



MEINEN ELTERN

Aus dem Institut für klinische und experimentelle Pharmakologie und Toxikologie
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. P. Dominiak

**Geschlechtsspezifische Expression von Präpro-Orexin und Orexin-Rezeptor
mRNA in peripheren Geweben von männlichen und weiblichen Wistar-Ratten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Stefanie Julia Neidert

aus Fulda

Luzern 2005

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Achim Peters
Tag der mündlichen Prüfung:	18.10.2005
Zum Druck genehmigt, Lübeck, den	18.10.2005

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Neuroanatomie des Orexin-Systems	2
1.1.1.	Präpro-Orexin	2
1.1.2.	Orexin-Rezeptoren	2
1.2.	Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts durch die Orexine	3
1.3.	Weitere zentrale Effekte von Orexin	5
1.3.1.	Der Einfluss von Orexin auf autonome Funktionen.....	5
1.3.2.	Orexin und Schlaf-Wachverhalten	5
1.3.3.	Der Einfluss von Orexin auf die Regulation neuroendokriner Funktionen.....	6
1.4.	Periphere Effekte von Orexin	8
1.5.	Zielsetzung	9
2.	MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Versuchstiere und Materialgewinnung	10
2.2.	RT-PCR	10
2.2.1.	RNA-Isolierung	10
2.2.2.	cDNA-Synthese	11
2.2.3.	Primer-Auswahl.....	12
2.2.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	13
2.3.	Restriktionsverdau	14
2.4.	Agarose-Gelelektrophorese	14
2.5.	Klonierung der PCR-Produkte	15
2.5.1.	PCR-Produkt-Extraktion aus dem Agarosegel	16
2.5.2.	Ligation des PCR-Produkts in den Vektor	16
2.5.3.	Transformation	17
2.5.4.	Plasmid-Präparation	17

2.6.	„Real-time“ PCR	18
2.7.	<i>In situ</i> Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden.....	21
2.7.1.	Anfertigung der Schnitte	21
2.7.2.	Auswahl der Oligonukleotid-Sonden	21
2.7.3.	Hybridisierung.....	23
2.7.4.	Autoradiographie.....	24
2.8.	Immunhistochemie	25
2.9.	Radioimmunoassay (RIA)	26
2.10.	Statistik.....	27
3.	ERGEBNISSE	28
3.1.	Spezifität der RT-PCR.....	28
3.2.	Expression der mRNA von Komponenten des Orexinsystems in peripheren Organen der Ratte.....	30
3.2.1.	Präpro-Orexin mRNA	30
3.2.2.	OX ₁ -Rezeptor mRNA.....	31
3.2.3.	OX ₂ -Rezeptor mRNA.....	32
3.3.	Quantifizierung der „steady-state“ mRNA-Spiegel.....	32
3.3.1.	Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte der „real-time“ PCR.....	33
3.3.2.	Präpro-Orexin mRNA	34
3.3.3.	OX ₁ -Rezeptor mRNA.....	35
3.3.4.	OX ₂ -Rezeptor mRNA.....	36
3.4.	Lokalisierung der Orexin-Rezeptor mRNA durch <i>in situ</i> Hybridisierung	37
3.5.	Vergleich der Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression zwischen weiblichen und männlichen Wistar-Ratten in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere.....	40
3.5.1.	Hypothalamus.....	40
3.5.2.	Hypophyse.....	41

3.5.3. Nebenniere.....	41
3.6. Orexin A Spiegel im Plasma	43
4. DISKUSSION	44
4.1. Peripheres Orexinsystem	44
4.1.1. Präpro-Orexin.....	44
4.1.2. Orexin-Rezeptoren	48
4.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Präpro-Orexin, der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression.....	56
4.2.1. Geschlechtsspezifisch höhere Expression von Präpro-Orexin und OX ₁ - Rezeptor mRNA im Hypothalamus weiblicher Wistar-Ratten	56
4.2.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression der Orexin Rezeptoren in der Hypophyse und der Nebenniere	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6. LITERATURVERZEICHNIS	61
7. ANHANG	76
7.1. Abkürzungsverzeichnis	76
7.2. Abbildungsverzeichnis	78
7.3. Tabellenverzeichnis.....	80
7.4. Danksagung	81
7.5. Lebenslauf.....	82
7.6. Originalarbeiten	84

1. Einleitung

Die Entdeckung des Peptidhormons Leptin (von griechisch leptos = dünn, schlank), welches in Adipozyten gebildet wird und durch Wirkung am Hypothalamus die Nahrungsaufnahme hemmt (95,101), initiierte die Erforschung von weiteren Peptiden, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme und des Stoffwechsels beteiligt sind. Peptide wie MCH und NPY wirken orexigen, während α MSH, CART und CRH anorexigene Wirkung zeigen (95).

1998 wurden durch Screening von HPLC-Fractionen aus Hirnextrakten von Ratten zwei weitere Peptide, Orexin A und B, als endogene Liganden sogenannter Orphan-Rezeptoren entdeckt (89). Auch ihnen wird eine bedeutende Rolle bezüglich der Energiehomöostase zugeschrieben.

Orexin A besteht aus 33 Aminosäuren mit zwei intramolekularen Schwefelbrücken, Orexin B enthält 28 Aminosäuren und besitzt zu Orexin A eine 46%ige Homologie in der Aminosäuresequenz (89). Sakurai et al. klonierten die cDNA, die für das aus 130 Aminosäuren bestehende Vorläuferprotein Präpro-Orexin kodiert (89). Orexin A und Orexin B entstehen durch proteolytische Spaltung dieses gemeinsamen Vorläuferproteins (89).

Parallel zur Isolierung der Orexine durch Sakurai et al. konnte eine andere Arbeitsgruppe um Sutcliffe et al., 2000 Hypothalamus-spezifische cDNA isolieren (19), die mit der Präpro-Orexin cDNA identisch ist und Präpro-Hypocretin genannt wurde (19).

Neben der orexigenen Wirkung konnte im Zuge intensiver Forschung gezeigt werden, dass die Orexine auch Einfluß auf die Steuerung endokriner (1,28,46,48,50,79,85,87,90,106,111) und autonomer Funktionen (48,57,90,97,105) haben und den Schlaf-Wachrhythmus (11,30,51,70,77) beeinflussen. Des Weiteren sind periphere Effekte der Orexine beschrieben worden (45,48,54,59,61,71,74,111).

1.1. Neuroanatomie des Orexin-Systems

1.1.1. Präpro-Orexin

Die Expression der Präpro-Orexin mRNA ist auf den lateralen Hypothalamus und die angrenzende Zona incerta beschränkt (15,18,19,78,89) und konnte bei der Ratte am Tag der Geburt detektiert werden (118).

Übereinstimmend mit der Verteilung der Präpro-Orexin-mRNA sind die Zellkörper der Orexin-immunopositiven-Neurone ausschließlich im lateralen und posterioren Hypothalamus zu finden (19,66,66,78,89).

Von dort projizieren Orexin-immunopositive Fasern in weitverbreitete Teile des Gehirns. Dichte Projektionen findet man zum Hypothalamus, hier vor allem zum Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis und anderen wichtigen Hirnregionen, die die Nahrungsaufnahme beeinflussen, wie zum Nucleus tractus solitarii, Nucleus ambiguus und Nucleus dorsalis nervi vagi im Hirnstamm (18,78). Weiterhin findet man eine dichte Innervation Orexin-immunopositiver-Fasern zum Locus coeruleus und Nucleus tuberomamillaris, Gebiete, die eine wichtige Rolle bezüglich Vigilanz und Schlaf-Wachverhalten spielen (28,78). Des Weiteren lassen sich Verbindungen zum Kleinhirn, Hippocampus, Amygdala, Septum, Bulbus olfactorius, Thalamus, Mittelhirn, Hirnstamm und in das Rückenmark nachweisen (12,15,18,78,110).

1.1.2. Orexin-Rezeptoren

Orexin A und Orexin B sind die endogenen Liganden für die zwei G-Protein gekoppelten Rezeptoren OX_1 und OX_2 . Rezeptorbindungsstudien mit radioaktiv markiertem Orexin A und B zeigten, dass Orexin A mit 2-3fach höherer Affinität an den OX_1 -Rezeptor gebunden wird, verglichen mit Orexin B. Der OX_2 -Rezeptor bindet beide Proteine mit etwa gleicher Affinität (89,98).

Das Verteilungsmuster der Orexin-Rezeptoren im Gehirn wurde durch *in situ* Hybridisierung untersucht. Die mRNA Expression der Rezeptoren entspricht den

Projektionen immunopositiver Neurone, dennoch sind Unterschiede bezüglich beider Rezeptor-Subtypen festzustellen (108). So ist die OX₁-Rezeptor mRNA vorzugsweise im frontalen Kortex, Hippocampus, paraventricularen Thalamus, ventromedialen Hypothalamus, hinteren Raphekern und im Locus coeruleus lokalisiert, während OX₂-Rezeptoren vornehmlich im Nucleus paraventricularis, aber auch in der Kleinhirnrinde, im Hippocampus und in Kerngebieten des Hypothalamus zu finden sind (56,108).

Aufgrund der Projektion der Orexin-Neurone und der neuroanatomischen Verteilung der Orexin-Rezeptoren wurde postuliert, dass Orexin neben seinem Effekt auf die Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase auch einen Einfluß auf die Regulation neuroendokriner Systeme und autonomer Funktionen sowie des Schlaf-Wachverhaltens ausüben könnte (15,18,66,78).

1.2. Regulation der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts durch die Orexine

Der laterale Hypothalamus spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Nahrungsaufnahme und Energiehomöostase. So konnten Anand und Brobeck schon 1951 zeigen, dass die bilaterale Zerstörung des lateralen Hypothalamus bei der Ratte Aphagie und Adipsie hervorruft, die schließlich innerhalb weniger Tage zum Tod führen (2,109), es sei denn die Tiere werden zwangsernährt (6). Demgegenüber führt elektrische Stimulation des lateralen Hypothalamus bei Ratten und Katzen zu gesteigerter Nahrungsaufnahme (21). Bei der Ratte resultiert Langezeitstimulation aufgrund exzessiver Nahrungsaufnahme in Übergewicht (100).

Aufgrund der Präpro-Orexin Expression in Neuronen des lateralen Hypothalamus schlossen Sakurai et al. auf eine mögliche Beteiligung der Orexine an der Nahrungsaufnahme (89). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die intracerebroventriculäre (i.c.v.) Injektion von Orexin A oder Orexin B dosisabhängig initial die Nahrungsaufnahme steigert (89). Orexin A war dabei signifikant wirksamer als Orexin B, vermutlich aufgrund seiner längeren Halbwertszeit. Bei fastenden Tieren war die hypothalamische Präpro-Orexin

mRNA Menge erhöht (89). So wurde der Name Orexin vom griechischen Wort „orexis“ für Appetit abgeleitet (89).

Weitere Arbeitsgruppen zeigten, dass Orexin A bei Maus, Ratte und Goldfisch die Nahrungsaufnahme steigert (24,36,53,83,103,112). Auch die Injektion von Orexin A in benachbarte Regionen des lateralen Hypothalamus wie den Nucleus paraventricularis, den Nucleus dorsomedialis oder die ventrale Area tegmentalis stimulierten die Nahrungsaufnahme (23,102,103,114). Yamada et al., 2000 zeigten, dass ein zentral injizierter Orexin A Antikörper die spontane Nahrungsaufnahme in fastenden Ratten inhibiert (117). Des weiteren verminderte die intraperitoneale Gabe eines selektiven OX₁-Rezeptor-Antagonisten (SB-334867-A) die Nahrungsaufnahme in der Nacht (32,84), was den Schluss zulässt, dass die Nahrungsaufnahme durch Orexin bzw. Stimulation des OX₁-Rezeptors reguliert wird.

Der orexinerge Effekt von Orexin ist vergleichbar mit dem von MCH oder Galanin, ist aber deutlich geringer als der von NPY (24). Zudem resultiert die chronische Gabe von Orexin, im Gegensatz zu NPY, nicht in Übergewicht in normalen Ratten (99,120), obwohl seine orexinerge Wirkung länger anhält (89). Des weiteren zeigten „Orexin-knockout-Mäuse“ trotz verminderter Nahrungsaufnahme eine Erhöhung ihres Körpergewichts (30). Die Zunahme des Körpergewichts könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Tiere eine geringere motorische Aktivität aufweisen und ihr Energieverbrauch reduziert ist (30). Daraus resultiert, dass der Energieverbrauch und die motorische Aktivität durch Orexin anscheinend stärker stimuliert wird als die Energieaufnahme.

