

Aus dem Institut für
experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein/Campus Lübeck
Direktor : Herr Prof. Dr. med. Dominiak

**Unterschiedliche Expression
von Orexin-Rezeptor mRNA in der Hypothalamus-
Hypophysen-Nebennieren-Achse bei adipösen und
diabetischen Ratten**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

Vorgelegt von
Julia Anne Frieda Gremmels
aus Wolfenbüttel

Lübeck 2005

1. Berichterstatter :	Herr PD Dr. rer nat. O. Jöhren
2. Berichterstatter :	Herr Prof. Dr. med. D. Ludwig
Tag der mündlichen Prüfung :	23.01.2006
Zum Druck genehmigt, Lübeck, den	23.01.2006

1 Einleitung

1.1	Das Metabolische Syndrom.....	1
1.2	Das Hormon Leptin.....	2
1.3	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA) –Achse und weitere Neuropeptide.....	3
1.4	Das Orexin-System.....	4
1.4.1	<i>Entdeckung und Struktur.....</i>	4
1.4.2	<i>Anatomie des Orexin Systems.....</i>	6
1.4.3	<i>Rolle der Orexine beim Stoffwechsel.....</i>	7
1.5	Tiermodelle für Diabetes und Adipositas.....	8
1.5.1	<i>Streptozotocin (STZ) Modell.....</i>	8
1.5.2	<i>Tiermodell nach Zucker.....</i>	9
1.5.3	<i>ZDF-Ratten.....</i>	10
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	10

2 Material und Methoden

2.1	Tiere und Organentnahme.....	11
2.2	Glukosemessung.....	12
2.3	Hormonbestimmung mittels RadiolimmunoAssay (RIA).....	12
2.3.1	<i>Prinzip des RIA.....</i>	12
2.3.1	<i>Durchführung des RIA.....</i>	12
2.3.1.1	<i>Insulin-RIA.....</i>	13
2.3.1.2	<i>Leptin-RIA.....</i>	13
2.3.1.3	<i>Orexin A-RIA.....</i>	14
2.3.1.4	<i>Kortikosteron-RIA.....</i>	15
2.4	RT-PCR.....	16
2.4.1	<i>mRNA-Isolierung.....</i>	16
2.4.2	<i>cDNA-Synthese.....</i>	16
2.4.3	<i>Quantitative „real-time“ PCR.....</i>	17
2.4.3.1	<i>Prinzip der PCR.....</i>	17
2.4.3.2	<i>Primer.....</i>	17
2.4.3.3	<i>Reaktionsbedingungen.....</i>	18
2.4.4	<i>Quantifizierung und Spezifität der mRNA-Kopien.....</i>	19
2.4.5	<i>Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente.....</i>	20

2.4.6	Restriktionsenzym-Analyse.....	20
2.5	In situ Hybridisierung.....	21
2.5.1	Allgemeines.....	21
2.5.2	Durchführung der in situ Hybridisierung.....	21
2.5.2.1	Hybridisierungssonde.....	21
2.5.2.2	Vorbereitung der Schnitte.....	22
2.5.2.3	Hybridisierung.....	22
2.5.2.4	Posthybridisierungswaschungen.....	22
2.6	Statistik.....	23
2.7	Materialien und Geräte.....	24
2.8	Substanzen.....	25
2.9	Puffer und Lösungen.....	26

3 Ergebnisse

3.1	Charakterisierung der Tiermodelle.....	27
3.1.1	Körpergewicht.....	27
3.1.2	Plasma Glukosekonzentration.....	28
3.1.3	Plasma Insulinkonzentration.....	29
3.1.4	Plasma Leptinkonzentration.....	30
3.1.5	Plasma Kortikosteronkonzentration.....	31
3.2	Nachweis des Orexin-Systems in den Tiermodellen.....	31
3.2.1	Plasma Orexin A Konzentration.....	31
3.2.2	Nachweis der PPO sowie der OX ₁ - und OX ₂ -Rezeptor mRNA.....	32
3.2.3	Spezifität der PCR (Schmelzkurven- und Restriktionsanalyse).....	35
3.3	Quantitative Analyse der PPO- sowie OX ₁ - und OX ₂ -Rezeptor mRNA.....	38
3.3.1	Quantitative Real-time-PCR Standardkurven.....	38
3.3.2	Streptozotocin behandelte Ratten.....	39
3.3.3	ZDF-Ratten.....	42
3.3.4	Zucker-Ratten.....	44
3.4	Lokalisierung der Orexin-Rezeptor mRNA in den Nebennieren.....	46

4 Diskussion

4.1	Expression der Orexin-Rezeptor mRNA in der HPA-Achse.....	48
4.1.1	Hypothalamus.....	48
4.1.2	Hypophyse.....	48
4.1.3	Nebennieren.....	49

4.2	Expression der Orexin-Rezeptoren in adipösen und diabetischen Ratten.....	50
4.2.1	<i>Hypothalamus</i>	50
4.2.2	<i>Hypophyse</i>	51
4.2.3	<i>Nebennieren</i>	52
4.3	Expression des Präpro-Orexins in adipösen und diabetischen Ratten.....	53
4.4	Orexin A Gehalt im Plasma adipöser und diabetischer Ratten.....	54
4.5	Zusammenfassung.....	57

5 Anhang

5.1	Literaturverzeichnis.....	59
5.2	Abkürzungsverzeichnis.....	74
5.3	Danksagung.....	76
5.4	Erklärung zu den Tierversuchen.....	77
5.5	Lebenslauf.....	78
5.6	Publikationen.....	79

1 Einleitung

1.1 Das Metabolische Syndrom

Die Inhalte des Metabolischen Syndroms wurden bereits 1967 von Dieterle treffend beschrieben (Dieterle, 1967). Hanefeld prägte den Begriff „Metabolisches Syndrom“ schon 1980 (Hanefeld, 1980); weltweit populär wurde der Begriff erst, nachdem Kaplan 1989 vom „deadly quartet“ sprach und die hohe Koinzidenz von abdominaler Adipositas, gestörter Glukosetoleranz, Hypertriglyzeridämie und Hypertonie darstellte (Kaplan, 1989). Adipositas führt durch eine erhöhte Insulinsekretion zu einer Herabregulation der Insulinrezeptoren und schließlich zur Insulinresistenz mit Hyperglykämien im Rahmen eines Diabetes mellitus Typ II. Dyslipoproteinämie und arterieller Hypertonus fördern die Entstehung der Arteriosklerose.

Die Therapiemöglichkeiten der Adipositas sind begrenzt. Diätische Maßnahmen wie z.B. Mischkostdiäten mit 1000 kcal sollen das Ess- und Ernährungsverhalten schulen. Bewegungstherapien bewirken eine Mobilisierung von Depotfett und führen zu einer günstigen Beeinflussung kardiovaskulärer Risikofaktoren. Es besteht die Möglichkeit einer unterstützenden medikamentösen Therapie, z.B. mit Reductil (Sibutramin, Knoll AG, Schweiz, BASF Pharma). Dieses Medikament hemmt die Wiederaufnahme von Serotonin im zentralen Nervensystem (ZNS) und ruft dadurch ein verstärktes Sättigungsgefühl hervor. Innerhalb von 3-6 Monaten kommt es zu einem Gewichtsverlust von etwa 8 kg, bei fortdauernder Medikamenteneinnahme wird jedoch keine weitere signifikante Gewichtsreduktion erzielt. Zudem kommt es nach Absetzen des Medikaments meist zu einer erneuten Gewichtszunahme (Paumgartner et al., 1999). Kürzlich entdeckte Peptidsysteme bieten möglicherweise neue Angriffspunkte für die medikamentöse Therapie der Adipositas bzw. des metabolischen Syndroms.

1.2 Das Hormon Leptin

Das Hormon Leptin (gr. *leptos* = *dünn*) wird fast ausschließlich von Adipozyten gebildet (Zhang et al., 1994). Die Plasma Leptinspiegel korrelieren positiv mit der Masse an Fettgewebe, wobei Fasten zu einer Abnahme der Plasma Leptinspiegel führt (Maffei et al., 1995). Man nimmt an, dass Leptin ein afferentes Signal in einem negativen Regelkreis ist, das die Masse an Fettgewebe reguliert. Gewichtsverlust führt zu einer *Abnahme* der Plasma Leptinkonzentration und über den Hypothalamus unter anderem zu einem *Anstieg* von Neuropeptid Y (NPY). Daraus resultiert eine erhöhte Nahrungsaufnahme. Eine Gewichtszunahme wiederum führt zu einem *Anstieg* der Plasma Leptinkonzentration, und wiederum über den Hypothalamus zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme. (Friedman, 1997). Intracerebroventrikuläre (i.c.v.) Injektion von Leptin reduziert die Nahrungsaufnahme, periphere Gabe von Leptin zeigt dagegen keine Wirkung (Halaas et al., 1997). Der Transportmechanismus für Leptin in das ZNS ist unbekannt (Banks et al., 1996).

Leptin ist das Genprodukt des ob-Gens (engl. *obese* = *fettleibig*) (Zhang et al., 1994). Bei der ob/ob-Maus hat eine Punktmutation im ob-Gen die Produktion eines funktionsuntüchtigen Leptinmoleküls zur Folge (Zhang et al., 1994). Das db-Gen (engl. *diabetic* = *diabetisch*) kodiert für den im Hypothalamus lokalisierten Leptinrezeptor; eine Punktmutation dieses Gens liegt bei der db/db-Maus vor (Lee et al., 1996). Aufgrund dieser Punktmutationen kommt es bei beiden Mausmodellen zum Auftreten massiver Adipositas und eines Diabetes mellitus Typ II (Friedman, 1992; Pelleymounter, 1995). Die ob/ob-Maus und die db/db-Maus gleichen sich phänotypisch. Durch i.v. Injektion von Leptin werden die erhöhten Insulin- und Glukosespiegel der ob/ob-Mäuse günstig beeinflusst (Pelleymounter et al., 1995).

Untersuchungen zeigen, dass Pankreasinselnzellen Leptinrezeptoren tragen und Leptin die basale und glukosestimulierte Insulinsekretion der Pankreaszellen hemmt (Fehmann et al., 1997; Emilsson et al., 1997; Kieffer et al., 1996). Außerdem wirkt Leptin insulinantagonistisch (Cohen et al., 1996; Müller et al., 1997). Insulin wiederum steigert in Anwesenheit von Glukose die Leptinsekretion (Mueller et al., 1998). Leptin beeinflusst also sowohl die Insulinsekretion als auch

die Insulinresistenz, während Insulin selbst glukoseabhängig auch an der Regulation der Leptinproduktion beteiligt zu sein scheint.

1.3 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA) - Achse und weitere Neuropeptide

Die Aktivität der HPA-Achse wird durch das Corticoliberin (CRH) bestimmt. CRH stimuliert über die Freisetzung von Corticotropin (ACTH) die Sekretion von Glukokortikoiden. Die HPA-Achse vermittelt eine adaptive Antwort auf Stressreaktionen, die eine Mobilisierung von Glukose über eine Erhöhung von Kortikosteron beinhaltet (Wahlestedt et al., 1987, Hanson et al., 1995). Die Verfügbarkeit von Glukose wiederum wirkt regulierend auf die HPA-Achse. Wahrscheinlich dient der Glukosegehalt der Nahrung als afferentes Signal, das die zentrale Kontrolle der ACTH-Sekretion beeinflusst: Nach Adrenektomie und fehlender bzw. niedriger Substitution mit Kortikosteron normalisiert mit der Nahrung aufgenommene Glukose die Energiebalance und sowohl die autonome als auch die neuroendokrine Systemantwort (Bell et al., 2000).

Auch die Nahrungsaufnahme regulierenden Neuropeptide beeinflussen die Aktivität der HPA-Achse (Laugero et al., 2001; Krysiak et al., 1999) (Abb. 1). Neuropeptide sind eine Gruppe von Neurotransmittern mit Peptidstruktur, die sowohl im ZNS als auch in anderen Organsystemen gebildet werden. Das hypothalamische Neuropeptid Y (NPY) wirkt orexigen, also auf die Nahrungsaufnahme fördernd, während CRH anorexigen, also auf die Nahrungsaufnahme hemmend wirkt (Porte et al., 1998): Nach i.c.v. Injektion von NPY kommt es zum Anstieg der Nahrungsaufnahme, des Körpergewichts und der Insulin- und Glukokortikoidsekretion (Zarjevski et al., 1993).

Das Hormon Leptin besitzt auf die Neuropeptide NPY und CRH eine gegensätzlich Wirkung: Während die Genexpression von NPY gehemmt wird (Friedman 1997), wird durch Leptin der CRH-Spiegel erhöht. So wird die Nahrungsaufnahme reduziert (Porte et al., 1998).

Auch die 1998 entdeckten Neuropeptide Orexin A und B gehören in die Gruppe der orexigenen Substanzen.

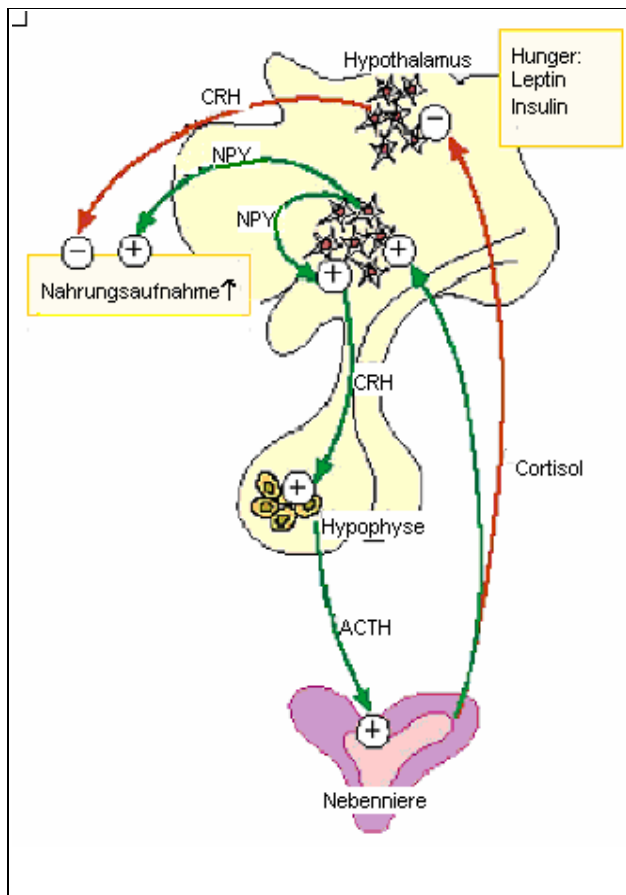


Abb.1: Bei erniedrigten Blutzuckerwerten sinken im Plasma die Leptin- und Insulinspiegel. Dadurch wird im Hypothalamus die NPY-Freisetzung erhöht. Dies wiederum wirkt stimulierend auf die Nahrungsaufnahme und die CRH-Freisetzung.

Die Aktivierung der HPA-Achse führt zu einer verstärkten Freisetzung von Glukokortikoiden, welche wiederum über eine negative Rückkopplung zu einer verminderten CRH-Bildung führt. Eine vermehrte NPY-Freisetzung stimuliert die Nahrungsaufnahme (Roter Pfeil=hemmende Wirkung, grüner Pfeil=stimulierende Wirkung), nach Krysiak et al., 1999).

1.4 Das Orexin-System

1.4.1 Entdeckung und Struktur

Aus Gehirnextrakten von Ratten und Rindern wurden mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie Neuropeptide als Liganden eines G-Protein-gekoppelten-Orphan-Rezeptors isoliert (Sakurai et al., 1998). Die so entdeckten Neuropeptide wurden Orexin A und Orexin B genannt, da i.c.v. injiziertes Orexin (grch. *Orexis* = *Hunger*) die Nahrungsaufnahme stimuliert (Sakurai et al., 1998).

Das Orexin-System besteht aus dem Gen für das Vorläuferpeptid Präpro-Orexin (PPO), aus dem durch proteolytische Spaltung die beiden Neuropeptide Orexin A und B entstehen. Zwei weitere Gene kodieren für den Orexin-1-Rezeptor (OX₁), den ursprünglichen Orphan-Rezeptor, und den Orexin-2-Rezeptor (OX₂), der durch Homologie-Screening kloniert wurde (Sakurai et al., 1998) (Abb. 2). Präpro-Orexin ist identisch mit dem Präpro-Hypocretin, das durch direkte tag-PCR-

Subtraktion als hypothalamusspezifische mRNA unabhängig von einer weiteren Arbeitsgruppe kloniert wurde (Gautvik et al., 1996, de Lecea et al., 1998).

Orexin-Rezeptoren sind hoch spezifisch für das Neuropeptid Orexin. NPY, MSH und andere Neuropeptide haben keinen Einfluss auf die Orexin-Bindung an Orexin-Rezeptoren (Holmqvist et al., 2001).

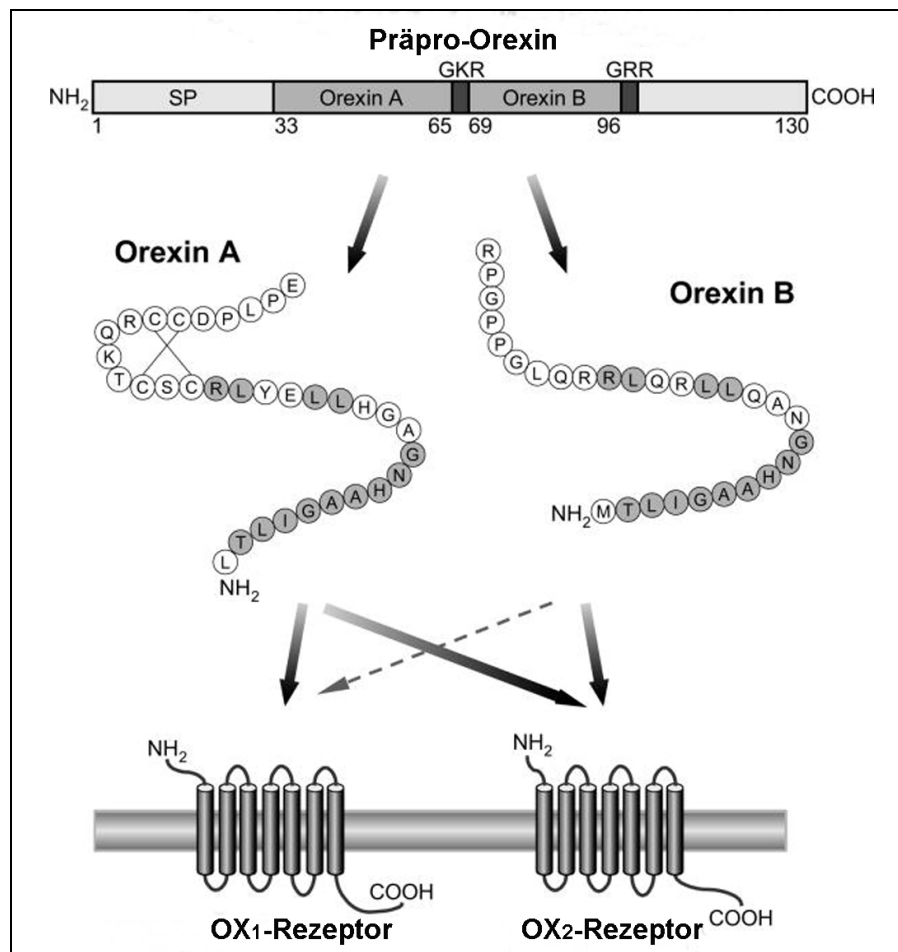


Abb. 2: (nach Jöhren et al., 2004) Orexin A besitzt Bindungsaffinität sowohl zum OX₁- als auch zum OX₂-Rezeptor. Es besitzt einen N-terminalen Pyroglutamyl-Rest, eine C-terminale Amidgruppe und zwei intramolekulare Disulfidbrücken. Orexin B liegt in linearer Struktur vor, besitzt eine C-terminale Amidgruppe und bindet ausschließlich an den OX₂-Rezeptor (Sakurai et al., 1998). Orexin A weist eine 46%ige Homologie zu Orexin B auf (identische Aminosäuren sind grau unterlegt). Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren OX₁ und OX₂ zeigen untereinander eine 64%ige Sequenzhomologie (Sakurai et al., 1998). SP, Signal Peptid Sequenz; GKR und GRR, spezifische Erkennungsstellen für Prohormonkonvertasen.

1.4.2 Anatomie des Orexin-Systems

Präpro-Orexin wird im lateralen Hypothalamus exprimiert, einer Region, der eine zentrale Steuerung der Nahrungsaufnahme zugesprochen wird (Stellar et al., 1954). Nach der Zwei-Zentren-Hypothese beruht die Nahrungsaufnahme auf der Aktivität des lateralen Hypothalamus, das Gefühl der Sättigung auf der Aktivität des ventromedialen Hypothalamus (Bernardis et al., 1993; Bernardis et al., 1996). Orexin-immunopositive Neurone sind übereinstimmend mit der Präpro-Orexin mRNA ausschließlich im lateralen Hypothalamus lokalisiert (Peyron et al., 1998). Sie projizieren in verschiedenste Hirnregionen einschließlich verschiedener Hypothalamuskern des cerebralen Cortex, in Teile des limbischen Systems (Hippocampus und Amygdala), in die paraventriculären Kerne des Thalamus, den Locus coeruleus, den Nucleus tractus solitarii, den Nucleus ambiguus, den Nucleus dorsalis nervi vagi und die Raphekern des Hirnstamms (de Lecea et al., 1998, Sakurai et al., 1998, Nambu et al., 1999, Peyron et al., 1998).

