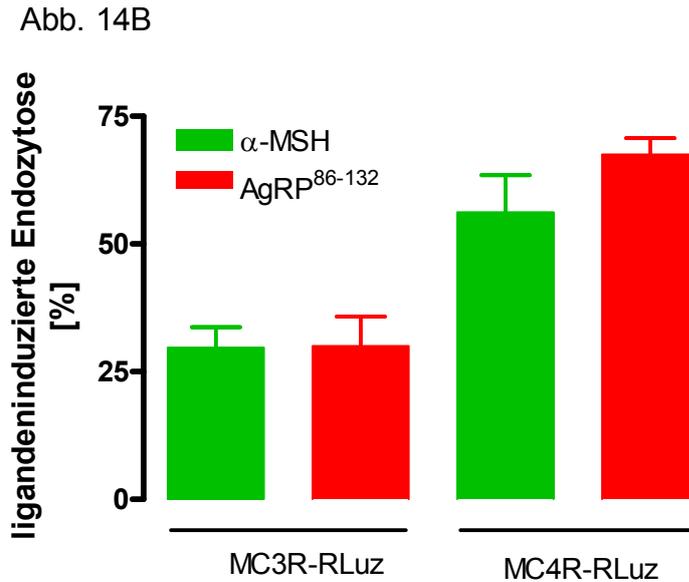


Abbildung 14B: Messung der von α -MSH und AgRP⁸⁶⁻¹³² induzierten Endozytose des Melanocortin-3- und -4-Rezeptors. Analog zu Abb. 14A wurden HEK-293-Zellen 48 Stunden vor Versuchsdurchführung mit dem entsprechenden Fusionsprotein (MC3R-RLuz und MC4R-RLuz) transfiziert. Daraus resultierte eine transiente Expression der Fusionsproteine. Stimuliert wurde mit α -MSH (1 μ M) sowie AgRP (100 nM) für 45 Minuten. Die in Prozent angegebene Endozytose ermittelt sich aus den u. a. in Abb. 14A dargestellten Angaben zur Rezeptordichte in den schweren sowie in den leichten Membranen vor und nach jeweiliger Stimulation mit α -MSH oder AgRP⁸⁶⁻¹³². Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert, der sich aus den Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung ergibt. Für die Messungen gilt N=3.

Abbildung 14A zeigt anhand eines Säulendiagramms die jeweilige Luziferaseaktivität der verschiedenen Membranen. Die mit α -MSH stimulierten Proben zeigen für den MC3R-RLuz und den MC4R-RLuz in den leichten Membranen, im Vergleich zum Basalwert, eine höhere Luziferaseaktivität. Zu den leichten Membranen zählen die intrazellulären Vesikel. Nach der Rezeptorendozytose enthalten sie die endozytierten Rezeptoren in ihrer Membran. Daher spricht die höhere Luziferaseaktivität der leichten Membranen in Abbildung 14A für eine Endozytose des MC3R sowie des MC4R. Ergänzend kommt es in den schweren Membranen zu einem Absinken der Luziferaseaktivität. Die gewonnenen Daten zur Rezeptorendozytose sind ebenfalls in Abbildung 14B dargestellt. Prozentual gesehen verringert sich die oberflächliche Rezeptoranzahl für den MC3R-RLuz nach α -MSH-Stimulation um 30 %. Beim MC4R-RLuz endozytieren unter ähnlichen Bedingungen sogar 60 % der oberflächlichen Rezeptoren. Analog zu den weiter oben mithilfe des ELISA durchgeführten Versuchen wurde auch in der Membranfraktionierung

durch Ultrazentrifugation die Wirkung des AgRP auf die Rezeptoren untersucht. So zeigt Abbildung 14B, dass auch die Stimulation mit AgRP zu einer Endozytose beider Rezeptorsubtypen führt. Diese beträgt für den MC3R-RLuz 30 %. Für den MC4R-RLuz verringert sich die oberflächliche Rezeptoranzahl nach AgRP-Stimulation um 70 %.

Mithilfe zweier voneinander unabhängiger Verfahren wurde so die Wirkung des α -MSH sowie des AgRP auf den MC3R und den MC4R untersucht. Die bereits in der Literatur beschriebene α -MSH-induzierte Endozytose des MC4R konnten mithilfe beider Methoden reproduziert werden. Darüber hinaus wurde analog dazu die agonisteninduzierte Endozytose des MC3R gezeigt. Neue Erkenntnisse wurden im Hinblick auf die Auswirkungen der AgRP-Stimulation auf die Rezeptoren gewonnen. Nach den oben dargestellten Ergebnissen endozytiert AgRP den MC3R ebenso wie den MC4R. Zu ergänzen ist hierbei, dass das AgRP die Rezeptoren ähnlich effektiv endozytiert wie das α -MSH. Es ist möglich, dass die gewonnenen Erkenntnisse eine Bedeutung für die dem Melanocortin-System zugewiesene Funktion der Regulation des Energiehaushalts haben.

3.3 α -MSH und AgRP rekrutieren β -Arrestine zu den MCR

Wird ein Melanocortin-Rezeptor durch einen Liganden aktiviert, kommt es zur Weiterleitung des vom Liganden ausgehenden Signals in das Zellinnere. Im Rahmen der Signaltransduktion kommt es zur Kopplung des Rezeptors an ein G-Protein. Darüber hinaus konnte für einige Subtypen der GPCR, zum Beispiel für den β_2 -adrenergen Rezeptor, die Phosphorylierung des Rezeptors durch spezifische Kinasen, sogenannte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRK) nachgewiesen werden [155,27]. Eine Folge dieser Phosphorylierung ist die Rekrutierung des intrazellulären Proteins β -Arrestin. Wie in der Einleitung unter 1.1.3 genauer beschrieben ist, wird dem Protein vor allem eine Rolle als Adapterprotein bei der Endozytose des Rezeptors zugeordnet [104].

Proteininteraktionen, so auch die β -Arrestin-Rekrutierung zu einem Rezeptor, können mithilfe des „Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfers“ (BRET) nachgewiesen werden (*siehe* 2.2.8.3). Hierbei kommt es durch die unmittelbare Nähe von Energiedonor und Energieakzeptor zur Energieübertragung die als BRET-Signal gemessen werden kann. In diesem Abschnitt der Arbeit wurde mittels dieses Verfahrens die β -Arrestin-Rekrutierung nach Stimulation mit α -MSH oder AgRP zu den jeweiligen MCR-Subtypen untersucht. Verwendet wurden hierbei, wie ebenfalls in Abschnitt 3.1 beschrieben, YFP-Fusionsproteine der Rezeptoren (MC3R-YFP, MC4R-YFP). Das β -Arrestin-RLuziferase-Fusionsprotein (β -Arr-2-RLuz) war eine freundliche Gabe von Dr. Bouvier (Montréal, Kanada). Neben dem MC3R und dem MC4R wurde parallel die Mutante des MC4R, die MC4R-D90N, auf ihre Interaktion mit β -Arrestin hin untersucht. Diese wurde ebenfalls zuvor mit dem YFP-Protein fusioniert (MC4R-D90N-YFP). Als Negativkontrolle wurde der mit YFP fusionierte GABA-Rezeptor (GABA_{BR2}-YFP) eingesetzt. Dieser Rezeptor bindet weder α -MSH noch AgRP, wodurch eine Aktivierung des Rezeptors ausgeschlossen werden kann (*siehe auch* 3.2.). Somit eignet sich der GABA_{BR2} als Negativkontrolle und kann als Kriterium zur Sicherung der Validität des Verfahrens eingesetzt werden. Für die Durchführung des BRET-Verfahrens wurden HEK-293-Zellen mit den Rezeptorfusionsproteinen sowie dem fusionierten β -Arrestin transfiziert. Dies führte zu einer transienten Co-Expression des Rezeptorsubtyps und des β -Arrestins.

Im Fall einer Proteininteraktion zwischen dem Rezeptorsubtyp und dem β -Arrestin kommt es zu einem, im Vergleich zum Basalwert, erhöhten BRET-Signal (*siehe* 2.2.8.3). In Abbildung 15 sind die BRET-Signale in Form eines Säulendiagramms dargestellt. Für den GABA_{BR2} zeigt sich aufgrund seiner fehlenden Interaktionsfähigkeit mit α -MSH sowie AgRP wie zu erwarten kein erhöhtes BRET-Signal. Hingegen kommt es für den MC3R nach Stimulation mit α -MSH oder AgRP zu einer Proteininteraktion mit β -Arrestin. Ein in der Tendenz ähnliches BRET-Signal, dessen Maximum lediglich geringer ausfällt, zeigt sich für den MC4R. Demnach führt eine α -MSH- und eine AgRP-Stimulation auch für den MC4R zu einer Interaktion mit β -Arrestin. Während für den MC4R

bereits eine agonisteninduzierte β -Arrestin-Rekrutierung beschrieben werden konnte [155], ist die β -Arrestin-Rekrutierung für den MC3R neu. Die Tatsache, dass nicht nur der Agonist, sondern auch der inverse Agonist AgRP eine β -Arrestin-Rekrutierung induziert, ist überraschend. AgRP hat als inverser Agonist über seine Fähigkeiten zur MCR-Endozytose hinaus bezüglich der β -Arrestin-Rekrutierung demnach die gleichen Eigenschaften wie der Agonist α -MSH. Interessant wäre es zu untersuchen, ob die AgRP-induzierte β -Arrestin-Rekrutierung auch eine Bedingung für die AgRP-induzierte Rezeptorendozytose darstellt. Dieses konnte bereits für die α -MSH-vermittelte MC4R-Endozytose gezeigt werden [155].

Für die MC4R-D90N-Mutante, die nicht zur $G\alpha_s$ -Kopplung fähig ist, zeigt sich ebenfalls in Abbildung 15 eine durch α -MSH sowie AgRP vermittelte β -Arrestin-Rekrutierung an den Rezeptor. Daraus lässt sich schließen, dass die β -Arrestin-Rekrutierung unabhängig von der $G\alpha_s$ -Kopplung stattfindet.

Abb. 15

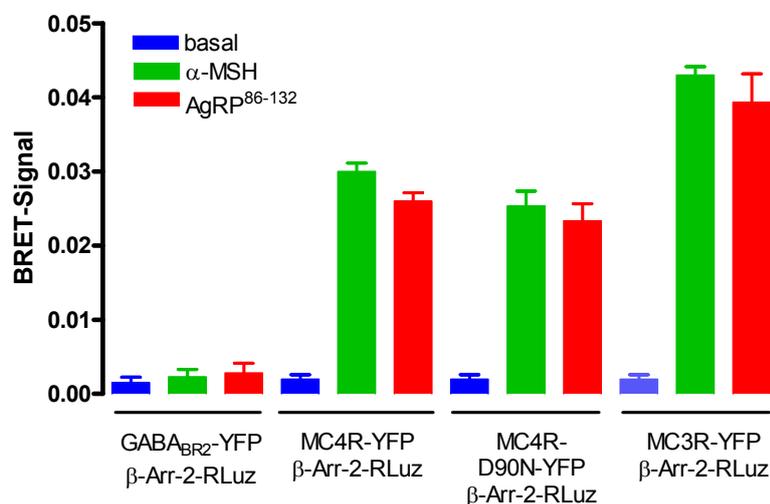


Abbildung 15: Messung der α -MSH- und AgRP⁸⁶⁻¹³²-induzierten β -Arrestin-Rekrutierung an die Melanocortin-Rezeptoren, die Mutante MC4R-D90N und den GABA_{BR2}. HEK-293-Zellen wurden mit dem entsprechenden Rezeptor-Fusionsprotein sowie dem β -Arrestin-Fusionsprotein 48 Stunden vor Versuchsdurchführung transfiziert. Hierdurch erfolgte eine transiente Co-Expression des Rezeptor-Fusionsproteins sowie des β -Arrestin-Fusionsproteins. Stimuliert wurde entweder mit α -MSH (1 μ M) oder AgRP (100 nM) für 45 Minuten. Gemessen wurde die Proteininteraktion mittels FLUOstar OPTIMA nach Zugabe des Luziferase-Substrats Colenterazine H (BRET-Signal). Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt N=3.

3.4 MCR endozytieren nur in der Anwesenheit von β -Arrestinen

Wie in der Einleitung unter 1.1.3 bereits eingehend erläutert wurde, wird dem β -Arrestin im Rahmen der Rezeptorendozytose primär eine Funktion als Adapterprotein zugeteilt. Hierbei agiert das β -Arrestin als Bindeglied zwischen dem Rezeptor sowie dem an der Einstülpung der Zellmembran beteiligten Clathrin. Diese Eigenschaft des β -Arrestins stellt wahrscheinlich die entscheidende Komponente der Rezeptorendozytose dar [155]. Nachdem für den MC4R bereits in der Literatur eine Beteiligung von β -Arrestin am Endozytosevorgang beschrieben werden konnte, bleibt zu untersuchen ob das, wie oben in Abbildung 15 gezeigt, an die Rezeptorsubtypen rekrutierte β -Arrestin auch im Fall des MC3R für dessen Endozytose entscheidend ist. Darüber hinaus soll die Beteiligung des β -Arrestins für die bereits weiter oben gezeigte AgRP-induzierte Endozytose der MCR evaluiert werden.

Die Untersuchung zur β -Arrestin-Beteiligung am Endozytoseprozess der MCR erfolgte mithilfe von COS-Zellen. Diese exprimieren endogen kein nachweisbares β -Arrestin oder nur sehr geringe Mengen davon [24, 110]. Damit stellen sie die ideale Bedingung dar, um die Abhängigkeit der Endozytose von der β -Arrestin-Rekrutierung zu untersuchen. Verwendet wurden Fusionsproteine des MC3R und des MC4R (MC3R-RLuz und MC4R-RLuz) sowie mit YFP fusioniertes β -Arrestin (β -Arrestin-2-YFP). Mithilfe des unter 3.2 bereits angewendeten Verfahrens der Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation wurde die Endozytose des MC3R und MC4R nach Co-Expression von β -Arrestin gemessen und mit der von nicht β -Arrestin co-exprimierenden COS-Zellen verglichen. Untersucht wurden hier die α -MSH-induzierte sowie die AgRP-induzierte Endozytose der MCR. Exprimierten die COS-Zellen den jeweiligen Rezeptor und β -Arrestin, so führte die Stimulation dieser Zellen mit α -MSH oder AgRP zu einer Endozytose des MC3R sowie des MC4R (Abb. 16A+B). Dabei fiel der Anteil der endozytierten Rezeptoren nach AgRP-Stimulation im Vergleich zur α -MSH-induzierten Endozytose größer aus. Exprimierten die COS-Zellen nur die Rezeptoren allein, kam es zu keiner Endozytose, obwohl die Rezeptoren ebenfalls zuvor mit α -MSH oder AgRP

stimuliert wurden (Abb. 16A+B). Die Anwesenheit von β -Arrestin scheint demnach eine Voraussetzung für die α -MSH- sowie für die AgRP-induzierte Endozytose des MC3R und MC4R zu sein.