Darüber hinaus scheint die chronische i.c.v. Gabe von Orexin auch den zirkadianen Rhythmus der Tiere bezüglich der Nahrungsaufnahme zu beeinflussen, indem die Nahrungsaufnahme tagsüber erhöht und nachts vermindert ist (33,119,120).

Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Insulin induzierte Hypoglykämie zu einem Anstieg der Präpro-Orexin mRNA im lateralen Hypothalamus führt, und die dort gelegenen Orexin-Neurone aktiviert werden (62). Zudem sind die Orexinplasmaspiegel in fastenden Menschen erhöht, während die Leptinplasmaspiegel sinken (47).

Nach i.c.v. Gabe von Orexin wurde auch eine vermehrte Wasseraufnahme bei Ratten beobachtet (49). Ließ man die Tiere über 48 Stunden dursten, so war die hypothalamische Präpro-Orexin mRNA Menge bei diesen Tieren erhöht (49).

1.3. Weitere zentrale Effekte von Orexin

1.3.1. Der Einfluss von Orexin auf autonome Funktionen

Mehrere Autoren zeigten, dass die intracerebroventriculäre Injektion sowohl von Orexin A als auch von Orexin B dosisabhängig zu einer Zunahme des mittleren arteriellen Blutdrucks sowie zu einer Steigerung der Herzfrequenz bei der Ratte und bei Kaninchen führt (57,90,97). Die Aktivität der renalen sympathischen Nerven dagegen wird nur durch Orexin A gesteigert (57,90,97). Des Weiteren steigt nach i.c.v. Injektion von Orexin die Plasma-Katecholamin-Konzentration an (57). Eine weitere Arbeitsgruppe injizierte Orexin sowohl intracisternal als auch in die rostrale ventrolaterale Medulla oblongata, d. h. in die nähere Umgebung von Arealen, die eine bedeutende Stellung in der Regulation des Blutdrucks haben. Auch hier konnte eine Steigerung von Herzfrequenz und Blutdruck beobachtet werden, wobei schon geringere Dosen von Orexin größere Effekte als nach i.c.v. Injektion hervorriefen (13).

Die intracisternale Injektion von Orexin A, nicht aber von Orexin B, stimuliert außerdem die Sekretion von Magensäure, ein Effekt, der sich nach intraperitonealer Injektion nicht nachweisen lässt (105). Die Steigerung der Magensäuresekretion lässt sich durch Vagotomie und das Parasympatholytikum Atropin antagonisieren (105).

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass Orexin direkten Einfluss auf das zentrale autonome Nervensystem ausübt.

1.3.2. Orexin und Schlaf-Wachverhalten

Die ausgedehnten Projektionen Orexin-immunopositiver Neurone in Gebiete wie zum Beispiel den Nucleus coeruleus, den Nucleus tuberomammillaris oder die

pontine Formatio reticularis implizierten deren Einfluss auf das Schlaf-Wachverhalten (11,18,78).

Hagan et al.,1999 konnten zeigen, dass i.c.v. injiziertes Orexin A eine deutliche Steigerung der Aktivität von Neuronen des Locus coeruleus bewirkt, eines der Kerngebiete im Hirnstamm, die den kortikalen Aktivitätszustand beeinflussen (28). Schlafstudien mit Ratten zeigten, dass die Aktivität Orexin-immunopositiver Neurone mit dem Wachheitsgrad der Tiere korreliert (93).

Aufsehen bereitete die Entdeckung, dass eine Mutation im sogenannten canarc1 Gen, welche bei Hunden in einem autosomal-rezessiven Erbgang mit 100%iger Penetranz zu Narkolepsie führt, sich als Mutation im OX₂-Rezeptor-Gen erwies (51). Außerdem zeigen Orexin-knockout-Mäuse Narkolepsie-ähnliche Symptome (11). Mäuse mit einem inaktivierten OX₂-Rezeptor-Gen haben mildere Narkolepsie Symptome als Orexin-knockout-Mäuse; OX₁-Rezeptor-knockout-Mäuse zeigen eine Veränderung im Schlafverhalten, OX₁- und OX₂-Rezeptor-knockout-Mäuse zeigen den gleichen Phänotyp wie Orexin-knockout-Mäuse (114). Des weiteren wiesen transgene Mäuse, welche das Ataxin-Gen unter dem Orexigen-Promotor exprimieren und in denen die Orexin produzierenden Neurone daraufhin degenerieren, neben einem stark erhöhten Körpergewicht Narkolepsie-ähnliche Symptome auf (30). Schließlich konnte auch beim Menschen ein Zusammenhang zwischen dem Orexinsystem und Schlaf-Wachverhalten belegt werden. So ist die Anzahl der Orexin-Neurone und deren Projektionen bei Narkolepsie-Patienten deutlich reduziert (70,77,107). Der Liquorgehalt dieser Patienten weist verminderte Orexin-Spiegel auf mit einer großen Schwankbreite in der Kontrollgruppe (70). Es wurden auch verminderte Orexinspiegel in einigen Fällen des Guillan-Barré-Syndroms detektiert (81). Interessanterweise wurde auch bei Narkolepsie-Patienten eine Erhöhung des Körpergewichts beobachtet (94).

1.3.3. Der Einfluss von Orexin auf die Regulation neuroendokriner Funktionen

Zentren endokriner Regelkreise wie zum Beispiel der Nucleus paraventricularis oder der Nucleus arcuatus des Hypothalamus zeichnen sich durch dichte Projektion Orexin-immunopositiver Fasern aus (18,78). Dies legte unter anderem

die Vermutung nahe, dass Orexine Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse nehmen könnten. Tatsächlich ließen sich nach i.c.v. Injektion von Orexin erhöhte Corticosteron-Plasma-Spiegel messen (1,28,86). Immunhistochemische Detektion des c-fos Proteins als Marker neuronaler Aktivität zeigte, dass die i.c.v. Injektion von Orexin A einen markanten Anstieg dieses Proteins im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus induziert (50). Durch *in situ* Hybridisierung konnte weiterhin eine Erhöhung der CRH mRNA Level im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus nach i.c.v. Injektion von Orexin A nachgewiesen werden (1). Parallel dazu ist ein Anstieg der Plasmakonzentration von CRH zu beobachten, der über NPY reguliert zu sein scheint, da die gleichzeitige Gabe eines NPY-Antagonisten den Effekt der erhöhten CRH-Ausschüttung nach Orexingabe aufhebt (86).

Orexin-Stimulation von kultivierten Hypophysen-Zellen bewirkt dagegen keine direkte Sekretion von ACTH aus der Hypophyse (91). Die erhöhten Plasmakonzentrationen von ACTH nach i.c.v. Gabe von Orexin A sind daher vermutlich durch die Freisetzung von CRH durch Orexin zu erklären (1,28,50,86).

Außerdem bewirkt die i.c.v. Applikation von Orexin A eine Reduktion der Plasma-Spiegel von Prolaktin und Wachstumshormon (28). Die verminderte Sekretion von Prolaktin scheint bei Orexin unabhängig von Dopamin vermittelt zu sein (85).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zentral injiziertes Orexin abhängig von der Präsenz von Östradiol und Progesteron eine Freisetzung von LH bedingt. In ovariectomierten Ratten, die Progesteron und Östradiol substituiert sind, induziert Orexin einen Anstieg der Plasma-LH Level, in unbehandelten ovariectomierten Tieren dagegen wird dieser Plasma-Anstieg inhibiert (79). Orexin hat allerdings keinen direkten Effekt auf die Freisetzung von LH in kultivierten Hypophysen-Zellen (91). Vielmehr scheint dieser Effekt zentral über die Regulation von GnRH (LHRH) vermittelt zu sein, da Orexin eine Freisetzung von GnRH (LHRH) auch aus Hypothalamus-Zellkulturen *in vitro* induziert (85). I.c.v. Injektion von Orexinen reduziert die pulsatile Frequenz sowie die Pulsamplitude der LH-Freisetzung in ovariectomierten Ratten (38,106). Die Arbeitsgruppe um Irahara et al., 2001 zeigte, dass die Hemmung der pulsatilen Sekretion von LH durch Orexin bei

ovarektomierten Ratten vermutlich über Hemmung der GnRH-Sekretion via β -Endorphin läuft (38).

1.4. Periphere Effekte von Orexin

In vitro Versuche mit Nebennieren von Ratten, Schweinen und Menschen zeigten, dass Orexin eine Freisetzung von Corticosteron/Kortisol und Aldosteron bewirkt (55,59,67). Dieser Effekt scheint unabhängig von ACTH zu laufen. Die gleichzeitige Gabe von Orexin und einem ACTH-Rezeptor-Antagonisten inhibiert diese Corticosteron-Freisetzung nämlich nicht (55). Weiterführende Versuche mit menschlichen Nebennieren bestätigten, die bei der Ratte erhobenen Befunde und zeigten, dass die Freisetzung von Kortisol über eine adenylatcyclase- bzw. inositolphosphat-abhängige Signalkaskade läuft (59,80). I.c.v. Gabe von Orexin beeinflusst auch die Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark von Ratten und Schweinen (67,97).

Darüber hinaus untersuchte die Arbeitsgruppe um Mitsuma et al., 1999 den Einfluß von i.v. injiziertem Orexin auf die Freisetzung von TRH bzw. TSH sowie die Schilddrüsenhormone T3 und T4 (61). Dabei zeigte sich, dass nach i.v. Injektion von Orexin A der Plasma-Spiegel von TSH signifikant sinkt, während der Plasma-Spiegel von TRH weitgehend konstant bleibt. TRH wurde jedoch vermehrt im Hypothalamus gespeichert und seine Freisetzung durch Orexin A unterdrückt. Orexin A hatte dabei keinen direkten Einfluß auf die Freisetzung von TSH aus der Adenohypophyse; die sinkenden Plasmaspiegel von TSH sind vermutlich vielmehr auf die inhibierte Ausschüttung von TRH zurückzuführen (61). Die Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone T3 und T4 blieben konstant (61).

Subkutane und i.v. Injektion von Orexin A bewirkt dosisabhängig eine Steigerung der Insulin-Ausschüttung (71). Auch bei *in vitro* Versuchen mit Pankreas-Präparationen bewirkt Orexin A im Perfusionsmedium eine Insulin-Freisetzung (71). Orexin A- und Orexin-Rezeptor-Immunoreaktivität wurde in Insulin- und Glukagon-immunopositiven Zellen des Pankreas detektiert (45). Die Orexin-Freisetzung aus Pankreaszellen wird durch niedrige Blutglukosespiegel stimuliert und durch erhöhte Blutglukosespiegel inhibiert (74). Orexin-positive

Pankreaszellen scheinen als „Glukosesensoren“ zu fungieren und die Sekretion der Pankreas-Hormone in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel zu beeinflussen.

Kirchgessner et al. beschrieben Orexin- bzw. Orexin-Rezeptor-ähnliche Immunoreaktivität im Magen/Darmtrakt von einigen Nagetierspezies und Menschen (45). Die Verteilung der Orexinneurone sowie der Rezeptoren und die Koexpression anderer Neurotransmitter lässt einen Einfluss der Orexine auf die Sekretion und Aufnahme von Enzymen und Hormonen, auf endokrine und autonome Funktionen aber auch auf die Darmmotilität vermuten (45,48,69).

1.5. Zielsetzung

Im Falle eines peripheren Orexinsystems sollte die Genexpression der Orexin-Rezeptoren in den peripheren Wirkungsstätten nachzuweisen sein. Zur Bestätigung dieser These wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Expression der mRNA von Orexin und den Orexin-Rezeptoren mittels RT-PCR inklusive erstmalig quantitativer „real-time“ PCR und *in situ* Hybridisierung in verschiedenen peripheren Geweben von Wistar-Ratten untersucht. Die oben aufgeführten Befunde lassen vermuten, dass es ein peripheres Orexinsystem gibt. Aufgrund der unterschiedlichen Expression der Orexin-Rezeptoren im Hypothalamus bei männlichen und weiblichen Wistar-Ratten haben wir auch eine geschlechtsspezifische Expression der Orexin- und der Orexin-Rezeptor-mRNA in den peripheren Geweben untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Materialgewinnung

Für die Versuche wurden weibliche und männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250-300 g von Charles River in Sulzfeld, Deutschland, verwendet. Die Tiere wurden mit einer Dosis von 100 mg/kg Pentobarbital anästhesiert und anschließend mittels einer Guillotine dekapitiert. Im sofortigen Anschluss wurden Gehirn, Hypophyse, Schilddrüse, Lunge, Herz, Nieren, Nebennieren, Milz, Leber, Magen, Pankreas, Jejunum, Duodenum, Aorta, Fettgewebe, Muskelgewebe, Ovarien und die Hoden entnommen und in Isopentan bei -30°C auf Trockeneis gefroren. Bis zum Gebrauch wurden die Organe bei -80°C aufbewahrt. Die Hypothalami wurden nach der Methode von Palkovits und Brownstein aus den gefrorenen Gehirnen freipräpariert (75).