Die Verteilung der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression im ZNS entspricht weitestgehend der Verteilung der Orexin-immunopositiven Neurone und deren Projektionen, was durch in situ Hybridisierung gezeigt wurde (Trivedi et al., 1998). Sehr hohe Konzentrationen von OX_1 - Rezeptor mRNA liegen im Locus coeruleus, Nucleus preopticus und Nucleus ventromedialis des Hypothalamus vor, während OX_2 -Rezeptor mRNA im Nucleus paraventricularis und Nucleus arcuatus des Hypothalamus exprimiert wird. Auf Grund der unterschiedlichen Verteilung der Rezeptorsubtypen in den verschiedenen Hirnregionen vermutet man eine unterschiedliche physiologische Bedeutung eines jeden Rezeptorsubtyps (Marcus et al., 2001). Die ausgedehnte Projektion Orexin-positiver Neurone und das Verteilungsmuster der Orexin-Rezeptoren lässt verschiedene Autoren vermuten, dass Orexine neben der Regulation der Energiehomöostase auch andere zentrale Funktionen wie die Regulation neuroendokriner Systeme und die des autonomen Nervensystems übernehmen. Zudem wird ein Zusammenhang zum Schlaf-Wachverhalten vermutet (Peyron et al., 1998; Date et al., 1999).

Außerhalb des ZNS wurde Präpro-Orexin mRNA im Hoden, jedoch nicht im Ovar gefunden (Jöhren et al., 2001). Auch die Expression der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression wurde außerhalb des ZNS in verschiedenen Organen nachgewiesen. OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression wurde in Hypophyse,

Nebennieren, Schilddrüse, Niere, Jejunum und Hoden gefunden. OX₂-Rezeptor mRNA konnte in Nebennieren, Gehirn, Lunge und Hypophyse nachgewiesen werden (Jöhren et al. 2001). In den Organen männlicher Ratten war die mRNA Menge des jeweiligen Rezeptors höher als in den Organen der weiblichen Ratten, so dass eine geschlechtsspezifische Regulation der Orexin-Rezeptoren vermutet wird (Jöhren et al., 2001).

Orexin A wurde in menschlichem Plasma gefunden (Arihara et al., 2001). Intravenös injiziertes Orexin A wird relativ langsam metabolisiert und überwindet die Blut-Hirn-Schranke durch Diffusion. Orexin B dagegen überwindet die Blut-Hirn-Schranke nicht (Kastin und Akerstrom, 1999) und besitzt eine kürzere Halbwertszeit als Orexin A. Orexin-haltige Neurone könnten zum Plasma Orexin-Spiegel beitragen, da sie zur Eminentia mediana sowie zur Hypophyse projizieren (Date et al., 2000).

Geschlechtsunterschiede der Plasma Orexin A-Spiegel konnten bei Ratten nicht festgestellt werden, obwohl in den Hoden, nicht aber in den Ovarien Orexin produziert wird (Jöhren et al., 2001).

1.4.3 Rolle der Orexine im Stoffwechsel

Der Hypothalamus gilt als das Zentrum für die Regulation des Gewichts und der Energiehomöostase. Speziell der laterale Hypothalamus, in dem die Orexin-immunopositiven Neurone liegen, wird als Zentrum für die Nahrungsaufnahme angesehen. Studien zeigen, dass i.c.v. injiziertes Orexin A und B während der ersten 4 Stunden eine deutliche Steigerung der Nahrungsaufnahme zur Folge hat (Dube et al., 2000; Haynes et al., 1999; Haynes et al., 2000; Rodgers et al., 2000; Sakurai et al., 1998; Sweet et al., 1999). Die Nahrungsaufnahme steigernde Potenz der Orexine ist allerdings deutlich geringer als die des NPY (Edwards et al., 1999; Ida et al., 1999; Kunii et al., 1999; Yamanaka et al., 2000; Zhu et al., 2002). Die hypothalamische Präpro-Orexin mRNA-Expression wird durch Fasten erhöht (Sakurai et al., 1998) und ist bei genetisch adipösen Mäusen erniedrigt (Yamamoto et al., 1999).

Hunger bzw. Hypoglykämie scheinen unter anderem über einen Anstieg von Orexinen zur Nahrungsaufnahme zu führen. Insulin induzierte Hypoglykämie verursacht eine Zunahme der Aktivität der Orexin-immunopositiven Neurone im

lateralen Hypothalamus (Moriguchi et al., 1999, Griffond et al., 1999). Bei normalgewichtigen, hungernden Frauen wurde ein Anstieg von Plasma Orexin A und eine Reduktion der Plasma Leptinspiegel gefunden (Komaki et al., 2001).

Darüber hinaus wird die Stoffwechselrate bei Mäusen und Ratten durch Orexine erhöht (Lubkin und Stricker-Krongrad, 1998; Wang et al., 2001; Wang et al., 2003). Genetisch manipulierte Mäuse, denen Orexin produzierende Neurone fehlen, zeigen trotz reduzierter Nahrungsaufnahme eine deutliche Zunahme des Körpergewichts (Hara et al., 2001). Der Einfluss von Orexinen auf den Energieverbrauch scheint den auf die Nahrungsaufnahme zu übertreffen.

Orexine und Leptin scheinen miteinander zu interagieren. Ein Anteil der Orexin Neurone exprimiert den Leptin Rezeptor (Horvath et al., 1999, Hakansson et al., 1999). Leptin reduziert die Konzentration von Orexin A im lateralen Hypothalamus (Beck und Richy, 1999). Außerdem wird die durch Fasten bedingte Aktivierung des Orexin-Systems durch Behandlung mit Leptin blockiert (Lopez et al., 2000).

Außerdem wurde gezeigt, dass das Orexin-System eng mit der Schlafregulation verknüpft ist. An Narkolepsie leidende Patienten weisen im lateralen Hypothalamus eine stark reduzierte Anzahl Orexin produzierender Neurone sowie reduzierte Orexin-Spiegel in der Zerebrospinalflüssigkeit auf (Nishino et al., 2000; Peyron et al., 2000; Thannickal et al., 2000). Bei Mäusen bewirkt eine genetisch induzierte Degeneration der Orexin produzierenden Neurone im lateralen Hypothalamus neben Narkolepsie auch Übergewicht (Hara et al., 2001). So haben auch an Narkolepsie leidende Patienten einen signifikant erhöhten BMI (Schuld et al., 2000).

1.5 Tiermodelle für Diabetes und Adipositas

Streptozotocin (STZ) Modell

Streptozotocin wurde ursprünglich zur antibiotischen Therapie aus dem Schimmelpilz *Streptomyces acromogenes* isoliert. Es erwies sich für die Antibiotika-Therapie jedoch als ungeeignet, da es im Pankreas selektiv die Insulin produzierenden β -Zellen zerstört (Rakieten et al.; 1963, Junod et al., 1967; Herr et al., 1967). Als β -Zelltoxin führt STZ sowohl zu einer verminderten Produktion von Insulin als auch zu degenerativen Prozessen in den β -Zellen. Auf Grund dieser

Eigenschaft eignet sich STZ dazu, im Tiermodell einen insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ I zu provozieren. Die einmalige Verabreichung von 50 mg/kg KG hat einen dauerhaften diabetogenen Effekt.

Tiermodell nach Zucker

Die homozygote Zucker-Ratte ist seit der Erstbeschreibung (Zucker und Zucker, 1962) eines der bestuntersuchten Tiermodelle für Adipositas. Als entscheidendes Merkmal dieses Tiermodells wurde eine Punktmutation der extrazellulären Domäne des Leptinrezeptors identifiziert, die zu einer Leptinresistenz mit Hyperleptinämie führt (Iida et al., 1996). Für diese Ratten sind im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten folgende Merkmale charakteristisch: Die Nahrungsaufnahme der fettleibigen Zucker-Ratten ist verglichen mit den normalgewichtigen Tieren der Kontrollgruppe schon im Alter von 17 Tagen signifikant erhöht (Stern und Johnson, 1977), was sich während der Wachstumsperiode der ersten 16 Lebenswochen noch weiter verstärkt (Vasselli et al., 1980). Des Weiteren liegt bei den Zucker-Ratten bereits im frühen Lebensalter eine Hypertriglyceridämie und Hypercholesterinämie vor (Zucker und Zucker, 1962, 1963).

Die fettleibigen Zucker-Ratten weisen eine starke Hyperinsulinämie (Zucker und Antoniadou, 1972) sowie eine Insulinresistenz auf (Terrettaz et al., 1986b). Der orale Glukosetoleranztest ist bei normalen Blutglukosespiegeln pathologisch (Ionescu et al., 1985). Außerdem findet man bei diesen Ratten reduzierte Glukagonspiegel, eine Hypothyreose sowie eine verringerte Fortpflanzungsfähigkeit (Argilés, 1998).

Auch durch lebenslange Nahrungsbeschränkungen entwickeln diese Ratten einen 50%igen Körperfettanteil, während der normale Körperfettanteil von Ratten weniger als 20% beträgt (Cleary et al., 1980). Die exzessive Nahrungsaufnahme dieser Ratten ist also nicht entscheidend für die Ausbildung der Fettleibigkeit. Vermutlich erklärt sie sich durch eine verminderte Sympathikusaktivität, die zu einem verringerten Energieumsatz führt.

ZDF-Ratten

Die Zucker Diabetic Fatty Ratte (ZDF)-Ratte wurde als Versuchsmodell für den Diabetes mellitus Typ II durch partielle Inzucht aus dem Stamm der Zucker-Ratten gezüchtet (Clark et al., 1983).

Bei einigen der männlichen Zucker-Ratten kam es immer wieder zu starkem Übergewicht mit hohem Körperfettanteil, ungewöhnlich hohen Glukosespiegeln und gestörter Glukosetoleranz. Diese Ratten wiesen zusätzlich zu der Mutation im Leptinrezeptor (siehe oben) eine Hypoinsulinämie auf. Dieser Defekt wird autosomal vererbt. So entwickeln sich bei den männlichen Ratten äußerst hyperglykämische Ratten. Die weiblichen Tiere bilden trotz Fettleibigkeit und Insulinresistenz keinen Diabetes mellitus Typ II aus. Im Alter von sieben Wochen steigt der Glukosegehalt des Blutes auf Werte über 175 mg/dl, erreicht dann ab der elften Woche Werte über 500 mg/dl und zeigt danach keine weiteren Veränderungen. Des Weiteren sind HbA_{1c}, freie Fettsäuren, Triglyceride und Cholesterin im Blut dieser Tiere signifikant höher als bei den Kontrolltieren (Peterson et al., 1990). So eignet sich dieser Rattenstamm für Versuche in der Diabetes- und Adipositasforschung.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der Präpro-Orexin-, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA bei verschiedenen Tiermodellen in den Organen der HPA-Achse, nämlich Hypothalamus, Hypophyse und Nebennieren nachzuweisen. Hierbei dienen mit Streptozotocin behandelte Ratten als Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ I, diabetische Zucker-Ratten (ZDF-Ratten) als Tiermodell für den Diabetes mellitus Typ II und adipöse Zucker-Ratten als Tiermodell für Adipositas. Außerdem soll untersucht werden, ob Orexine im Plasma vorliegen und inwieweit sich die Plasma Orexinspiegel der verschiedenen Tiermodelle von denen der Kontrolltiere unterscheiden.

Die Präpro-Orexin und Orexin-Rezeptor mRNA-Expression sollen mittels „real-time“ PCR ermittelt werden; zur Lokalisierung der Orexin-Rezeptoren in den Nebennieren wird eine in situ Hybridisierung durchgeführt. Die Orexin A-Spiegel im Plasma werden mittels Radio-Immuno-Assay bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Organentnahme

Männlichen Sprague-Dawley (SD)-Ratten (Charles River, Sulzfeld) wurde einmalig 65 mg/kg/KG Streptozotocin in 0,05 M Natriumcitratpuffer mit einem pH-Wert von 4,5 intraperitoneal injiziert. Der männlichen Kontrollgruppe der SD-Ratten wurde nur das Vehikel Natriumcitratpuffer intraperitoneal injiziert. 15 Tage bekamen diese Versuchstiere Standardfutter und Trinkwasser ad libitum. Im Alter von 13 Wochen wurden sie durch Dekapitation mittels Guillotine getötet.

Männliche, homozygote ZDF-Ratten (fa/fa) von Genetic Models Inc. (Indianapolis, USA) und die entsprechenden heterozygoten Ratten der Kontrollgruppe (fa/?) wurden als Modell für einen Diabetes mellitus Typ II über Charles River (Sulzfeld) bezogen. Die ZDF-Ratten erhielten für drei Wochen Spezialnahrung. Diese Nahrung ist proteinreich (Proteinanteil >23,0 %) und hochkalorisch (Formulab Diet 5008). Auch diese Ratten bekamen Trinkwasser ad libitum. Sie wurden im Alter von 14 Wochen dekapitiert.

Männliche, homozygote Zucker-Ratten (fa/fa) und die entsprechenden männlichen, heterozygoten Zucker-Ratten (fa/?) wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Ratten hatten ständig ungehinderten Zugang zu Standardfutter und Trinkwasser ad libitum. Im Alter von 12 Wochen wurden sie dekapitiert.

Aus den Halsgefäßen fließendes Blut wurde gleich nach der Dekapitation in Polypropylenröhrchen aufgefangen und bei 1600 g für 15 min zentrifugiert. Das Plasma wurde bei -70°C gelagert. Die Organe wurden entnommen, in Isopentan bei -30°C auf Trockeneis gefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der Hypothalamus wurde bei -20°C aus dem Gehirn dissektiert, rostral begrenzt vom Chiasma opticum, kaudal begrenzt von den Corpora mamillaria, dorsal von der Commissura anterior und lateral vom Archicortex. Die Nebennieren wurden in gefrorenem Zustand am Kryostat bei -20°C in 16 µm dünne Scheiben geschnitten, auf einen Objektträger, der zuvor mit 70% Ethanol überschichtet wurde, aufgezogen und bei -80°C gelagert.

2.2 Glukosemessung

Die Glukose im Plasma wurde mit einem Standard-Blutzuckermessgerät (Glucorometer Elite XL) bestimmt. Die Messung erfolgte elektrochemisch: die Glukose in der Probe reagiert mit der Glukoseoxidase, die sich auf der Elektrode des Sensors befindet. Dadurch werden Elektronen generiert, die einen Strom produzieren, der proportional zur Glukose in der Probe ist. Das Blutzuckermessgerät misst den produzierten Strom.

2.3 Hormonbestimmung mittels Radio-Immuno-Assay (RIA)

2.3.1 Prinzip des RIA

Der kompetitive Radio-Immuno-Assay nutzt die Antigen-Antikörper-Reaktion in Lösung. Zu einer unbekannten Menge Insulin/Leptin/Orexin A/Kortikosteron, dem unmarkierten Antigen, wird eine bekannte Menge an radioaktiv markiertem Antigen (^{125}I), der Tracer und ein spezifischer Antikörper im Überschuss gegeben. Dabei konkurrieren markiertes und unmarkiertes Antigen um die Antikörperbindungsstellen. Bei steigender Konzentration der Proben wird das markierte Antigen durch das unmarkierte ersetzt. Die Verdrängung kann durch bekannte Antigenmengen kalibriert werden. Nach dem Ausfällen der Antigen-Antikörper-Komplexe durch Zugabe eines Doppelantikörpers, Zentrifugation und Verwerfung des Überstandes wird die Radioaktivität im Gamma-Zähler gemessen, die Quantifizierung erfolgt über eine Standardkurve. Entsprechend dem Testprinzip ist die Menge Insulin/Leptin/Orexin A/Kortikosteron umgekehrt proportional zur gemessenen Radioaktivität.

2.3.2 Durchführung des RIA

Die Hormone Insulin und Leptin wurden mit dem Rat Insulin/Leptin RIA Kit (Linco, St. Charles, USA), Kortikosteron mit dem Rat Kortikosteron Kit (ICN Biomedicals, Eschwege) bestimmt. Das Neuropeptid Orexin A wurde mit dem RIA Kit (Peninsula Laboratories, San Carlos, USA) bestimmt (Jöhren et al., 2001).

2.3.2.1 *Insulin- RIA*

In Doppelbestimmung wurde für NSB 200 µl Puffer und für Bo 100 µl Puffer in RIA-Röhrchen angesetzt. Je 100 µl Probe, Kontrolle und Standard wurden ebenfalls in Doppelbestimmung mit 100 µl Tracer und 100 µl Antikörper versetzt, gemischt und 24 h bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden zur Ausfällung der Antigen-Antikörper-Komplexe die Proben mit 1 ml des präzipitierenden Doppelantikörpers (Ziege-Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin) versetzt, gemischt, für 20 min bei 4 °C inkubiert und dann für 20 min in einer Minifuge RF (Heraeus, Hanau) zentrifugiert (4 °C, 2500 g). Der Überstand wurde abgesaugt und die Radioaktivität des Niederschlages in den RIA-Röhrchen mit einem Gamma-Zähler bei einer Zählzeit von 5 min gemessen (Tab. 1).

	TC	NSB	Bo	Standards	Proben	Kontrollen
<u>RIA-Puffer</u>	---	200	100	---	---	---
Standards	---	---	---	100	---	---
Proben	---	---	---	---	100	---
Kontrollen	---	---	---	---	---	100
Tracer	100	100	100	100	100	100
Antikörper	---	---	100	100	100	100
24 h bei 4 °C inkubieren						
<u>Doppelantikörper</u>	---	1000	1000	1000	1000	1000
20 min bei 4 °C inkubieren						
20 min zentrifugieren (4 °C, 2000-3000 g),absaugen						

Tabelle 1: Pipettierschema für den Insulin-RIA (alle Mengenangaben in µl)

2.3.2.2 *Leptin- RIA*

Zur Bestimmung von Leptin wurde in ähnlicher Weise vorgegangen (Tabelle 2.2). Hier wurden zunächst in Doppelbestimmung für NSB 300 µl Puffer, für Bo 200 µl Puffer und für die Standards, Proben und Kontrollen je 100 µl Puffer in RIA-Röhrchen vorgelegt. Je 100 µl Probe, Standard und Kontrolle wurden hinzupipettiert und mit 100 µl Antikörper versetzt. Dieser Ansatz wurde gemischt und 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl des

Tracers (^{125}I -Insulin) dazugegeben, die Proben wurden gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am dritten Tag wurden die Proben mit 1 ml des präzipitierenden Doppelantikörpers (Ziege-Anti-Meerschweinchen-Gammaglobulin) versetzt, gemischt, für 20 min bei 4°C inkubiert, für 20 min zentrifugiert (4°C, 2500 g), der Überstand wurde abgesaugt und die Radioaktivität des Niederschlages in den RIA-Röhrchen im Gamma-Zähler bei einer Zählzeit von 5 min gemessen (Tab. 2).

	TC	NSB	Bo	Standards	Proben	Kontrollen
RIA-Puffer	---	300	200	100	100	100
Standards	---	---	---	100	---	---
Proben	---	---	---	---	100	---
Kontrollen	---	---	---	---	---	100
Antikörper	---	---	100	100	100	100
24 h bei Raumtemperatur inkubieren						
Tracer	100	100	100	100	100	100
24 h bei Raumtemperatur inkubieren						
Doppelantikörper	---	1000	1000	1000	1000	1000
20 min bei 4°C inkubieren						
20 min zentrifugieren (4°C, 2000-3000 g), absaugen						

Tabelle 2: Pipettierschema für den Leptin-RIA (alle Mengenangaben in µl).

2.3.2.3 *Orexin A-RIA*

Zunächst wurden zur Peptidextraktion 1 ml Plasma und 1 ml 1% TFA gemischt, 15 min bei 4°C bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand wurde auf Isolute-Säulen gegeben. Danach wurden nacheinander Eluent (60% ACN, 1% TFA), Puffer und 1% TFA auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde über Nacht lyophilisiert und für den RIA in 100µl RIA-Puffer aufgenommen. In Doppelbestimmung wurde für NSB 80 µl Puffer und für Bo 40 µl Puffer in den RIA-Röhrchen angesetzt. Es wurden je 40 µl Probe, Kontrolle und Standard ebenfalls in Doppelbestimmung mit 40 µl Tracer und 40 µl Antikörper versetzt, gemischt und 24 h bei 4°C inkubiert. Dann wurden 40 µl des Tracers (^{125}I -Orexin A) dazugegeben, die Proben gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten

Tag wurden 80 µl des präzipitierenden Doppelantikörpers versetzt, gemischt und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde zu den Proben 200 µl RIA-Puffer gegeben, gemischt und für 20 min bei 4°C mit 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, und die Radioaktivität des Niederschlages in den RIA-Röhrchen im Gamma-Zähler gemessen (Tab. 3).