Abb. 16A

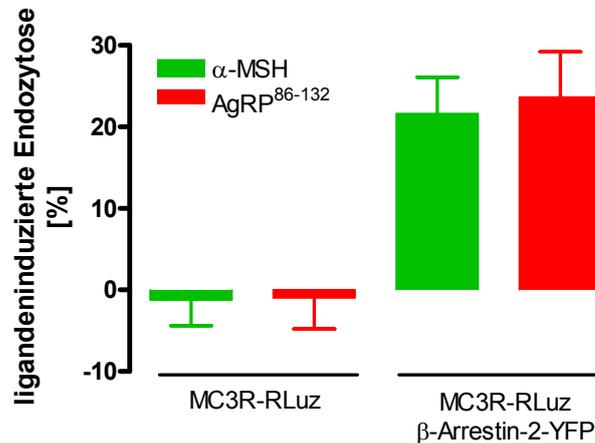


Abb. 16B

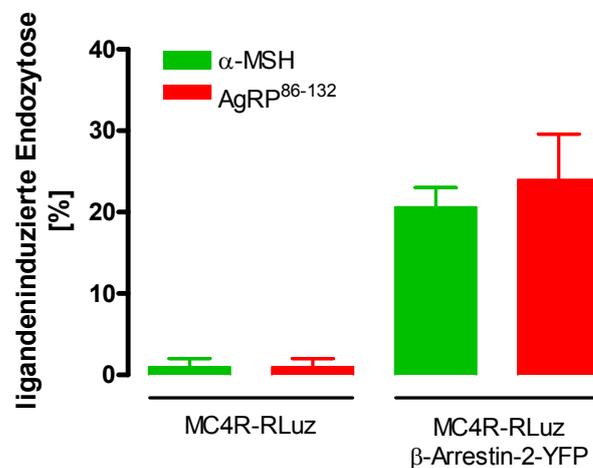


Abbildung 16: Messung der β -Arrestin-Abhängigkeit der α -MSH- und AgRP⁸⁶⁻¹³²-induzierten Endozytose des Melanocortin-3- und -4-Rezeptors. COS-7-Zellen wurden entweder mit dem MC3R- oder MC4R-Fusionsprotein transfiziert. Ein Teil der COS-7-Zellen wurde darüber hinaus zusätzlich mit YFP-fusioniertem β -Arrestin transfiziert. So erfolgte eine transiente Co-Expression des Rezeptor-Fusionsproteins und des β -Arrestin-Fusionsproteins. Stimuliert wurde entweder mit α -MSH (1 μ M) oder AgRP⁸⁶⁻¹³² (100 nM) für 45 Minuten. Die in Prozent angegebene Endozytose bezieht sich auf unstimulierte Zellen. Ermittelt wurden die Endozytose-Daten mithilfe der Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation durch ein Saccharosekissen (35 %). Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt N=3.

3.5 AgRP induziert die MC4R-Endozytose auch in GT1-1-Hypothalamuszellen

Die bisher verwendeten HEK-293- oder COS-Zellen eignen sich besonders zur rekombinanten Über-Expression verschiedenster Proteine. Die GT1-1-Hypothalamuszellen entstammen dem Hypothalamus. Dieser exprimiert unter physiologischen Bedingungen die MCR. Folglich exprimieren die GT1-1-Hypothalamuszellen endogen die MCR und im Speziellen den MC4R [109,96]. Sie stellen damit ein Zellsystem dar, anhand dessen es möglich ist, den MC4R in seiner physiologischen Umgebung zu untersuchen. In diesem Abschnitt wird der MC4R exemplarisch für die MCR und die bisher durchgeführten Untersuchungen auf sein durch α -MSH und AgRP induziertes Endozytoseverhalten in GT1-1-Hypothalamuszellen hin untersucht.

Zur Charakterisierung der α -MSH- und AgRP-induzierten MC4R-Endozytose in GT1-1-Hypothalamuszellen wurde der bereits in 3.2 erwähnte Oberflächen-ELISA modifiziert und angewendet. Ein gegen den N-Terminus des MC4R-Proteins gerichteter Antikörper ermöglicht die Quantifizierung der Oberflächenexpression des Rezeptors. Nach Stimulation mit AgRP zeigt sich im Vergleich zum Basalwert in Abbildung 17 ein Absinken der OD. Darauf zurückzuführen ist eine verminderte Oberflächenexpression des MC4R und folglich seine AgRP-vermittelte Endozytose. Parallel zeigt sich ebenfalls eine α -MSH-induzierte Endozytose des MC4R. Damit ist belegt, dass die α -MSH- sowie die AgRP-induzierte Endozytose des MC4R in HEK-293-Zellen nicht auf eine Über-Expression des Rezeptorproteins zurückzuführen ist. Auch endogen exprimierte Rezeptoren unterliegen demnach der α -MSH- und AgRP-vermittelten Internalisierung. Dieses Ergebnis zeigt, dass zumindest für den MC4R ausgeschlossen werden kann, dass seine ligandeninduzierte Endozytose auf molekulargenetisch veränderte Zellsysteme limitiert ist.

Abb. 17

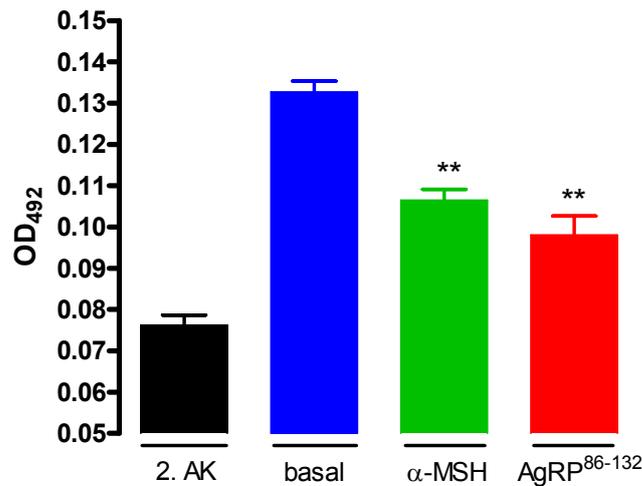


Abbildung 17: Messung der α -MSH- und AgRP⁸⁶⁻¹³²-induzierten Endozytose des Melanocortin-4-Rezeptors in GT1-1-Hypothalamuszellen. GT-1-1-Hypothalamuszellen wurden entweder mit α -MSH (1 μ M) oder AgRP (250 nM) für 45 Minuten stimuliert. Nach Durchführung des Oberflächen-ELISA wurde die Absorption der jeweiligen Proben bei einer optischen Dichte von 492 mittels Spektrometer ermittelt. Parallel wurde die OD für einen Basalwert bestimmt sowie die OD des Zweitantikörpers (2. AK) als Referenz ermittelt. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Vierfachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt N=6. Die Sternchen indizieren eine signifikante (**, $p < 0.01$) Differenz zwischen den gemessenen Werten für die stimulierten und die unstimulierten GT1-1-Hypothalamuszellen.

3.6 α -MSH induziert keine Endozytose der MC4R-D90N-Mutante

Für eine Mutante des MC4R, die MC4R-D90N, konnte unter Abschnitt 3.1 sowie in der Literatur eine Blockade des $G\alpha_s$ -Signalweges gezeigt werden [22]. Diese Eigenschaft bietet ideale Voraussetzungen dafür, die Bedeutung des $G\alpha_s$ -Signalweges für die Signaltransduktion des MC4R zu untersuchen. Für die MC4R-D90N-Mutante wurde nachgewiesen, dass sie mit einer bereits im Jugendalter auftretenden Adipositas assoziiert ist (*siehe 1.2.7*). Hierbei nimmt man an, dass die Blockade des $G\alpha_s$ -Signalweges eine Ursache für die stark ausgeprägte Fettleibigkeit sein könnte. Mithilfe des ELISA und der Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation, wurde das Endozytoseverhalten der MC4R-D90N untersucht. Verwendet wurden HEK-293-Zellen, welche die MC4R-D90N-Mutante stabil sowie transient exprimieren.

Abb. 18A

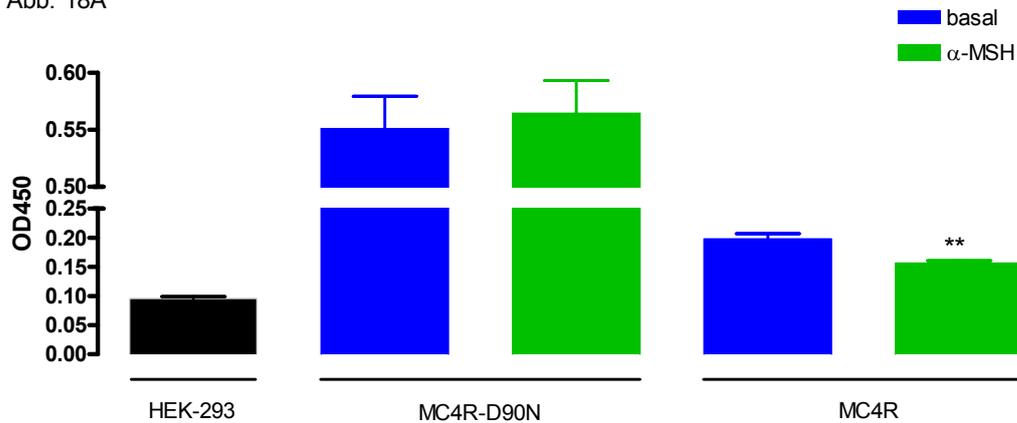


Abb. 18B

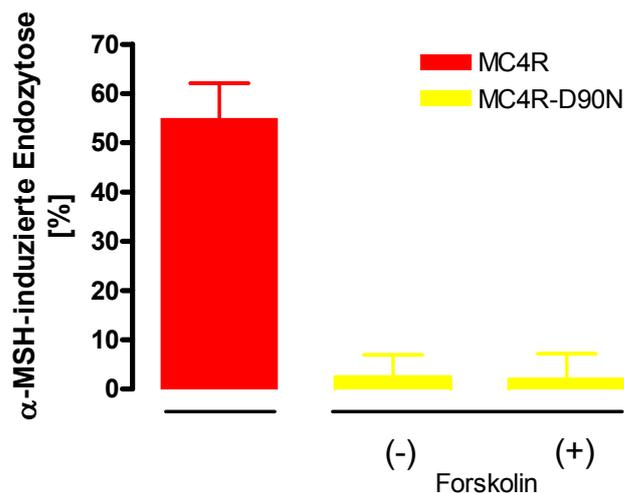


Abbildung 18: Messung der Endozytose der stabil in HEK-293-Zellen exprimierten MC4R-D90N-Mutante sowie des Wildtyp-Rezeptors mittels Oberflächen-ELISA. Abb. 18A: Stimuliert wurde mit α -MSH (1 μ M) für ca. 45 Minuten. Verwendet wurden mit dem Xpress-Epitop konjugierte Rezeptoren. Die angefertigten Daten zur Endozytose wurden durch die Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe eines Spektrometers ermittelt. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Für die Messungen gilt N=3. **Abb. 18B:** Stimuliert wurde mit α -MSH (1 μ M) sowie die MC4R-D90N-Mutante ebenfalls mit Forskolin (FSK, 10 mM). Verwendet wurden ebenfalls mit dem Xpress-Epitop konjugierte Rezeptoren. Die Prozentangaben zur Endozytose beziehen sich auf unstimulierte Zellen und ergeben sich aus dem jeweiligen Mittelwert aus den gewonnenen Mittelwerten der, in Dreifachbestimmung unabhängig voneinander durchgeführten Messungen unter Berücksichtigung der Standardabweichung. Dabei gilt N=3.

Parallel zur Untersuchung der Endozytose der MC4R-D90N wurde die α -MSH-induzierte MC4R-Endozytose gemessen. Dieser Wert diente als positive

Referenz für die spätere Auswertung der MC4R-D90N-Endozytose. Während der MC4R, wie bereits mehrfach in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, erneut endozytierte, reduzierte sich die oberflächliche Rezeptoranzahl der MC4R-D90N nach Gabe des Agonisten nicht (Abb. 18A). Daraufhin wurde im Verlauf das Endozytoseverhalten der MC4R-D90N im ELISA unter Zusatz von 100 μ M Forskolin untersucht. Forskolin stammt aus der Wurzel von *Coleus forskohlii* und besitzt die Fähigkeit, direkt die Adenylatzyklase zu aktivieren. Hierdurch kommt es zu einer intrazellulären Anreicherung von cAMP [48]. Die oberflächliche Rezeptoranzahl der MC4R-D90N reduzierte sich jedoch auch nicht, wenn die Zellen mit dem Agonisten und Forskolin co-stimuliert wurden. Hingegen zeigt Abbildung 18B erneut eine Endozytose des MC4R (55 %) ohne den Zusatz von Forskolin. Trotz AZ-Aktivierung und einhergehender cAMP-Anreicherung erfolgte keine Endozytose der MC4R-D90N-Mutante.

In dem oben durchgeführten ELISA wurden stabil exprimierte Rezeptoren verwendet. Dabei lassen sich nur selten zwei Klone der zu untersuchenden Rezeptorsubtypen finden, die über eine gleiche basale Rezeptorexpression verfügen. Auch für den MC4R konnte kein Klon gefunden werden, dessen basale Expression annähernd der basalen MC4R-D90N-Expression entsprach. Ein Vergleich der Rezeptorendozytosen untereinander wurde somit erschwert. Denn die Endozytosefähigkeit einer Zelle wird durch die vorhandene Menge an Adapterproteinen limitiert. Sie sind für die Endozytose der Rezeptoren entscheidend. Demnach können nur so viele Rezeptoren endozytiert werden, wie auch Adapterproteine vorhanden sind. Werden also mehr Rezeptoren exprimiert als Adapterproteine vorhanden sind, sinkt die prozentuale Endozytose. Zellen, die genauso viele Rezeptoren exprimieren, wie auch Adapterproteine in der Zelle vorhanden sind, haben dann einen maximalen Endozytosewert von 100 %. Es entsteht so eine Verfälschung der prozentualen Endozytose. Um das Problem der basalen Expressionsdifferenz zwischen dem Wildtyp und seiner Mutante zu beheben, wurden HEK-293-Zellen transient mit der dem MC4R sowie der Mutante entsprechenden DNS transfiziert. Es wurde dann die Abhängigkeit der α -MSH-induzierten Endozytose von der zuvor transfizierten Menge an Rezeptor-DNS untersucht.