2.2. RT-PCR

2.2.1. RNA-Isolierung

Die Extraktion der mRNA aus den gefrorenen Organen erfolgte mit einem mRNA-Isolierungskit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland. Zunächst wurden die tiefgefrorenen Gewebe in Guanidinisothiocyanat- und β -Mercaptoethanol-haltigen RLT-Puffer mittels eines Rotorstabes ca. eine Minute homogenisiert. Das Homogenat wurde für drei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand mit Ethanol (70%) versetzt. Durch Zentrifugieren (15 Sekunden bei $>8000\text{ g}$) über eine Silicalgelmatrix-haltige Säule wird die mRNA an das Säulenmaterial gebunden. Es wurden nicht mehr als 30 mg Gewebe pro Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit 700 μl RW1 Puffer gewaschen, zentrifugiert und zweimal mit 500 μl RPE Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift erneut zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA aus den Säulen mit 50 μl RNase freiem Wasser durch Zentrifugieren (1 Minute bei $>8000\text{ g}$) eluiert.

DNase-Behandlung

Um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu beseitigen, wurde die RNA mit einer DNase I behandelt. Dabei wurde das Eluat mit Wasser auf 87,5 µl aufgefüllt mit 2,5 µl DNase I und 10 µl RDD Puffer (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit 350 µl RLT-Puffer und 250 µl Ethanol (96-100%) gemischt und auf eine Säule aufgetragen. Die anschließenden Waschschriffe sowie die Eluierung der RNA liefen nach dem gleichen Schema wie bei der RNA-Isolierung ab. Bis zu ihrer weiteren Verarbeitung wurde die gewonnene RNA bei -80°C aufbewahrt.

Quantifizierung der RNA

Durch spektralphotometrische Messung der optischen Dichte lässt sich sowohl die Menge als auch die Reinheit der zuvor isolierten RNA quantifizieren. Während Nucleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) ein Maximum an Lichtabsorption aufweisen, befindet sich das Absorptionsmaximum von Proteinen bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}). Die absolute Extinktion der Lösung gegen Wasser ist nach dem Lambert-Beer-Gesetz linear dem RNA-Gehalt, wohingegen der Quotient A_{260}/A_{280} ein Maß für die Kontamination der Probe mit Proteinen darstellt. Ein Verhältnis von 1,8 wurde als hinreichend reine Präparation angesehen.

Die Proben wurden 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) gemessen. Eine Absorptionseinheit entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA pro ml Wasser.

2.2.2. cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA, Ausgangsprodukt für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), wurde mit Hilfe des AMV Reverse Transkriptase Systems der Firma Promega, Mannheim, Deutschland, durchgeführt. Zunächst wurde die RNA für 10 Minuten bei 70°C erhitzt und auf Eis aufbewahrt. In einem Volumen von 20µl

wurden folgende Reagenzien mit den angegebenen Endkonzentrationen zusammenpipettiert:

5 mM MgCl₂

1 x Reverse Transkriptase Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25 °C), 50 mM KCl, 0,1% Triton® X-100)

jeweils 1 mM ATP, CTP, GTP, TTP

1 U/μl rekombinanter Ribonuklease Inhibitor (RNasin®)

15 U/μg AMV Reverse-Transkriptase

0,5 μg Oligo(dT)₁₅-Primer pro μg RNA

50 ng/μl RNA

RNase-freies Wasser

Das Reaktionsgemisch wurde in einem Thermocycler auf 42°C für 15 Minuten erhitzt, dann für 5 Minuten auf 99°C erhitzt und abschließend für 5 Minuten auf 0°C abgekühlt. Durch diesen Abkühlvorgang wird die Reverse Transkriptase inaktiviert und daran gehindert, erneut an der cDNA zu binden. Die cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

2.2.3. Primer-Auswahl

Anhand der veröffentlichten Nukleotidsequenzen (73,89) wurden mit Hilfe der Primer 3 Software von S. Rozen (erhältlich unter http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) spezifische sense- und antisense-Primerpaare für Präpro-Orexin, den OX₁- und OX₂-Rezeptoren und β-Aktin konstruiert. Synthetisiert wurden diese Oligonukleotid-Primer von der Firma Live Technologies in Karlsruhe, Deutschland.

Tabelle 2.1: Nukleotidsequenzen der Primer

Name	Orientierung	Sequenz	Größe des PCR-Produkts (in Bp)
Präpro-Orexin	sense	5'-GCCGTCTCTACGAACTGTTG-3'	303
	antisense	5'-CGAGGAGAGGGGAAAGTTAG-3'	
OX ₁ -Rezeptor	sense	5'-CCCTCAACTCCAGTCCTAGC-3'	260
	antisense	5'-CAGGGAGGGCCTATAATTGA-3'	
OX ₂ -Rezeptor	sense	5'-CAATGTTGTTGGGGTGCTTA-3'	314
	antisense	5'-TCCCCCTCTCATAAACTTGG-3'	
β-Aktin	sense	5'-GTGGGTATGGGTCAGAAGGA-3'	380
	antisense	5'-AGCGCGTAACCCTCATAGAT-3'	

2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt es, *in vitro* auch kleinste Mengen an DNA zu amplifizieren. Die Neusynthese der DNA-Sequenzen, die von zwei synthetischen Oligonukleotiden (sog. Primern) eingerahmt werden, erfolgt mittels einer DNA-Polymerase. Ein Reaktionszyklus läuft wie folgt ab: Aufspaltung der DNA durch Erhitzen, Hybridisierung der spezifischen Primer (sogenanntes „annealing“) und Neusynthese (sogenannte Amplifizierung) der DNA-Sequenz durch die DNA-Polymerase. Durch exponentielle Anreicherung der DNA-Sequenz können nach mehrfacher Wiederholung des Vorgangs (20-40 Zyklen) die DNA-Abschnitte nachweisbar gemacht und für andere molekularbiologische Methoden benutzt werden (64).

In einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl wurden folgende Reagenzien angegeben in ihren Endkonzentrationen zusammenpipettiert:

5 µl cDNA-Lösung aus der RT-Reaktion

1 X Reverse Transkriptions Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25 °C), 50 mM KCl, 0,1% Triton® X-100)

- 200 µM dNTP (schon in 5 µl cDNA-Lösung enthalten)
- 1 – 1,5 mM MgCl₂
- 25 pmol „sense“ Primer
- 25 pmol „antisense“ Primer
- 1,25 U Dynazyme DNA Polymerase, Finnzymes, Espoo, Finnland

Im Thermocycler wurde die PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Aufspaltung der DNA-Doppelstränge für 5 Minuten bei 95°C, je Zyklus Denaturierung für 30 Sekunden bei 95°C, anschließendes „Annealing“ für 30 Sekunden bei 56°C und Amplifizierung bei 72°C für 30 Sekunden. Abschließend wurde das Reaktionsgemisch noch auf 72°C für 5 Minuten erhitzt, um noch nicht vollständig amplifizierte DNA-Moleküle zu vervollständigen. Das Amplifizierungsprodukt wurde auf 4°C abgekühlt und bei –20°C eingefroren.

2.3. Restriktionsverdau

Die Spezifität des PCR-Produktes wurde durch Restriktionsenzyme, welche an bestimmten Stellen der DNA-Sequenz schneiden, überprüft. In einem Reaktionsansatz wurden 10 µl der PCR-Probe mit 1 µl 10 x Reaktionspuffer und 5 U Restriktionsendonuklease versetzt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Das Präpro-Orexin-Amplifizierungsprodukt wurde mit dem Restriktionsenzym Pvu II und dem Puffer React 6 (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) geschnitten, die PCR-Produkte des OX₁- und OX₂-Rezeptors wurden mit Alu I und Puffer React 1 (Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verdaut. Nach Verdau durch die Enzyme wurde die Größe der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 2%igen Agarosegel untersucht. Dazu wurden 2 g Agarose (Agarose I, Amresco) in 10 ml 10 x TAE (400 mM Tris Acetat, 100 mM EDTA) und 90 ml DEPC-Wasser (DEPC, Sigma) in der Mikrowelle gelöst. Nach leichter Abkühlung des Gels wurde Ethidiumbromid in

einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben, das Gel in eine Gelkammer gegossen und für 10-20 Minuten zum Auspolymerisieren bei 4°C stehengelassen. Die DNA wurde mit einem Ladepuffer (0,25% Xylene Cyanol FF, 30% Glycerin in 6 x TAE-Puffer) im Verhältnis 1:6 verdünnt. Parallel wurde ein DNA-Standard (100 Bp „Molecular Ruler“, BioRAD) geladen. Die DNA wurde anschließend über 30-45 Minuten bei einer Spannung von 10-15 V pro cm Gellänge in 1 x TAE aufgetrennt. Durch Interkalieren des im Gel vorhandenen fluoreszierenden Ethidiumbromids mit der DNA konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und mit den Markerbanden verglichen werden. Die Gele wurden im UV-Licht mittels einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.5. Klonierung der PCR-Produkte

Um die Spezifität unserer PCR-Produkte zu überprüfen sowie Standard-DNA-Lösungen für die „real-time“ PCR herzustellen, wurden sie kloniert und sequenziert.

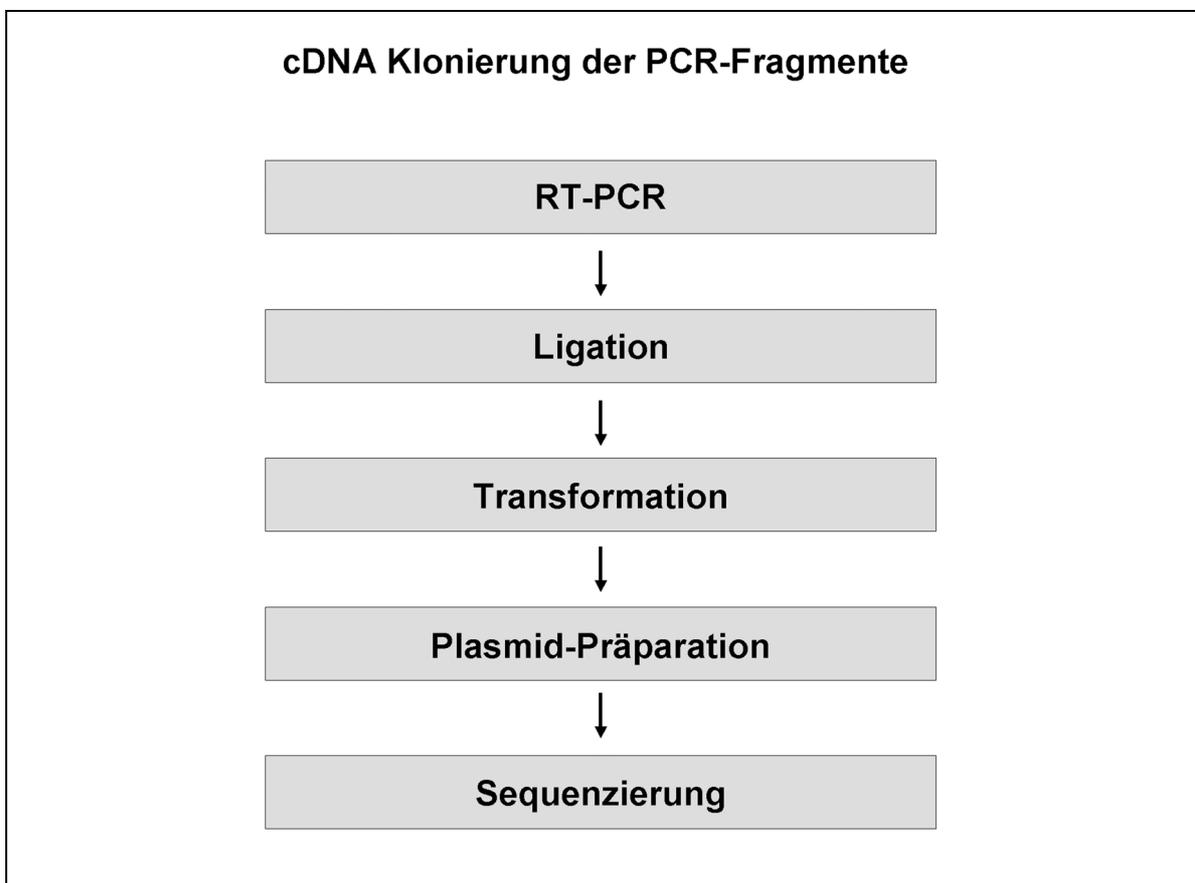


Abbildung 2.1: Flussschema der cDNA Klonierung

2.5.1. PCR-Produkt-Extraktion aus dem Agarosegel

Die PCR-Produkte wurden durch das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach der Elektrophorese aus dem Agarosegel isoliert. Dazu wurde die entsprechende DNA-Bande mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Zu je 100 mg Gel wurden ca. 300 µl QG Puffer gegeben. Die Gelmenge pro Säule überschritt dabei 400 mg nicht. Das Gel wurde in dem Puffer für 10 Minute auf 50°C erhitzt, bis es sich aufgelöst hatte. Es wurde eine der eingesetzten Gelmenge entsprechende Menge Isopropanol zu der Lösung gegeben, diese in eine Säule überführt und 1 Minute zentrifugiert. Nach erneutem Auftragen von 500 µl QG Puffer und Zentrifugation, wurde zunächst mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Die Säule wurde danach nochmals für 1 Minute bei 10000 g zentrifugiert. Abschließend wurde die DNA durch Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit mit 50 µl Wasser aus der Säule eluiert.