	TC	NSB	Bo	Standards	Proben	Kontrollen
RIA-Puffer	---	80	40	40	40	40
Standards	---	---	---	40	---	---
Proben	---	---	---	---	40	---
Kontrollen	---	---	---	---	---	40
Antikörper	---	---	40	40	40	40
24 h bei 4°C inkubieren						
Tracer	40	40	40	40	40	40
24 h bei 4°C inkubieren						
Doppelantikörper	---	80	80	80	80	80
90 min bei Raumtemperatur inkubieren						
RIA-Puffer	---	200	200	200	200	200
20 min zentrifugieren (4°C, 2000-3000 g), absaugen						

Tabelle 3: Pipettierschema für den Orexin-RIA (alle Mengenangaben in µl)

2.3.2.4 Kortikosteron-RIA

Das Plasma wurde 1:200 verdünnt eingesetzt. In Doppelbestimmung wurde in mit Antikörpern (Cortisol-Antiserum (Kanninchen)) beschichtete Röhrchen je 25 µl Probe, Kontrolle und Standard gegeben, mit 500 µl Tracer versetzt, gemischt und 45 min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Radioaktivität in den Röhrchen jeweils 1 min mit einem Gamma-Zähler gemessen (Tab. 4). Die Intra- und Interassay-Varianz lag unter 6% bzw. 10%.

	TC	Standards	Proben	Kontrollen
Standards	---	25	---	---
Proben	---	---	25	---
Kontrollen	---	---	---	25
Tracer	500	500	500	500
45 min bei 37 °C inkubieren, dekantieren				

Tabelle 4: Pipettierschema für den Kortikosteron-RIA (alle Mengenangaben in µl)

2.4 RT-PCR

2.4.1 mRNA-Isolierung

Die Extraktion der mRNA erfolgte mit einem Extraktionskit (RNeasy-Kit, Qiagen, Hilden). Die Gewebe wurden in 600 µl Lyse-Puffer homogenisiert. Anschließend wurde die Probe mit 70% Ethanol versetzt, um die Bindung der RNA an die Silicagelmatrix-Membran zu ermöglichen. Die Säule wurde mit der Probe beladen und für 15 s bei 8000 g in einer Zentrifuge zentrifugiert. Dann wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer 15 s bei 8000 g gewaschen, mit 80 µl DNase (10 µl DNase und 70 µl DNase-Puffer) für 15 min bei 20°C inkubiert, erneut mit 350 µl RW1-Puffer 15 s bei 8000 g gewaschen, mit 500 µl RPE-Puffer 15 s bei 8000 g gewaschen, erneut mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und 2 min bei Maximalgeschwindigkeit der Zentrifuge getrocknet. Die in der Silicagelmatrix-Membran enthaltene RNA wurde mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Zur quantitativen Bestimmung wurde die mRNA 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Die Bestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum für RNA, und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum für aromatische Aminosäuren, der Quotient (260 nm/280 nm) wurde gebildet. Lag der Quotient zwischen 1,8 und 2,0, wurde dies als Reinheit der Proben gewertet.

2.4.2 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA erfolgte mittels eines kommerziellen Kits (Reverse Transkriptase System, Firma Promega, Mannheim). Die für die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) verwendete Menge Gesamt-RNA (1 µg)

wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 19,5 µl eingestellt, während 10 min bei 70°C im Thermocycler linearisiert und in einem Eisbad abgekühlt. Dann wurde in Anwesenheit von 4 µl Desoxyribonukleotid-Gemisch, 2 µl Oligo-(Desoxythymidin)–Primer (0,5 µg/ml), 1 µl RNase Inhibitor (40 units/µl), 1,5 µl AMV-Reverse-Transkriptase (20 units/µl), 4 µl Reverse–Transkriptase–Puffer und 4 µl MgCl (50 mM) aus 2 µg mRNA 40 µl cDNA im Thermocycler hergestellt. Hierzu wurde die Probe zunächst 15 min auf 42°C erhitzt, dann wurde zur Inaktivierung der AMV-Reverse-Transkriptase die Temperatur 5 min auf 99°C erhöht.

2.4.3 Quantitative „rael-time“ PCR

2.4.3.1 Prinzip der PCR

Die PCR ist ein Verfahren, welches die enzymatische Amplifikation von DNA ermöglicht. Mit der „rael-time“ PCR wird das Reaktionsprodukt jeder Probe nach jedem Zyklus quantitativ bestimmt und somit eine Quantifizierung der Ausgangsmengen an mRNA möglich (Gibson et al., 1996; Bustin, 2002). Bei den herkömmlichen PCR-Methoden findet lediglich eine Endpunktanalyse statt. Bei der „rael-time“ PCR wird das Signal des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green-I nach jedem Zyklus quantifiziert, welcher eine sehr sensitive Detektion ermöglicht (Higuchi et al., 1992; Morrison et al., 1998). Die Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffes ist direkt proportional zur Menge des PCR-Produktes. SYBR-Green-I interkaliert unspezifisch in Doppelstrang-DNA, wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm. Die Datenanalyse einschließlich der Berechnung der Standardkurven und der Kopienzahl wird automatisch mit der Software des Gene-Amp-5700-Sequence Detection-System durchgeführt.

2.4.3.2 Primer

Die Primer wurden mit Hilfe der Primer 3 Software (S. Rozen und H.J. Skaletsky, http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.htm) auf Basis der

veröffentlichen Gen-Bank-Sequenzen des NCBI (Bethesda, U.S.A.) konstruiert und von der Fa. Life Technologies (Karlsruhe) synthetisiert (Tab. 5).

Name	Orientierung	Sequenz	GeneBank Nr.	Primerposition im Gen		PCR-Produkt (in bp)
				5'-Ende	3'-Ende	
PPO	sense	5'- GCCGTCTCTACGAACTGTTG- 3'	AF041241 ¹	227	246	303
	antisense	5'- CGAGGAGAGGGGAAAGTTAG- 3'		510	529	
OX₁	sense	5'- CCCTCAACTCCAGTCCTAGC- 3'	AF041244 ¹	1910	1929	260
	antisense	5'- CAGGGAGGGCCTATAATTGA- 3'		2150	2169	
OX₂	sense	5'- CAATGTTGTTGGGGTGCTTA- 3'	AF041246 ¹	1834	1859	314
	antisense	5'- TCCCCCTCTCATAAACTTGG- 3'		2128	2147	
GAPDH	sense	5'- CTCCCTCAAGATTGTCAGCA- 3'	NM017008 ²	450	469	249
	antisense	5'- GTTCTAGCTCTGGGATGACCT- 3'		699	718	

Tabelle 5 : ¹ Sakurai et al., 1998, ² Tso et al., 1985

2.4.3.3 Reaktionsbedingungen

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gel-Elektrophorese. Dazu wurde ein 2% Agarosegel (Agarose aufgekocht in 1x TAE-Puffer) hergestellt. Die DNA wurde durch Gabe von Ethidiumbromid (2 µl/100 ml) gefärbt. Optimiert wurden die MgCl₂-Konzentrationen und die Annealing-Temperatur. Die PCR wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz mit Komponenten aus dem SYBR-Green-I-Reaction-System (Eureogentec SA, Seraing, Belgien) durchgeführt. In

Dreifachbestimmung wurden zu 2 µl des cDNA-Reaktionsansatzes 5 µl PCR-Puffer, 4 µl dNTP-Gemisch, 0,25 µl Hot Gold-Star-Enzym, 1,5 µl Sybr Green (1/2000), 1,5 µl sense und antisense Primer (10 pmol/µl) und Primerpaar-abhängige MgCl₂-Konzentration (1,0-5,0 mM) hinzugegeben und mit DEPC auf 50 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde DEPC eingesetzt. Die PCR wurde auf einem Gene-Amp-5700 durchgeführt. Nach zehnminütiger Denaturierung bei 95°C wurde die cDNA während 40 Zyklen amplifiziert. Jeder Zyklus beinhaltete die Denaturierung bei 95°C für 15 sec, das Primer-Annealing bei 56°C bzw. bei 60°C für 30 sec und die Primer-Extension bei 60°C für 30 sec (Tab. 6).

Name	Annealing	MgCl ₂ -Konzentration
<i>OX₁</i>	58°C, 30 sec	3,0 mM
<i>OX₂</i>	60°C, 30 sec	5,0 mM
<i>PPO</i>	58°C, 30 sec	1,0 mM
<i>GAPDH</i>	60°C, 30 sec	3,0 mM

Tabelle 6: Annealing

2.4.4 Quantifizierung und Spezifität der mRNA-Kopien

Die Quantifizierung der PPO-, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Kopien erfolgte mit der Zyklus-Schwellenwert-Methode (Higuchi et al., 1993). Hierzu wurden Verdünnungsreihen (10³–10⁷) bekannter Mengen klonierter PPO-, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA-Fragmente zur Erstellung der Standardkurve genutzt. Die Schwellenwert-Zyklusanzahl (C_t) wurde für jede Probe mit der Gene-Amp-5700-Sequence-Detection-System Software bei einem Fluoreszenz-Schwellenwert von 0,3 (R_n), den alle Proben während 40 Zyklen überschritten, bestimmt und die entsprechende Zahl der mRNA-Kopien berechnet. Die Anzahl der PPO-, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Kopien der verschiedenen Versuchstiere wurde mit der Anzahl der GAPDH mRNA-Kopien korrigiert und somit vergleichbar.

Die Spezifität der amplifizierten Präpro-Orexin-, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA wurde routinemässig durch DNA-Schmelzkurven-Analyse bestätigt. Durch die vollständige Integration der Schmelzkurven-Analyse in den Ablauf der „real-time“

PCR wird eine sichere und schnelle Differenzierung der PCR-Produkte ermöglicht (Ririe et al., 1997).

2.4.5 Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente

Zur Überprüfung der PCR-Produktspezifität wurde 15 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Ladepuffer versetzt und auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2% Agarosegel aufgetragen. Zur Beurteilung der Länge des amplifizierten DNA-Produktes wurde ein 100-bp-Längenmarker aufgetragen, außerdem wurde das Reaktionsprodukt der Negativkontrolle aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte mittels Elektrophorese bei einer Spannung von 10 V/cm Gellänge bei einer maximalen Stromstärke von 400 mA für 30 min in einer Gelkammer. Die Visualisierung der DNA erfolgte durch einen UV-Transilluminator. Die photographische Dokumentation erfolgte durch digitale Aufzeichnung mittels CCD-Kamera.

2.4.6 Restriktionsenzym-Analyse

Restriktionsenzyme sind in der Lage, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungsstellen zu binden und zu spalten. Die durch Verdau mit Restriktionsenzymen entstandenen Fragmente haben eine bestimmte Länge durch die Lage der Spaltstellen. Durch Gel-Elektrophorese werden sie ihrer Größe nach aufgetrennt und für jedes geschnittene DNA-Molekül ergibt sich im Gel ein typisches Bandenmuster aus Restriktionsfragmenten. Deren ungefähre Größe kann mit Hilfe eines Markers in Basenpaaren zugeordnet werden.

Die Restriktionsenzym-Analyse erfolgte mit spezifischen Endonukleasen von BioLabs (New England, USA). 30 µl des PCR-Produktes wurden mit 3 µl NEBuffer und 2 µl des Enzyms für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Für PPO wurde das Enzym Pvu II, für OX₁ und OX₂ das Enzym Alu I verwendet. Die Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und auf ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel aufgetragen. Nach 50-minütiger Elektrophorese (10 V/cm, maximale Stromstärke 400 mA) wurde das Gel mit einer CellCam photographisch aufgenommen.

2.5 In situ Hybridisierung

2.5.1 Allgemeines

Die in situ Hybridisierung ist eine Technik, mit der spezifische Nucleinsäuren-RNA direkt in fixierten Gewebepreparaten lokalisiert werden. Dazu werden Gewebeschnitte mit radioaktiv markierten Gensonden zusammengebracht. Stößt die Sonde im Gewebe auf das zu ihr passende aktivierte Gen, seine mRNA, heften sich die Moleküle aneinander und es kommt zur Hybridisierung. Über die Markierung der Sonde lässt sich die mRNA anschließend sichtbar machen.

2.5.2 Durchführung der in situ Hybridisierung

2.5.2.1 Hybridisierungssonde

Die Spezifität zu OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA der Antisenseoligonukleotide wurde vorher durch Hybridisierung gezeigt. Zur Verstärkung des Hybridisierungssignals wurden drei verschiedene Antisenseoligonukleotide, jeweils gegen verschiedene Regionen der jeweiligen mRNA gerichtet, gleichzeitig zur Detektion von Rezeptor mRNA genutzt (Trivedi et al., 1998). Die Sequenzen des OX₁-Rezeptor Antisenseoligonukleotids waren 5'-TCC TCA TAG TCT GGA GGC AGG TGG AAG TGG AAG GGT TCC CCA CTG CTA GTG-3', 5'-AAG GCT ATG AGA AAC ACG GCC ACG TAG GCC GCG ATG AGA ACC CAC-3' und 5'-TGC TGA GCT TCC AGT TGC TCT GAG GGT CGC TTC CAG TTC CGC ACC-3'. Die Sequenzen des OX₂-Rezeptor Antisenseoligonukleotids waren 5'-AGT TGC GAC GAG GGA GGG AAT CCT CCA ATT TGG TGC TGG ACA TCA-3', 5'-AGA GCC ACG ACG AAC ACG ATG ATA TAC CCT GCG ATC AGG ACC CAC-3' und 5'-CAA AGT TGC TGA TCT GAG TAG TCA GGG ACT TCC TGC TCT CTG TAC-3'. 10 Picomol eines jeden Antisenseoligonukleotids wurden zu einer spezifischen Aktivität von 10⁴ Ci/mmol durch Inkubation während 60 min bei 37°C mit 50 pmol ³³P-dATP und terminaler Desoxynukleotidyltransferase am 3'-Ende markiert. Die markierten Oligonukleotide wurden mit Sephadex G-25 Säulen aufgereinigt.

2.5.2.2 Vorbereitung der Schnitte

Zunächst wurden serielle Gefrierschnitte von 16 µm Dicke an einem Kryostat der zuvor mit „embedding matrix“ aufgefrorenen Nebennierenblöcke bei einer Kammertemperatur von –20°C angefertigt. Die gefrorenen Schnitte wurden auf Raumtemperatur gebracht und für 10 min in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Schnitte wurden zweimal 1 min mit 1X PBS gewaschen und es wurde 500 µl Essigsäureanhydrit in 200 ml TEA-Puffer für 10 min direkt auf die Schnitte gegeben. Es folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (eine Minute in 70% Ethanol, 2 min in 95% Ethanol und 1 min in 100% Ethanol), für 5 min in Chloroform, und erneut die Behandlung der Schnitte mit Ethanol (jeweils 1 min in 100% Ethanol und 1 min in 95% Ethanol). Anschließend wurden die Schnitte 45 min an der Luft getrocknet.

2.5.2.3 Hybridisierung

1 pmol (5 µl) markierte Oligonukleotidsonde wurde mit 20 µl RNA-Gemisch für 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 900 µl Hybridisierungs-Puffer, 60 µl 2,5 M DTT und 20 µl 10% SDS hinzugegeben, gemischt und kurz zentrifugiert. 200 µl dieses Hybridisierungs-Gemischs wurde auf den Objektträger gegeben, das dann mit einem Deckgläschen überdeckt wurde.

Die Hybridisierung erfolgte während 18 h bei 42°C in einer feuchten Kammer, um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern. Hierzu wurde der Boden der Kammer mit Whatman-Filterpapier ausgelegt, auf das 20 ml 50% Formamid/2X SSC gegeben wurde.

2.5.2.4 Posthybridisierungswaschungen

Das Deckgläschen wurden in 1X SSC-Pufferlösung abgespült. Anschließend wurde zur Entfernung überschüssiger Sonden der Objektträger zweimal 5 min in 1X SSC-Pufferlösung bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde 30 min in 1 X SSC bei 55°C, sowie 1 min in 1 X SSC und 1 min in 0,1 X SSC gewaschen. Zu 200 ml Waschpuffer wurden 200 µl 2,5 M DTT gegeben. Es folgte

die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 1 min mit 10 ml 6 M NH_4Ac in 200 ml 50%, 80% und 95% Ethanol und kurz in 100% Ethanol).

Die Schnitte wurden luftgetrocknet und unter einem Hyperfilm- ^3H für ein bis zwei Wochen in Anwesenheit von ^{14}C -Standards exponiert. Danach wurde der Film in der Dunkelkammer 4 min lang entwickelt, 30 s gewässert, 5 min fixiert und erneut 30 min gewässert. Die Aufnahme der autoradiographischen Abbildungen erfolgte auf einem Leuchttisch mit einer CCD-Kamera. Die Bilder wurden durch das digitale Bildverarbeitungsprogramm „scion image beta 4.0.2“ (Scion Image Software, NIH, Washington, USA) analysiert. Der Schwärzungsgrad stellte dabei ein relatives Maß für die Konzentration der detektierten mRNA dar. Die Hintergrunddichte wurde über alle Schnitte gemittelt und vom spezifischen Signal des einzelnen Schnitts subtrahiert.

Die Spezifität des Hybridisierungssignals wurde durch Hybridisierung des ^{33}P -markierten Antisenseoligonukleotids unter Anwesenheit von 100-fach unmarkiertem Oligonukleotid gezeigt.

2.6 Statistik

Die Ergebnisse der Versuche sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung vom Mittelwert, aus $n = 10$ Tiere, angegeben. Zur Untersuchung der Unterschiede zwischen den untersuchten genetischen Gruppen und der jeweiligen Kontrollgruppe wurde der t-Test nach Student eingesetzt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeiten sind folgendermaßen dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit (p):	< 0,05	< 0,01	< 0,001
Symbol:	*	**	***

2.7 Materialien und Geräte

^{14}C -Standards	American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, USA
CCD-Kamera	Phase GmbH, Lübeck
CellCam	Phase GmbH, Lübeck
Gamma-Zähler	LKB, München
Gelkammer	Bio-RAD, München
Gene-Amp-5700-Sequence Detection-System	PE Applied Biosystems Elmer, Weiterstadt
Glucorometer Elite XL	Bayer, Leverkusen
Hyperfilm- ^3H	Amersham, Freiburg
Isolute-Säulen	Fa. International Sorbent Technology, Hengoed, UK
Kryostat	Leica, Wetzlar
Objektträger	Sigma, Dreisenhofen
Photometer	Bio-RAD, München
Polypropylenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
RIA-Röhrchen	Greiner Bio-One AG, Frickenhausen
Sephadex G-25 Säulen	Amersham, Freiburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
UV-Transilluminator	Phase GmbH, Lübeck
Whatman-Filterpapier	Bio-RAD, München
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

2.8 Substanzen

Agarose	Gibco-Life Technologies, Eggenstein
Antisenseoligonukleotide	Gibco-Life Technologies, Eggenstein
β -Mercaptoethanol	Sigma, Dreisenhofen
Chloroform	Sigma, Dreisenhofen
Denhard's Solution	Sigma, Dreisenhofen
DEPC	Sigma, Dreisenhofen
Desoxynukleotidyltransferase	Amersham, Freiburg
DNase-Puffer	Promega, Heidelberg
dNTP mix	Promega, Heidelberg
DTT	Sigma, Dreisenhofen
EDTA	Merck, Darmstadt
„embedding matrix“	Lipshaw, Pittsburgh, PA, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Dreisenhofen
Essigsäureanhydrit	Sigma, Dreisenhofen
Formamid	Sigma, Dreisenhofen
100-bp-Längenmarker	Roche, Mannheim
NEBuffer	BioLabs, New England, USA
NTE-Puffer	Sigma, Dreisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma, Dreisenhofen
PBS	Apotheke, Universitätsklinikum Lübeck
³³ P-dATP	Amersham, Freiburg
RNase	Sigma, Dreisenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
Spezialnahrung Formulab Diet 5008	PMI Nutrition International, Nottingham, UK
SSC	Gibco-Life Technologies, Eggenstein
Standardfutter	Altromin, Lage
Streptozotocin	Sigma, Dreisenhofen
SYBR-Green-I	Eurogentec SA, Seraing, Belgien
Terminale Desoxynukleotidyltransferase	Amersham, Freiburg
TEA-Puffer	Sigma, Dreisenhofen
TFA	Sigma, Dreisenhofen

2.9 Puffer und Lösungen

DEPC	1l bidestilliertes H ₂ O wurde mit 1 ml DEPC-H ₂ O versetzt, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert
Desoxyribonukleotid-Gemisch	10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP
dNTP-Gemisch	2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP
Essigsäureanhydrit	3 ml TEA und 840 µl konzentrierte HCl wurden auf 200 ml H ₂ O-DEPC gegeben (wurde erst dazugegeben, als die Schnitte im Puffer waren)
Hybridisierungs-Puffer	200 µl 1 M Tris, pH 7,5, 5 ml Formamid, 600 µl 5 M NaCl, 20 µl 0,5 M EDTA, 200 µl 50 X Denhard's Sol., 2 ml 50% Dextran-Sulfat, 980 µl H ₂ O-DEPC
Ladepuffer	600 µl Glycerol, 1200 µl DEPC-H ₂ O, 200 µl 2,5% Xylen-Cyanol in DEPC
NEBuffer	50 mM NaCl, 10 mM Tris HCl, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, pH 7,9 bei 25°C
NTE-Puffer	20 ml 5 M NaCl, 2 ml 1 M Tris, pH 8,0 und 400 µl 0,5 M EDTA in 200 ml H ₂ O.
PCR-Puffer	1,4 ml KCl, 1,4 ml HCl
Reverse-Transkriptase-Puffer	10mM Tris HCl, 50 mM KCl, 0,1% Triton X-100
RNA-Gemisch	Salmon Testes DNA (Sigma, 10 mg/ml) und Hefe tRNA (GibcoBRL, 25 mg/ml) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt
TAE-Puffer	400 mM Tris-Acetat und 10 mM EDTA mit einem pH von 8,3 bei 22°C

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Tiermodelle

Zur Charakterisierung der mit Streptozotocin behandelten Ratten, der ZDF-Ratten und der Zucker-Ratten wurden Körpergewicht sowie die Plasma Glukose-, Insulin-, Leptin- und Kortikosteronkonzentrationen bestimmt und mit den Werten der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen.