Abbildung 19A stellt das Ergebnis dar. Für den MC4R konnte erneut eine signifikante agonisteninduzierte Endozytose gemessen werden. Für die einzelnen zuvor transfizierten MC4R-DNS-Mengen scheint es sich um eine negative exponentielle Korrelation zwischen exprimierter Rezeptormenge und Endozytose zu handeln. Je mehr oberflächliche Rezeptoren vorhanden waren, desto geringer fiel die absolute Endozytose in Prozentangaben aus. Es ist anzunehmen, dass die Sättigung der benötigten Signalkomponenten die an der MC4R-Endozytose beteiligt sind die Ursache für die in Prozentangaben geringere Endozytose war. Wie bereits im vorherigen Absatz beschrieben wurde, ist die Endozytosefähigkeit der Zelle abhängig von der vorhandenen Menge an Adapterproteinen. Daher verringert sich die Endozytose nur prozentual, während effektiv die gleiche Menge an Rezeptoren endozytiert wird. Anders als für den Wildtyp-Rezeptor zeigt sich für die α -MSH-Stimulation der MC4R-D90N-Mutante eine Zunahme der oberflächlichen Rezeptoren. Die Ergebnisse sind noch einmal zusammenfassend in Abbildung 19B dargestellt. Hier zeigt sich eine Endozytose des MC4R von 45 % sowie ein Anstieg der oberflächlichen MC4R-D90N von 20 %. Im Hinblick auf die in dieser Arbeit weiter oben gewonnenen Ergebnisse bezüglich der Endozytose und der β -Arrestin-Rekrutierung von G_{α_s} -gekoppelten Rezeptoren erscheint dieses Ergebnis überraschend. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt wurde, stellt die β -Arrestin-Rekrutierung ebenfalls einen entscheidenden Schritt auf dem Weg zur Rezeptorendozytose dar. Diesbezüglich ist die Mutante in der Lage, durch Stimulation mit α -MSH oder AgRP β -Arrestin zu rekrutieren. Endozytieren kann sie jedoch nicht. Daher stellt vermutlich die G_{α_s} -Kopplung des Rezeptors eine wichtige Grundlage für die Rezeptorendozytose dar.

Abb. 19A

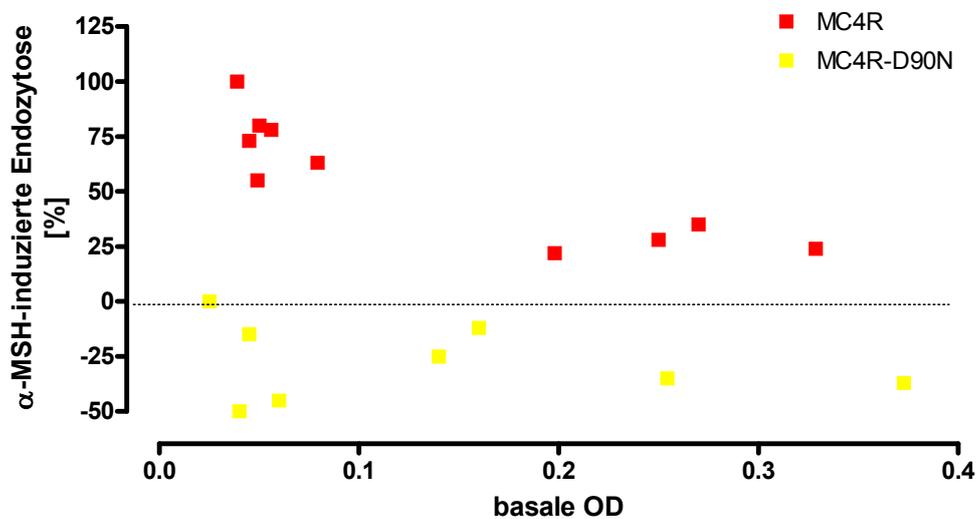


Abb. 19B

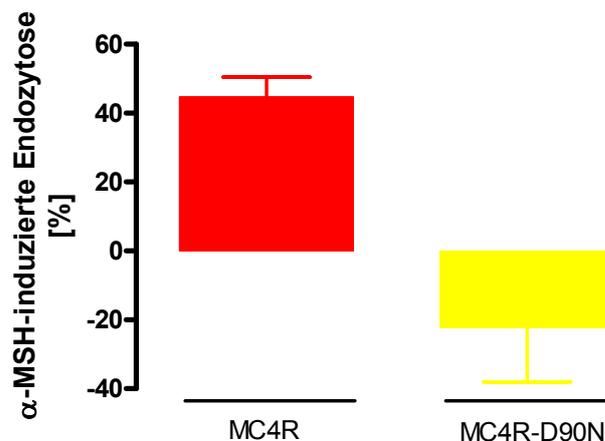


Abbildung 19: Messung der α -MSH-induzierten Endozytose der in HEK-293-Zellen transient exprimierten MC4R-D90N-Mutante sowie des Wildtyp-Rezeptors. HEK-293-Zellen wurden ca. 48 Stunden vor Durchführung des Oberflächen-ELISA mit der entsprechenden Rezeptor-Fusionsprotein-DNS transfiziert (Ex-MC4R-RLuz, Ex-MC4R-D90N-RLuz). Stimuliert wurde mit α -MSH (1 μ M) für ca. 45 Minuten. Für **Abb. 19A** wurden Zellen mit verschiedenen DNS-Mengen des jeweiligen Rezeptors transfiziert. Für den Wildtyp-Rezeptor wurden Zellen mit 2 μ g, 4 μ g und 6 μ g DNS und für die MC4R-D90N-Mutante Zellen mit 0,7 μ g, 1,3 μ g sowie 2 μ g DNS transfiziert. Die Transfektionen wurden an vier unterschiedlichen Tagen wiederholt. **Abb. 19B** zeigt die prozentuale Endozytose der MC4R-D90N-Mutante sowie des Wildtyp-Rezeptors. Dargestellt ist der jeweilige Mittelwert aus den in Abb. 19A gewonnenen Daten unter Berücksichtigung der Standardabweichung.

4 Diskussion

4.1 MCR werden durch α -MSH und AgRP unter Arrestinbeteiligung endozytiert

Die agonisteninduzierte Endozytose ist ein auf viele GPCR zutreffendes Phänomen [174,175]. Nur für wenige Ausnahmen, wie den β_3 -adrenergen Rezeptor [120] oder den κ -opioid-Rezeptor [95] konnte die Endozytose bisher nicht belegt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch der MC3R durch seinen Agonisten α -MSH endozytiert wird. Unter den Melanocortin-Rezeptoren ist er damit nicht der einzige Rezeptor, der ligandenabhängig internalisiert. Für den MC2R [9,40] sowie für den MC4R [66,155,23] konnte ebenfalls eine agonistenabhängige Endozytose nachgewiesen werden. Mithilfe zweier, voneinander unabhängiger Verfahren wurde die Endozytose des MC3R ermittelt. Der Oberflächen-ELISA stellt ein gängiges Verfahren zur Bestimmung der oberflächlichen Rezeptorexpression dar und wurde bereits vielfach zur Bestimmung der Endozytose anderer MCR eingesetzt [176,99,142]. Parallel fand die Membranfraktionierung durch Ultrazentrifugation Anwendung. Diese von *Hertel at al.* erstmals beschriebene Methode [86] wurde bereits von anderen erfolgreich zur Bestimmung der Rezeptorendozytose verwendet [24]. Verglichen mit dem ELISA gibt sie zusätzlich Auskunft über den Verbleib des Rezeptorproteins innerhalb der Zelle und bekräftigt damit die Ergebnisse zur Endozytose des MC3R.

Wie bereits in der Einleitung erläutert, endozytieren viele GPCR nur infolge einer β -Arrestin-Rekrutierung. Auch für den MC4R konnte eine β -Arrestin-abhängige Endozytose gezeigt werden [155]. Eine Beteiligung von β -Arrestin an der MC3R-Endozytose ist daher wahrscheinlich. Mithilfe des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers, des BRET, zeigt die Arbeit eine α -MSH-induzierte β -Arrestin-Rekrutierung an den MC3R. Das BRET-Verfahren konnte bereits erfolgreich in der Untersuchung von Rezeptor- β -Arrestin-Interaktionen vieler verschiedener GPCR angewendet werden [4,80,36,24]. Es eignet sich daher hervorragend zur Untersuchung der Interaktion von β -Arrestin mit dem MC3R in

lebenden Zellen. Mithilfe von COS-Zellen, die im Vergleich zu HEK-293-Zellen nur vernachlässigbar geringe Mengen an β -Arrestin exprimieren [110], wurde die Abhängigkeit der Endozytose des MC3R vom β -Arrestin gezeigt. In COS-Zellen exprimierte MC3R endozytierten erst nach Co-Expression von β -Arrestin. Dieses Phänomen der β -Arrestin-abhängigen Endozytose in COS-Zellen konnte bereits für diverse GPCR mit dem BRET-Verfahren gezeigt werden [149,24,152]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine α -MSH-induzierte, β -Arrestin-abhängige Endozytose des MC3R sehr wahrscheinlich. Natürlich kann argumentiert werden, dass die gezeigte MC3R-Endozytose möglicherweise durch den Zelltyp beeinflusst wird und es womöglich nicht in allen Zellarten zu einer MC3R-Endozytose kommt. So endozytierte der MC3R in der hier vorliegenden Arbeit zunächst nicht in COS-Zellen. Hier fehlte das entscheidende Protein β -Arrestin. Daten zur Endozytose von anderen Rezeptoren wie dem β_2 -adrenergen oder dem ATII-Rezeptor zeigen jedoch, dass abhängig vom Zelltyp zwar gelegentlich Unterschiede in der Endozytoserate auftreten, allgemein aber innerhalb des Zellpools in jedem Fall eine Endozytose stattfindet [91,119,85,107]. Deshalb ist davon auszugehen, dass die gezeigte MC3R-Endozytose auch auf andere Zellarten übertragbar ist, sofern gleichzeitig eine β -Arrestin-Expression vorliegt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Stimulation des MC3R mit α -MSH zu einer β -Arrestin-2-Rekrutierung an den Rezeptor führt. Für viele GPCR stellt die vorausgehende Phosphorylierung des Rezeptors durch GRK die Bedingung für die anschließende β -Arrestin-Rekrutierung dar. Hierdurch wird der Rezeptor desensibilisiert und eine β -Arrestin-Bindung ermöglicht. Auch für die MC4R-Endozytose konnte eine solche GRK-Beteiligung gezeigt werden [155]. Hier sind es vornehmlich die GRK2/3, die zu einer Rezeptorphosphorylierung führen. GT1-7-Zellen exprimieren nachweislich β -Arrestin-2, ebenso wie auch Neuronenzellen des Hypothalamus, die den GT-Zellen in ihrer Physiologie sehr ähnlich sind, diesen β -Arrestin-Subtyp exprimieren [155]. Beide Zelltypen weisen darüber hinaus eine Expression des MC3R auf [63,96,50]. Die GT1-7-Zellen eignen sich damit hervorragend dafür, den MC3R unter physiologischen Bedingungen auf seine Eigenschaften hin zu untersuchen. Ebenso ist anzunehmen, dass sie womöglich auch für den MC3R spezifische GRK

exprimieren. Diese Vermutung bleibt, wie die Fragestellung, ob es für den MC3R überhaupt zu einer GRK-vermittelten Rezeptorphosphorylierung kommt, in weiteren Arbeiten abzuklären. Darüber hinaus ist zu prüfen, ob das β -Arrestin-2 und eventuell für den MC3R spezifische GRK auch in anderen Geweben physiologischen Ursprungs, die den MC3R exprimieren, zu finden sind.

Obwohl die Rolle des MC3R bei der Regulation der Nahrungsaufnahme umstritten ist [92,82,1], gibt es einige Hinweise darauf, dass er an der Homöostase des Energiehaushalts beteiligt ist [2,3,31]. Durch eine gesteigerte Nahrungsaufnahme kommt es unter anderem über eine erhöhte Leptinausschüttung zu einem erhöhten α -MSH-Spiegel in Arealen des Hypothalamus. Nimmt man an, dass α -MSH, wie oben und bereits in der Literatur gezeigt, ein Agonist des MC3R ist, kommt es auf diesem Weg zu einer verstärkten α -MSH-Stimulation des MC3R. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf den MC3R erfolgt dann die Desensibilisierung des Rezeptors und schließlich die Rezeptorendozytose. Ist der Rezeptor endozytiert, gibt es mehrere Möglichkeiten seines Verbleibs innerhalb der Zelle. Eine Variante ist der Abbau des Rezeptorproteins durch die Enzyme eines Endosoms. Folgt die α -MSH-Stimulation des MC3R mehrfach aufeinander, so kann es durch den eben beschriebenen Prozess zur „Down“-Regulation des Rezeptors kommen. Sie ist charakterisiert durch eine verminderte Anzahl oberflächlicher sowie intrazellulärer Rezeptoren als Folge einer Langzeitexposition des Agonisten. Dieses Phänomen ist die molekulare Grundlage der Toleranzentwicklung gegenüber Opiaten. Nach einem längerfristigen, äquivalent dosierten Opiatkonsum kommt es aufgrund der „Down“-Regulation der Opiatrezeptoren zu einer verminderten oberflächlichen Rezeptoranzahl. Dementsprechend stehen identischen Opiatmengen weniger Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung und es kommt über einen längeren Zeitraum hinweg zu einer Abnahme des analgetischen Effekts der Opiate, einer sogenannten Opiattoleranz. Dabei kann dieses Phänomen als Autoregulationsprozess des menschlichen Organismus aufgefasst werden, um sich vor einer zu starken Opioidwirkung zu schützen [164,81,37,127]. Ein ähnlicher Effekt könnte für den MC3R im Zusammenhang mit der

Langzeitregulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielen. Durch eine erhöhte Nahrungszufuhr kommt es zu einer erhöhten α -MSH-Ausschüttung, die eine Endozytose des MC3R bewirkt. Bei längerfristiger α -MSH-Ausschüttung kann es dann zu einer „Down“-Regulation des Rezeptors kommen. Damit würden dem α -MSH über einen gewissen Zeitraum hinweg weniger oberflächliche Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung stehen und seine Wirkung wäre vermindert. Auch hierbei könnte es sich um einen Autoregulationsmechanismus des Organismus bezüglich der Nahrungsregulation handeln, da es zu einer Selbstlimitierung der α -MSH-vermittelten Wirkung kommt. Für den MC4R konnte ein solches Phänomen bereits gezeigt werden. Eine nahrungsinduzierte Adipositas bei Mäusen führte zu einer „Down“-Regulation des MC4R in spezifischen Arealen des Hypothalamus [82]. Wenn man die Konsequenz der α -MSH-induzierten MC3R-Endozytose, die Inhibition der Nahrungsaufnahme, kennt, ist es verständlich, dass eine Fehlfunktion dieser Kaskade eine von der Norm abweichende und womöglich pathologische Signalweiterleitung zur Folge haben könnte. Parallel kann diskutiert werden, inwiefern ein chronischer Mangel an oberflächlichen MC3R die Ursache für ein pathologisches Übergewicht beziehungsweise die Adipositas darstellt. Werden in einem Organismus generell wenig MC3R exprimiert, so limitiert sich hierdurch die anorexigene Wirkung des α -MSH. Analog zu dieser Modellvorstellung existieren bereits einige Krankheitsbilder, die vermutlich auf den Mangel eines spezifischen Rezeptors zurückzuführen sind. Neben den bereits erwähnten Opiatrezeptoren, bei denen ein Mangel zu einer Opiattoleranz führen kann wurde beispielsweise im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz ein Verlust von β -adrenergen Rezeptoren verzeichnet. Hierbei ist nicht eindeutig geklärt, ob die permanent erhöhte Sympathikusstimulation der β -adrenergen Rezeptoren der Grund für den Rezeptorverlust und damit für die Herzinsuffizienz ist oder aber ob die erhöhte Stimulationsrate eine Folge einer erhöhten „Down“-Regulation der Rezeptoren darstellt. Lediglich der Zusammenhang zwischen dem Mangel an β -adrenergen Rezeptoren und der Herzinsuffizienz scheint gesichert. Für den MC3R lässt sich schlussfolgern, dass in weiteren Arbeiten abgeklärt werden sollte, inwiefern adipöse Patienten parallel einen MC3R-Mangel aufweisen.