2.5.2. Ligation des PCR-Produkts in den Vektor

Mit Hilfe des TA Cloning[®] Kit Dual Promoter (pCR[®]II) (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) wurden die PCR-Produkte in das Plasmid (pCR[®]II) ligiert. Der linearisierte Vektor pCR[®]II hat an der Insertionsstelle für PCR-Produkte 3'-Deoxythymidinüberhänge, welche zu den 3'-Deoxyadenosin-Überhänge der PCR-Produkte kompatibel sind.

Ein Ligationsansatz von 10 µl enthielt folgende Reagenzien:

- 3 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1 µl 10 x Liagationspuffer (60 mM Tris-HCl, 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mg/ml bovines Serumalbumin, 70 mM Mercaptoethanol, 1 mM ATP, 20 mM Dithiothreitol, 10 mM Spermidine)
- 2 µl pCR[®]II Vektor (25 ng/µl in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5)
- 1 µl T4 DNA Ligase
- 3 µl Wasser

Die Ligation wurde bei 14°C über Nacht inkubiert. Die Ligationsansätze wurden bis zur Transformation in die Bakterienzellen bei -20°C eingefroren.

2.5.3. Transformation

Vorbereitung der LB-Platten

Die Bakterien wurden auf Luria-Bertani-Medium-haltigen Agar-Platten gezüchtet. Für 1l LB-Medium wurden 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast-Extrakt, 10 g NaCl und 15 g/l Agarose in 950 ml deionisiertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert, auf 55°C abgekühlt und mit 50 µg/ml Ampicillin versetzt. Die Lösung wurde in die Platten gefüllt und diese nach dem Auspolymerisieren bei 4°C gekühlt.

Kompetente *Escherichia coli* INVαF' (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) und Plasmide mit inserierter Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA wurden auf Eis aufgetaut. 2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl der Bakterien pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Reaktionsansätze für 30 Sekunden in ein Wasserbad von 42°C erhitzt und wieder auf Eis platziert. Zu jedem Ansatz wurden 250 µl SOC-Medium (2% Tryptone, 0,5% Yeast Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose) pipettiert. Die Ansätze wurden bei 37°C für 1 Stunde geschüttelt und schließlich vollständig auf die vorbereiteten LB-Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 18 Stunden bei 37°C inkubiert.

Selektion der Bakterienkolonien

Da das Plasmid, in welches die PCR-Produkte ligiert wurden, ein Resistenzgen gegen Ampicillin trägt, wuchsen nur die Bakterien, die nach erfolgreicher Transformation auch das Resistenzgen durch das Plasmid erhalten haben.

2.5.4. Plasmid-Präparation

Zur Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte wurden die Plasmide zunächst isoliert. Dazu wurden einige Kolonien in 5 ml LB-Medium (10 g Bacto-Tryptone, 5 g Bacto-Yeast-Extrakt und 10 g NaCl in 950 ml deionisiertem Wasser gelöst) übergeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Plasmid-Isolierung wurde

das NukleoSpin[®] Isolierungskit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Das Nährmedium mit den enthaltenen Bakterien wurde zunächst 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde durch mehrfaches Pipettieren in 250 µl A1 Puffer resuspendiert. Es wurden nun 250 µl A2 Puffer hinzugegeben, die Suspension vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert. 300 µl A3 Puffer wurden zugefügt, die Suspension vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei 12000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der von Zellresten gereinigte Überstand wurde auf eine NucleoSpin Säule gegeben und erneut für 60 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. 700 µl eines Ethanol-haltigen Puffers wurden auf die Säule aufgetragen und erneut 1 Minute zentrifugiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt um den restlichen Alkohol auszuwaschen. Die DNA wurde mit 50 µl AE Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) durch Zentrifugieren eluiert.

Die Sequenzanalyse der klonierten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland.

2.6. „Real-time“ PCR

Bei „real-time“ PCR ist während des PCR-Verlaufs eine kontinuierliche Messung des entstehenden PCR-Produktes und somit eine Quantifizierung der Ausgangsmengen möglich (9,26). Die „real-time“ PCR erfolgt unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I, welcher eine sehr sensitive Detektion ermöglicht (63,64). SYBR-Green I interkaliert unspezifisch in Doppelstrang-DNA, wird bei einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm. Für die Messung wurde das Gene Amp 5700 Sequence Detection System der Firma PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland, verwendet. Von jeder Probe wurde eine Dreifachmessung durchgeführt und mit einer Standardreihe verglichen. Eingesetzt wurde das „qPCR[™] Core Kit for SYBR[™] Green I“ der Firma Eurogentec, Köln, Deutschland. In einem Endvolumen von 50 µl wurde folgender Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

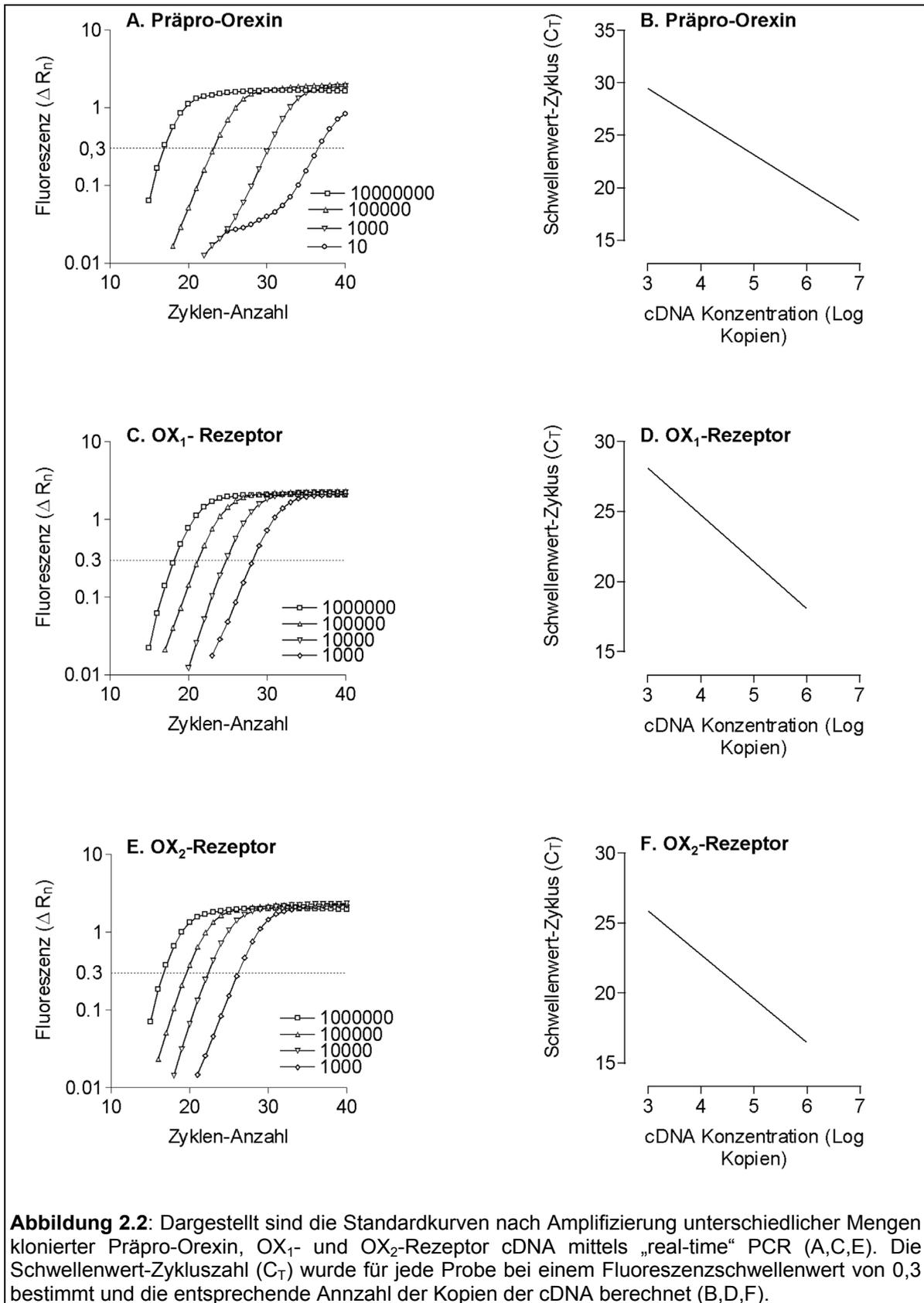
100 ng cDNA-Lösung aus RT-Reaktion
1 x Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25 °C), 50 mM KCl)
200 µM dNTP-Gemisch
3 mM MgCl₂
0,3 µM sense Primer
0,3 µM antisense Primer
1,5 µl SybrTM Green I (1:2000 Verdünnung in Dimethylsulfoxid)
1,25 U Hot GoldStar DNA Polymerase (Eurogentec, Köln, Deutschland)

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95°C schlossen sich 40 Amplifizierungszyklen, beginnend mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden, 30 Sekunden „Annealing“ bei 56°C und 30 Sekunden Amplifizierung bei 60°C an. Zugefügt wurde dem PCR-Ansatz klonierte cDNA-Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen sowie ein Leerwert.

Die Spezifität der amplifizierten cDNA wird durch DNA-Schmelzkurven-Analyse jeder individuellen PCR bestätigt. Die Schmelzkurven-Analyse ist vollständig in den Ablauf der PCR integriert und ermöglicht eine sichere und schnelle Differenzierung der PCR Produkte (82).

Quantifizierung der mRNA durch die Zyklus-Schwellenwert-Methode

Die Quantifizierung der mRNA erfolgte mit der Zyklus-Schwellenwert-Methode (35). Durch serielle Verdünnungen bekannter Mengen der klonierten cDNA Fragmente für Präpro-Orexin, den OX₁-Rezeptor und OX₂-Rezeptor wurden Standardkurven erstellt (Abbildung 2.2.). Die Schwellenwert-Zykluszahl (C_t) wird für jede Probe mit der GeneAmp 5700 Sequenz Detection Software bei einem Fluoreszenz-Schwellenwert von 0,3 (R_n) bestimmt und die entsprechende Zahl der mRNA Kopien pro 100 ng cDNA gemäß der eingesetzten mRNA Menge berechnet.



2.7. *In situ* Hybridisierung mit Oligonukleotidsonden

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) mittels einer Gensonde am Gewebeschnitt und birgt - im Unterschied etwa zur PCR - den Vorteil, dass ein positives Signal "in situ", also vor Ort, lokalisiert werden kann (3,14,31,76).

2.7.1. Anfertigung der Schnitte

Die entnommenen und bei -80°C gefrorenen Organe wurden in $16\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte bei -20°C in einem Kryostaten geschnitten. Jeder zweite Schnitt wurde mit silanisierten Objektträgern (silane-prep slides, Sigma) aufgenommen und bei -80°C bis zum späteren Gebrauch aufbewahrt.