3.1.1 Körpergewicht

Die Kontrolltiere wogen im Mittel 347 g (STZ), 365 g (ZDF) und 337 g (Zucker). Die mit Streptozotocin behandelten Ratten hatten 15 Tage nach der Behandlung ein um 12% niedrigeres Körpergewicht als die unbehandelten Ratten der Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen den ZDF-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied. Das Körpergewicht der adipösen Zucker-Ratten war gegenüber der Kontrollgruppe um 48% erhöht (Abb. 3).

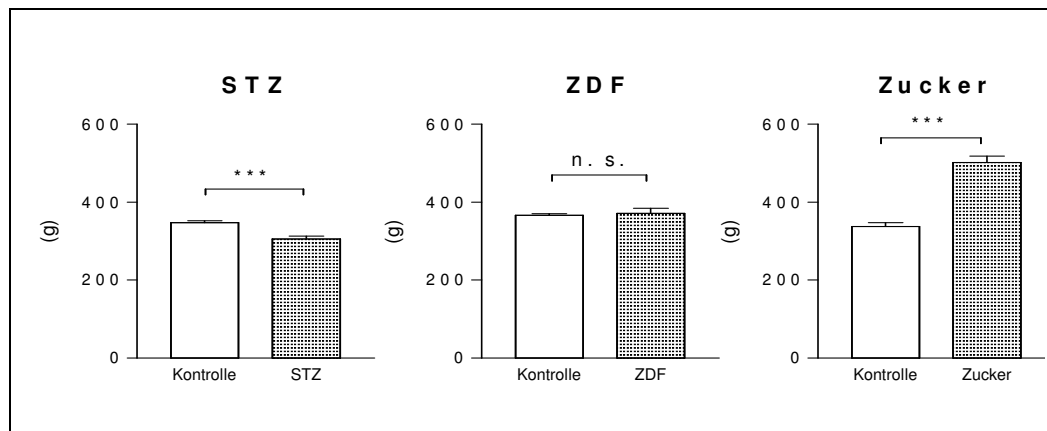


Abb. 3: Vergleich des Körpergewichts der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu dem der jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.1.2 Plasma Glukosekonzentration

In dem nach der Dekapitation gewonnenem Plasma wurde die Glukosekonzentration bestimmt. Die Plasma Glukosekonzentrationen der Kontrolltiere betrugen im Mittel 156 mg/dl (STZ), 154 mg/dl (ZDF) und 142 mg/dl (Zucker). Die Plasma Glukosekonzentration der mit Streptozotocin behandelten Ratten war um 194% höher als die der Kontrollgruppe. Die Plasma Glukosekonzentration der ZDF-Ratten war im Vergleich zu der Kontrollgruppe um 219% erhöht. Bei den Zucker-Ratten war der Glukosewert gegenüber den Ratten der Kontrollgruppe nur um etwa 10% erhöht (Abb. 4).

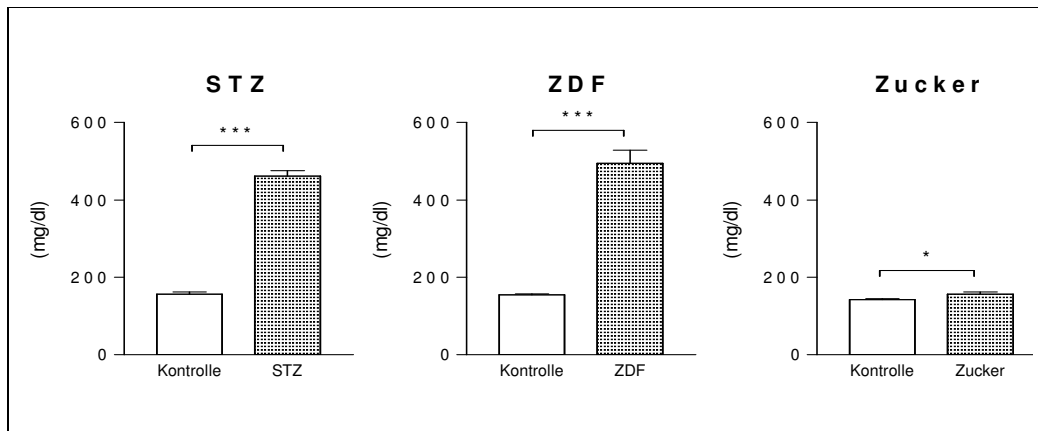


Abb. 4: Vergleich der Glukosekonzentrationen im Plasma der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.1.3 Plasma Insulinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung des Hormons Insulin erfolgte mittels RIA aus dem nach der Dekapitation gewonnenem Plasma. Im Mittel betrugen die Plasma Insulinkonzentrationen der Kontrolltiere 2,5 ng/ml (STZ), 2,3 ng/ml (ZDF) und 2,1 ng/ml (Zucker). Die Plasma Insulinkonzentration der mit Streptozotocin behandelten Ratten war um 90% gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt. Zwischen den ZDF-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe bestand ein kleiner aber signifikanter Unterschied. Die Zucker-Ratten hatten verglichen mit den Ratten der Kontrollgruppe einen um 575% erhöhten Insulinwert (Abb. 5).

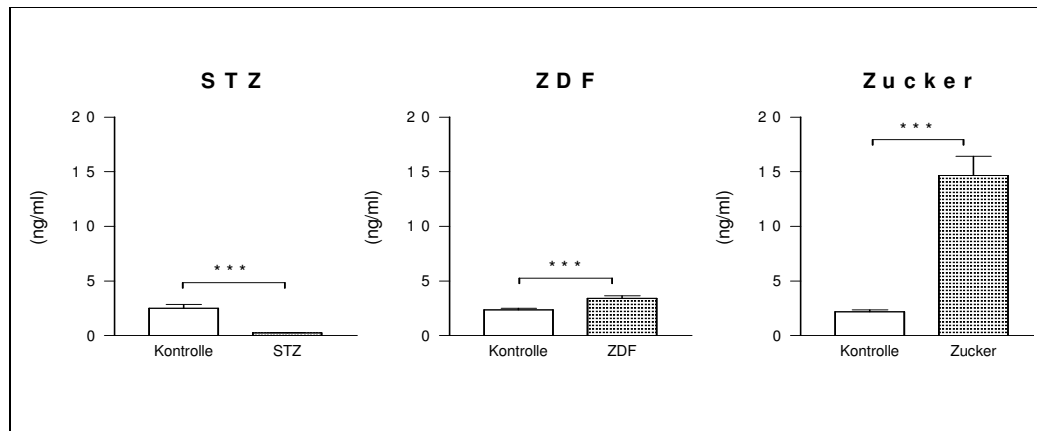


Abb. 5: Vergleich der Insulinkonzentrationen im Plasma der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.1.4 Plasma Leptinkonzentration

Die Konzentration des Hormons Leptin wurde mittels RIA aus dem nach der Dekapitation gewonnenen Plasma bestimmt. Die Plasma Leptinkonzentrationen der Kontrolltiere lagen im Mittel bei 4,2 ng/ml (STZ), 4,6 ng/ml (ZDF) und 4,1 ng/ml (Zucker). Die Plasma Leptinkonzentration lag bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten unterhalb der Nachweisgrenze. Die Leptinkonzentration im Plasma der ZDF-Ratten war gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe um 295% erhöht. Die Zucker-Ratten hatten gegenüber der Kontrollgruppe eine um 2054% erhöhte Plasma Leptinkonzentration (Abb. 6).

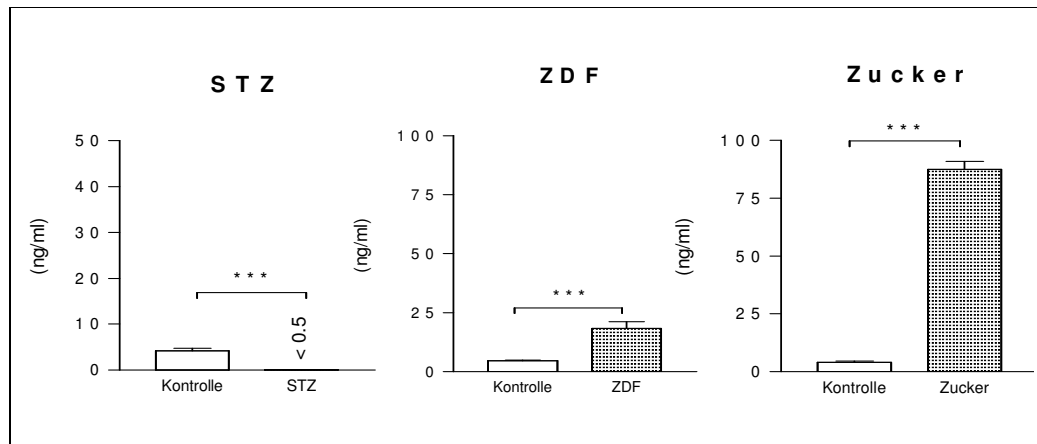


Abb. 6: Vergleich der Leptinkonzentrationen im Plasma der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.1.5 Plasma Kortikosteronkonzentration

Die Kortikosteronkonzentration des nach Dekapitation gewonnenen Plasmas wurde mittels RIA bestimmt. Die Konzentrationen des Hormons Kortikosteron im Plasma der Kontrolltiere betrugen im Mittel 288 pg/ml (STZ), 209 pg/ml (ZDF) und 111 pg/ml (Zucker). Die Kortikosteronkonzentration im Plasma der mit Streptozotocin behandelten Ratten war um 100% gegenüber der von den Tieren der Kontrollgruppe erhöht. Der Vergleich der Plasma Kortikosteronkonzentration zwischen den ZDF-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe sowie zwischen den Zucker-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 7).

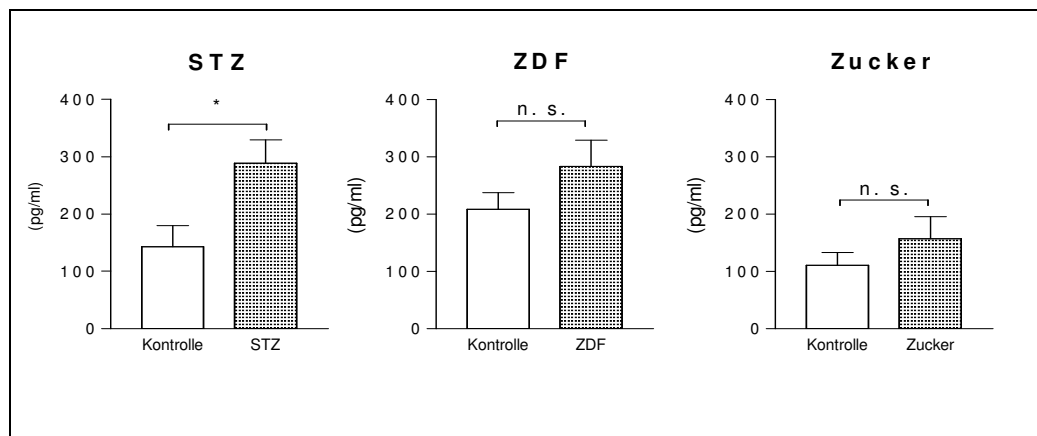


Abb. 7: Vergleich der Kortikosteronkonzentration im Plasma der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert $\pm$ SEM; $n = 10$).

3.2 Nachweis des Orexin Systems in den Tiermodellen

3.2.1 Plasma Orexin A Konzentrationen

Die Konzentration des Neuropeptids Orexin A im Plasma wurde mittels RIA bestimmt. Die Plasma Orexin A Konzentrationen der Kontrolltiere lagen im Mittel bei 39 pg/ml (STZ), 55 pg/ml (ZDF) und 59 pg/ml (Zucker). Der Vergleich der Orexin A Konzentrationen zwischen den mit Streptozotocin behandelten Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe ergab keinen statistisch signifikanten

Unterschied. Die Plasmakonzentration des Orexin A war sowohl bei den ZDF-Ratten als auch bei den Zucker-Ratten gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe um 15% erniedrigt (Abb.8).

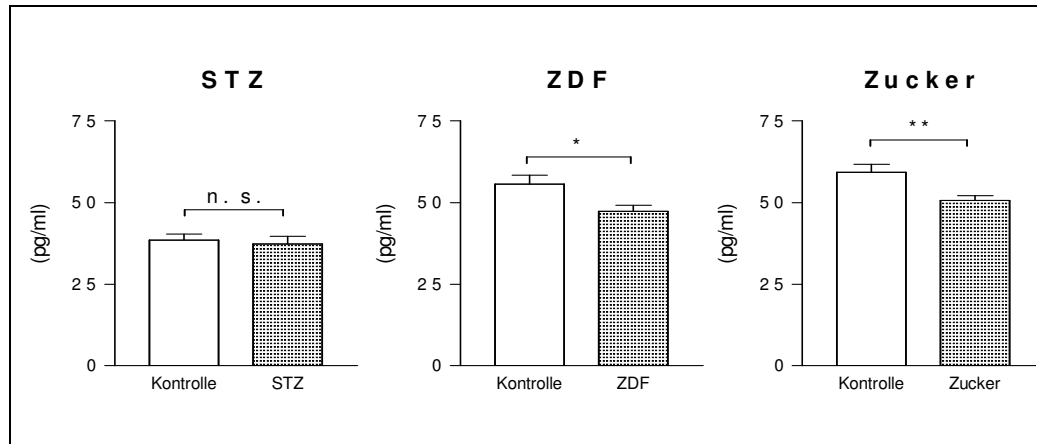


Abb. 8: Vergleich der Orexin A- Konzentrationen im Plasma der mit Streptozotocin (STZ) behandelten Ratten, der diabetischen ZDF-Ratten (ZDF) und der adipösen Zucker-Ratten (Zucker) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.2.2. Nachweis der PPO sowie der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA

Mittels „real-time“ PCR wurden einzelne cDNA-Fragmente der erwarteten Größe in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere amplifiziert. OX_1 -Rezeptor mRNA spezifische DNA Fragmente von 260 bp wurden im Hypothalamus, der Hypophyse und den Nebennieren mittels „real-time“ PCR amplifiziert. In diesen Organen wurden auch OX_2 -Rezeptor mRNA spezifische DNA-Fragmente von 314 bp amplifiziert. Die PCR für Präpro-Orexin mRNA ergab die Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten von 303 Basenpaaren im Hypothalamus. Kontrollen, bei denen in der PCR die cDNA Proben durch H_2O ersetzt wurden, liefen parallel zu allen Versuchen. Der fehlende gelelektrophoretische Nachweis von Banden wurde als Zeichen der Reinheit der Proben gewertet. cDNA Kontaminationen konnten damit ausgeschlossen werden (Abb. 9, 10, 11).

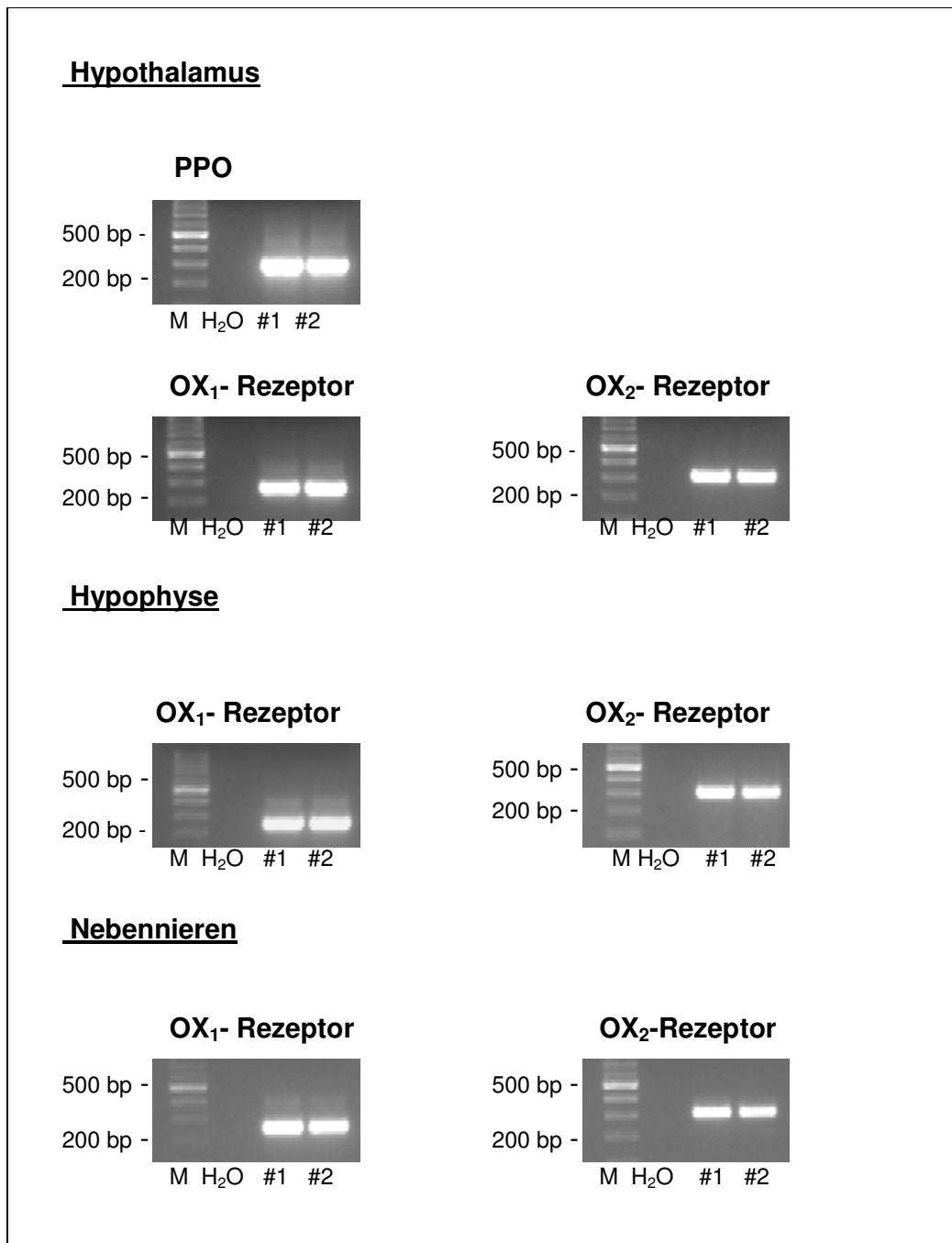


Abb. 9: Agarosegel-Analyse der amplifizierten OX₁-, OX₂-Rezeptor und Präpro-Orexin cDNA-Fragmente im Hypothalamus (A), in der Hypophyse (B) und in den Nebennieren (C) der mit Streptozotocin behandelten Ratten (#1) und der Ratten der Kontrollgruppe (#2).

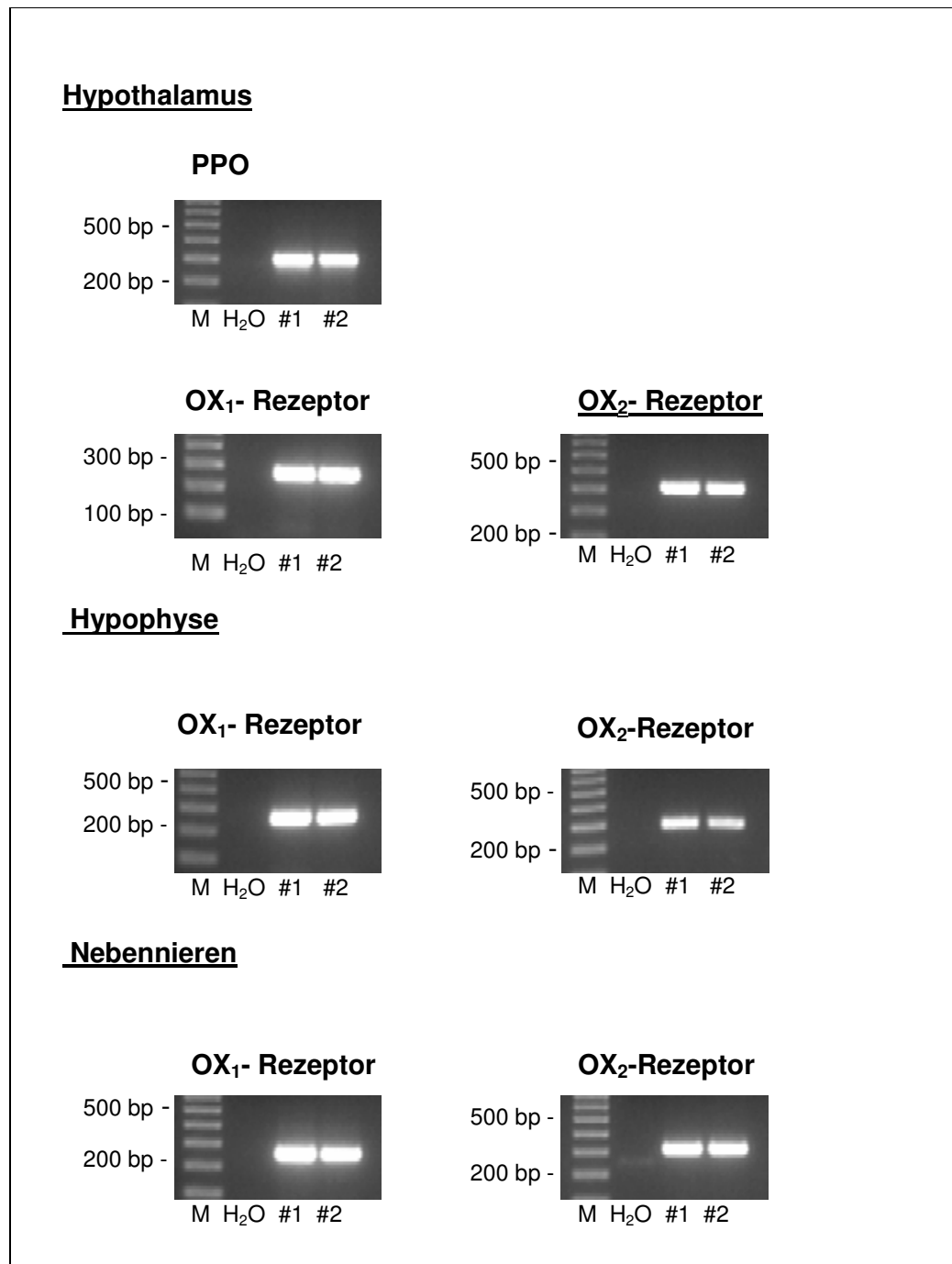


Abb. 10: Agarosegel-Analyse der amplifizierten OX₁-, OX₂- Rezeptor und Präpro-Orexin cDNA Fragmente im Hypothalamus (A), in der Hypophyse (B) und in den Nebennieren (C) der ZDF-Ratten (#1) und der Kontrollgruppe (#2).