Die Existenz eines Liganden, der über den MC4R und nach den Daten dieser Arbeit wohl auch über den MC3R einen anorexigenen Effekt auf den Organismus ausübt, erweckt im Hinblick auf die sich immer stärker ausbreitende Adipositas das Interesse der Industrie. So arbeiten bereits mehrere Unternehmen an der Entwicklung von MC4R-selektiven Liganden [11,124,167,]. Erste Versuche, über die Regulation von MCR einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme zu nehmen, erfolgten bereits mit Melanotan TII (MTII), einem synthetischen MCR-Agonisten. Die Injektion von MTII in periventriculäre Regionen von Mäusen führte zu einer Gewichtsreduktion [53,70,165]. Darüber hinaus kam es zu diversen physiologischen Reaktionen unabhängig von der eigentlichen Wirkung auf das Melanocortin-System, da die MCR auch an weiteren Vorgängen des Organismus beteiligt sind. Beobachtet wurde eine Beteiligung der MCR an der Blutdruckregulation [172], an Entzündungsprozessen [35] und an der Entstehung von Schmerzen [177]. In klinischen Studien mit humanen Organismen führte die Gabe von MTII eher zu einer Steigerung der Erektionsfähigkeit [77,78]. Seitdem versucht man, MTII vorwiegend in der Therapie von Erektionsstörungen einzusetzen [171,47,181]. Allerdings ist bei der Entwicklung von α -MSH-Analoga und auch anderen Arzneimitteln zu beachten, dass synthetische Agonisten grundlegend die gleichen Auswirkungen wie ihre physiologischen Pendanten haben. Wie die meisten GPCR-Agonisten führen sie zu einer Rezeptordesensibilisierung, Rezeptorinternalisierung oder zu einer „Down“-Regulation als Folge einer Dauerstimulierung [41]. Dadurch ist ihr therapeutischer Effekt selbstlimitierend. Dieser Gedanke muss bei der Entwicklung solcher therapeutischer MCR-Agonisten berücksichtigt werden.

Die weitere Aufklärung der molekulargenetischen Grundlage der α -MSH-induzierten MC3R-Endozytose und im weiteren Sinne der MC4R-Endozytose könnte eine Reihe von Schlüsselproteinen und Kaskaden aufzeigen, die sich als Zielstruktur von Arzneimitteln eignen würden. Generell könnten weitere Kenntnisse zum Verhalten der MCR im Regulationssystem des Energiehaushalts zu einem besseren Verständnis des Melanocortin-Systems und dessen Auswirkung auf die Nahrungsaufnahme, den Energieverbrauch und

weitere, dem MC-System zugeordnete Funktionen wie das Sexualverhalten, die Herzfrequenz und viele andere führen.

AgRP führt als Gegenspieler des α -MSH über die Wirkung an den Melanocortin-Rezeptoren zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme [98]. Bei den Untersuchungen zur Auswirkung der AgRP-Stimulation auf den MC3R und den MC4R bewirkte AgRP eine verminderte cAMP-Produktion beider Rezeptorsubtypen. Dieses konnte bereits von *Nijenhuis et al.* gezeigt werden. Sie konnten nachweisen, dass AgRP die basale Aktivität der MCR senkt und es so zu einer verminderten cAMP-Produktion kommt [125]. AgRP hat als endogener inverser Agonist eine negative intrinsische Aktivität und stabilisiert die Rezeptorkonformation, in der es zu keiner G-Protein-Kopplung kommt. Folglich wird dann kein cAMP produziert.

Die β -Arrestin-Rekrutierung ist für viele GPCR ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Rezeptorendozytose. Ungeachtet der Tatsache, dass zumeist Agonisten eine β -Arrestin-Rekrutierung hervorrufen, stellt die vorliegende Arbeit unter Beweis, dass auch AgRP als inverser Agonist eine β -Arrestin-Rekrutierung induziert. Darüber hinaus führt diese von AgRP induzierte β -Arrestin-Rekrutierung zu der Rezeptorendozytose von Melanocortin-Rezeptoren. AgRP induziert die Endozytose des MC3R und des MC4R. In diesem Zusammenhang macht der Versuch mithilfe von COS-Zellen deutlich, dass es sich wie bei der α -MSH-induzierten Endozytose auch bei der von AgRP verursachten Internalisierung um eine β -Arrestin-abhängige Endozytose handelt. Diesbezüglich wurden auch von *Azzi et al.* inverse Agonisten beschrieben, die eine β -Arrestin-Rekrutierung an den β_2 -adrenergen Rezeptor induzieren [7]. Hierbei handelt es sich jedoch im Gegensatz zum AgRP, welches endogen exprimiert wird, um synthetische inverse Agonisten. Auch – und das ist der entscheidende Unterschied zum AgRP – führen die von *Azzi et al.* beschriebenen inversen Agonisten zu keiner Endozytose des β_2 -adrenergen Rezeptors (*siehe Publikation zu dieser Arbeit unter 7*). Damit ist das AgRP den inversen Agonisten der β_2 -adrenergen Rezeptoren nicht nur insofern überlegen, dass es endogen exprimiert wird, sondern es führt darüber hinaus zur Endozytose des Rezeptors. Eine wichtige Eigenschaft des AgRP ist dabei auch,

dass es den MC3R und den MC4R unabhängig vom Zelltyp endozytiert. So konnte die AgRP-induzierte MCR-Endozytose in GT-Zellen reproduziert werden. In Bezug auf ihre Physiologie kommen die GT-Zellen den Hypothalamuszellen, welche die höchste Expression des MC3R und des MC4R aufweisen, sehr nahe. So exprimieren auch sie endogen die MCR. Zu unterscheiden sind hierbei die GT1-1- von den GT1-7-Zellen. Während die GT1-1-Zellen sowie die GT1-7-Zellen beide den MC4R exprimieren, findet sich nur in den GT1-7-Zellen auch eine endogene Expression von MC3R [50,96]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es auch in GT1-1-Zellen zu einer α -MSH- und AgRP-vermittelten Endozytose des MC4R kommt. Es wird deutlich, dass die agonisteninduzierte, aber auch die durch den inversen Agonisten induzierte Endozytose ein auf viele Zelltypen übertragbares Phänomen für den MC4R, aber wahrscheinlich auch für den MC3R darstellt.

Mit der Erkenntnis, dass das AgRP den MC3R, aber auch den MC4R im humanen Organismus endozytiert, bleibt zu klären, welche Konsequenz dies für den Organismus hat. Im Regelkreislauf des Energiehaushalts führt eine vermehrte Nahrungsaufnahme zu einer leptinvermittelten α -MSH-Stimulation des MC3R und MC4R. Dadurch kommt es zu einer MAPK-Aktivierung, welche über noch ungeklärte Signalkaskaden zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führt. AgRP agiert in diesem Regelkreislauf als Gegenspieler zum α -MSH und führt zunächst über seinen kompetitiven Antagonismus an den MCR zu einer Hemmung der α -MSH-vermittelten Reduktion der Nahrungsaufnahme. Hieraus resultiert ein Anstieg der Nahrungsaufnahme und damit zugleich eine Gewichtszunahme (*siehe Einleitung*). Berücksichtigt man die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich des inversen Agonismus von AgRP und seiner Fähigkeit, den MC3R sowie den MC4R zu endozytieren, so ergibt sich ein neues Modell für die AgRP-vermittelte Regulation des Energiehaushalts. Nach den bisherigen Kenntnissen zur AgRP-vermittelten Signaltransduktion war es AgRP nur möglich, die anorexigene Wirkung von α -MSH zu blockieren. Die Blockade wird dabei nur so lange aufrechterhalten, wie das AgRP an den Rezeptor gebunden ist. Meist erfolgt eine Dissoziation des Antagonisten von seinem Rezeptor bereits nach wenigen Sekunden. Durch die Fähigkeit von AgRP, den MC3R

und MC4R zu endozytieren, führt AgRP zu einer Reduktion der oberflächlichen MCR. Damit stehen dem α -MSH weniger Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung. Im Vergleich zu der durch AgRP verursachten Rezeptorblockade dauert die Resensibilisierung des durch AgRP endozytierten Rezeptors nicht Sekunden, sondern eher Minuten. Demnach stehen dem α -MSH über einen längeren Zeitraum hinweg als bei der reinen Rezeptorblockade weniger Rezeptoren zur Bindung zur Verfügung. Die durch AgRP induzierte MCR-Endozytose resultiert in einem so von AgRP vermittelten Langzeitantagonismus. Dieser von AgRP vermittelte Effekt eröffnet völlig neuartige Möglichkeiten in Bezug auf die Regulation des Energiehaushalts und sollte in weitere Modellvorstellungen zur Rolle des Melanocortin-Systems in der Nahrungsregulation mit einbezogen werden.

Konnte in dieser Arbeit die AgRP-induzierte Endozytose des MC3R, aber auch des MC4R vor allem in den GT-Zellen gezeigt werden, so bleibt zu überlegen, inwiefern die durch AgRP verursachte Endozytose auch auf die weiteren Mitglieder der MCR, den MC1R, den MC2R und den MC5R, zu übertragen ist. Nehmen wir als Beispiel den MC1R. Dieser steht im Zusammenhang mit der Hautpigmentierung. α -MSH und Agouti, aus dem das AgRP-Fragment stammt, nehmen über die Wirkung am MC1R Einfluss auf die Hautpigmentierung. Während α -MSH auch hier als Agonist agiert, ist Agouti als Antagonist des MC1R bekannt. Die von Agouti vermittelte Auswirkung auf die Hautpigmentierung kann jedoch nicht ausschließlich auf seine antagonistische Aktivität am MC1R zurückgeführt werden. Es wird angenommen, dass Agouti auch hier analog zu den oben gewonnenen Erkenntnissen bezüglich des AgRP als inverser Agonist den MC1R endozytiert. Nach *Ollman et al.* scheint das Agouti-Protein die gleiche Eigenschaft wie das AgRP-Fragment zu besitzen [129,128]. Es bleibt jedoch zu klären, ob sich die Wirkung von Agouti und die des Fragments AgRP in ihrer Spezifität unterscheidet oder ob sie übereinstimmt. Anzunehmen ist allerdings, dass die für den MC3R und MC4R gezeigte Endozytose durch AgRP zumindest auf den MC1R und Agouti übertragen werden kann. Dass auch die anderen beiden MCR-Subtypen, der MC2R und der MC5R, eventuell einer durch einen inversen Agonisten induzierten Endozytose unterliegen, ist wahrscheinlich – bleibt dennoch in

weiteren Arbeiten zu klären. Auch die daraus resultierende Konsequenz für die über den MC2R vermittelte Glukokortikoidfreisetzung aus der Nebennierenrinde und die damit einhergehenden Auswirkungen u. a. auf das Immunsystem bleiben zu klären. Denkbar wäre es, dass ein möglicher inverser Agonist des MC2R neue Regulationsmechanismen für die Glukokortikoidfreisetzung liefert.

Nachdem die von AgRP-induzierte MCR-Endozytose mit ihrer Bedeutung und möglichen Auswirkungen für den menschlichen Organismus und die Regulation des Energiehaushalts erläutert wurde, bleibt zu diskutieren, über welche Art von Signalkaskade es über die Stimulation mit AgRP zu einer MC3R- oder MC4R-Endozytose kommt. Im Fall einer durch einen Agonisten induzierten Rezeptorendozytose führt die Aktivierung des G-Proteins zu einer $G\beta\gamma$ -vermittelten GRK-Aktivierung. Die GRK phosphorylieren den Rezeptor und es kommt zur gleichzeitigen Rekrutierung von β -Arrestin. Das β -Arrestin führt mithilfe des an der Einstülpung der Zellmembran beteiligten Proteins Clathrin zur Rezeptorendozytose. Parallel kann das β -Arrestin weitere Signalmoleküle aktivieren. AgRP induziert keine intrazelluläre cAMP-Anreicherung und führt daher zu keiner $G\alpha_s$ -Aktivierung des MC3R sowie des MC4R. Demnach kann die von AgRP induzierte β -Arrestin-Rekrutierung nicht über die $G\alpha_s$ -Untereinheit reguliert werden. Es bleibt also primär die Möglichkeit, dass die von AgRP induzierte und zur Rezeptorendozytose führende β -Arrestin-Rekrutierung G-Protein- oder zumindest $G\alpha_s$ -unabhängig erfolgt. Eine Möglichkeit zur G-Protein-unabhängigen β -Arrestin-Rekrutierung stellt die direkte GRK-Aktivierung dar. *Feng et al.* gehen dabei von der Existenz solcher GRK-aktivierenden, aber G-Protein-unabhängigen Signalkaskaden aus [57]. Darüber hinaus liefert eine weitere Arbeit Daten, welche das Vorhandensein solcher direkt die GRK aktivierenden Signalkaskaden aufweist. *Hildreth et al.* zeigten, dass die GRK2/3 den P2X₇-Rezeptor internalisieren, obwohl dessen Aktivierung keine G-Protein-Kopplung beinhaltet [87]. Aufgrund der Tatsache, dass AgRP zu keiner cAMP-Produktion führt und folglich keine $G\alpha_s$ -Aktivierung induziert, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es womöglich zu einer Aktivierung eines anderen G-Proteins kommt. Beispielsweise wird für den β_2 -adrenergen Rezeptor eine direkte $G\alpha_i$ -Aktivierung diskutiert [89]. Unveröffentlichte Daten von *Breit et al.* zeigen zusätzlich eine $G\alpha_i$ -Kopplung für

den MC4R. Eine AgRP-induzierte G_{α_i} -Kopplung für den MC3R und MC4R wäre also denkbar. Um zu klären, ob es für den MC3R und/oder MC4R zu einer AgRP-vermittelten G_{α_i} -Kopplung kommt, wäre es sinnvoll zu testen, welche Auswirkungen die AgRP-Stimulation auf die MCR unter Zusatz von *Pertussistoxin* hat. Das von dem Bakterium *Bordetella pertussis* synthetisierte *Pertussistoxin* ribosyliert die G_{α_i} -Untereinheit mit ADP und verhindert so dessen Kopplung an den Rezeptor. Sollte es eine durch AgRP induzierte Kopplung des MCR an G_{α_i} und eine so induzierte Endozytose geben, würde diese somit verhindert werden.