Um einer Zerstörung der RNA durch RNasen vorzubeugen, wurden alle verwendeten Glaswaren vor Gebrauch für zwei Stunden bei 200°C gebacken sowie alle notwendigen Pufferlösungen mit 0,1% DEPC behandeltem Wasser hergestellt. Dazu wurde zu Wasser DEPC in einer Endkonzentration von 0,1% hinzugegeben, für 12 Stunden inkubiert und das DEPC durch Autoklavieren zerstört.

2.7.2. Auswahl der Oligonukleotid-Sonden

Die erforderlichen Oligonukleotid-Sonden wurden von der Firma Live Technologies, Karlsruhe, Deutschland, synthetisiert. Die Spezifität der Sonden für die mRNA des OX_1 - und des OX_2 -Rezeptors wurde von der Arbeitsgruppe um Trivedi et al., 1998 nachgewiesen (108). Um das Hybridisierungssignal zu verstärken wurden gleichzeitig drei unterschiedliche Antisense-Oligonukleotid-Sonden pro Rezeptor eingesetzt.

Tabelle 2.2: Nukleotidsequenzen der Antisense-Oligonucleotid-Primer des OX₁- und OX₂-Rezeptors

Rezeptor	Sequenz
OX₁-Rezeptor-Antisense-Oligonukleotide	5'-TCC-TCA-TAG-TCT-GGA-GGC-AGG-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'
	5'-TGC-TGA-GCT-TCC-AGT-TGC-TCT-GAG-GGT-GGC-TTC-CAG-TTC-CGC-ACC-3'
OX₂-Rezeptor-Antisense-Oligonukleotide	5'-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'
	5'-CAA-AGT-TGC-TGA-TCT-GAG-TAG-TCA-GGG-ACT-TCC-TGC-TCT-CTG-TAC-3'

Markierung der Oligonucleotid-Sonden:

Die Oligonucleotid-DNA wurde mit dem „3'-end labeling Kit“ (N4020) der Firma Amersham und [³³P]deoxy-ATP (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) mit Hilfe der terminalen Deoxynukleotidtransferase (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) markiert. In einem Reaktionsansatz von 50 µl wurden folgende Reagenzien bei 37°C im Wasserbad für 1 Stunde inkubiert:

- 5 µl Cacodylate Puffer (5mM CoCl₂, 5mM DTT, 500mM Sodium Cocodylate)
- 10 µl Oligonucleotide (10 pmol/µl antisense-Oligonucleotid)
- 50 pmol [³³P]deoxy-ATP
- 5 µl Terminale Deoxynukleotidtransferase
- 25 µl Wasser

Nach der Markierungsreaktion wurden zu jedem Ansatz 5 µl 0,5 M EDTA-Lösung pipettiert, die Ansätze gemischt und kurz zentrifugiert.

Aufreinigung der markierten Oligonucleotid-Sonden

Die markierten Oligonucleotid-Sonden wurden über ProbeQuant™ G-25 Sephadex-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grossbritannien) aufgereinigt und von nicht eingebauten [³³P] dATP getrennt. Dazu wurden die Säulen zunächst 1 Minute zentrifugiert, um den in der Säule enthaltenen Puffer auszuwaschen. Die vorher markierten Proben wurden mit STE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 10,95 g/l NaCl) auf 50 µl aufgefüllt, auf die Säulen gegeben und für 2 Minuten bei 735 g zentrifugiert.

2.7.3. Hybridisierung

Vorbehandlung der Schnitte

Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für ca. 1 Stunde aufgetaut, mit folgenden Puffern fixiert und dehydriert:

- 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd in 1x PBS
- 1 Minute in 1x PBS
- 1 Minute in 1x PBS
- 1 Minute in 70% Ethanol
- 2 Minuten in 95% Ethanol

Die Schnitte wurden dann luftgetrocknet.

Hybridisierung

Die Oligonucleotid-Sonden wurden im Hybridisierungsgemisch auf 1-2 pmol verdünnt. 1 ml Hybridisierungsmix enthielt folgende Reagenzien:

- 5-10 µl [³³P]-markierte Oligonucleotid-Sonde
- 20 µl DNA/RNA-Gemisch (Lachshoden-DNA [Sigma D-7656] 100 µg/ml, Hefe-tRNA [Gibco BRL 15401-029] 250 µg/ml)
- 900 µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 20 mM Tris pH 7,5, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 x Denhard's Solution, 10% Dextran-Sulfat, Wasser)
- 60 µl Dithiothreitol (150 mM)

20 µl SDS (0,2%)

Pro Objektträger wurden ca. 150 µl des Hybridisierungsmixes aufgetragen, mit einem sterilen Deckglas abgedeckt und 16-20 Stunden bei 42°C in speziellen Kammern inkubiert. Einem Austrocknen der Schnitte wurde vorgebeugt, indem der Boden der Plastikboxen mit Filter-Papier (Whatman) ausgelegt wurde und dieses mit 20 ml 50% Formamid in 2 x SSC getränkt wurde.

Waschen der Schnitte nach der Hybridisierung

Die Objektträger wurden mehrfach in 1 x SSC gewaschen und so die Deckgläser heruntergespült. Es schlossen sich folgende Waschschrirte an:

5 Minuten in 1 x SSC bei Raumtemperatur (RT)

30 Minuten in 1 x SSC bei 55°C

1 Minute in 1 x SSC bei RT

1 Minute in 0,1 x SSC bei RT

Im Anschluß wurden die Schnitte dehydriert:

1 Minute in 70% Ethanol mit 300 mM Ammonium Acetat

1 Minute in 95% Ethanol mit 300 mM Ammonium Acetat

Schließlich wurden die Objektträger kurz in 100% Ethanol gespült und an der Luft getrocknet.

2.7.4. Autoradiographie

Die Objektträger wurden in einer Filmkassette angeordnet und 1-2 Wochen gegen Hyperfilm³H (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien) exponiert. Die durch den [³³P]-Zerfall entstandene β-Strahlung reagierte mit den Silberhalogeniden des Films. Die Filme wurde anschließend in der Dunkelkammer mittels Kodak Entwickler bei 15°C für 3 Minuten entwickelt und anschließend 4 Minuten fixiert.

2.8. Immunhistochemie

Das Nebennierenmark wurde mit Hilfe eines monoklonalen Maus-Thyrosin-Hydroxylase-Antikörpers (Clone TH2, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit Hilfe der Biotin-Avidin-Komplex-Methode und eines biotinylierten Anti-Maus-Antikörpers durch das LSAB 2Kit (Dako Corporation, Hamburg, Deutschland) gefärbt. Dabei bilden die an den Zweitantikörper gebundenen Biotinreste mit Streptavidin einen Komplex. Die an diesen Komplex gebundenen Peroxidasen färben das Chromogen DAB (2,44 g Tris, 1,72g NaCl, 100 mg 3,3'-Diaminobenzidine (Sigma) in 200 ml Wasser) im Beisein von H_2O_2 an. Die aufgetauten Gefrierschnitte wurden in eisgekühltem Aceton für 10 Minuten fixiert, luftgetrocknet und 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Serum (Dako-Kit) geblockt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Erstantikörper (in einer Verdünnung von 1:2000) für 1 Stunde bei 37°C in Tris-Puffer pH 7,6 in 0,1% BSA (Rinder-Serumalbumin) inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte à 5 Minuten in PBS (Phosphat gepufferte Saline). Danach wurde der biotinylierte Anti-Maus-Antikörper (Dako-Kit) aufgetragen, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Um endogene Peroxidasen abzusättigen, die nicht mit dem Chromogen reagieren sollen, wurden diese mit 0,6% H_2O_2 in Methanol 20 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneuter zweimaliger Waschung wurden die Schnitte mit Streptavidin (Dako-Kit) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte in PBS und abschließend die Inkubation der Schnitte für 5 Minuten mit dem DAB-Substrat unter Zugabe von 70 μ l/200 ml 30% H_2O_2 . Abschließend wurden die Schnitte in Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend 5 und 2 Minuten in 95% bzw. 100% Ethanol entwässert und dann 5 Minuten und abschließend nocheinmal 2 Minuten in Xylene fixiert. Die getrockneten Schnitte wurden mit Eukitt (Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) und Deckgläschen luftdicht abgeschlossen.

Als Negativkontrolle wurde der Erstantikörper weggelassen. In diesem Fall war keine Färbung des Nebennierenmarks zu beobachten.

2.9. Radioimmunoassay (RIA)

Peptidextraktion aus dem Plasma

Für die Blutentnahme aus der Schwanzvene der Wistar-Ratten, wurden 9 ml EDTA-Monovetten mit 250 µl Trasytol (200000 KIU/10 ml) versetzt und bei 4°C vorgekühlt. Das Vollblut wurde sofort nach der Abnahme bei 4°C bei 3000 rpm abzentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C eingefroren.

Orexin A wurde mit Hilfe von Phenyl-Silikat-Säulen (International Sorbet Technologie, Mid Glamorgan, England) aus dem Plasma isoliert. Dazu wurde zunächst 2 ml Eluent (60% Acetonitril, 1% Trifluoressigsäure in Wasser) auf die Säule gegeben, dann zweimal je 2 ml Puffer (200mM NaH₂PO₄, 0,9% NaCl pH 7,4), anschließend zweimal je 1 ml des gewonnenen Plasmas. Die Säulen wurden schließlich erneut mit 2 ml Puffer, 2 ml 1% TFA und 2 ml Eluent gespült. Das Eluat wurde anschließend über Nacht lyophilisiert. Die lyophilisierten Proben wurden durch Mixen in 100 µl RIA-Puffer (Peninsula Laboratories, Inc., Merseyside, England) gelöst.

RIA

Der RIA wurde anhand der Angaben des Herstellers mit Hilfe eines RIA-Kits der Firma Peninsula Laboratories, Inc., Merseyside, England, durchgeführt. Unmarkiertes Peptid wurde in verschiedenen, bekannten Konzentrationen in RIA-Puffer zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt.

40 µl Kaninchen-Anti-Ratte-Orexin-A-Serum (Peninsula Laboratories, Inc., San Carlos, Californien) wurde in gleichem Volumen mit den in RIA-Puffer gelösten Proben verdünnt, gevortext und 16-24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden pro Röhrchen 40 µl [¹²⁵I]-markiertes Orexin A zur Competition hinzugegeben. Die Aktivität dieses Tracers lag im Bereich von ca. 5000 cpm/40 µl. Nach Zugabe wurden die Röhrchen geschüttelt und 16-24 Stunden bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 40 µl Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Serum in RIA-Puffer pro Röhrchen wurde Antikörper-gebundenes Peptid (radioaktiv-markiert und unmarkiert) während 90 Minuten Inkubation präzipitiert. Abschließend wurden pro

Röhrchen 200 µl RIA-Puffer zugegeben und erneut gemischt. Die Ansätze wurden bei 4°C für 20 Minuten bei ca. 1700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und im Gamma-Counter die Aktivität des Pellets gemessen. Durch Standardmessreihen mit bekannten Peptidkonzentrationen war eine Quantifizierung der Peptidkonzentrationen aus der gemessenen Radioaktivität möglich.