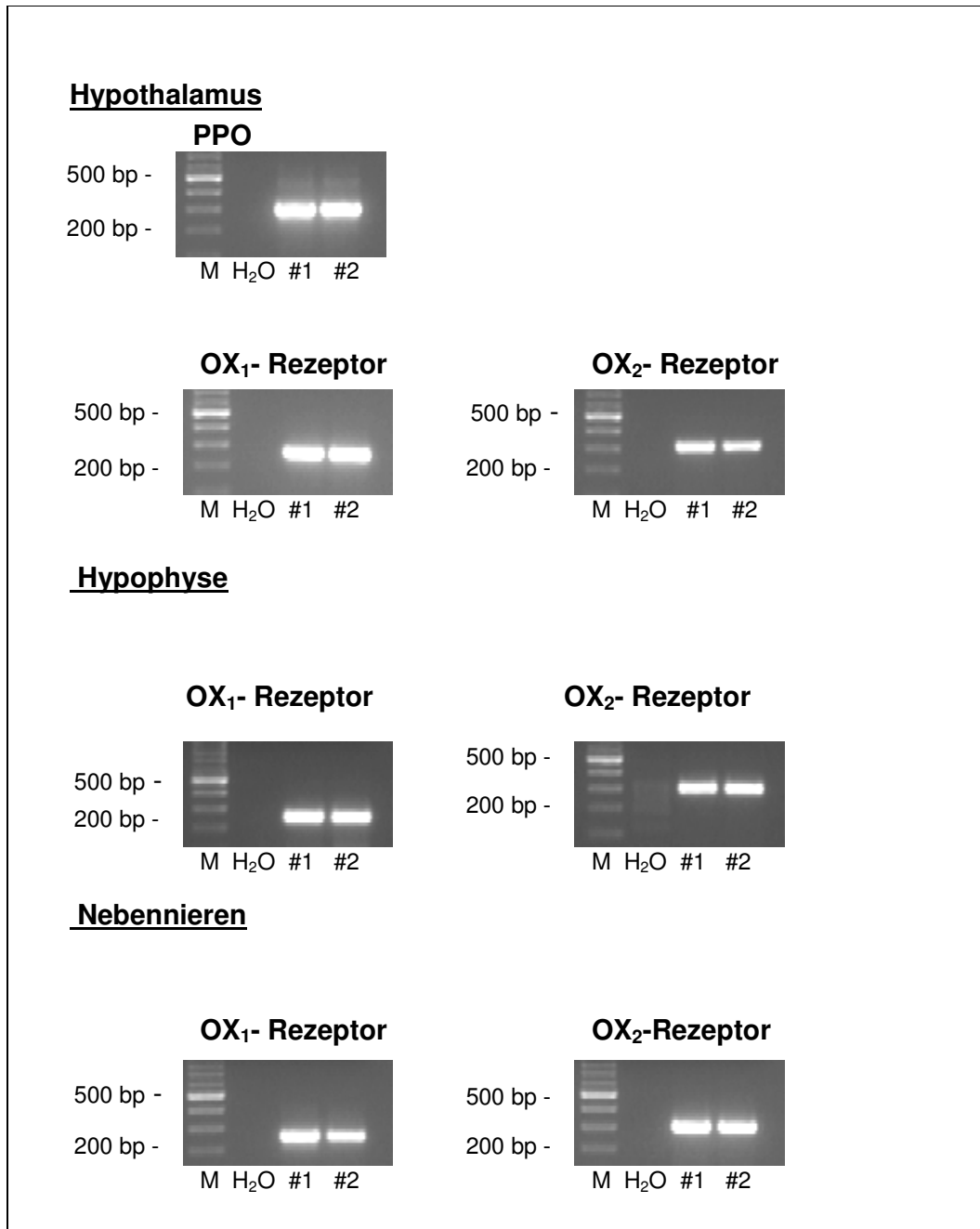


Abb. 11: Agarosegel-Analyse der amplifizierten OX₁-, OX₂-Rezeptor und Präpro-Orexin cDNA Fragmente im Hypothalamus (A), in der Hypophyse (B) und in den Nebennieren (C) der Zucker-Ratten (#1) und der Ratten der Kontrollgruppe (#2).

3.2.3 Spezifität der PCR (Schmelzkurven- und Restriktionsanalyse)

Die Spezifität der amplifizierten Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA-Fragmente wurde routinemäßig durch eine DNA-Schmelzkurvenanalyse bestätigt

(Abb.12). Der sprunghafte Abfall des Fluoreszenzsignals während der Denaturierung dieser verschiedenen cDNA Fragmente liegt bei einer für das jeweilige Fragment spezifischen Temperatur - für das Präpro-Orexin bei einer Temperatur von etwa 93°C, für den OX₁- Rezeptor bei einer Temperatur von etwa 88°C und für den OX₂- Rezeptor bei einer Temperatur von etwa 82°C. Der fehlende Nachweis von Fluoreszenzsignalen bei anderen Temperaturen wurde als Zeichen der Reinheit der Proben gewertet.

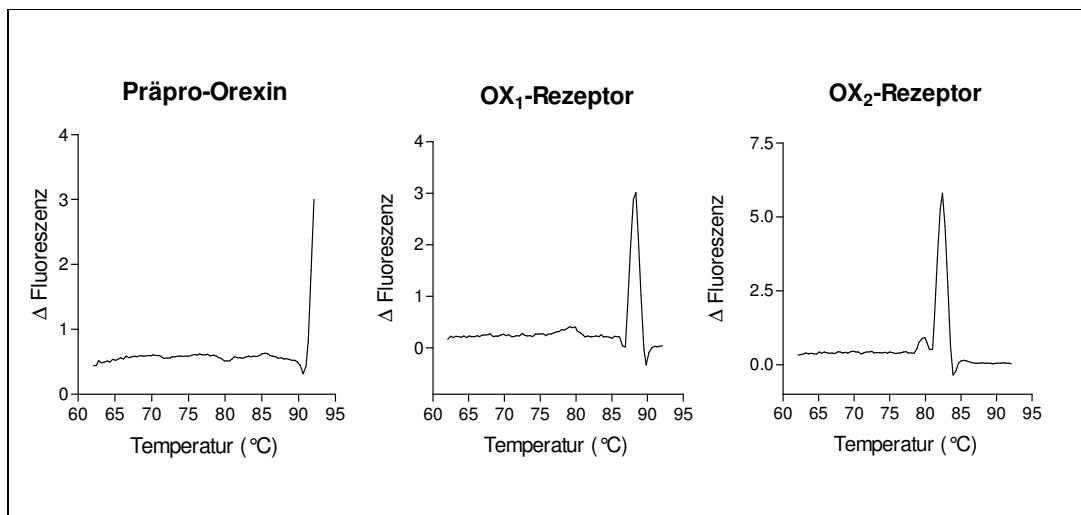


Abb. 12: Schmelzkurvenanalyse der amplifizierten Präpro-Orexin-, OX₁-, OX₂-Rezeptor cDNA-Fragmente.

Außerdem wurde die Spezifität der „real-time“ PCR in ausgewählten PCR-Proben durch Restriktionsverdau überprüft. Die Restriktionsenzyme schneiden das PCR-Produkt an spezifischen Stellen, so dass die Größe der entstehenden Fragmente mittels Gelelektrophorese überprüft werden kann.

Der Verdau der aus dem Hypothalamus amplifizierten Präpro-Orexin cDNA mit Pvu II ergab zwei cDNA-Fragmente, die den erwarteten Größen von 136 bp und 167 bp entsprachen (Abb. 13). Das OX₁-Rezeptor PCR-Produkt wurde durch Alu I dreimal geschnitten, wodurch vier Fragmente der erwarteten Größe von 20 bp, 51 bp, 59 bp und 130 bp entstanden. Das Produkt des OX₂-Rezeptors wurde ebenfalls durch Alu I geschnitten und ergab zwei Fragmente der erwarteten Größe von 89 bp und 225 bp (Abb. 13).

Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde in einer PCR die cDNA durch H₂O ersetzt. Das Fehlen von Banden nach der Gel-Elektrophorese wurde als Zeichen

der Abwesenheit möglicher kontaminierender PCR-Produkte in den Puffern, Enzymen und verwendeten Lösungen gewertet.

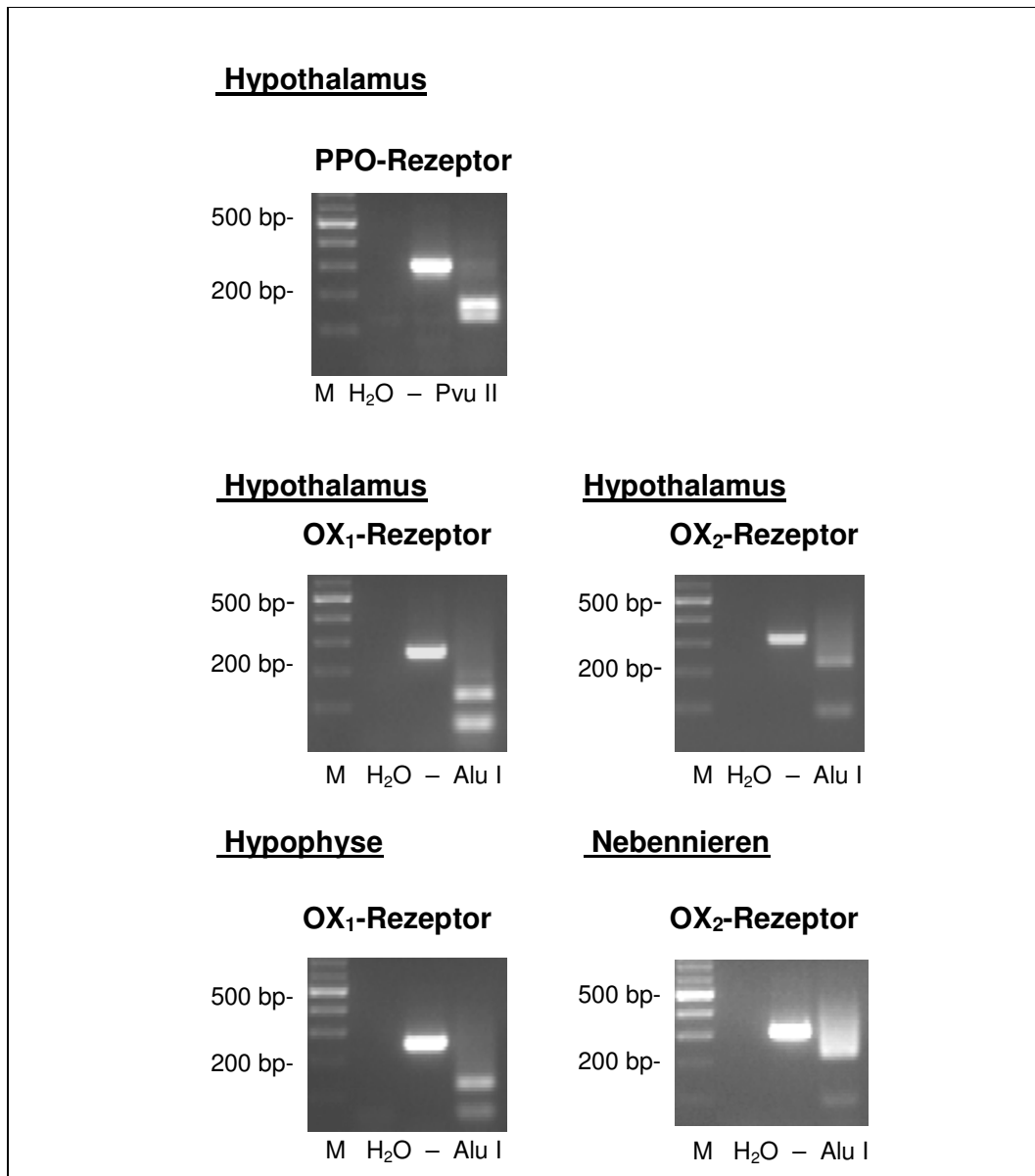


Abb. 13: Nachweis der Spezifität der „real-time“ PCR: Keine Bande ist bei der H₂O-Kontrolle nachweisbar. Die Restriktionsenzyme schneiden die DNA-Templates vollständig in die oben angegebenen Fragmente. Die 20 bp- und die 51 bp-großen Fragmente des OX₁-Rezeptors waren nach dem Verdau mit der Gel-Elektrophorese nicht darstellbar.

3.3 Quantitative Analyse der PPO sowie OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA

Die OX_1 -, OX_2 - und Präpro-Orexin mRNA-Mengen der mit Streptozotocin behandelten Ratten, der ZDF-Ratten und der Zucker-Ratten wurde mit den mRNA-Mengen der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen. Mittels „real-time“ PCR wurden die OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Mengen im Hypothalamus, in der Hypophyse und in den Nebennieren quantifiziert. Im Hypothalamus wurde außerdem noch die Präpro-Orexin mRNA-Menge bestimmt.

3.3.1 Quantitative „real-time“ PCR-Standardkurven

Die Amplifizierung bekannter Mengen klonierter Präpro-Orexin-, OX_1 - und OX_2 -Rezeptor cDNA war in der exponentiellen Phase der PCR über einen Bereich von 10^3 bis 10^6 Kopien möglich und zeigt die in Abbildung 14 erstellten Standardkurven. Die Quantifizierung der Präpro-Orexin, OX_1 - und OX_2 -Rezeptor cDNA-Kopien erfolgte mit der Zyklus-Schwellenwert-Methode.

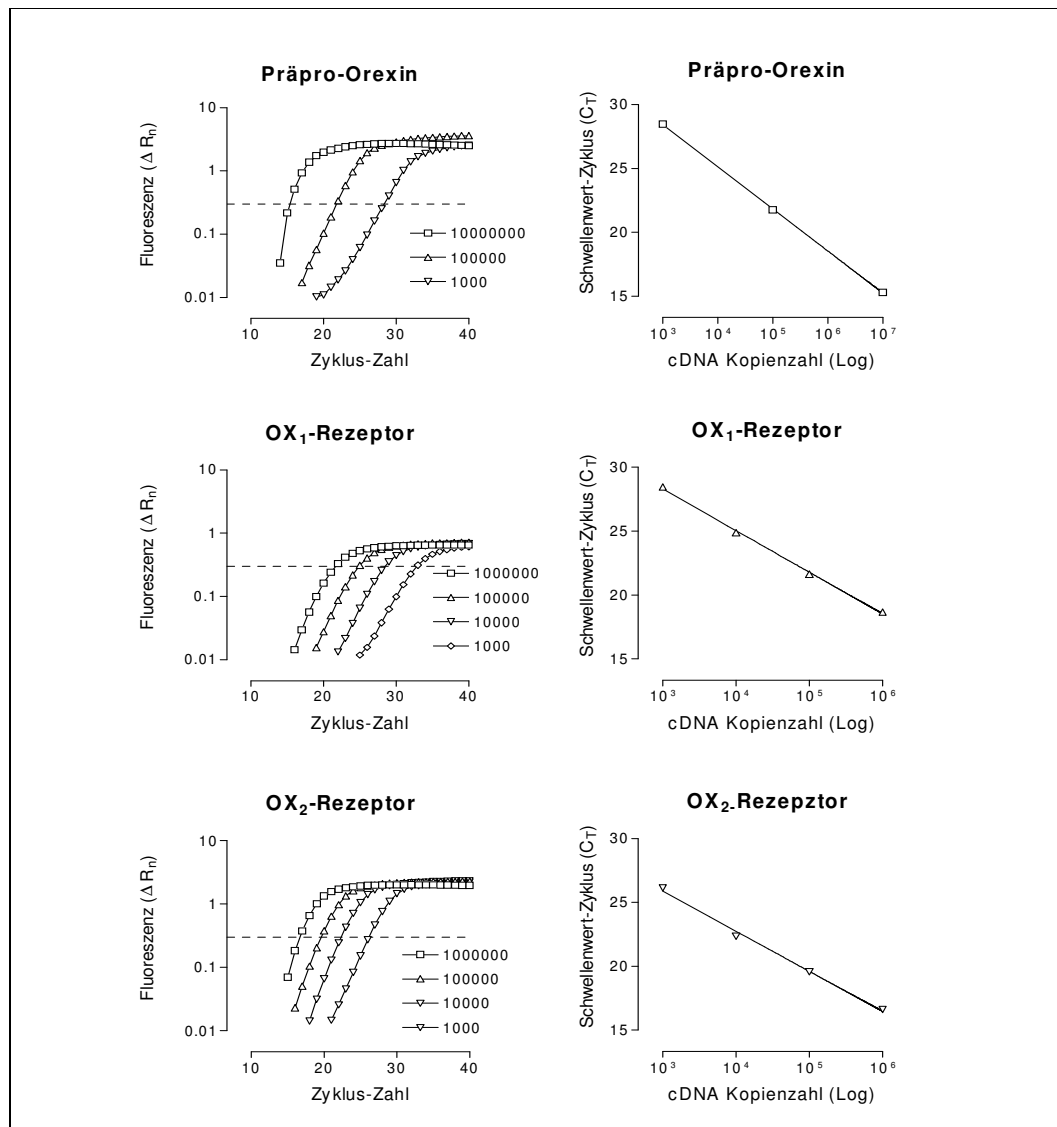


Abb. 14: Quantitative „real-time“ PCR: Amplifizierung unterschiedlicher Mengen klonierter Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA (angegeben ist die Anzahl der Kopien) und die daraus ermittelten Standard-Kurven.

3.3.2 Streptozotocin behandelte Ratten

Hypothalamus

Neben den hohen Mengen an OX₁-Rezeptor mRNA im Hypothalamus wurden moderate OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen und sehr hohe PPO mRNA-Mengen gefunden. Die PPO mRNA-Menge war statistisch signifikant um 38% im Hypothalamus der mit Streptozotocin behandelten Ratten erniedrigt. Im

Hypothalamus der mit Streptozotocin behandelten Ratten zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der OX_1 -, OX_2 -Rezeptor mRNA-Mengen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 15).

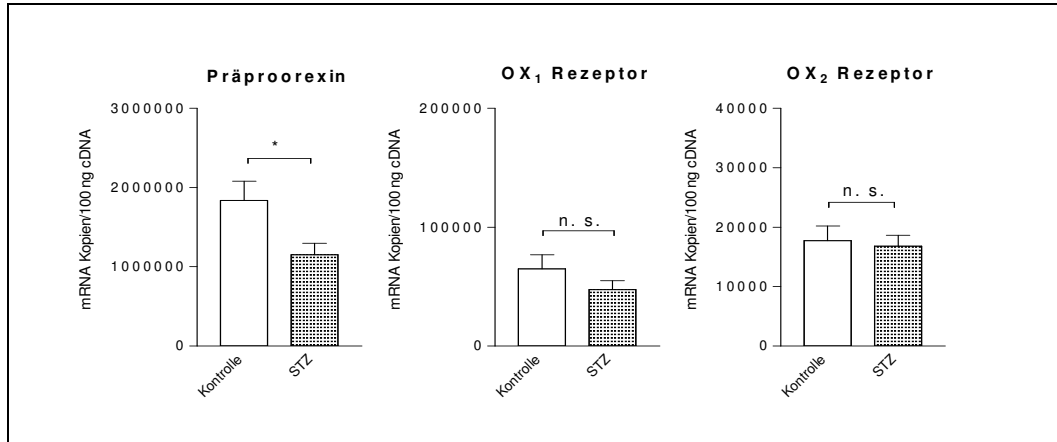


Abb. 15: Vergleich der Präpro-Orexin-, OX_1 -, OX_2 -Rezeptor mRNA-Mengen im Hypothalamus zwischen mit Streptozotocin behandelten Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Hypophyse

In der Hypophyse der mit Streptozotocin behandelten Ratten wurden hohe mRNA-Mengen des OX_1 -Rezeptors gefunden und sehr niedrige OX_2 -Rezeptor mRNA-Mengen, wobei sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der mRNA-Mengen zu den Tieren der Kontrollgruppe zeigten (Abb. 16).