Die hier aufgezeigten Möglichkeiten, die unter Umständen für die von AgRP vermittelte β -Arrestin-Rekrutierung verantwortlich sein könnten, bergen darüber hinaus noch weiteres Potenzial im Hinblick auf die Signalübermittlung. Betrachtet man erneut die Grundlage des Regelkreises zur Homöostase des Energiehaushalts, so führt die α -MSH-vermittelte Endozytose der MCR über die Aktivierung der MAPK zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme. Die erfolgreiche Aktivierung dieser unter anderem an der Zellproliferation sowie -differenzierung beteiligten Kinasen konnte bisher nur auf die Rezeptor-G-Protein-Aktivierung durch Agonisten zurückgeführt werden. Erst die Studie von *Azzi et al.* zeigte, dass auch ein inverser Agonist trotz seiner negativen intrinsischen Aktivität auf die G_{α_s} -vermittelte AZ-Aktivierung zu einer MAPK-Aktivierung führen kann. Dabei kommt es zu einer β -Arrestin-vermittelten MAPK-Aktivierung [7]. Aber auch eine G_{α_i} -abhängige MAPK-Aktivierung wurde gezeigt [33,152]. Es wäre also denkbar, dass auch AgRP an den MCR über diese Mechanismen zu einer MAPK-Aktivierung führt. Daher sollte untersucht werden, ob die möglichen Signaltransduktionsvorgänge für AgRP, wie die der G_{α_i} -Kopplung oder der direkten GRK-Aktivierung, andere Auswirkungen von AgRP erklären könnten. Es bleibt zu prüfen, ob die beispielsweise von AgRP induzierte cAMP-Reduktion möglicherweise nicht G_{α_s} - sondern G_{α_i} -vermittelt ist.

4.2 $G\alpha_s$ als essentielle Komponente der MC4R-Endozytose

Anhand der durch Mutationen veränderten Signaleigenschaften von GPCR-Mutanten lässt sich oftmals ein Rückschluss auf die an der Signaltransduktion beteiligten Signalmoleküle und deren Kaskaden des Wildtyp-Rezeptors ziehen. Dafür werden spezifische Mutanten gezielt konstruiert und anschließend im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor im Hinblick auf eine konkrete Eigenschaft hin untersucht. Treten Mutanten unter physiologischen Bedingungen im Organismus auf, führen sie aufgrund ihrer häufig veränderten Signaleigenschaften zu pathophysiologischen Erscheinungsbildern. Betroffene GPCR spielen aufgrund ihrer enormen Vielfalt und weiten Verbreitung im menschlichen Organismus bei der Entstehung von Krankheiten eine besondere Rolle. Sie sind unter anderem beteiligt an der Retinitis pigmentosa (Rhodopsin), dem Diabetes mellitus und dem Bluthochdruck (Glucagon-Rezeptor) oder dem Hyperparathyroidismus (Calcium-Rezeptor) [144,166,163]. Die D90N-Mutante des MC4-Rezeptors konnte aus dem Genom eines stark adipösen Kindes isoliert werden. Man vermutet daher einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der MC4R-D90N-Mutante und der juvenilen Adipositas [22]. Für die α -MSH-Stimulation der Mutante, die ihre Fähigkeit zur $G\alpha_s$ -Kopplung verloren hat, wurde in der hier vorliegenden Arbeit keine Rezeptor-Endozytose gemessen. Die Mehrheit der bisher beschriebenen GPCR-Mutanten endozytiert nach Agonistenstimulation jedoch trotz ihrer fehlenden G-Protein-Kopplung [173,57,118]. Das Ausbleiben der MC4R-D90N-Endozytose stellt somit eine Besonderheit dar. Desto wichtiger ist daher die Aufklärung der molekulargenetischen Grundlagen des verhinderten Endozytoseprozesses, da die hier gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise weitreichende Konsequenzen für die allgemeinen Signaltransduktionsprozesse von GPCR haben könnten bzw. zum allgemeinen Verständnis der konventionellen Signalkaskade des Wildtyp-Rezeptors beitragen würden.

Für den Wildtyp-Rezeptor der MC4R-D90N-Mutante, den MC4R, führt die Stimulation mit seinem Agonisten α -MSH zu einer G-Protein-Aktivierung. Darüber kommt es neben der AZ-vermittelten cAMP-Anreicherung zu einer durch GRK induzierten β -Arrestin-Rekrutierung an den Rezeptor. Auch für die

MC4R-D90N-Mutante konnte eine α -MSH-vermittelte β -Arrestin-Rekrutierung gemessen werden. Erstaunlicherweise bleibt die für den Wildtyp-Rezeptor daran anschließende Rezeptorendozytose im Fall der MC4R-D90N-Mutante aus. Dabei stellt sich zunächst einmal die Frage, wie es für die Mutante, die ihre Fähigkeit an die $G\alpha_s$ -Untereinheit zu koppeln verloren hat, trotz dieser fehlenden G-Protein-Aktivierung zu einer β -Arrestin-Rekrutierung kommt. Wird für den Wildtyp-Rezeptor bisher angenommen, dass die β -Arrestin-Rekrutierung durch die bei der G-Protein-Kopplung aktivierte $G\beta\gamma$ -Untereinheit erfolgt, muss zunächst rückfolgernd angenommen werden, dass die β -Arrestin-Rekrutierung der MC4R-D90N-Mutante G-Protein-unabhängig erfolgt. Im Zusammenhang mit einer G-Protein-unabhängigen β -Arrestin-Rekrutierung bleibt dann herauszufinden, ob es im Rahmen der Signaltransduktion der MC4R-D90N-Mutante zu einer Phosphorylierung des Rezeptors kommt. Die Rezeptorphosphorylierung ist ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung von β -Arrestin und erfolgt im Regelfall durch GRK oder andere Kinasen. In Bezug auf die MC4R-D90N-Mutante könnte mithilfe von GRK-Inhibitoren untersucht werden, ob im Rahmen der β -Arrestin-Rekrutierung eine Phosphorylierung der Rezeptor-Mutante erfolgt. Im positiven Fall einer GRK-abhängigen Phosphorylierung der MC4R-D90N wäre darüber hinaus zu klären, inwieweit auch andere Kinasen, wie beispielsweise die Proteinkinase A (PKA) oder C (PKC), in der Lage sind, die Mutante zu phosphorylieren. Eindeutig ist für den Fall einer bestehenden Phosphorylierung der MC4R-D90N jedoch, dass der Mutante eine bisher unbekannt Komponente, die für die Endozytose eines Rezeptors entscheidend ist, fehlt. Wird die Mutante nicht phosphoryliert, das heisst weder von GRK noch von anderen Proteinkinasen, so würden bereits zwei bedeutende Komponenten der für viele GPCR zur Rezeptorendozytose führenden Signalkaskade fehlen: zum einen die G-Protein-Kopplung und zum anderen die Rezeptorphosphorylierung. Für diesen Fall wäre es wahrscheinlich, dass die von der Mutante ausgehende β -Arrestin-Rekrutierung über einen vollständig anderen Signalweg vermittelt wird.

Sucht man weiter nach Erklärungsansätzen, warum die MC4R-D90N-Mutante nicht endozytiert, so gilt es zu hinterfragen, ob die Mutante wirklich zu keiner G-Protein-Kopplung fähig ist. Denn bekannt ist bisher ausschließlich, dass sie

nicht an die $G\alpha_s$ -Untereinheit des G-Proteins koppelt. Um zu prüfen, ob die Mutante möglicherweise andere G-Protein-Untereinheiten aktiviert, kann evaluiert werden, inwiefern sich beispielsweise eine Agonistenstimulation der Mutante auf die intrazelluläre Calciumkonzentration auswirkt. Würde die Stimulation zu einer Calciumerhöhung führen, so ließe das auf eine Aktivierung der $G\alpha_q$ -Untereinheit schließen, die über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciums führt. Umgekehrt würde eine unveränderte Calciumkonzentration gegen die $G\alpha_q$ -Aktivierung sprechen. Ähnliches lässt sich aus der intrazellulären cAMP-Konzentration ableiten. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, wird durch die α -MSH-Stimulation der Mutante die cAMP-Konzentration erniedrigt. Hier wurde bisher angenommen, dass diese Tatsache die Folge der fehlenden $G\alpha_s$ -Aktivierung ist, die im Normalfall zu einer cAMP-Erhöhung führen würde. Aber auch die G-Protein-Untereinheit $G\alpha_i$ wirkt regulierend auf die cAMP-Konzentration. Ihre Aktivierung führt zu einer erniedrigten cAMP-Konzentration. Vorstellbar wäre daher, dass die MC4R-D90N-Mutante eine $G\alpha_i$ -Aktivierung bewirkt. Unterstützt wird dieser Gedanke durch die Tatsache, dass unveröffentlichte Daten von *Breit et al.* zeigen, dass auch die Stimulation des MC4R mit seinem Agonisten α -MSH zu einer $G\alpha_i$ -Aktivierung führt. Ob auch die MC4R-D90N eine $G\alpha_i$ -Aktivierung zur Folge hat, ließe sich in weiteren Arbeiten unter Einsatz des *Pertussistoxin* herausfinden. Wie oben beschrieben, ribosyliert das *Pertussistoxin* die $G\alpha_i$ -Untereinheit mit ADP und verhindert so dessen Kopplung an den Rezeptor. Sollte es eine $G\alpha_i$ -Kopplung der MC4R-D90N geben, so müsste es dann zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kommen.

Im Hinblick auf weitere Erklärungsansätze zur ausbleibenden Endozytose der MC4R-D90N konnte auch unter Zusatz von Forskolin keine Endozytose der Mutante induziert werden. Forskolin führt durch seine direkte AZ-Aktivierung zur Anreicherung von cAMP innerhalb der Zelle und ersetzt so eine Auswirkung der am Wildtyp-Rezeptor durch α -MSH induzierten $G\alpha_s$ -Kopplung. Auch die AZ-Aktivierung mit folgender cAMP-Produktion scheint damit allerdings nicht die ausschließliche Bedingung für die Endozytose der Mutante zu erfüllen. Somit stellt sich die Frage, ob es überhaupt die fehlende $G\alpha_s$ -Kopplung allein ist, die

zum Ausbleiben der Endozytose führt, oder ob der MC4R-D90N vielmehr eine weitere, für die Endozytose entscheidende Komponente fehlt. Dabei rücken die RGS ins Zentrum der Aufmerksamkeit. RGS („Regulators of G-protein signalling“) sind Proteine, die an der Regulation der G-Protein-vermittelten Signalübermittlung beteiligt sind. Hier unterscheiden sich RGS, welche die Deaktivierung des Rezeptors beschleunigen, von RGS, die eine Rolle als Effektor haben und ein Signal weiterleiten [123,67,122]. Störungen im Bereich der die Endozytose der MC4R-D90N regulierenden RGS könnten die Ursache der fehlenden Endozytosefähigkeit der Mutante sein bzw. die $G\alpha_s$ -Kopplung unterbinden, sodass die Mutante ohne die Fehlregulation der RGS doch das G-Protein aktivieren würde. Denn für einige Fehlregulationsmechanismen oder Tumorgeneseprozesse konnte die Ursache in fehlenden oder veränderten RGS gefunden werden [34].

Im Rahmen der von *Biebermann et al.* gemachten Untersuchung zur Charakterisierung der MC4R-D90N konnte ein dominant-negativer Effekt der Mutante auf den Wildtyp-Rezeptor gezeigt werden [22]. Grundlage dieser Übertragung des dominant-negativen Effekts ist die heteromere Dimerisierung der Mutante und des Wildtyp-Rezeptors. Die heteromere, aber auch die homologe Dimerisierung ist ein unter den GPCR weit verbreitetes Phänomen [13,59,114]. Dabei kommt es zur Zerstörung von Eigenschaften, die für die an der Dimerisierung beteiligten Rezeptoren charakteristisch sind. Gleichzeitig können dimerspezifische neue Eigenschaften entstehen. Auch für den MC4R konnte eine solche homologe Dimerisierung (Oligomerisierung) gezeigt werden [52]. Durch die heteromere Dimerisierung der MC4R-D90N-Mutante mit dem MC4R kommt es zur Zerstörung der Fähigkeit des MC4R, an $G\alpha_s$ zu koppeln. Das Dimer ist dann, wie von *Biebermann et al.* gezeigt, so wie die MC4R-D90N-Mutante nicht mehr in der Lage, $G\alpha_s$ zu aktivieren. Da, wie oben erläutert, die Mehrheit der nicht $G\alpha_s$ -koppelnden Rezeptoren trotzdem endozytiert, wäre es interessant zu untersuchen, wie sich das so gebildete Dimer aus Mutante und Wildtyp-Rezeptor im Hinblick auf die ligandeninduzierte Endozytose verhält. Für den Fall, dass das Dimer endozytieren sollte, müsste es eine Eigenschaft oder ein gewisses Protein für den MC4R geben, die oder das der MC4R-D90N fehlt. Durch die Interaktion beider Rezeptoren könnte es zu einer Übertragung dieser

Eigenschaft auf die MC4R-D90N kommen, die zu einer Endozytose des Dimers führt. In diesem Fall wäre es ebenfalls sinnvoll, das Dimer auf weitere an der Endozytose von GPCR beteiligte Signalwege zu untersuchen, um sich so der Ursache für das Ausbleiben der MC4R-D90N-Endozytose zu nähern. Ein solcher bekannter Signalweg, auf dem viele Rezeptoren endozytieren, ist die β -Arrestin-Rekrutierung. Käme es für das Dimer zu einer β -Arrestin-Rekrutierung, so würde man dann nach weiteren an der Endozytose von GPCR beteiligten Signalkaskaden oder Signalmolekülen suchen. Beispielsweise könnte das Dimer auf seine Fähigkeit, die MAPK zu aktivieren, untersucht werden. Aber auch für den Fall, dass das Dimer nicht endozytieren sollte, müsste man mithilfe weiterer Studien der Ursache hierfür auf den Grund gehen.