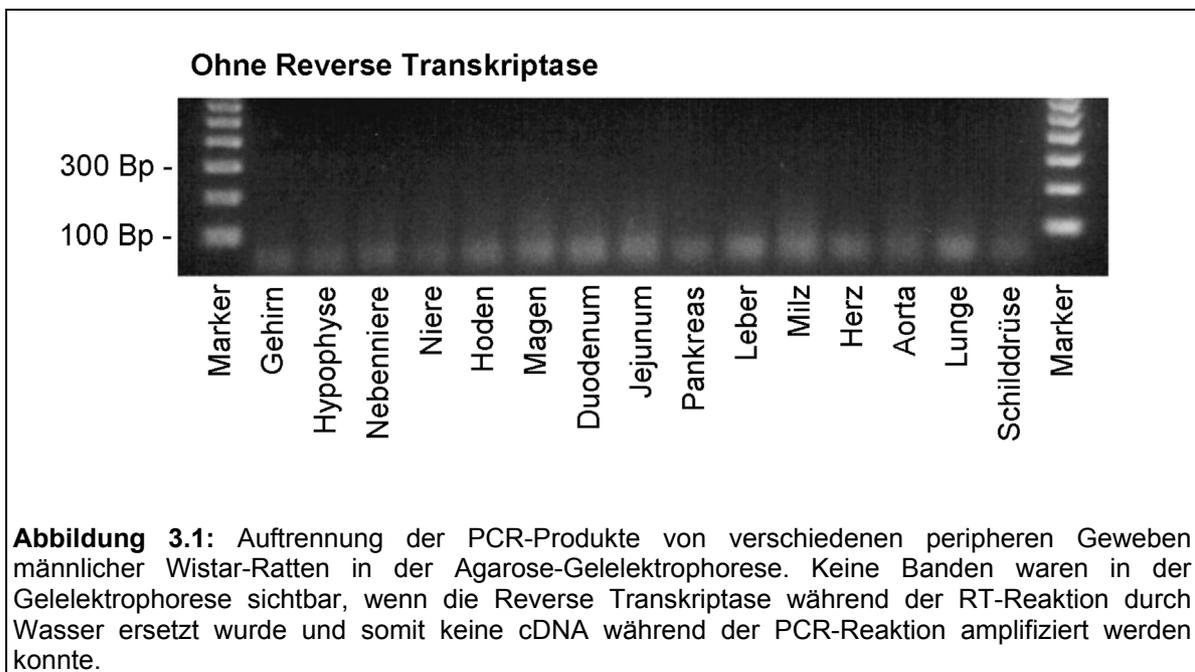
2.10. Statistik

Die statistische Analyse der Unterschiede bezüglich der Genexpression von Präpro-Orexin sowie des OX₁- und OX₂-Rezeptors männlicher und weiblicher Wistar-Ratten wurde mit einem t-Test durchgeführt. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Spezifität der RT-PCR

Um mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA zu detektieren, wurde die Reverse Transkriptase während der RT-Reaktion durch Wasser ersetzt. In diesem Fall wurde keine cDNA während der RT-Reaktion gebildet, welche in der PCR amplifiziert werden konnte. In der Agarose-Gelelektrophorese waren keine Banden sichtbar. Eine Verunreinigung mit genomischer DNA konnte daher ausgeschlossen werden (Abbildung 3.1).



Restriktionsanalyse der amplifizierten Präpro-Orexin-DNA-Fragmente mit dem Restriktionsenzym Pvu II ergab zwei spezifische DNA-Fragmente der erwarteten Größe von 136 und 167 Bp (Abbildung 3.2A). Die OX₁- und OX₂-Rezeptor spezifischen DNA-Fragmente wurden mit Alu I verdaut. Nach Verdau der OX₁-Rezeptor-DNA-Fragmente entstanden vier Fragmente von 20 (nicht sichtbar), 51, 59 und 130 Bp (Abbildung 3.2B). Das OX₂-Rezeptor spezifische DNA-Fragment wurden in zwei Fragmente von 89 und 225 Bp geschnitten (Abbildung 3.2C).

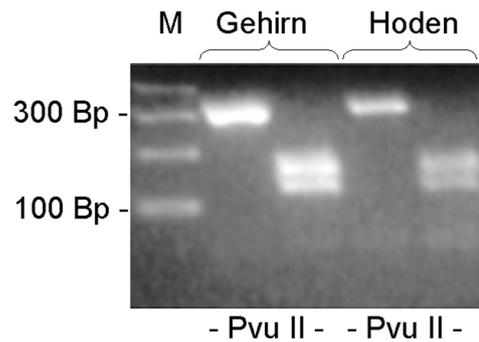
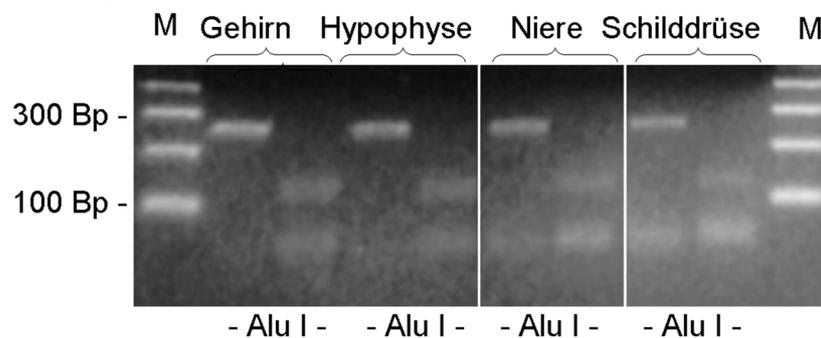
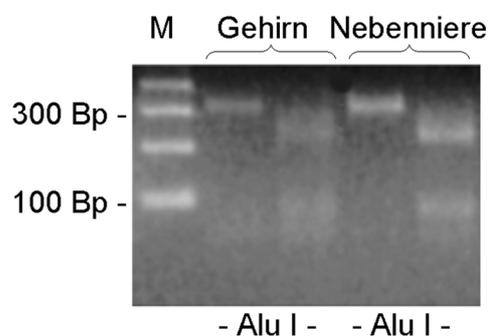
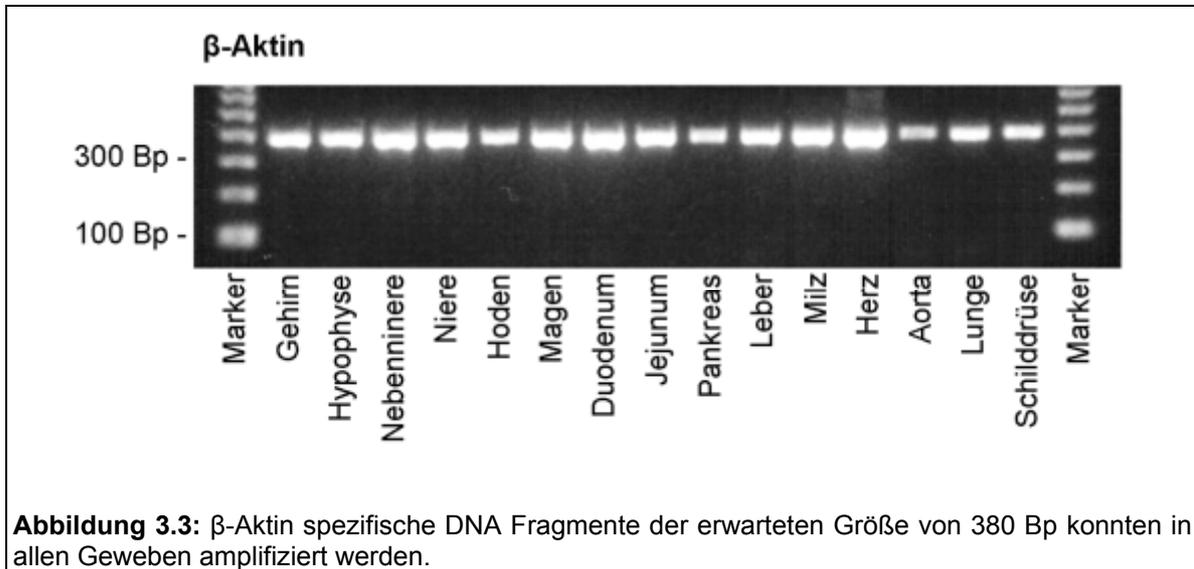
A. Präpro-Orexin**B. OX₁-Rezeptor****C. OX₂-Rezeptor**

Abbildung 3.2: Restriktionsanalyse der amplifizierten DNA-Fragmente von Präpro-Orexin- durch Pvu II ergab zwei Fragmente von 136 und 167 Bp (Abb. 3.2A). Die DNA Fragmente des OX₁- und OX₂-Rezeptors wurden mit Alu I verdaut. Im Fall des OX₁-Rezeptors entstanden vier Fragmente von 20, 51, 59 und 130 Bp (Abb. 3.2B), der OX₂-Rezeptor wurde in zwei 89 und 225 Bp große Fragmente verdaut (Abb. 3.2C).

Schließlich wurden die amplifizierten PCR-Fragmente für Präpro-Orexin, den OX₁- und OX₂-Rezeptor kloniert. Die Nukleotid-Sequenzanalyse zeigte ihre identische Sequenz mit den entsprechenden veröffentlichten Sequenzen für Präpro-Orexin, den OX₁- und OX₂-Rezeptor.

β -Aktin spezifische DNA-Fragmente der erwarteten Größe von 380 Bp wurden in allen untersuchten Organen männlicher Ratten amplifiziert. Dies bestätigte die Integrität der untersuchten RNA Proben sowie die erfolgreiche cDNA-Synthese (Abbildung 3.3).



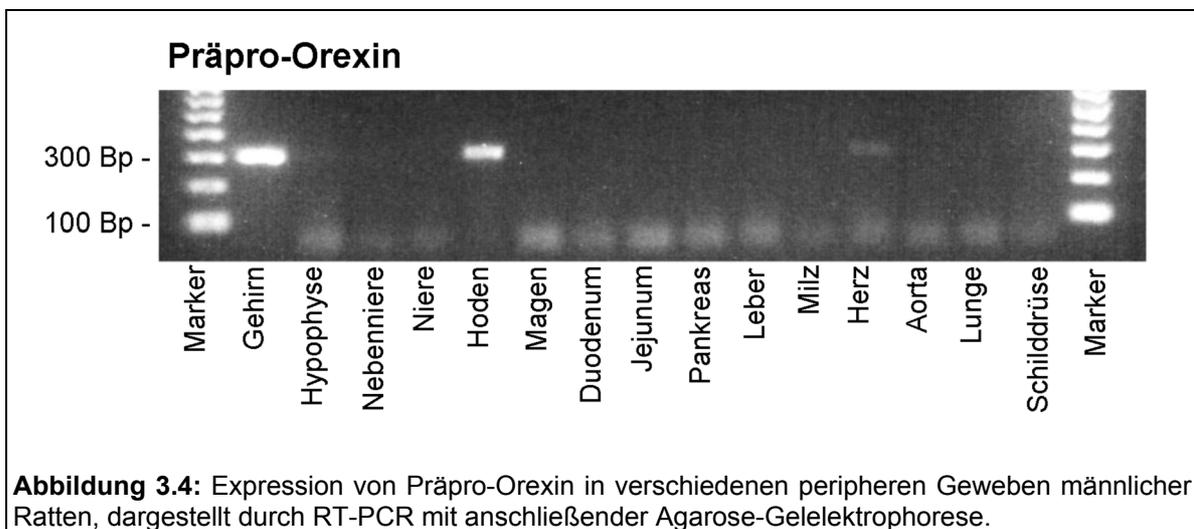
3.2. Expression der mRNA von Komponenten des Orexinsystems in peripheren Organen der Ratte

Die mRNA Expression von Präpro-Orexin, dem OX₁- und OX₂-Rezeptor in verschiedenen peripheren Geweben von 12 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten wurde zunächst durch RT-PCR untersucht. Die Gesamtgehirnproben galten dabei als Positivkontrolle, da sowohl die mRNA von Präpro-Orexin wie auch die der beiden Rezeptorsubtypen im Gehirn gebildet werden (19,89,108).

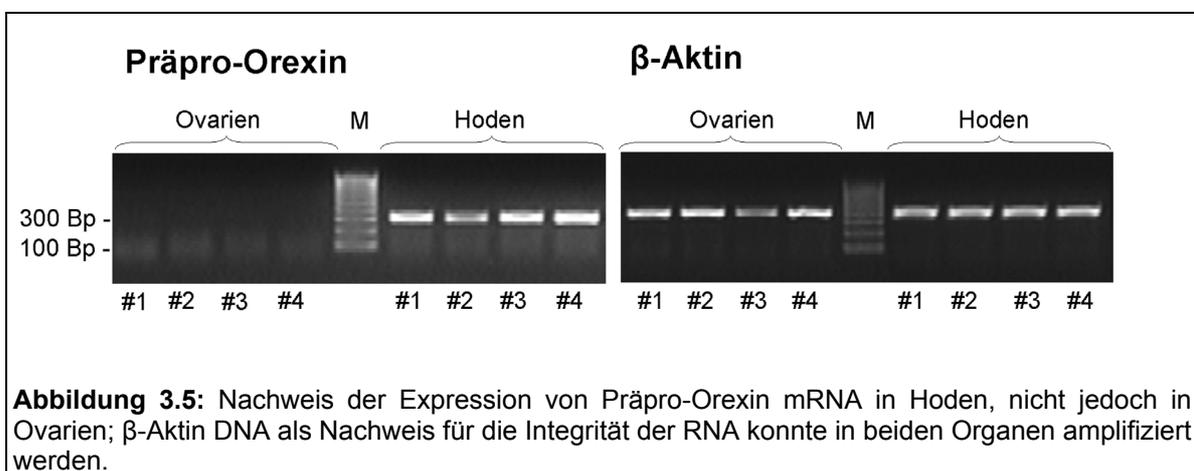
3.2.1. Präpro-Orexin mRNA

Im Elektrophoresegel wurde für Präpro-Orexin ein charakteristisches DNA-Fragment bei 303 Bp im Gehirn beobachtet. Weiterhin wurde Präpro-Orexin mRNA im Hoden und eine geringe Menge vereinzelt auch im Herz bei männlichen Tieren gefunden. Keine Präpro-Orexin mRNA konnte dagegen in den anderen peripheren Organen wie Nebenniere, Niere, Magen, Duodenum, Jejunum,

Pankreas, Leber, Milz, Aorta, Lunge, Schilddrüse, Fettgewebe, Muskelgewebe sowie in der Hypophyse nachgewiesen werden (Abbildung 3.4).