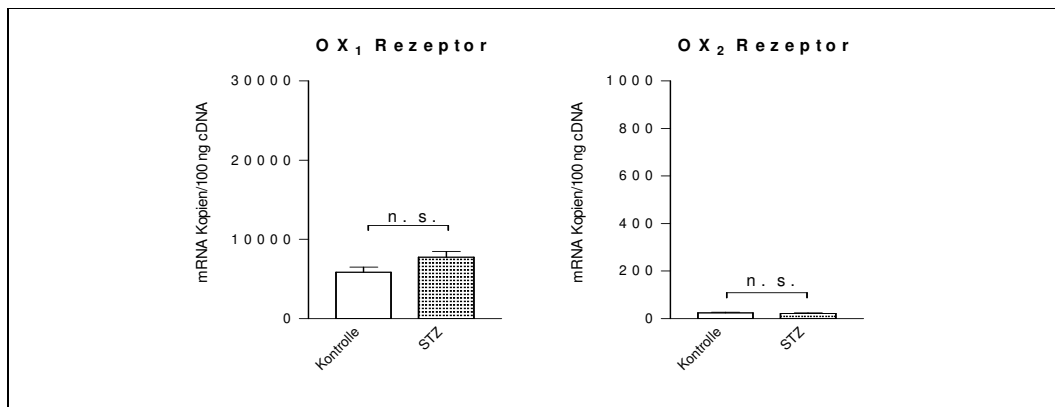


Abb. 16: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in der Hypophyse zwischen mit Streptozotocin behandelten Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Nebennieren

In der Nebenniere wurden niedrige OX₁-Rezeptor mRNA-Mengen gefunden, wobei bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten eine statistisch signifikante Erhöhung der OX₁-Rezeptor mRNA-Menge um 274% zu sehen war. Hohe Mengen an OX₂-Rezeptor mRNA wurden in den Nebennieren gefunden, die bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten statistisch signifikant um 51% reduziert waren (Abb. 17).

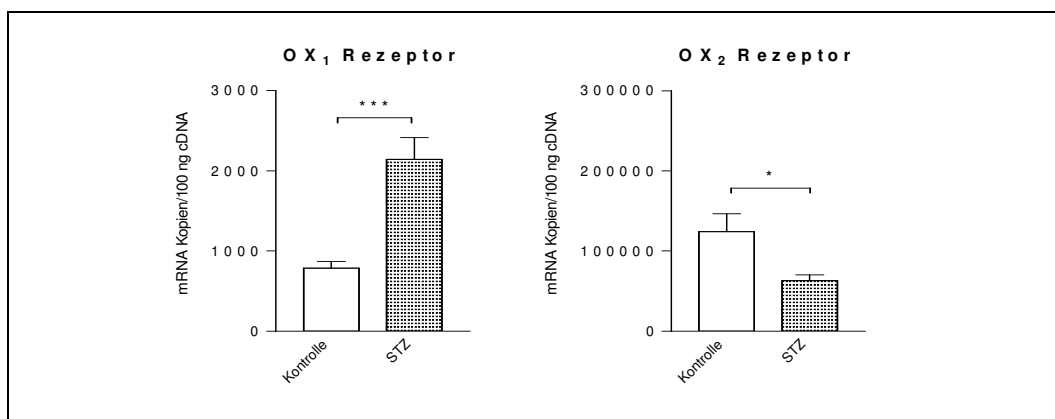


Abb. 17: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in den Nebennieren zwischen mit Streptozotocin behandelten Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.3.3 ZDF-Ratten

Hypothalamus

Im Hypothalamus wurden hohe Mengen an OX_1 -Rezeptor mRNA, moderate Mengen an OX_2 -Rezeptor mRNA und sehr hohe Mengen an PPO mRNA gefunden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den OX_1 -, OX_2 -Rezeptor und PPO mRNA-Mengen der ZDF-Ratten und der Ratten der Kontrollgruppe zeigten sich nicht (Abb. 18).

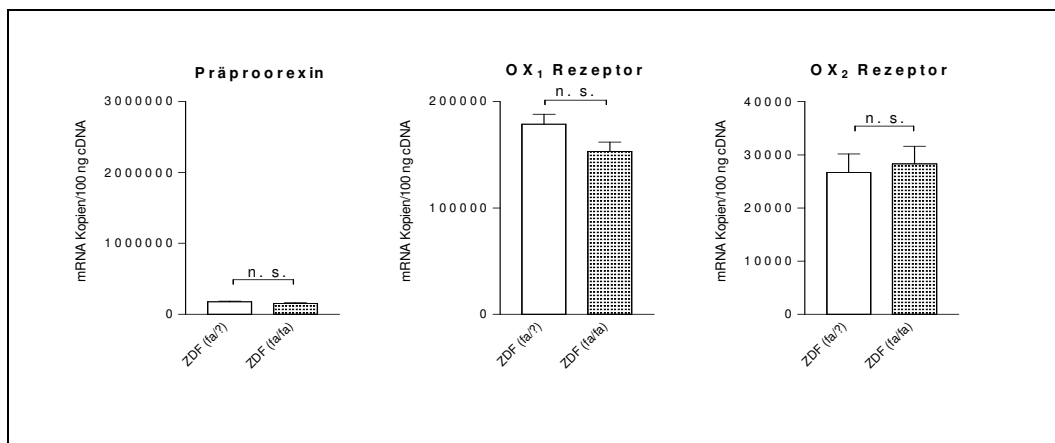


Abb. 18: Vergleich der OX_1 -, OX_2 -Rezeptor und PPO mRNA-Mengen im Hypothalamus zwischen ZDF-Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Hypophyse

In der Hypophyse wurden hohe OX_1 -Rezeptor mRNA-Mengen gefunden, wobei sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den OX_1 -Rezeptor mRNA-Mengen der Ratten der Kontrollgruppe und der ZDF-Ratten zeigte. In der Hypophyse der ZDF-Ratten wurden um 223% höhere mRNA-Mengen nachgewiesen als in der Hypophyse der Ratten der Kontrollgruppe. Sehr niedrige OX_2 -Rezeptor mRNA-Mengen wurden in der Hypophyse nachgewiesen. Hier bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den ZDF-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe (Abb. 19).

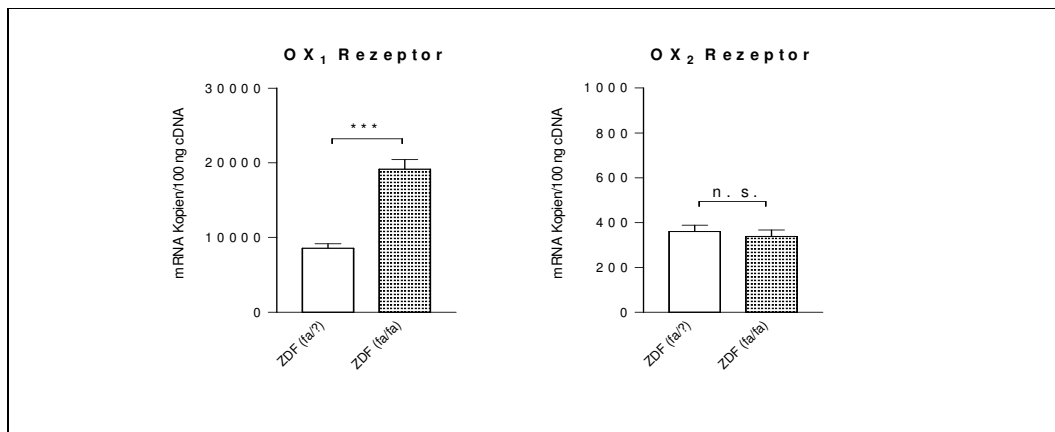


Abb. 19: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in der Hypophyse zwischen ZDF-Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Nebennieren

Niedrige OX₁-Rezeptor und hohe OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen wurden in der Nebenniere gefunden. Die OX₁-Rezeptor mRNA-Menge der ZDF-Ratten war gegenüber den Ratten der Kontrollgruppe um 137% statistisch signifikant erhöht. Die OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in den Nebennieren der ZDF-Ratten war statistisch signifikant um 55% reduziert (Abb. 20).

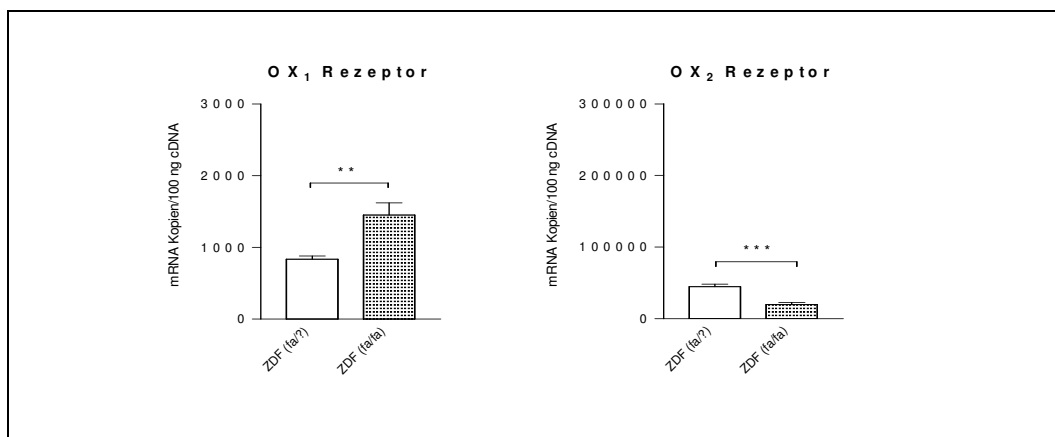


Abb. 20: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in den Nebennieren zwischen ZDF-Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.3.4 Zucker-Ratten

Hypothalamus

Neben hohen OX₁-Rezeptor mRNA-Mengen wurden sehr niedrige OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen und sehr hohe PPO mRNA-Mengen im Hypothalamus gefunden. Es konnten keine statistisch signifikanten Änderungen der OX₁-, OX₂-Rezeptor und PPO mRNA-Mengen zwischen den Zucker-Ratten und den Tieren der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 21).

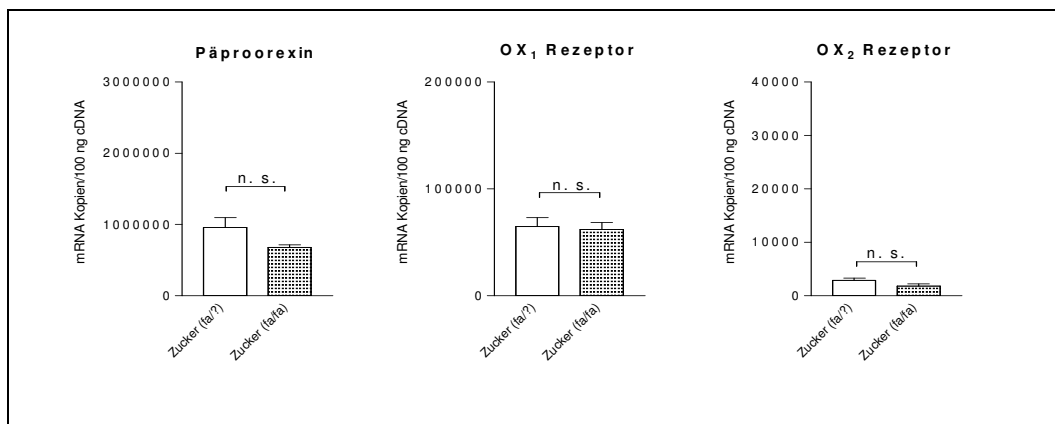


Abb. 21: Vergleich der OX₁-, OX₂-Rezeptor und PPO mRNA-Mengen im Hypothalamus zwischen Zucker-Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Hypophyse

In der Hypophyse wurden hohe Mengen an OX₁-Rezeptor mRNA und sehr niedrige Mengen an OX₂-Rezeptor mRNA gefunden. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen zwischen den Zucker-Ratten und den Ratten der Kontrollgruppe (Abb. 22).

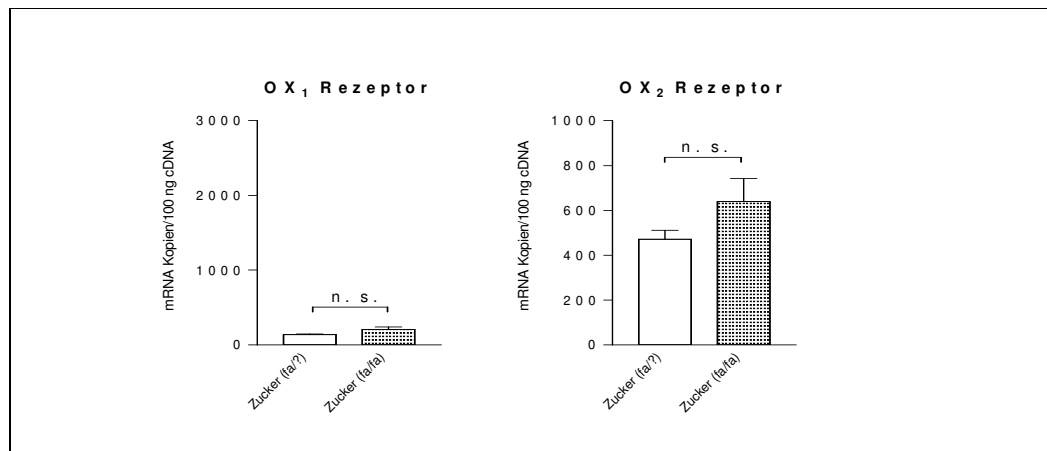


Abb. 22: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in der Hypophyse zwischen Zucker-Ratten und Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

Nebennieren

In den Nebennieren wurden niedrige OX₁-Rezeptor mRNA-Mengen und moderate OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen gefunden. Die OX₁-Rezeptor mRNA-Menge der Zucker-Ratten war statistisch signifikant um 64% gegenüber der der Ratten der Kontrollgruppe erhöht. Die OX₂-Rezeptor mRNA-Menge der Zucker-Ratten war im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe um 62% statistisch signifikant reduziert (Abb. 23).

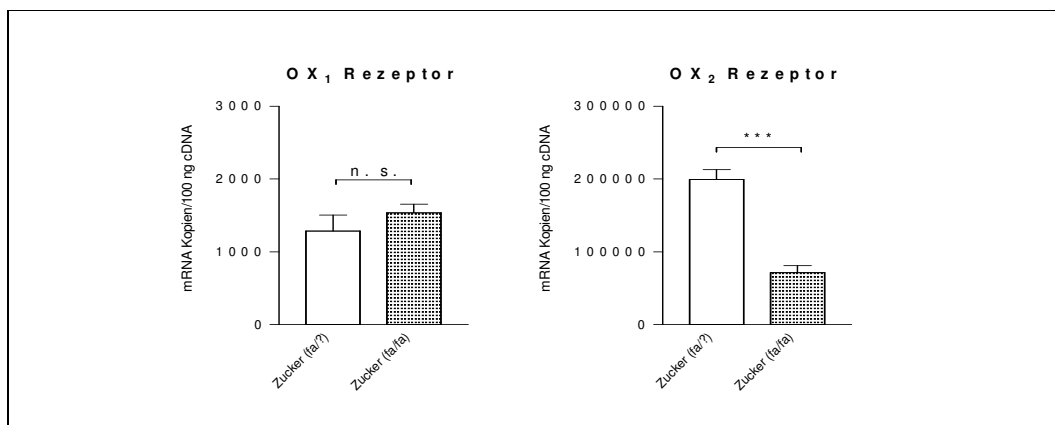


Abb. 23: Vergleich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in den Nebennieren zwischen Zucker-Ratten und der Ratten der Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

3.4 Lokalisierung der Orexin-Rezeptor mRNA in den Nebennieren

Mittels in situ Hybridisierung konnte die Verteilung der OX_2 -Rezeptor mRNA in der Nebenniere dargestellt werden. OX_2 -Rezeptor mRNA wurde in den Nebennierenrinden der Ratten in der Zonula glomerulosa und der Zonula reticularis lokalisiert (Abb. 24).

Es wurde keine signifikante Expression von OX_2 -Rezeptor mRNA im Nebennierenmark und in der Zona fasciculata detektiert.

OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression konnte durch in situ Hybridisierung in den Nebennieren nicht detektiert werden (nicht abgebildet).

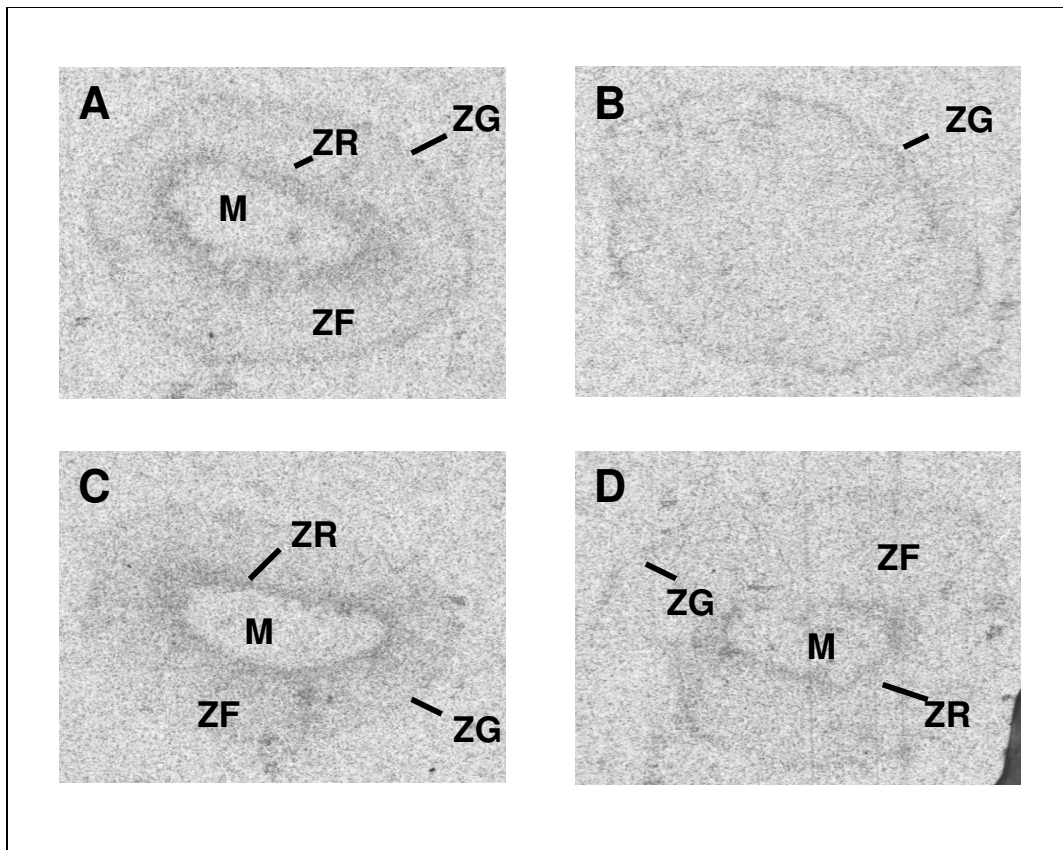


Abb. 24: Lokalisierung von OX_2 -Rezeptor mRNA in den Nebennieren der Kontrolltiere der adipösen Zucker-Ratten (A), der adipösen Zucker-Ratten (B), der Kontrolltiere der diabetischen ZDF-Ratten (C) und der diabetischen ZDF-Ratten (D) mittels in situ Hybridisierung. M: Mark, ZG: Zona glomerulosa, ZF: Zona fasciculata, Z: Zona reticularis.

In der Zona glomerulosa der ZDF-Ratten war der OX_2 -Rezeptor mRNA-Gehalt im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich erhöht. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich des OX_2 -Rezeptor mRNA-Gehalts in der Zona reticularis zwischen den Kontrolltieren der ZDF-Ratten und den ZDF-Ratten selbst. Bei den Zucker-Ratten war der OX_2 - Rezeptor mRNA Gehalt in der Zona glomerulosa gegenüber dem der Ratten der Kontrollgruppe erniedrigt, ebenso in der Zona reticularis (Abb. 25).