Hinweise auf die Eigenschaften der MC4R-D90N-Mutante können auch aus der hier mutierten Aminosäure Asparaginsäure gewonnen werden. Für GPCR im Allgemeinen wurden für die an neunzigster Stelle der TMD2 zu findende Aminosäure Interaktionen mit Aminosäuren der TMD1 gezeigt, welche eine Rolle bei der Rezeptoraktivierung zu spielen scheinen [72]. Für Rezeptoren, die um die neunzigste Stelle der TMD2 herum über eine Punktmutation verfügen, konnten als Folge dieser Mutation verschiedene Auswirkungen auf die Rezeptoreigenschaften gezeigt werden. So konnte für die P90A-Mutation im C5a-Anaphylatoxin-Rezeptor (C5aR) eine 10-fach geringere Ligandenbindung aufgedeckt werden [69]. Eine ebenfalls 100-fach geringere Ligandenbindung zeigte sich für den MC1R und seine Mutante V92M [139]. Für den Cholezystokinin-1-Rezeptor (CCK1R) und seine Mutante D87E fand sich eine erniedrigte Affinität sowie Potenz des Agonisten [5]. Und für die L88F-Mutante des humanen Dopamin-Rezeptors erhöhte sich die Affinität des Agonisten für den Rezeptor [56]. Die aus der MC4R-D90N-Mutante hervorgehenden Eigenschaften beziehen sich zwar, wie von *Govaerts et al.* diagnostiziert, auf die Rezeptoraktivierung, unterscheiden sich dennoch von den oben aufgelisteten Eigenschaften anderer im Bereich der neunzigsten AS der TMD2 zu findenden Mutationen. Auch hieran wird deutlich, dass die MC4R-D90N im Hinblick auf ihre mutationsbedingten Eigenschaften eine Besonderheit darstellt, wie oben bereits in Bezug auf die Rezeptorendozytose erläutert wurde.

Darüber hinaus kann darüber spekuliert werden, ob die α -MSH-Aktivierung des MC4R direkt eine bisher unbekannte Komponente aktiviert, die für die Rezeptorendozytose von Bedeutung ist und bei der die MC4R-D90N-Mutante nicht aktiviert wird. Vielleicht kommt es auch gleich zu Beginn der Rezeptoraktivierung zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, welche ebenfalls einen Einfluss auf die nachfolgende Endozytose hat und die bei der Mutante aufgrund ihrer veränderten Konformation nicht eintritt. All das sind Mutmaßungen, die einer weiteren Abklärung bedürfen, um die Ursache der ausbleibenden MC4R-D90N-Endozytose zu klären. Bisher weisen die Ergebnisse jedoch darauf hin, dass entgegen den für andere GPCR-Mutanten gewonnenen Erkenntnissen die G_{α_s} -Kopplung eine signifikante Bedingung für die Endozytose von GPCR darstellt. Eine Möglichkeit, dies weiter zu untersuchen, wäre die Evaluation der Wirkung von *Cholera toxin* am endogen in GT-Zellen exprimierten Wildtyp-Rezeptor. *Cholera toxin* führt, unabhängig von einer Ligandenstimulation des Rezeptors, durch die ADP-Ribosylierung der GTPase zunächst zur andauernden cAMP-Produktion und schließlich zum Abbau des G-Proteins. Dadurch kann der Wildtyp-Rezeptor an kein G_{α_s} -Protein mehr koppeln. Nach Aktivierung des MCR durch einen Agonisten dürfte der Rezeptor dann, sofern die intakte G_{α_s} -Kopplung die Bedingung zur Endozytosefähigkeit des Rezeptors darstellt, nicht mehr endozytieren.

Eine Aufklärung der molekulargenetischen Grundlagen der MC4R-D90N-Mutante mit der Identifizierung eines an der Endozytose der Mutante beteiligten Schlüsselproteins hätte weitreichende Auswirkungen für das Verständnis der von GPCR vermittelten Signalkaskaden. Auch im Hinblick auf die MCR und das Melanocortin-System würde dies zum besseren Verständnis der Regulationsmechanismen des Energiehaushalts beitragen und Möglichkeiten für einen pharmakologischen Therapieansatz der Adipositas bieten. Besonders aber im Fall der MC4R-D90N-Mutante würde die Kenntnis der Ursache für die nicht eintretende Rezeptorendozytose eine ideale Angriffsmöglichkeit für pharmakologisch wirksame Therapeutika darstellen. Damit könnte die Ursache der juvenilen Adipositas bekämpft und das Leiden vieler adipöser Kinder verringert werden. Auch Folgeerkrankungen der Adipositas könnten so reduziert und die Kosten für das Gesundheitssystem minimiert werden. Die

weitere Abklärung der hier aufgestellten These, dass die $G\alpha_s$ -Kopplung entgegen bisherigen Ergebnissen doch eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorendozytose spielt, bildet daher den zentralen Ansatzpunkt weiterer Untersuchungen. Dabei stehen die Aufklärung der einzelnen molekulargenetischen Schritte auf dem Weg zur Rezeptorendozytose, ihre Bedeutung bei der Regulation des Melanocortin-Systems und somit eine mögliche Vermeidung der Adipositas im Zentrum.

5 Zusammenfassung

Melanocortin-Rezeptoren (MCR) gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und regulieren unter anderem die Nahrungsaufnahme sowie den Kalorienverbrauch. Exprimiert werden sie in hypothalamischen Kerngebieten wie dem Nucleus arcuatus und dem Nucleus paraventricularis. Reguliert wird die MCR-Aktivität durch den Agonisten α -MSH und den Antagonist „Agouti-Related Protein“ (AgRP). Die Aktivierung der MCR durch α -MSH vermittelt anorexigene Effekte während AgRP durch die Blockierung der MCR orexigen wirkt. Neben seiner antagonistischen Aktivität wirkt AgRP auch als inverser Agonist der MCR und inhibiert somit die basale Aktivität dieser Rezeptoren. Die physiologische Bedeutung der invers-agonistischen AgRP-Wirkung ist bisher nicht geklärt. Die ligandenabhängige Rezeptorendozytose stellt einen wichtigen Mechanismus zur Regulation der Sensitivität von Zellen gegenüber Peptidhormonen dar. Obwohl die Bedeutung der MCR für die Energiehomöostase unumstritten ist, ist ihr Endozytoseverhalten weniger gut untersucht. Die vorliegende Arbeit hat die Auswirkungen von α -MSH oder AgRP auf die Endozytose des MC3R oder MC4R zunächst in rekombinanten Zellsystemen untersucht. Für den MC3R konnte erstmalig eine α -MSH-abhängige Endozytose gezeigt werden, die ähnlich wie bereits für den MC4R gezeigt, die Expression von β -Arrestinen benötigt. Überraschende Daten konnten darüber hinaus für die Wirkung von AgRP gewonnen werden, da auch dieses antagonistisch wirkende Peptid in der Lage war die Endozytose der MCR zu induzieren. Für diese antagonistischen induzierte Endozytose konnte ebenfalls eine Beteiligung von β -Arrestinen nachgewiesen werden. Der Nachweis der AgRP-vermittelten MCR-Endozytose in einer murinen Hypothalamuszelllinie (GT1-1 Zellen) unterstreicht die mögliche physiologische Relevanz dieses neuen Mechanismus in einem endogenen Modellsystem. Die durch inverse Agonisten induzierte Rezeptorendozytose legt die Vermutung nahe, dass agonistenunabhängige Signalwege bei der Endozytose eine Rolle spielen. Daher wurde das Endozytoseverhalten einer MC4R-Mutante (Austausch Asp zu Asn an Position 90 (D90N)) untersucht. Für diese adipositasassoziierte Rezeptorvariante konnte bereits gezeigt werden, dass sie

trotz ihrer unverändert hohen Affinität zu α -MSH keine Aktivierung des für den MC4R etablierten G_{α_s} -Signalwegs bewirkt. Interessanterweise konnte für diese Mutante eine Interaktion mit β -Arrestinen aber keine daraus resultierende Rezeptorendozytose nachgewiesen werden. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass die agonisteninduzierte Endozytose der MCR nicht aber ihre Bindung mit β -Arrestinen eine Aktivierung des G_{α_s} -Signalwegs voraussetzt. Die Grundlagen der antagonistischen Rezeptorendozytose hingegen konnten nicht endgültig geklärt werden. Zusammenfassend gibt diese Arbeit neue Einblicke in die Regulation des Melanocortin-Systems auf molekularer Ebene und etabliert darüber hinaus die durch endogene Antagonisten induzierte Rezeptorendozytose als neuen Mechanismus zur Regulation der GPCR-Aktivität im Allgemeinen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] **Abbott, C. R.**, M. Rossi, et al. (2000). "Investigation of the melanocyte stimulating hormones on food intake. Lack Of evidence to support a role for the melanocortin-3-receptor." Brain Res **869**(1-2): 203-10.
- [2] **Adan, R. A.** and W. H. Gispen (1997). "Brain melanocortin receptors: from cloning to function." Peptides **18**(8): 1279-87.
- [3] **Adan, R. A.**, J. Oosterom, et al. (1997). "Molecular pharmacology of neural melanocortin receptors." Receptors Channels **5**(3-4): 215-23.
- [4] **Angers, S.**, A. Salahpour, et al. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-9.
- [5] **Archer-Lahlou, E.**, C. Escrieut, et al. (2005). "Molecular mechanism underlying partial and full agonism mediated by the human cholecystokinin-1 receptor." J Biol Chem **280**(11): 10664-74.
- [6] **Attramadal, H.**, J. L. Arriza, et al. (1992). "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family." J Biol Chem **267**(25): 17882-90.
- [7] **Azzi, M.**, P. G. Charest, et al. (2003). "Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(20): 11406-11.
- [8] **Azzi, M.**, G. Pineyro, et al. (2001). "Allosteric effects of G protein overexpression on the binding of beta-adrenergic ligands with distinct inverse efficacies." Mol Pharmacol **60**(5): 999-1007.
- [9] **Baig, A. H.**, F. M. Swords, et al. (2002). "Agonist activated adrenocorticotropin receptor internalizes via a clathrin-mediated G protein receptor kinase dependent mechanism." Endocr Res **28**(4): 281-9.
- [10] **Baker, J. G.**, I. P. Hall, et al. (2003). "Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling." Mol Pharmacol **64**(6): 1357-69.
- [11] **Bakshi, R. K.**, Q. Hong, et al. (2006). "Optimization of a privileged structure leading to potent and selective human melanocortin subtype-4 receptor ligands." Bioorg Med Chem Lett **16**(5): 1130-3.
- [12] **Banks, W. A.**, A. J. Kastin, et al. (1996). "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin." Peptides **17**(2): 305-11.

- [13] **Barnes, P. J.** (2006). "Receptor heterodimerization: a new level of cross-talk." J Clin Invest **116**(5): 1210-2.
- [14] **Baskin, D. G.**, J. F. Breininger, et al. (1999). "Leptin binding in the arcuate nucleus is increased during fasting." Brain Res **828**(1-2): 154-8.
- [15] **Baskin, D. G.**, D. Figlewicz Lattemann, et al. (1999). "Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight." Brain Res **848**(1-2): 114-23.
- [16] **Baskin, D. G.**, T. M. Hahn, et al. (1999). "Leptin sensitive neurons in the hypothalamus." Horm Metab Res **31**(5): 345-50.
- [17] **Baskin, D. G.**, A. J. Sipols, et al. (1993). "Immunocytochemical detection of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) in rat brain: colocalization with phosphotyrosine." Regul Pept **48**(1-2): 257-66.
- [18] **Batterham, R. L.**, M. A. Cowley, et al. (2002). "Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake." Nature **418**(6898): 650-4.
- [19] **Benovic, J. L.**, H. Kuhn, et al. (1987). "Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 8879-82.
- [20] **Berridge, M. J.** (1984). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers." Biochem J **220**(2): 345-60.
- [21] **Berridge, M. J.**, P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- [22] **Biebermann, H.**, H. Krude, et al. (2003). "Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization." Diabetes **52**(12): 2984-8.
- [23] **Blondet, A.**, M. Doghman, et al. (2004). "Characterization of cell lines stably expressing human normal or mutated EGFP-tagged MC4R." J Biochem **135**(4): 541-6.
- [24] **Breit, A.**, M. Lagace, et al. (2004). "Hetero-oligomerization between beta2- and beta3-adrenergic receptors generates a beta-adrenergic signaling unit with distinct functional properties." J Biol Chem **279**(27): 28756-65.
- [25] **Bronstein, D. M.**, M. K. Schafer, et al. (1992). "Evidence that beta-endorphin is synthesized in cells in the nucleus tractus solitarius: detection of POMC mRNA." Brain Res **587**(2): 269-75.
- [26] **Bultman, S. J.**, E. J. Michaud, et al. (1992). "Molecular characterization of the mouse agouti locus." Cell **71**(7): 1195-204.

- [27] **Bunemann, M.** and M. M. Hosey (1999). "G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling." J Physiol **517** (Pt 1): 5-23.
- [28] **Bunemann, M.**, K. B. Lee, et al. (1999). "Desensitization of G-protein-coupled receptors in the cardiovascular system." Annu Rev Physiol **61**: 169-92.
- [29] **Burdakov, D.** and F. M. Ashcroft (2002). "Cholecystokinin tunes firing of an electrically distinct subset of arcuate nucleus neurons by activating A-Type potassium channels." J Neurosci **22**(15): 6380-7.
- [30] **Butler, A. A.** (2006). "The melanocortin system and energy balance." Peptides **27**(2): 281-90.
- [31] **Butler, A. A.**, R. A. Kesterson, et al. (2000). "A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse." Endocrinology **141**(9): 3518-21.
- [32] **Butler, A. A.**, D. L. Marks, et al. (2001). "Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat." Nat Neurosci **4**(6): 605-11.
- [33] **Cao, W.**, L. M. Luttrell, et al. (2000). "Direct binding of activated c-Src to the beta 3-adrenergic receptor is required for MAP kinase activation." J Biol Chem **275**(49): 38131-4.
- [34] **Cao, X.**, J. Qin, et al. (2006). "Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) inhibits androgen-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells." Oncogene **25**(26): 3719-34.
- [35] **Catania, A.**, S. Gatti, et al. (2004). "Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation." Pharmacol Rev **56**(1): 1-29.
- [36] **Charest, P. G.** and M. Bouvier (2003). "Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor carboxyl tail enhances beta-arrestin recruitment leading to efficient receptor endocytosis and ERK1/2 activation." J Biol Chem **278**(42): 41541-51.
- [37] **Chaturvedi, K.** (2003). "Opioid peptides, opioid receptors and mechanism of down regulation." Indian J Exp Biol **41**(1): 5-13.
- [38] **Cheung, C. C.**, D. K. Clifton, et al. (1997). "Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus." Endocrinology **138**(10): 4489-92.
- [39] **Chidiac, P.**, T. E. Hebert, et al. (1994). "Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists." Mol Pharmacol **45**(3): 490-9.