In den Ovarien weiblicher Wistar-Ratten wurde im Gegensatz zum Hoden keine Präpro-Orexin cDNA amplifiziert (Abbildung 3.5). Auch hier wurden die Integrität der RNA sowie die erfolgreiche cDNA Synthese wieder durch den Nachweis β -Aktin spezifischer DNA-Fragmente erbracht (Abbildung 3.5).

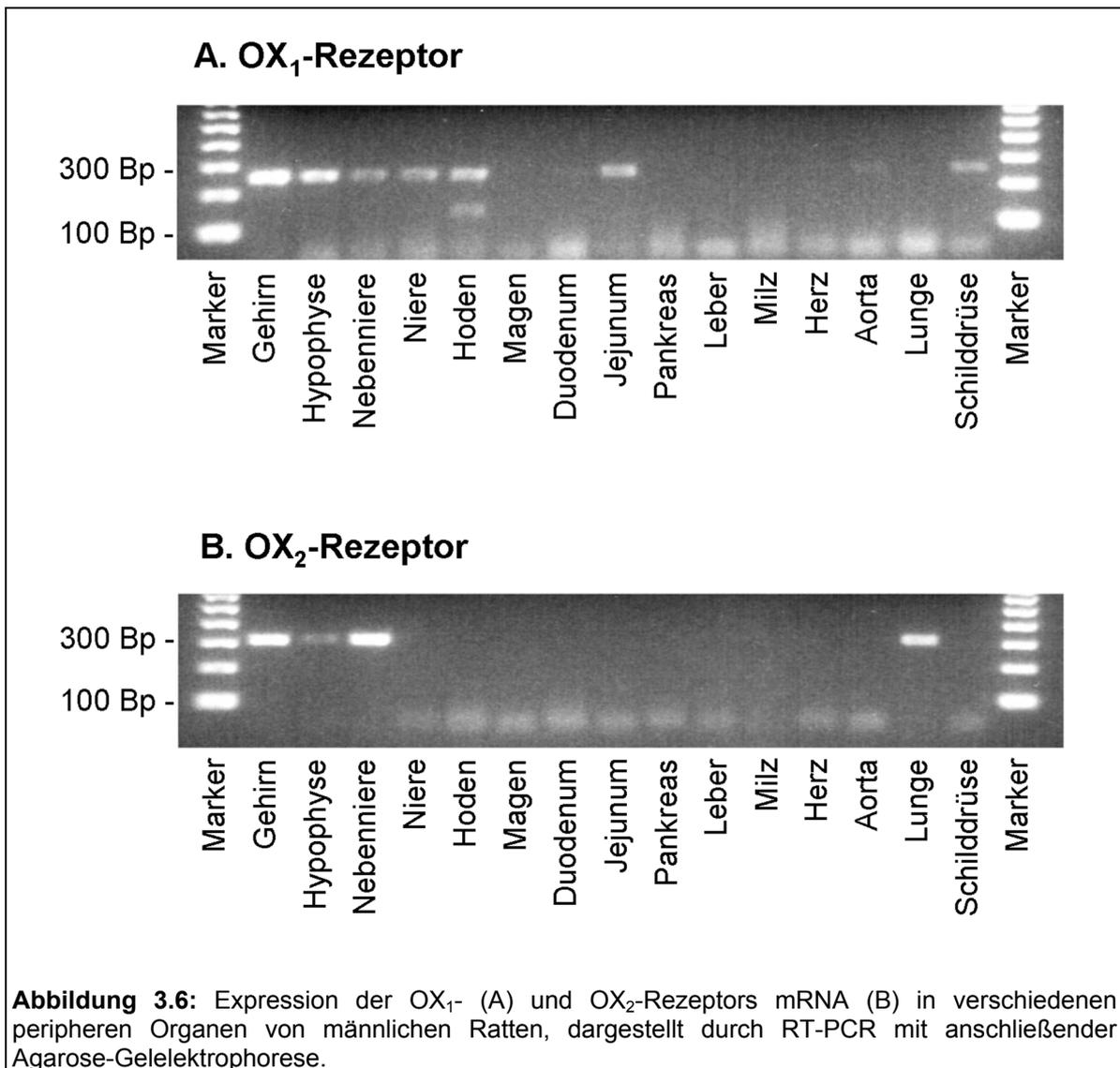


3.2.2. OX₁-Rezeptor mRNA

Eine für den OX₁-Rezeptor spezifische Bande bei 260 Bp konnte in Gehirn, Hypophyse, Nebenniere, Niere, Schilddrüse, Jejunum und Hoden nachgewiesen werden. Keine OX₁-Rezeptor mRNA konnte in Magen, Duodenum, Pankreas, Leber, Milz, Herz und Aorta detektiert werden (Abbildung 3.6A).

3.2.3. OX₂-Rezeptor mRNA

Die für den OX₂-Rezeptor spezifischen DNA Fragmente bei 314 Bp wurden in Gehirn, Lunge, Nebenniere und Hypophyse amplifiziert. Für den OX₂-Rezeptor wurde keine mRNA in Niere, Hoden, Magen, Duodenum, Jejunum, Pankreas, Leber, Milz, Herz und Aorta detektiert (Abbildung 3.6B).



3.3. Quantifizierung der „steady-state“ mRNA-Spiegel

Die Expression der Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor DNA wurde mit der „real-time“ PCR überprüft, um eine quantitative Aussage bezüglich der

detektierten Mengen an mRNA in den unterschiedlichen Organen treffen zu können.

3.3.1. Überprüfung der Spezifität der PCR-Produkte der „real-time“ PCR

Da bei Verwendung von Sybr-Green I auch Primer-Dimere oder unspezifische Reaktionsnebenprodukte einen Fluoreszenzanstieg verursachen, muss die Spezifität der PCR-Produkte nach Abschluss der Reaktion mittels einer Schmelzkurvenanalyse bzw. durch Agarosegelelektrophorese erfolgen. Dazu wurden die PCR-Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich erhitzt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorlagen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wurde aufgezeichnet. Da kleinere Fragmente wie z.B. Primer-Dimere einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifischen PCR-Produkte aufweisen, konnte die Spezifität des PCR-Produkts anhand des charakteristischen Peaks bei der Schmelzkurvenanalyse überprüft werden (Abbildung 3.7).

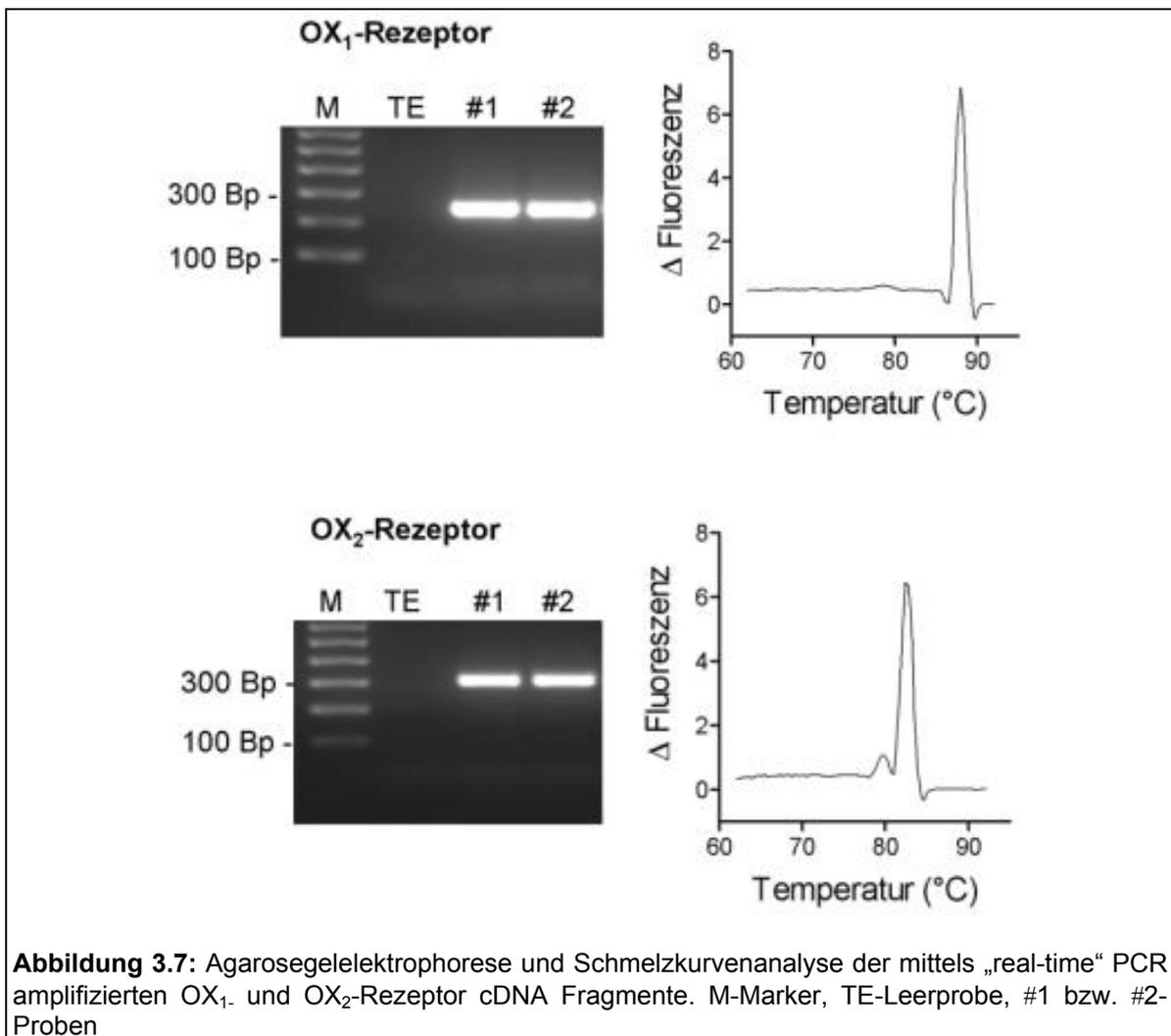
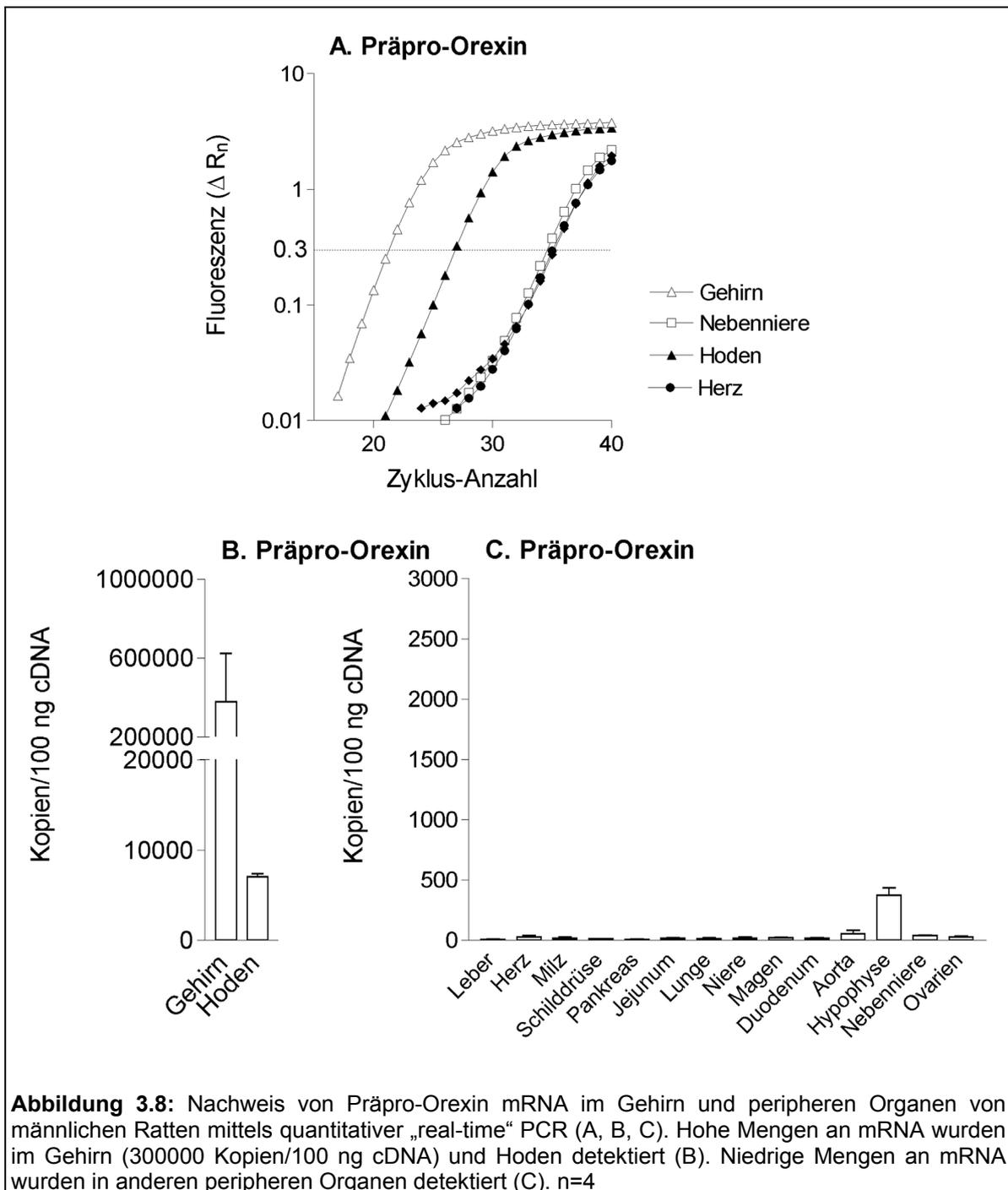