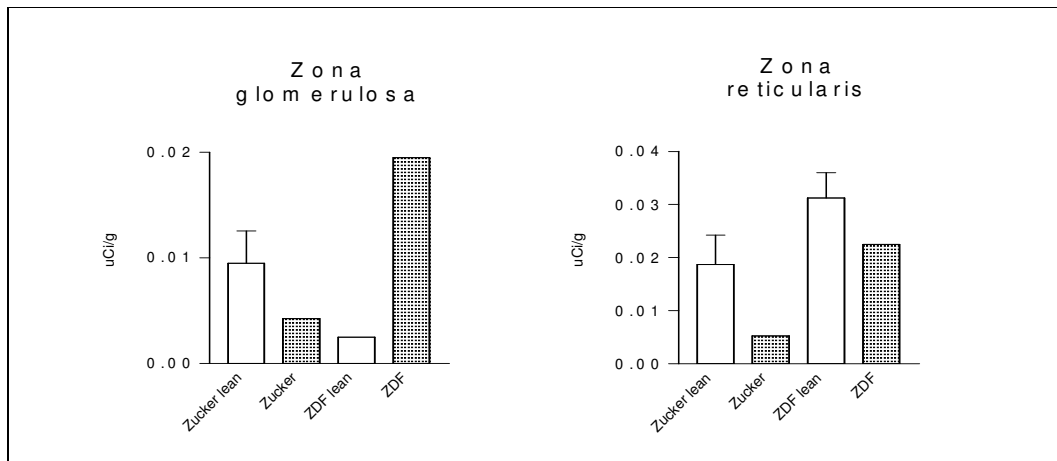


Abb. 25: Semiquantitative Analyse der OX_2 -Rezeptor mRNA-Menge in der Zona glomerulosa und der Zona reticularis der Zucker-Ratten und der ZDF-Ratten im Vergleich zu den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe. (Mittelwert + / - SEM; n = 10).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Orexin-System in Tiermodellen für Adipositas, Diabetes mellitus Typ I und II untersucht. Orexin-Rezeptoren wurden in den Organen der HPA-Achse der Tiermodelle nachgewiesen.

Die *hypothalamischen* Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen der drei Tiermodelle zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppen.

Die OX₁-Rezeptor mRNA-Expression in der *Hypophyse* der mit Streptozotocin behandelten Ratten und der ZDF-Ratten war im Vergleich zu den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe gesteigert.

In den *Nebennieren* der drei Tiermodelle konnte eine Verringerung der OX₂-Rezeptor mRNA im Vergleich zu den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe gezeigt werden.

4.1 Expression der Orexin-Rezeptor mRNA in der HPA-Achse

4.1.1 Hypothalamus

Die mRNA-Expression der Orexin-Rezeptor-Subtypen OX₁ und OX₂ wurde mittels in situ Hybridisierung im Rattenhirn unter anderem im lateralen Hypothalamus lokalisiert (Trivedi et al., 1998). Die Präsenz beider Orexin-Rezeptoren im Hypothalamus wurde von den hier vorliegenden Befunden unterstützt.

4.1.2 Hypophyse

Außerhalb des ZNS wurde in der Hypophyse der höchste OX₁-Rezeptor mRNA-Gehalt gefunden (Jöhren et al., 2001). Sowohl in der Adenohypophyse als auch in der Neurohypophyse und der pars intermedialis der Hypophyse wurden OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA lokalisiert, wobei in der Adenohypophyse die OX₁-Rezeptor mRNA-Expression höher als die OX₂-Rezeptor mRNA-Expression war (Date et al., 2000). Immunhistochemisch wurden OX₁-Rezeptoren in somatotropen und OX₂-Rezeptoren in kortikotropen Zellen nachgewiesen (Blanco et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden hohe OX₁-Rezeptor mRNA-Mengen sowie deutlich niedrigere OX₂-Rezeptor mRNA-Mengen in Rattenhypophysen gemessen (Kap. 3.3). Die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass der OX₂-Rezeptor auf Grund seiner geringen Expression in der Hypophyse dort nur eine untergeordnete Rolle spielt.

4.1.3 Nebennieren

In der Literatur sind widersprüchliche Ergebnisse über die Präsenz und die Verteilung der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA-Expression in den Nebennieren beschrieben. Als Methoden für die Untersuchung der Orexin-Rezeptoren dienten hierbei RT-PCR, Western-Blot, Immunhistochemie und in situ Hybridisierung.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Nachweis und die Lokalisierung von Orexin-Rezeptor mRNA in den Nebennieren mittels quantitativer „real-time“ PCR und in situ Hybridisierung. Mittels „real-time“ PCR wurde die mRNA beider Orexin-Rezeptor Subtypen in den Nebennieren der Ratten gefunden, wobei eine hohe OX₂-Rezeptor mRNA-Expression und eine niedrige OX₁-Rezeptor mRNA-Expression gemessen wurde. Diese Daten stehen im Einklang mit früheren „real-time“ PCR-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Jöhren et al., 2001 und 2004). Durch in situ Hybridisierung konnte in dieser Arbeit zusätzlich eine Aussage über die Lokalisierung der Orexin-Rezeptor mRNA-Expression in der Nebenniere getroffen werden. OX₂-Rezeptor mRNA-Expression wurde in der Zona glomerulosa und der Zona reticularis der Nebennierenrinde lokalisiert. Entsprechend den mittels „real-time“ PCR gemessenen sehr geringen OX₁-Rezeptor Mengen konnte durch in situ Hybridisierung in den gesamten Nebennieren keine OX₁-Rezeptor mRNA-Expression nachgewiesen werden.

Diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche RT-PCR (Lopez et al., 1999), in situ Hybridisierung und Immunhistochemie (Randeva et al., 2001) sowie Western-Blot-Untersuchungen (Karteris et al., 2001) durchgeführt haben.

Mehrere Arbeitsgruppen kamen jedoch zu gegensätzlichen Ergebnissen: Karteris und Mitarbeiter konnten OX₂-, nicht jedoch OX₁-Rezeptor mRNA-Expression in den Nebennieren nachweisen (Karteris et al., 2001). Andere Arbeiten beschrieben die Expression von mRNA beider Rezeptorsubtypen sowohl in der

Nebennierenrinde als auch im -mark (Nanmoku et al., 2002; Mazzocchi et al., 2001; Malendowicz et al., 2001). Die Daten der oben genannten Arbeiten basieren jedoch auf RT-PCR Untersuchungen, wobei jeweils eine hohe Anzahl von mehr als 35 Amplifikationszyklen durchgeführt worden ist. Die quantitative Messung von PCR-Produkten ist jedoch nur während der exponentiellen Phase der Amplifikation aussagekräftig, welche bei einer Zyklenzahl von weniger als 25-30 Zyklen erreicht wird. Bei zu hoher Zyklenzahl könnten also falsch positive Ergebnisse entstanden sein. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Arbeiten, die nur eine Endpunktanalyse des PCR-Produkts nach mehr als 35 Amplifikationszyklen durchgeführt haben, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der „real-time“ PCR das Reaktionsprodukt jeder Probe nach jedem Zyklus quantitativ bestimmt.

4.2 Expression der Orexin-Rezeptoren in adipösen und diabetischen Ratten

4.2.1 Hypothalamus

In der vorliegenden Arbeit wurden im Hypothalamus sowohl bei Streptozotocin behandelten Ratten als auch bei ZDF- und Zucker-Ratten keine signifikanten Unterschiede der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression im Vergleich zu den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe gefunden. Dies lässt vermuten, dass bei Adipositas und Diabetes mellitus die physiologische Wirkung von Orexinen im Hypothalamus nicht verändert ist. Da eine durch Fasten ausgelöste Zunahme der OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression im Hypothalamus durch Leptingabe wieder aufgehoben werden konnte (Lopez et al., 2000), wäre es denkbar, dass das Orexin-System im Hypothalamus nur während Phasen der Hypoalimentation aktiviert ist.

In der Literatur gibt es widersprüchliche Ergebnisse, die die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigen können. Beck und Mitarbeiter fanden eine erhöhte OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression im Hypothalamus von Zucker-Ratten im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe (Beck et al., 2001). Eine andere Studie zeigte erniedrigte OX_2 -Rezeptor, jedoch unveränderte OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression im Hypothalamus von Zucker-Ratten (Yamamoto et

al., 2002). Auch hier kann es durch verschiedene Methoden und verschiedene Tiermodelle zu den unterschiedlichen Ergebnissen kommen.

In der Literatur beschriebene Effekte des Orexins nach i.c.v. Injektion:

Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass durch i. c. v. Injektion von Orexinen die Aktivität der HPA-Achse stimuliert werden konnte, so dass es zu einem Anstieg der Plasma Glukokortikoidkonzentrationen kam (Hagan et al., 1999; Kuru et al., 2000; Ida et al., 2000; Jaszberenyi et al., 2000, Al Barazannji et al., 2001; Jaszberenyi et al., 2001; Jones et al., 2001; Russell et al., 2001; Samson et al., 2002; Brunton et al., 2003). Dieser Effekt wurde höchstwahrscheinlich über CRH vermittelt, denn durch Orexin erhöhte Plasma Kortikosteron-Spiegel gingen mit einer erhöhten ACTH-Konzentration einher (Kuru et al., 2000; Al Barazannji et al., 2001; Russell et al., 2001; Samson et al., 2002). Durch CRH-Antagonisten konnte ein Anstieg der Plasma Glukokortikoidkonzentration nach zentraler Orexin-Gabe verhindert werden (Jaszberenyi et al., 2000; Samson et al., 2002). Außerdem depolarisierte Orexin Neurone im Nucleus paraventricularis (PVN), dem Bildungsort des CRH (Samson et al., 2002; Shirasaka et al., 2001) und stimulierte die Freisetzung von CRH aus Hypothalamus-Explantaten (Russell et al., 2000; Russell et al., 2001).

4.2.2 Hypophyse

In der Hypophyse der ZDF-Ratten war die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression gegenüber der Kontrollgruppe signifikant um 223% erhöht.

In der Hypophyse der mit Streptozotocin behandelten Ratten und der adipösen Zucker-Ratten war die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe nicht statistisch signifikant verändert.

Die insgesamt sehr niedrige OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression in den drei Tiermodellen zeigte keine Veränderung zu den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe.

Eine signifikante Erhöhung der OX_1 -Rezeptoren der Hypophyse wurde also nur im Tiermodell für Diabetes mellitus Typ II gemessen. Bei den mit Streptozotocin behandelten Ratten, bei denen durch Zerstörung der pankreatischen Beta-Zellen

ein Diabetes mellitus Typ I hervorgerufen wurde, war die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression nicht signifikant verändert. Das Orexin-System zeigt also Unterschiede bei Diabetes mellitus Typ I und Typ II.

Es wurden bereits mehrere Effekte von Orexin auf Plasma-Spiegel der neuroendokrinen Hypophysenhormone ACTH, Prolaktin, Lutropin (LH) und Somatotropin (GH) beschrieben, wobei ein direkter, hemmender Orexin-Effekt auf die Hypophyse nur für die ACTH Freisetzung gezeigt werden konnte (Hagan et al., 1999; Kuru et al., 2000; Russell et al., 2000). Denkbar wäre, dass die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression in der Hypophyse kompensatorisch erhöht ist, um der Aktivierung der HPA-Achse entgegen zu wirken: Durch eine verstärkte hemmende Wirkung der Orexine auf die ACTH-Freisetzung käme es folglich zu einer Verringerung der Glukokortikoidfreisetzung und der Glukoneogenese, was wiederum den Anstieg der Plasma Glukose-Spiegel bei Diabetes mellitus Typ II verringern würde.

4.2.3 Nebennieren

In den Nebennieren aller drei Tiergruppen wurden sehr hohe OX_2 -Rezeptor mRNA-Spiegel gemessen. Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe war die OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression bei allen Tiermodellen signifikant erniedrigt. Dies ging mit stark erniedrigten Plasma Leptinspiegeln der mit Streptozotocin behandelten Ratten und der Leptinresistenz der ZDF-Ratten und der Zucker-Ratten einher. Möglicherweise liegt hier eine Beeinflussung des Orexin-Systems durch Leptin vor. Diese Fragestellung ist gerade Gegenstand weiterführender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

Im Gegensatz dazu war die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression in den Nebennieren der drei Tiermodelle insgesamt niedrig, so dass eher eine untergeordnete Rolle dieses Rezeptorsubtyps in den Nebennieren vermutet werden kann.

In der Literatur wurde beschrieben, dass Orexine auf die Glukokortikoidsynthese der Nebennieren einen direkten, stimulierenden Effekt besitzen (Malendowicz et al., 1999; Nanmouk et al. 2002). Diese vermehrte Synthese von Glukokortikoiden fand ohne einen Anstieg von hypothalamischem CRH bzw. hypophysärem ACTH statt; Orexin scheint die Nebennieren über das Blut zu erreichen und direkt die Hormonsynthese zu stimulieren (Malendowicz et al., 2001). Auf Grund der hohen

Expression von OX₂-Rezeptor mRNA in den Nebennieren und der in dieser Arbeit mittels in situ Hybridisierung durchgeführten Lokalisierung der OX₂-Rezeptor mRNA in der Nebennierenrinde, nicht jedoch im Nebennierenmark, kann vermutet werden, dass dieser Effekt hauptsächlich über den OX₂-Rezeptor vermittelt wird.

4.3 Expression des Präpro-Orexins in adipösen und diabetischen Tiermodellen

STZ-Ratten

Präpro-Orexin mRNA wird in großen Mengen im lateralen Hypothalamus exprimiert (Sakurai et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals im Hypothalamus der mit Streptozotocin behandelten Ratten eine statistisch signifikante Verringerung der Präpro-Orexin mRNA-Expression um 38% gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe gefunden. In der Literatur wurden bisher bei Ratten mit Streptozotocin induziertem Diabetes mellitus keine verminderten hypothalamische Präpro-Orexin mRNA-Spiegel beschrieben (Cai et al., 1999; Swart et al., 2001).

ZDF- und Zucker-Ratten

In der vorliegenden Arbeit konnten im Hypothalamus der ZDF-Ratten und der Zucker-Ratten im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe keine Unterschiede der Präpro-Orexin mRNA-Expression festgestellt werden. In der Literatur wird die Expression von Präpro-Orexin in Zucker-Ratten kontrovers diskutiert. Während einige Arbeiten im Einklang mit den eigenen Ergebnissen stehen (Cai et al., 2000; Taheri et al., 2001), werden von anderen Arbeitsgruppen reduzierte Präpro-Orexin mRNA-Spiegel beschrieben (Cai et al., 2000; Beck et al., 2001; Yamamoto et al., 2002).

Diese Diskrepanzen zu den eigenen Ergebnissen können bedingt sein durch das Alter der Ratten zum Zeitpunkt der Dekapitation, durch die Diät, durch den Grad der Adipositas bzw. des Diabetes und durch die Methode der Hirnpräparation.

Mausmodelle

Auch bei Mausmodellen für Diabetes mellitus Typ II und Adipositas gibt es Diskrepanzen in der Literatur in bezug auf die Veränderung hypothalamischer

Präpro-Orexin mRNA-Expression. Bei ob/ob-Mäusen wurde beschrieben, dass die Präpro-Orexin mRNA-Expression im Hypothalamus gegenüber den Kontrollen erniedrigt waren (Stricker-Krongrad et al., 2002; Yamamoto et al., 1999); andere Arbeiten zeigten keine Unterschiede der Präpro-Orexin mRNA-Expression zwischen ob/ob-Mäusen und den Mäusen der Kontrollgruppe (Hakansson et al., 1999; Tritos et al., 2001). Bei db/db-Mäusen wurde eine erniedrigte Präpro-Orexin mRNA-Expression im Hypothalamus gemessen (Yamamoto et al., 2000).

Schlussfolgerungen

In einigen Arbeiten wurde beschrieben, dass Nahrungskarenz die Präpro-Orexin mRNA-Expression im Hypothalamus erhöht, die durch Leptingabe wieder aufgehoben werden konnte (Sakurai et al., 1998; Cai et al., 1999; Lopez et al., 2000). Außerdem wurde gezeigt, dass die hypothalamische Präpro-Orexin mRNA-Expression sowohl durch kurzweilige (fünf Stunden) als auch durch chronische (sechs Tage) Insulin-induzierte Hypoglykämie erhöht werden konnte; gleichzeitige Gabe von Glukose hob diesen Effekt auf (Cai et al., 1999; Griffond et al., 1999).

Die hypothalamische Präpro-Orexin mRNA-Expression scheint also nicht durch Gewichtsänderungen, Insulin oder Leptin verändert zu werden, wohl aber durch niedrige Plasma-Glukose bzw. Hypoglykämie und Nahrungskarenz. Dies würde die unveränderte Präpro-Orexin mRNA-Expression im Hypothalamus der in dieser Arbeit untersuchten ZDF- und Zucker-Ratten im Vergleich zu den Ratten der Kontrollgruppe erklären können.

Neben einer Beeinflussung der Präpro-Orexin mRNA-Expression durch niedrige Plasma-Glukose wäre eine Beeinflussung auch durch Afferenzen aus den Eingeweiden denkbar. Denn die Orexin-Neurone im lateralen Hypothalamus wurden durch Insulin-induzierte Hypoglykämie von drei bzw. fünf Stunden aktiviert, allerdings nur in Kombination mit Nahrungsrestriktion, jedoch nicht bei Nahrung ad libitum (Moriguchi et al., 1999; Cai et al., 2001).

4.4 Orexin A-Gehalt im Plasma adipöser und diabetischer Ratten

In dieser Arbeit wurde Orexin A im Plasma der drei Tiermodelle und deren jeweiligen Kontrollen gefunden. Die Orexin A-Spiegel der ZDF- und der Zucker-Ratten zeigten einen um 15% erniedrigten Orexin A-Spiegel im Plasma im

Vergleich zu den jeweiligen Ratten der Kontrollgruppe. Andere Arbeiten bestätigten sowohl bei Zucker-Ratten als auch bei adipösen Menschen erniedrigte Plasma Orexin A-Spiegel (Beck et al., 2001; Adam et al., 2002). Die Bedeutung dieser leicht erniedrigten Werte bleibt unklar. Plasma Orexin A- und Plasma Leptinspiegel zeigten in dieser Arbeit eine negative Korrelation. Auch bei Menschen wurde eine negative Korrelation der Plasma Orexin A- mit den Plasma Leptinspiegeln festgestellt, Hunger erhöhte die Plasma Orexin A-Spiegel und reduzierte die Plasma Leptinspiegel (Komaki et al., 2001). Außerdem zeigte die vorliegende Arbeit, dass die Plasma Orexin A-Spiegel bei mit Streptozotocin behandelten Ratten im Vergleich zu den unbehandelten Ratten nicht verändert waren.

Die Herkunft des Orexin A im Plasma ist nicht vollständig geklärt. Orexin-haltige Neurone projizieren in großer Zahl in die Eminentia mediana, einige der Fasern projizieren in die Neurohypophyse, nicht jedoch in die Adenohypophyse, und könnten auch so durch die örtliche Nähe zum hypothalamo-hypophysären Pfortaderkreislauf zu den Plasma Orexin-Spiegeln beitragen (Date et al., 2000; Nambu et al., 1999). Die Peptide Orexin A und B wurden in der Eminentia mediana von Ratten mittels RIA und Immunhistochemie gefunden (Date et al., 2000; Mondal et al., 1999; Nambu et al., 1999).

Die Freisetzung von Orexin A, das in den alpha- und beta-Zellen der Inselzellen des Pankreas gebildet wurde, wurde durch sinkende Glukosespiegel im Plasma stimuliert (Ouedraogo et al., 2003). Die Regulation der Orexin A-Freisetzung aus dem Pankreas war ähnlich der Glukagon-Freisetzung, denn sowohl Orexin A- als auch Glukagon-Freisetzung wurden durch hohe Plasma Glukosespiegel gehemmt, durch niedrige Plasma Glukosespiegel stimuliert und stiegen während des Fastens an (Ouedraogo et al., 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass Orexin A die Sekretion von Pankreashormonen und die Plasma Glukosespiegel modulieren kann (Ouedraogo et al., 2003). Das aus den Inselzellen des Pankreas freigesetzte Orexin A scheint somit ein Signal zu sein, um die Glukosespiegel im Plasma unter Beeinflussung der Glukagon- und Insulinsekretion wieder anzuheben (Ouedraogo et al., 2003). Da Orexin-Rezeptor mRNA auch im Pankreas gefunden wurde, ist es möglich, dass die Orexin A enthaltenden Zellen im Pankreas Teil des „glukosesensiblen“ Netzwerkes sind, zu dem der laterale Hypothalamus und der Darm zählen, und welche durch sinkende Plasma Glukosespiegel aktiviert werden

(Ouedraogo et al., 2003; Kirchgessner et al., 2003). So könnten die in der vorliegenden Arbeit gemessenen erniedrigten Plasma Orexin-Spiegel auf Grund der Hyperglykämie der ZDF- und der der Zucker-Ratten bestehen. Da Orexine sowohl die Sekretion von Glukokortikoiden aus den Nebennieren stimulieren als auch bei niedrigen Plasma Glukosespiegeln an der Bereitstellung von Energiereserven beteiligt sind, um den Plasma Glukosespiegel in den Normbereich anzuheben, könnten Orexine eine Verbindung zwischen adrenokortikaler Funktion und Energiehomöostase darstellen.

4.5 Zusammenfassung

Orexin A und B sind im lateralen Hypothalamus, im Pankreas und im Darm gebildete Peptide, die die Nahrungsaufnahme, die Energiehomöostase, das Schlaf-Wach-Verhalten und endokrine Funktionen regulieren. Orexin A und -B entstehen durch proteolytische Spaltung des gemeinsamen Vorläuferpeptids Präpro-Orexin, dessen mRNA in großen Mengen im lateralen Hypothalamus exprimiert wird. Orexine aktivieren zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, den OX_1 - und den OX_2 -Rezeptor. Da beide Orexin-Rezeptor mRNAs unterschiedlich in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse exprimiert werden, vermutet man verschiedene Funktionen der Orexine in der Hypophyse und den Nebennieren.