- [40] **Clark, A. J.**, A. H. Baig, et al. (2003). "Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R)." Ann N Y Acad Sci **994**: 111-7.
- [41] **Clark, R. B.**, B. J. Knoll, et al. (1999). "Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization." Trends Pharmacol Sci **20**(7): 279-86.
- [42] **Cone, R. D.**, M. A. Cowley, et al. (2001). "The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis." Int J Obes Relat Metab Disord **25 Suppl 5**: S63-7.
- [43] **Cowley, M. A.**, J. L. Smart, et al. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." Nature **411**(6836): 480-4.
- [44] **Cowley, M. A.**, R. G. Smith, et al. (2003). "The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis." Neuron **37**(4): 649-61.
- [45] **Craft, C. M.**, D. H. Whitmore, et al. (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." J Biol Chem **269**(6): 4613-9.
- [46] **DeFea, K. A.**, J. Zalevsky, et al. (2000). "beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2." J Cell Biol **148**(6): 1267-81.
- [47] **Diamond, L. E.**, D. C. Earle, et al. (2004). "Double-blind, placebo-controlled evaluation of the safety, pharmacokinetic properties and pharmacodynamic effects of intranasal PT-141, a melanocortin receptor agonist, in healthy males and patients with mild-to-moderate erectile dysfunction." Int J Impot Res **16**(1): 51-9.
- [48] **Doi, K.**, N. Mori, et al. (1990). "The effect of adenylate cyclase stimulation on endocochlear potential in the guinea pig." Eur Arch Otorhinolaryngol **247**(1): 16-9.
- [49] **Drocourt, D.**, T. Calmels, et al. (1990). "Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance." Nucleic Acids Res **18**(13): 4009.
- [50] **Dumont, L. M.**, C. S. Wu, et al. (2001). "Mouse melanocortin-4 receptor gene 5'-flanking region imparts cell specific expression in vitro." Mol Cell Endocrinol **184**(1-2): 173-85.
- [51] **Ellacott, K. L.** and R. D. Cone (2004). "The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis." Recent Prog Horm Res **59**: 395-408.

- [52] **Elsner, A.**, P. Tarnow, et al. (2006). "MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues." Peptides **27**(2): 372-9.
- [53] **Fan, W.**, B. A. Boston, et al. (1997). "Role of melanocortinergergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome." Nature **385**(6612): 165-8.
- [54] **Farooqi, I. S.**, J. M. Keogh, et al. (2003). "Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene." N Engl J Med **348**(12): 1085-95.
- [55] **Farooqi, I. S.**, G. S. Yeo, et al. (2000). "Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency." J Clin Invest **106**(2): 271-9.
- [56] **Feng, J.**, J. L. Sobell, et al. (1998). "Scanning of the dopamine D1 and D5 receptor genes by REF in neuropsychiatric patients reveals a novel missense change at a highly conserved amino acid." Am J Med Genet **81**(2): 172-8.
- [57] **Feng, Y. H.**, Y. Ding, et al. (2005). "Unconventional homologous internalization of the angiotensin II type-1 receptor induced by G-protein-independent signals." Hypertension **46**(2): 419-25.
- [58] **Ferguson, S. S.** (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- [59] **Franco, R.**, V. Casado, et al. (2007). "Basic concepts in G-protein-coupled receptor homo- and heterodimerization." ScientificWorldJournal **7**: 48-57.
- [60] **Freedman, N. J.** and R. J. Lefkowitz (1996). "Desensitization of G protein-coupled receptors." Recent Prog Horm Res **51**: 319-51; discussion 352-3.
- [61] **Friedman, J. M.** (2002). "The function of leptin in nutrition, weight, and physiology." Nutr Rev **60**(10 Pt 2): S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- [62] **Gantz, I.** and T. M. Fong (2003). "The melanocortin system." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(3): E468-74.
- [63] **Gantz, I.**, Y. Konda, et al. (1993). "Molecular cloning of a novel melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(11): 8246-50.
- [64] **Gantz, I.**, H. Miwa, et al. (1993). "Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor." J Biol Chem **268**(20): 15174-9.

- [65] **Gantz, I.**, T. Tashiro, et al. (1993). "Localization of the genes encoding the melanocortin-2 (adrenocorticotrophic hormone) and melanocortin-3 receptors to chromosomes 18p11.2 and 20q13.2-q13.3 by fluorescence in situ hybridization." Genomics **18**(1): 166-7.
- [66] **Gao, Z.**, D. Lei, et al. (2003). "Agonist-dependent internalization of the human melanocortin-4 receptors in human embryonic kidney 293 cells." J Pharmacol Exp Ther **307**(3): 870-7.
- [67] **Garzon, J.**, M. Rodriguez-Munoz, et al. (2005). "Effector antagonism by the regulators of G protein signalling (RGS) proteins causes desensitization of mu-opioid receptors in the CNS." Psychopharmacology (Berl) **180**(1): 1-11.
- [68] **Gether, U.** (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.
- [69] **Geva, A.**, T. B. Lassere, et al. (2000). "Genetic mapping of the human C5a receptor. Identification of transmembrane amino acids critical for receptor function." J Biol Chem **275**(45): 35393-401.
- [70] **Giraud, S. Q.**, C. J. Billington, et al. (1998). "Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands." Brain Res **809**(2): 302-6.
- [71] **Gluzman, Y.** (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-82.
- [72] **Govaerts, C.**, S. Srinivasan, et al. (2005). "Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function." Peptides **26**(10): 1909-19.
- [73] **Graham, F. L.**, J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- [74] **Griffon, N.**, V. Mignon, et al. (1994). "Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor." Biochem Biophys Res Commun **200**(2): 1007-14.
- [75] **Gudermann, T.**, F. Kalkbrenner, et al. (1996). "Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 429-59.
- [76] **Gudermann, T.**, T. Schoneberg, et al. (1997). "Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors." Annu Rev Neurosci **20**: 399-427.
- [77] **Hadley, M. E.** (2005). "Discovery that a melanocortin regulates sexual functions in male and female humans." Peptides **26**(10): 1687-9.

- [78] **Hadley, M. E.** and R. T. Dorr (2006). "Melanocortin peptide therapeutics: historical milestones, clinical studies and commercialization." Peptides **27**(4): 921-30.
- [79] **Hahn, T. M.**, J. F. Breininger, et al. (1998). "Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons." Nat Neurosci **1**(4): 271-2.
- [80] **Hanyaloglu, A. C.**, R. M. Seeber, et al. (2002). "Homo- and hetero-oligomerization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor subtypes. Differential regulation of beta-arrestins 1 and 2." J Biol Chem **277**(52): 50422-30.
- [81] **Harrison, L. M.**, A. J. Kastin, et al. (1998). "Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates." Peptides **19**(9): 1603-30.
- [82] **Harrold, J. A.**, P. S. Widdowson, et al. (1999). "Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding." Diabetes **48**(2): 267-71.
- [83] **Harrold, J. A.**, G. Williams, et al. (1999). "Changes in hypothalamic agouti-related protein (AGRP), but not alpha-MSH or pro-opiomelanocortin concentrations in dietary-obese and food-restricted rats." Biochem Biophys Res Commun **258**(3): 574-7.
- [84] **Hausdorff, W. P.**, M. Bouvier, et al. (1989). "Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization." J Biol Chem **264**(21): 12657-65.
- [85] **Hegener, O.**, L. Prenner, et al. (2004). "Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells." Biochemistry **43**(20): 6190-9.
- [86] **Hertel, C.**, M. Staehelin, et al. (1983). "Evidence for intravesicular beta-adrenergic receptors in membrane fractions from desensitized cells: binding of the hydrophilic ligand CGP-12177 only in the presence of alamethicin." J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res **9**(2): 119-28.
- [87] **Hildreth, K. L.**, J. H. Wu, et al. (2004). "Phosphorylation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-2 reduces receptor signaling and interaction with the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor." J Biol Chem **279**(40): 41775-82.
- [88] **Hill, S. J.** (2006). "G-protein-coupled receptors: past, present and future." Br J Pharmacol **147 Suppl 1**: S27-37.
- [89] **Hill, S. J.** and J. G. Baker (2003). "The ups and downs of Gs- to Gi-protein switching." Br J Pharmacol **138**(7): 1188-9.

- [90] **Hinney, A.**, S. Hohmann, et al. (2003). "Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4258-67.
- [91] **Hunyady, L.** (1999). "Molecular mechanisms of angiotensin II receptor internalization." J Am Soc Nephrol **10 Suppl 11**: S47-56.
- [92] **Huszar, D.**, C. A. Lynch, et al. (1997). "Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice." Cell **88**(1): 131-41.
- [93] **Inglese, J.**, N. J. Freedman, et al. (1993). "Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases." J Biol Chem **268**(32): 23735-8.
- [94] **Inoue, H.**, H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene **96**(1): 23-8.
- [95] **Jordan, B. A.** and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." Nature **399**(6737): 697-700.
- [96] **Khong, K.**, S. E. Kurtz, et al. (2001). "Expression of functional melanocortin-4 receptor in the hypothalamic GT1-1 cell line." Neuroendocrinology **74**(3): 193-201.
- [97] **Koch, T.**, D. F. Wu, et al. (2006). "Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G-protein coupled receptors." J Neurochem **97**(2): 365-72.
- [98] **Korner, J.**, S. Wissig, et al. (2003). "Effects of agouti-related protein on metabolism and hypothalamic neuropeptide gene expression." J Neuroendocrinol **15**(12): 1116-21.
- [99] **Lavoie, C.**, J. F. Mercier, et al. (2002). "Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy." J Biol Chem **277**(38): 35402-10.
- [100] **Lefkowitz, R. J.**, S. Cotecchia, et al. (1993). "Adrenergic receptors: recent insights into their mechanism of activation and desensitization." Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **28**: 1-9.
- [101] **Leterrier, C.**, J. Laine, et al. (2006). "Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors." J Neurosci **26**(12): 3141-53.
- [102] **Lin, F. T.**, W. E. Miller, et al. (1999). "Feedback regulation of beta-arrestin1 function by extracellular signal-regulated kinases." J Biol Chem **274**(23): 15971-4.

- [103] **Lohse, M. J.**, J. L. Benovic, et al. (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-50.
- [104] **Luttrell, L. M.** and R. J. Lefkowitz (2002). "The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals." J Cell Sci **115**(Pt 3): 455-65.
- [105] **Luttrell, L. M.**, F. L. Roudabush, et al. (2001). "Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2449-54.
- [106] **Maffei, M.**, J. Halaas, et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." Nat Med **1**(11): 1155-61.
- [107] **Mangmool, S.**, T. Haga, et al. (2006). "Clathrin required for phosphorylation and internalization of beta2-adrenergic receptor by G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)." J Biol Chem **281**(42): 31940-9.
- [108] **Martin, S. C.**, S. J. Russek, et al. (1999). "Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1." Mol Cell Neurosci **13**(3): 180-91.
- [109] **Mellon, P. L.**, J. J. Windle, et al. (1990). "Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis." Neuron **5**(1): 1-10.
- [110] **Menard, L.**, S. S. Ferguson, et al. (1997). "Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization." Mol Pharmacol **51**(5): 800-8.
- [111] **Mergen, M.**, H. Mergen, et al. (2001). "A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity." J Clin Endocrinol Metab **86**(7): 3448.
- [112] **Mikoshiba, K.** (1997). "The InsP3 receptor and intracellular Ca²⁺ signaling." Curr Opin Neurobiol **7**(3): 339-45.
- [113] **Millington, G. W.**, Y. C. Tung, et al. (2001). "Differential effects of alpha-, beta- and gamma(2)-melanocyte-stimulating hormones on hypothalamic neuronal activation and feeding in the fasted rat." Neuroscience **108**(3): 437-45.
- [114] **Minneman, K. P.** (2007). "Heterodimerization and surface localization of G protein coupled receptors." Biochem Pharmacol **73**(8): 1043-50.

- [115] **Mountjoy, K. G.**, M. T. Mortrud, et al. (1994). "Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain." Mol Endocrinol **8**(10): 1298-308.
- [116] **Mountjoy, K. G.**, L. S. Robbins, et al. (1992). "The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors." Science **257**(5074): 1248-51.
- [117] **Murakami, A.**, T. Yajima, et al. (1993). "X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome." FEBS Lett **334**(2): 203-9.
- [118] **Nachtergaeel, I.**, N. Gaspard, et al. (2006). "Asn229 in the third helix of VPAC1 receptor is essential for receptor activation but not for receptor phosphorylation and internalization: comparison with Asn216 in VPAC2 receptor." Cell Signal **18**(12): 2121-30.
- [119] **Nahmod, K. A.**, M. E. Vermeulen, et al. (2003). "Control of dendritic cell differentiation by angiotensin II." Faseb J **17**(3): 491-3.
- [120] **Nantel, F.**, H. Bonin, et al. (1993). "The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization." Mol Pharmacol **43**(4): 548-55.
- [121] **Neer, E. J.** (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." Cell **80**(2): 249-57.
- [122] **Neitzel, K. L.** and J. R. Hepler (2006). "Cellular mechanisms that determine selective RGS protein regulation of G protein-coupled receptor signaling." Semin Cell Dev Biol **17**(3): 383-9.
- [123] **Neubig, R. R.** and D. P. Siderovski (2002). "Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets." Nat Rev Drug Discov **1**(3): 187-97.
- [124] **Nicholson, J. R.**, G. Kohler, et al. (2006). "Peripheral administration of a melanocortin 4-receptor inverse agonist prevents loss of lean body mass in tumor-bearing mice." J Pharmacol Exp Ther **317**(2): 771-7.
- [125] **Nijenhuis, W. A.**, J. Oosterom, et al. (2001). "AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor." Mol Endocrinol **15**(1): 164-71.
- [126] **Nishizuka, Y.** (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation." Nature **334**(6184): 661-5.
- [127] **Okura, T.**, E. V. Varga, et al. (2003). "Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor." Eur J Pharmacol **459**(1): 9-16.