Um die Bedeutung der Orexine bei Diabetes mellitus Typ I und II und bei Adipositas zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression der Präpro-Orexin- und die der Orexin-Rezeptoren in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse durch quantitative „real-time“ PCR untersucht. Als Tiermodelle wurden mit Streptozotocin behandelte Ratten gewählt, die einen Diabetes mellitus Typ I entwickelten, diabetische Zucker-Ratten, die einen Diabetes mellitus Typ II entwickelten, und adipöse Zucker-Ratten als Tiermodell für Adipositas. Zur Charakterisierung der Tiermodelle wurden Glukose-, Insulin-, Leptin-, Kortikosteron- und Orexin A-Spiegel im Plasma durch Radio-Immuno-Assay ermittelt. Die Lokalisierung der Orexin-Rezeptoren in den Nebennieren erfolgte durch in situ Hybridisierung.

Die hypothalamischen Präpro-Orexin, OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression der drei Tiermodelle zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich mit den Ratten der Kontrollgruppen. Die OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression in der Hypophyse bei diabetischen Zucker-Ratten war im Vergleich mit den Ratten der Kontrollgruppe gesteigert. In den Nebennieren der drei Tiermodelle konnte eine Verringerung der OX_2 -Rezeptor mRNA im Vergleich mit den Ratten der jeweiligen Kontrollgruppe gezeigt werden. Die OX_2 -Rezeptor mRNA wurde in den Nebennieren in der Zona glomerulosa und in der Zona reticularis lokalisiert.

Die erhöhte OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression in der Hypophyse bei diabetischen Zucker-Ratten und die unveränderte OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression bei den mit

Streptozotocin behandelten Ratten könnte darauf hindeuten, dass sich das Orexin-System zwischen Diabetes mellitus Typ I und Typ II unterscheidet. Außerdem wäre es denkbar, dass die Erhöhung der OX_1 -Rezeptor mRNA-Expression in der Hypophyse ein kompensatorischer Mechanismus sein könnte, um der Aktivierung der HPA-Achse entgegen zu wirken: Durch eine verstärkte hemmende Wirkung der Orexine auf die ACTH-Freisetzung käme es folglich zu einer Verringerung der Glukokortikoidfreisetzung und der Glukoneogenese, was wiederum den Anstieg des Plasma Glukosespiegels bei Diabetes mellitus Typ II verringern würde.

Die Verringerung der Expression der OX_2 -Rezeptor-mRNA in den Nebennieren könnte auf Grund der Leptin-Resistenz bei diabetischen und adipösen Zucker-Ratten und den äußerst niedrigen Plasma Leptinspiegeln bei Ratten, die mit Streptozotocin behandelt wurden, bestehen. Eine Regulation der OX_2 -Rezeptor mRNA-Expression durch Leptin wäre denkbar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das Orexin-System und insbesondere die hypophysären OX_1 -Rezeptoren sowie die adrenalen OX_2 -Rezeptoren bei der Regulation der Glukosehomöostase beteiligt sind.

5. Anhang

5.1 Literaturverzeichnis

Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW (2002) Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Disord* 26:274-276

Al Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS (2001) Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurons in conscious rats. *J Neuroendocrinol* 13:421-424.

Argilés JP (1989) The obese Zucker rat: a choice for fat metabolism 1968-1988: twenty years of research on the insights of the Zucker mutation. *Prog Lipid Res* 28:53-66

Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Mouri T (2001) Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 22:139-142

Banks WA et al. (1996) Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311

Beck B, Richy S (1999) Hypothalamic hypocretin/orexin and neuropeptide Y: divergent interaction with energy depletion and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 258:119-122

Beck B, Richy S, Dimitrov T, Stricker-Krongrad A (2001) Opposite regulation of hypothalamic orexin and neuropeptide Y receptors and peptide expressions in obese Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun* 286:518-523

Bell ME, Bhatnagar S, Liang J, Soriano L, Nagy TR, Dallman MF (2000) Voluntary sucrose ingestion, like corticosterone replacement, prevents the metabolic deficits of adrenalectomy. *J Neuroendocrinol* 12:461-470

- Bernardis LL, Bellinger LL (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 17(2):141-193
- Bernardis LL, Bellinger LL (1996) The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20(2):189-287
- Blanco M, Lopez M, Garcia-Caballero T, Gallego R, Vazquez-Boquete A, Morel G, Senaris R, Casanueva F, Dieguez C, Beiras A (2001) Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1616-1619
- Brunton PJ, Russell JA (2003) Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to centrally administered orexin-A are suppressed in pregnant rats. *J Neuroendocrinol* 15:633-637.
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39
- Cai XJ, Evans ML, Lister CA, Leslie RA, Arch JR, Wilson S, Williams G (2001) Hypoglycemia activates orexin neurons and selectively increases hypothalamic orexin-B levels: responses inhibited by feeding and possibly mediated by the nucleus of the solitary tract. *Diabetes* 50:105-112
- Cai XJ, Lister CA, Buckingham RE, Pickavance L, Wilding J, Arch JR, Wilson S, Williams G (2000) Down-regulation of orexin gene expression by severe obesity in the rats: studies in Zucker fatty and Zucker diabetic fatty rats and effects of rosiglitazone. *Brain Res Mol Brain Res* 77:131-137
- Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G (1999) Hypothalamic orexin expression: modulation by glucose and feeding. *Diabetes* 48:2132-2137

- Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN (1983) the diabetic Zucker fatty rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 173(1):68-75
- Cleary Mp, Vasselli JR, Greenwood MRC (1980) Development of obesity in Zucker obese (fa/fa) rat in absence of hyperphagia. *Am J Physiol* 238:E284-E292
- Cohen B, Novick D, Rubinstein M (1996) Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274:1185-1188
- Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M (1999) Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neurendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:748-753
- Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M (2000) Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Mol Brain Res* 76:1-6
- Dieterle P, Fehm H, Stroder W, Henner J, Bottermann P, Schwarz K (1967) Asymptomatic diabetes mellitus in normal weight subjects with hypertension. Studies on glucose tolerance, serum insulin and nonesterified fatty acids essential hypertension. *Dtsch Med Wochenschr* 92:2376-2381
- Dube MG, Horvath TL, Kalra PS, Kalra SP (2000) Evidence of NPY Y5 receptor involvement in food intake elicited by orexin A in sated rats. *Peptides* 21:1557-1560.
- Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR (1999) The effects of orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160:R7-12.

- Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M (1997) Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. *Diabetes* 46:313-316
- Fehmann HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Goke B (1997) Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. *Peptides* 18:1267-1273
- Friedman JM, Leibel RL (1992) Tackling a weighty problem. *Cell* 69:217-220
- Friedman JM (1997) The alphabet of weight control. *Nature* 385:119-120
- Gautvik KM, de Lecea L, gautvik VT, Danielson PE, Tranque P, Dopazo A, Bloom FE, Sutcliffe JG (1996) Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNA, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8733-8738
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6:995-1001
- Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D (1999) Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262:77-80
- Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N (1999) Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10911-10916
- Hakansson M, De Lecea L, Sutcliffe JG, Yanagisawa M, Meister B (1999) Leptin receptor-and STAT-immunoreactivities in hypocretin/orexin neurones of the lateral hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 11:653-663

- Halaas JL et al. (1997) Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:8878-8883
- Hanefeld M (1980) Therapy of Hyperlipoproteinemias. *Z Arztl Fortbild* 74:648-651
- Hanson ES, Dallman MF (1995) Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 7:273-279
- Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2001) Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia and obesity. *Neuron* 30:345-354
- Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR (2000) A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96:45-51
- Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR (1999) Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of orexins on feeding in rats. *Peptides* 20:1099-1105.
- Herr RR, Jahnke HK, Argoudelis AD (1967) The structure of streptozotocin. *J Am Chem Soc* 89(18):4808-4809
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413-417
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechniques (NY)* 11:1026-1030

- Holmqvist T, Akerman KE, Kukkonen JP (2001) High specificity of human orexin receptors for orexins over neuropeptide Y and other neuropeptides. *Neurosci Lett* 305:177-180
- Horvath TL, Diano S, van den Pol AN (1999) Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: A novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19:1072-1087
- Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M (1999) Effect of lateral cerebroventricular injection of appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioural activities of rats. *Brain Res* 821:526-529.
- Ida T, Nakahara K, Kuroiwa T, Fukui K, Nakazato M, Murakami T, Murakami N (2000) Both corticotropin releasing factor and neuropeptide Y are involved in the effect of orexin (hypocretin) on the food intake in rats. *Neurosci Lett* 293:119-122.
- Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K (1996) Substitution at codon 269 (glutamine->proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem Biophys Res Commun* 224:597-604
- Ionescu E, Sauter JF, Jeanrenaud B (1985) Abnormal glucose tolerance in genetically obese (fa/fa) rats. *Am J Physiol* 248:E500-E506
- Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I, Telegdy G (2000) effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol* 12:1174-1178.
- Jaszberenyi M, Bujdoso E, Telegdy G (2001) The role of Neuropeptide Y in Orexin-induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activation. *J Neuroendocrinol* 13:438-442

- Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P (2001) Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142:3324-3331
- Jöhren O, Brüggemann N, Dominiak P (2004) Orexins (Hypocretins) and Adrenal Function. *Horm Metab Res* 36:1-7
- Jones DN, Gartlon J, Parker F, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Hatcher JP, Johns A, Porter RA, Hagan JJ, Hunter AJ, Upton N (2001) Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B induced hyperactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 153:210-218
- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) Studies of the Diabetogenic Action of Streptozotocin. *Proceeding Society of Experimental Biology and Medicine* 126:2201-205
- Kaplan NM (1989) The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension. *Arch Intern Med* 149:1514-1520
Review
- Karteris E, Randeva HS, Grammatopoulos DK, Jaffre RB, Hillhouse EW (2001) Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4512-4519
- Kastin AJ, Akerstrom V (1999) Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 289:219-223
- Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF (1996) Leptin receptors expressed on pancreatic b-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:522-527
- Kirchgessner AL, Liu M (2003) Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24:941-951.

- Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, Kawai K, Nozaki T, takii M, Sogawa H, Kubo C (2001) Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur J Endocrinol* 144:645-651
- Krysiak R, Obuchowicz E, Herman ZS (1999) Interactions between the neuropeptide Y system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Endocrinol* 140:130-136
- Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T (1999) Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842:256-261.
- Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H (2000) Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11:1977-1980
- Laugero KD, Bell ME, Bhatnagar S, Soriano L, Dallman MF (2001) Sucrose ingestion normalizes central expression of corticotropin-releasing-factor messenger ribonucleic acid and energy balance in adrenalectomized rats: a glucocorticoid-metabolic-brain axis? *Endocrinology* 142:2796-2804
- Lecea de L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van Den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG (1998) The Hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:322-327
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996) Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632-635
- Lopez M, Senaris R, Gallego R, Garcia-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Dieguez C (1999) Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of rat. *Endocrinology* 140:5991-5994

- Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C (2000) Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269:41-45
- Lubkin M, Stricker-Krongrad A (1998) Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253:241-245.
- Maffei M et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med* 1, 1155-1161
- Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG (1999) Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase dependent signalling cascade. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70:185-188
- Malendowicz LK, Jedrzejczak N, Belloni AS, Trejter M, Hochol A, Nussdorfer GG (2001) Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands. *Histol Histopathol* 16:713-717
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK (2001) Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435:6-25
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG (2001) Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab* 86:778-782
- Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Hanada R, Sakata T, Matsukura S (1999) Characterization of orexin A and orexin B in the microdissected rat

- brain nuclei and their contents in two obese rat models. *Neurosci Lett* 273:45-48
- Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K (1999) Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett* 264:101-104
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962
- Mueller WM, Gregoire R, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ (1998) Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured adipocytes. *Endocrinol* 139:551-558
- Müller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G (1997) Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272:10585-10593
- Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K (1999) Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827:243-260
- Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Goto K, Nakai T (2002) Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul Pept* 104:1225-130
- Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E (2000) Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355:39-40
- Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner AL (2003) Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52:111-117
- Paumgartner G, Brandt T, Greten H, Koch KM, Lode H, van de Loo J, Schattenkirchner M, Seeger W, Steinbeck G, Ziegler R (1999) Therapie

innerer Krankheiten (9. Auflage), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio 784-787

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB (1995) Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269:540-543

Peterson RG, Shaw WN, Neel MA, Little LA, Eichberg J (1990) Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus. *ILAR News* Vol 32(3)

Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS (1998) Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18:9996-10015

Peyron C, Faranco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E (2000) A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med* 6:991-997

Porte D, Seeley RJ, Woods SC, Baskin DG, Figlewicz DP, Schwartz MW (1998) Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41:863-881

Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963) Studies on the Diabetogenic Action of Streptozotocin (NSC-37917) *Cancer Chemotherapy Reports* 29:91-98

Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW (2001) Expression of orexin A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4808-4813

- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245:154-160
- Rodgers RJ, Halford JC, Nunes de Souza RL, Canto de Souza AL, Piper DC, Arch JR, Blundell JE (2000) Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul pept* 96:71-84.
- Russell SH, Kim MS, Small CJ, Abbott Cr, Morgan DG, Taheri S, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR (2000) Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* 12:1213-1218
- Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR (2001) The central effects of orexin-A in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in vivo and in vitro in male rats. *J Neuroendocrinol* 13:561-566.
- Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585
- Samson WK, Taylor MM, Follwell M, Ferguson AV (2002) Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul Pept* 104:97-103
- Schuld A, Hebebrand J, Geller F, Pollmacher T (2000) Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 355:1274-1275
- Shirasaka T, Miyahara S, Kunitake T, Jin QH, Kato K, Takasaki M, Kannan H (2001) Orexins depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1114-R1118

- Stellar E (1954) The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61(1):5-22
- Stern JS, Johnson MRC (1977) Spontaneous activity and adipose cellularity in the genetically obese Zucker rat (fa/fa). *Metabolism* 26:371-380
- Stricker-Krongrad A, Richy S, Beck B (2002) Orexins/hypocretins in the ob/ob mouse: hypothalamic gene expression, peptide content and metabolic effects. *Regul Pept* 104:11-20
- Swart I, Overton JM, Houpt TA (2001) The effects of food deprivation and experimental diabetes on orexin and NPY mRNA levels. *Peptides* 22:2175-2179
- Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM (1999) Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821:535-538
- Taheri S, Gardiner J, Hafizi S, Murphy K, Dakin C, Seal L, Small C, Ghatei M, Bloom S (2001) Orexin A immunoreactivity and preproorexin mRNA in the brain of Zucker and WKY rats. *Neuroreport* 12:459-464
- Terrettaz J, Assimakopoulos-Jeannet F, Jeanrenaud B (1986b) Severe hepatic and peripheral insulin resistance as evidenced by euglycemic clamps in genetically obese fa/fa rats. *Endocrinology* 118:674-678
- Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM (2000) Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469-474
- Tritos NA, Mastaitis JW, Kokkotou E, Maratos-Flier E (2001) Characterization of melanin concentrating hormone and preproorexin expression in the murine hypothalamus. *Brain Res* 895:160-166
- Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM (1998) Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438:71-75

- Tso JY, Sun XH, Kao TH, Reece KS, Wu R (1985) Isolation and characterization of rat and human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. *Nucleic Acids Res* 13:2485-2502
- Vasselli JR, Cleary MP, Jen KLC, Greenwood MRC, Johnson PR (1980) Development of food motivated behavior in free feeding and food restricted Zucker fatty (fa/fa) rats. *Physiol Behav* 25(4):565-573
- Wahlestedt C, Skagerberg G, Ekman R, Heilig M, Sundler F, Hakanson R (1987) Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Brain Res* 417:33-38
- Wang J, Osaka T, Inoue S (2001) Energy expenditure by intracerebroventricular administration of orexin to anesthetized rats. *Neurosci Lett* 315:49-52
- Wang J, Osaka T, Inoue S (2003) Orexin-A sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 971:128-134
- Yamamoto Y, Ueta Y, Date Y, Nakazato M, Hara Y, Scrino R, Nomura M, Shibuya I, Matsukura S, Yamashita H (1999) Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res* 65:14-22
- Yamamoto Y, Ueta Y, Serino R, Nomura M, Shibuya I, Yamashita H (2000) Effects of food restriction on the hypothalamic prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Bull* 51:515-521

- Yamamoto Y, Ueta Y, Yamashita H, Asayama K, Shirahata A (2002) Expressions of the prepro-orexin and the orexin type 2 receptor genes in obese rat. *Peptides* 23:1689-1696
- Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T (2000) Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 849:248-252
- Zarjevski N, Cusin I, Vetter R et al. (1993) Chronic intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133: 1753-1758
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
- Zucker LM, Antoniades HN (1972) Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty". *Endocrinology* 90:1320-1330
- Zucker TF, Zucker LM (1962) Hereditary obesity in the rat associated with high serum fat and cholesterol. *Proc Soc Exp Biol Med* 110:165-171
- Zucker TF, Zucker LM (1963) Fat accretion and growth in the rat. *J Nutr* 80:6-19
- Zhu Y, Yamanaka A, Kunii K, Tsujino N, Goto K, Sakurai T (2002) Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. *Physiol Behav* 77:251-257

5.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ACTH	Corticotropin
Alu I	Restriktionsenzym <i>Arthrobacter luteus</i>
AMV	Reverse Transkriptase Arian Myeloblastosis Virus
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-mass-index
Bo „Bound“	Radioaktivität bei maximaler Bindung von Tracer, Antikörper und Doppelantikörper ohne Konkurrenz mit unmarkiertem Antigen
bp	Basenpaar
CRH	Corticoliberin
CTP	Cytosintriphosphat
db	diabetisch (engl. diabetic)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP-Gemisch	Nukleinsäure-Gemisch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GH	Wachstumshormon (engl. Growth hormone)
GHRH	Growth hormone releasing hormone
GnRH	Gonadoliberin
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
LH	Lutropin
MgCl₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
NEBuffer	Reaktionspuffer für die Restriktion
n.s.	nicht signifikant
NSB	„Non specific bound“ : unspezifische Bindung des Tracers an Doppelantikörper ohne Zusatz von Antikörper
NPY	Neuropeptid Y

ob	fettleibig (engl. obese)
OX	Orexin
P	Phosphor
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
POMC	Proopiomelanocortin
PPO	Präpro-Orexin
PVN	Nucleus paraventricularis
Pvu II	Restriktionsenzym Proteus vulgaris
RIA	Radio-Immuno-Assay
RNase	Ribonuklease
RPE	Waschpuffer 2
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RW1	Waschpuffer 1
SD	Sprague-Dawley
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. Sodium Dodecyl Sulfate)
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat (engl. sodium chloride/sodium citrate)
STZ	Streptozotocin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris HCl, Eisessig, EDTA
TC	„Total count“ : Ausgangsradioaktivität des radioaktiv markierten Antigens (Tracer)
TEA	Triethanolamin
TFA	Trifluoressigsäure
TRH	Thyreotropin releasing hormone
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSH	Thyreostimulierendes Hormon
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
ZNS	Zentrales Nervensystem

5.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Herrn PD Dr. Jöhren** für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung, die Einarbeitung und seine Unterstützung bei allen inhaltlichen und organisatorischen Fragen.

Mein Dank gilt ebenfalls **Herrn Prof. Dr. Sczakiel** aus dem Institut für Molekulare Medizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck für die mir gegebene Möglichkeit das „Gene-Amp-5700-sequence-detection-system“ zu benutzen.

Des Weiteren möchte ich **Frau Constanze Siggel** und **Frau Gudrun Vierke** für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der verschiedenen Experimente danken.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank **meinen Eltern Ulrike und Eberhard Gremmels**, ohne deren Unterstützung diese Arbeit so nicht hätte entstehen können.

5.4 Erklärung zu den Tierversuchen

Die in Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden für die STZ-Ratten unter dem Versuchsvorhaben 9 / y / 01 vom 10.08.2002 und für die Zucker- und ZDF-Ratten unter dem Versuchsvorhaben 9 / A34 / 00 vom 31.10.2000 von der Ethikkommission genehmigt.

5.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Julia Gremmels
Anschrift: Zimmermannstr. 14
12163 Berlin
Geburtsdatum / -ort: 10.07.1977 in Wolfenbüttel

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Braunschweig-Stöckheim
1988-1990 Orientierungsstufe Braunschweig-Stöckheim
1990-1997 Gymnasium Kleine Burg, Braunschweig
1997 Abitur

Hochschulbildung

10 / 1997 Beginn des Studiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck
09 / 1999 Physikum
08 / 2000 1. Staatsexamen
01 / 2002 Beginn des experimentellen Teils der Doktorarbeit am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie
03 / 2003 2. Staatsexamen
06 / 2004 3. Staatsexamen

Ärztliche Weiterbildung

Seit dem 19.07.2004 Assistenzärztin an der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin

5.6 Publikationen

Poster

Orexin (hypocretin) receptor subtypes are differentially expressed in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of rat models of obesity and diabetes

Gremmels J, Jöhren O, Qadri F, Dendorfer A, Dominiak P

7th Annual Meeting of the Neuroendocrinology Section of the German Society of Endocrinology (DGE), 17.-18.10.2003, Lübeck, Germany.

Veröffentlicht in: Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes 2003 Sept; 111: 305-404.

Manuskript in Vorbereitung

Differential expression of orexin and orexin receptors in obese and diabetic rats

Jöhren O, Gremmels J, Qadri F, Dendorfer A, Dominiak P (2005)