- [128] **Ollmann, M. M.** and G. S. Barsh (1999). "Down-regulation of melanocortin receptor signaling mediated by the amino terminus of Agouti protein in *Xenopus melanophores*." J Biol Chem **274**(22): 15837-46.
- [129] **Ollmann, M. M.**, M. L. Lamoreux, et al. (1998). "Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo." Genes Dev **12**(3): 316-30.
- [130] **Ollmann, M. M.**, B. D. Wilson, et al. (1997). "Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein." Science **278**(5335): 135-8.
- [131] **Olney, J. W.** (1969). "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate." Science **164**(880): 719-21.
- [132] **Palkovits, M.** (1999). "Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998." Front Neuroendocrinol **20**(4): 270-95.
- [133] **Palkovits, M.**, E. Mezey, et al. (1987). "Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat." Brain Res **436**(2): 323-38.
- [134] **Pedersen-Bjergaard, U.**, U. Host, et al. (1996). "Influence of meal composition on postprandial peripheral plasma concentrations of vasoactive peptides in man." Scand J Clin Lab Invest **56**(6): 497-503.
- [135] **Pierce, K. L.**, L. M. Luttrell, et al. (2001). "New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades." Oncogene **20**(13): 1532-9.
- [136] **Pitcher, J. A.**, E. S. Payne, et al. (1995). "The G-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8343-7.
- [137] **Polonsky, K. S.**, B. D. Given, et al. (1988). "Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects." J Clin Invest **81**(2): 435-41.
- [138] **Polonsky, K. S.**, B. D. Given, et al. (1988). "Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects." J Clin Invest **81**(2): 442-8.
- [139] **Ringholm, A.**, J. Klovins, et al. (2004). "Pharmacological characterization of loss of function mutations of the human melanocortin 1 receptor that are associated with red hair." J Invest Dermatol **123**(5): 917-23.

- [140] **Roselli-Rehfuß, L.**, K. G. Mountjoy, et al. (1993). "Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19): 8856-60.
- [141] **Rossi, M.**, M. S. Kim, et al. (1998). "A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo." Endocrinology **139**(10): 4428-31.
- [142] **Salahpour, A.**, S. Angers, et al. (2004). "Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting." J Biol Chem **279**(32): 33390-7.
- [143] **Sambrook, J.**, Russel DW. (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [144] **Schoneberg, T.**, A. Schulz, et al. (2004). "Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases." Pharmacol Ther **104**(3): 173-206.
- [145] **Schwartz, M. W.**, D. G. Baskin, et al. (1996). "Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice." Diabetes **45**(4): 531-5.
- [146] **Schwartz, M. W.**, R. J. Seeley, et al. (1996). "Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus." J Clin Invest **98**(5): 1101-6.
- [147] **Schwartz, M. W.**, R. J. Seeley, et al. (1997). "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." Diabetes **46**(12): 2119-23.
- [148] **Schwartz, M. W.**, A. J. Sipols, et al. (1992). "Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin." Endocrinology **130**(6): 3608-16.
- [149] **Sclafani, A.**, K. Ackroff, et al. (2003). "Selective effects of vagal deafferentation and celiac-superior mesenteric ganglionectomy on the reinforcing and satiating action of intestinal nutrients." Physiol Behav **78**(2): 285-94.
- [150] **Sears, M. R.** and J. Lotvall (2005). "Past, present and future--beta2-adrenoceptor agonists in asthma management." Respir Med **99**(2): 152-70.
- [151] **Seidah, N. G.**, S. Benjannet, et al. (1999). "The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1." Ann N Y Acad Sci **885**: 57-74.

- [152] **Shenoy, S. K.**, M. T. Drake, et al. (2006). "beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor." J Biol Chem **281**(2): 1261-73.
- [153] **Shinohara, T.**, B. Dietzschold, et al. (1987). "Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein)." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 6975-9.
- [154] **Shinohara, T.**, L. Donoso, et al. (1987). "The structure of bovine retinal S-antigen: sequence analysis and identification of monoclonal antibody epitopes and uveitogenic site." Jpn J Ophthalmol **31**(2): 197-206.
- [155] **Shinyama, H.**, H. Masuzaki, et al. (2003). "Regulation of melanocortin-4 receptor signaling: agonist-mediated desensitization and internalization." Endocrinology **144**(4): 1301-14.
- [156] **Shutter, J. R.**, M. Graham, et al. (1997). "Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice." Genes Dev **11**(5): 593-602.
- [157] **Sibley, D. R.**, J. L. Benovic, et al. (1987). "Molecular mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization." Adv Exp Med Biol **221**: 253-73.
- [158] **Smith, C.** and M. Teitler (1999). "Beta-blocker selectivity at cloned human beta 1- and beta 2-adrenergic receptors." Cardiovasc Drugs Ther **13**(2): 123-6.
- [159] **Srinivasan, S.**, C. Lubrano-Berthelier, et al. (2004). "Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans." J Clin Invest **114**(8): 1158-64.
- [160] **Strasser, R. H.**, J. L. Benovic, et al. (1988). "The beta-adrenergic receptor kinase: role in homologous desensitization in S49 lymphoma cells." Adv Exp Med Biol **231**: 503-17.
- [161] **Surya, A.**, J. M. Stadel, et al. (1998). "Evidence for multiple, biochemically distinguishable states in the G protein-coupled receptor, rhodopsin." Trends Pharmacol Sci **19**(7): 243-7.
- [162] **Sutton, G. M.**, B. Duos, et al. (2005). "Melanocortinergic modulation of cholecystinin-induced suppression of feeding through extracellular signal-regulated kinase signaling in rat solitary nucleus." Endocrinology **146**(9): 3739-47.
- [163] **Tao, Y. X.** (2006). "Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications." Pharmacol Ther **111**(3): 949-73.

- [164] **Tempel, A.**, J. Habas, et al. (1988). "Morphine-induced downregulation of mu-opioid receptors in neonatal rat brain." Brain Res **469**(1-2): 129-33.
- [165] **Thiele, T. E.**, G. van Dijk, et al. (1998). "Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion." Am J Physiol **274**(1 Pt 2): R248-54.
- [166] **Thompson, M. D.**, W. M. Burnham, et al. (2005). "The G protein-coupled receptors: pharmacogenetics and disease." Crit Rev Clin Lab Sci **42**(4): 311-92.
- [167] **Tian, X.**, X. Chen, et al. (2006). "Synthesis of Tic-D-Phe Psi[CH₂-CH₂] isostere and its use in the development of melanocortin receptor agonists." Bioorg Med Chem Lett **16**(6): 1721-5.
- [168] **Trapaidez, N.**, I. Gomes, et al. (2000). "Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway." Brain Res Mol Brain Res **76**(2): 220-8.
- [169] **Vaisse, C.**, K. Clement, et al. (2000). "Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity." J Clin Invest **106**(2): 253-62.
- [170] **Vaisse, C.**, K. Clement, et al. (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." Nat Genet **20**(2): 113-4.
- [171] **Van der Ploeg, L. H.**, W. J. Martin, et al. (2002). "A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11381-6.
- [172] **Versteeg, D. H.**, P. Van Bergen, et al. (1998). "Melanocortins and cardiovascular regulation." Eur J Pharmacol **360**(1): 1-14.
- [173] **Villardaga, J. P.**, M. Frank, et al. (2001). "Differential conformational requirements for activation of G proteins and the regulatory proteins arrestin and G protein-coupled receptor kinase in the G protein-coupled receptor for parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein." J Biol Chem **276**(36): 33435-43.
- [174] **von Zastrow, M.** (2001). "Role of endocytosis in signalling and regulation of G-protein-coupled receptors." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 500-4.
- [175] **von Zastrow, M.** (2003). "Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway." Life Sci **74**(2-3): 217-24.
- [176] **Vrecl, M.**, L. Anderson, et al. (1998). "Agonist-induced endocytosis and recycling of the gonadotropin-releasing hormone receptor: effect of beta-arrestin on internalization kinetics." Mol Endocrinol **12**(12): 1818-29.

- [177] **Vrinten, D. H.**, C. J. Kalkman, et al. (2001). "Neuropathic pain: a possible role for the melanocortin system?" Eur J Pharmacol **429**(1-3): 61-9.
- [178] **Wess, J.** (1996). "Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors." Crit Rev Neurobiol **10**(1): 69-99.
- [179] **Wess, J.** (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." Faseb J **11**(5): 346-54.
- [180] **Wess, J.** (1998). "Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity." Pharmacol Ther **80**(3): 231-64.
- [181] **Wessells, H.**, J. E. Blevins, et al. (2005). "Melanocortinergic control of penile erection." Peptides **26**(10): 1972-7.
- [182] **Whitfeld, P. L.**, P. H. Seeburg, et al. (1982). "The human pro-opiomelanocortin gene: organization, sequence, and interspersion with repetitive DNA." DNA **1**(2): 133-43.
- [183] **Wilden, U.**, E. Wust, et al. (1986). "Rapid affinity purification of retinal arrestin (48 kDa protein) via its light-dependent binding to phosphorylated rhodopsin." FEBS Lett **207**(2): 292-5.
- [184] **Wilson, B. D.**, D. Bagnol, et al. (1999). "Physiological and anatomical circuitry between Agouti-related protein and leptin signaling." Endocrinology **140**(5): 2387-97.
- [185] **Wood, K. V.**, Y. A. Lam, et al. (1989). "Introduction to beetle luciferases and their applications." J Biolumin Chemilumin **4**(1): 289-301.
- [186] **Woods, S. C.**, M. Chavez, et al. (1996). "The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain." Neurosci Biobehav Rev **20**(1): 139-44.
- [187] **Woods, S. C.**, E. Decke, et al. (1974). "Metabolic hormones and regulation of body weight." Psychol Rev **81**(1): 26-43.
- [188] **Yamaki, K.**, Y. Takahashi, et al. (1987). "Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina." Biochem Biophys Res Commun **142**(3): 904-10.
- [189] **Zhang, J.**, S. S. Ferguson, et al. (1996). "Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization." J Biol Chem **271**(31): 18302-5.
- [190] **Zhang, Y.**, R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-32.

- [191] **Zimanyi, I. A.** and M. A. Pelleymounter (2003). "The role of melanocortin peptides and receptors in regulation of energy balance." Curr Pharm Des **9**(8): 627-41.

7 Publikationsliste

Publikation

Breit A, Wolff K, Kalwa H, Jarry H, Büch T, Gudermann T. (2006) *The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. J Biol Chem Vol. 281* **49**:37447–56

Kongressbeiträge

Title: *Agouti-related protein exhibits agonistic properties on the arrestin-mediated endocytosis pathway of melanocortinreceptors*

Author(s): Breit A, Wolff K, Büch T, et al.

Source: NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY

Volume: 375 Pages: 22–22 Supplement: Suppl. 1

Meeting Abstract: 54 Published: MAR 2007

Title: *G(s)-independent signalling of melanocortin-4 receptors*

Author(s): Breit A, Wolff K, Gudermann T

Source: NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY

Volume: 372 Pages: 35–35 Supplement: Suppl 1

Meeting Abstract: 92 Published: MAR 2006

8 Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Abb.	Abbildung
AgRP	„Agouti-Related Protein“
AK	Antikörper
ARC	Nucleus arcuatus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AZ	Adenylatzyklase
BMI	Body-Mass-Index
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C5aR	C5a-Anaphylatoxin-Rezeptor
ca.	circa
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CART	„Cocaine/Amphetamine Related Transcript“
CCK1R	Cholezystokinin-1-Rezeptor
CKK	Cholezystokinin
COS-Zellen	Fibroblastenzelllinie
CRE	„cAMP-responsive-element“
DAG	Diacylglycerin
DNA	englisches Synonym für DNS
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DNS	Desoxyribunukleinsäure
EC50	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgebundener Immunosorbent-Assay
ERK	extrazelluläre Signale regulierende Kinasen
Ex-Epitop	Xpress-Epitop
FBS	fötales Kälberserum

FLuz	Firefly Luziferase
FSK	Forskolin
GABA _{BR2}	γ -Aminobuttersäure-B-Rezeptor-2
GDP	Guanosindiphosphat
ggf.	gegebenenfalls
GHsR	Ghrelin-Rezeptor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen
GTP	Guanosintriphosphat
HCL	Wasserstoffchlorid
HEK-Zellen	humane Embryonale Nierenzellen
HRP	Horseradish Peroxidase
IP3	Inositoltrisphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MCR	Melanocortin-Rezeptor
MC-System	Melanocortin-System
MSH	melanozytenstimulierendes Hormon
MTII	Melanotan II
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarius
Ob-R	Leptin-Rezeptor
OD	optische Dichte
PBS	„Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline“
pcDNA	Vektor Desoxyribunukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF- β -Rezeptor	„Platelet-Derived-Growth-Factor- β -Receptor“
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
	G-Protein-gekoppelte rezeptorenspezifische Protein-
PP2A	Phosphatasen

PVN	Nucleus paraventricularis
R	Rezeptor
RGS	„Regulators of G-protein signalling“
RLuz	Renilla Luziferase
RMA	Repulsive Membran-Azidolyse-Technik
RT	Raumtemperatur
TMB	3,3',5,5' Tetramethylbenzidin
TMD	Transmembrandomäne
VMH	Nucleus ventromedialis
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZNS	Zentralnervensystem

9 Danksagung

Danken möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. T. Gudermann für die mir eingeräumte Möglichkeit, im Institut für Pharmakologie und Toxikologie zu promovieren, sowie für die Überlassung der sehr interessanten Fragestellung.

Besonders danke ich Herrn Dr. A. Breit für seine sorgfältige, verlässliche und ausdauernde Unterstützung sowie für seine Hilfestellung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit. Darüber hinaus geht mein Dank an Herrn Dr. T. Büch, Herrn Herrmann Kalwa sowie an Herrn Dr. T. Hofmann, die mir bei Fragen immer zur Seite standen.

Frau Jutta Hellge und Juliet Williams danke ich für die Hilfe bei der Erstellung eines großen Anteils der Abbildungen in dieser Arbeit.

Die Erstellung meiner Arbeit hat mir trotz allen Hürden auf diesem Weg viel Freude bereitet. Ich habe in dieser Zeit sehr viele neue, prägende Erfahrungen gesammelt, die mich sicherlich in meinem Denken und Handeln nachhaltig beeinflussen werden. Mein Dank gilt daher allen, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben. Besonders aber danke ich hierfür meiner Familie.

10 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Aumüller	Moll
Barth	Moosdorf
Basler	Müller
Baum	Neubauer
Cetin	Renz
Daut	Röper
Gerdes	Rothmund
Gudermann	Schäfer
Happle	Seitz
Hasilik	Steiniger
Lill	Wagner
Löffler	Weihe
Lohoff	Werner
Maier	Westermann
Maisch	Wulf

Meine akademischen Lehrer in Hamburg waren die Damen und Herren:

Adam	Kodolitsch
Baur	Püschel
Eschenhagen	Sauter
Gerloff	Trojan
Jänicke	Weber
Klemm	Weil
Knecht	