Abbildung 3.7: Agarosegelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse der mittels „real-time“ PCR amplifizierten OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA Fragmente. M-Marker, TE-Leerprobe, #1 bzw. #2-Proben

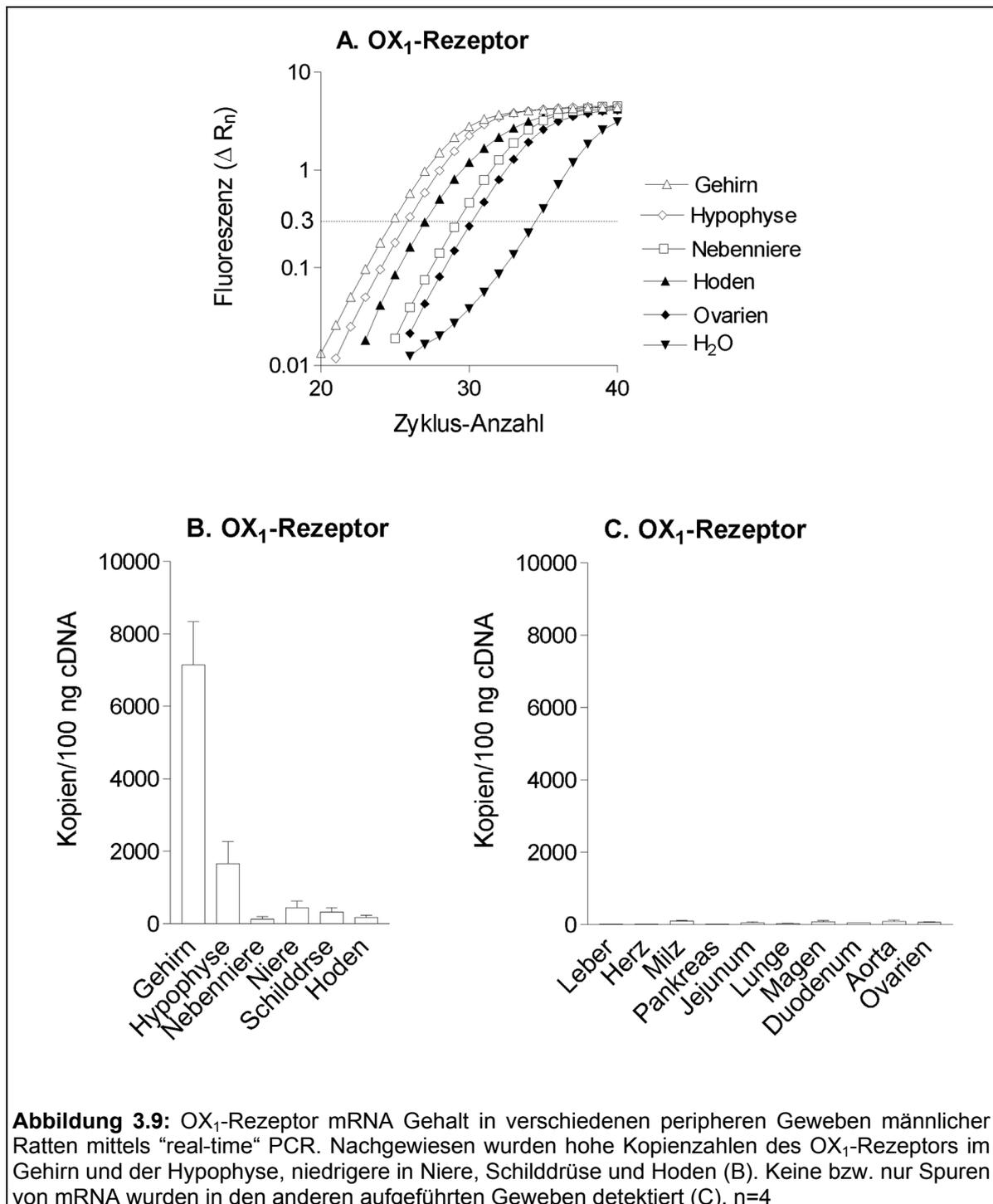
3.3.2. Präpro-Orexin mRNA

Mit Hilfe der real-time PCR konnte gezeigt werden, dass im Gehirn große Mengen an mRNA von Präpro-Orexin vorhanden sind (300 000 Kopien/100 ng cDNA). Ebenso bestätigte sich die Existenz von Präpro-Orexin mRNA im Hoden, die detektierten Mengen im Herz und in den Ovarien überschritten den Schwellenwert von 0,3 erst oberhalb von 35 Zyklen und wurden damit als nicht signifikant bezeichnet (Abbildung 3.8).



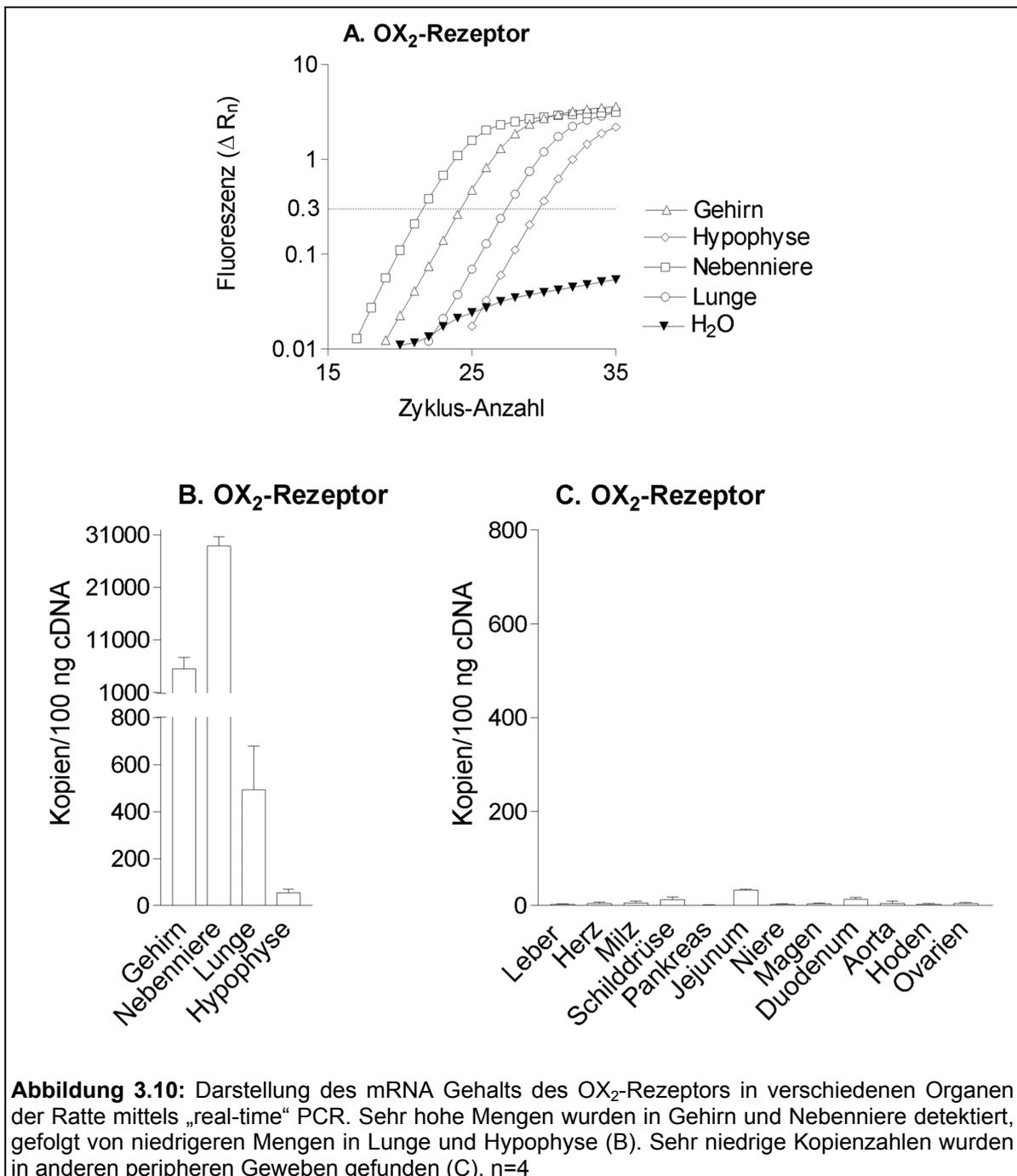
3.3.3. OX₁-Rezeptor mRNA

Der höchste mRNA Gehalt für den OX₁-Rezeptor wurde im Gehirn gefunden (~7000 Kopien/100ng cDNA), gefolgt von einer etwa 1/3 geringeren Menge in der Hypophyse und sehr geringen Mengen in Niere, Nebenniere, Schilddrüse, Hoden, und Ovarien. In den anderen Geweben konnten keine signifikanten Mengen an OX₁-Rezeptor spezifischer cDNA detektiert werden (Abbildung 3.9).



3.3.4. OX₂-Rezeptor mRNA

Bestätigt wurde auch die Expression der mRNA des OX₂-Rezeptors in der Nebenniere. Diese war vier mal so hoch wie diejenige im Gehirn. In der Lunge und der Hypophyse wurden nur geringe, aber signifikante Mengen an OX₂-Rezeptor mRNA nachgewiesen (Abbildung 3.10).



3.4. Lokalisierung der Orexin-Rezeptor mRNA durch *in situ* Hybridisierung

Die Expression der Orexin-Rezeptor mRNA wurde mittels [³³P]-markierten Oligonukleotidsonden durch *in situ* Hybridisierung untersucht. Um zwischen der Expression der Rezeptoren im Nebennierenmark und der angrenzenden Zona reticularis unterscheiden zu können, wurde das Nebennierenmark mit Hilfe eines

spezifischen Antikörpers gegen Thyrosin-Hydroxylase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Katecholaminsynthese, angefärbt (Abbildung 3.11B). Die OX₂-Rezeptor mRNA wurde in der Zona glomerulosa und der Zona reticularis der Nebennierenrinde, nicht jedoch in der Zona fasciculata oder dem Nebennierenmark nachgewiesen (Abbildung 3.11D). *In situ* Hybridisierung mit [³³P] markierten OX₁-Rezeptor Oligonukleotidsonden erbrachte kein positives Signal (Abbildung 3.11C). Als Positivkontrolle konnte ein starkes Signal für den OX₁-Rezeptor im Locus coeruleus nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Spezifität des Hybridisierungssignals wurde durch das Ausbleiben eines Signals bei Verwendung von 10fachem Überschuss an unmarkierten Oligonukleotidsonden sowohl für den OX₁-Rezeptor als auch den OX₂-Rezeptor bestätigt (Abbildung 3.11E und 3.11F).

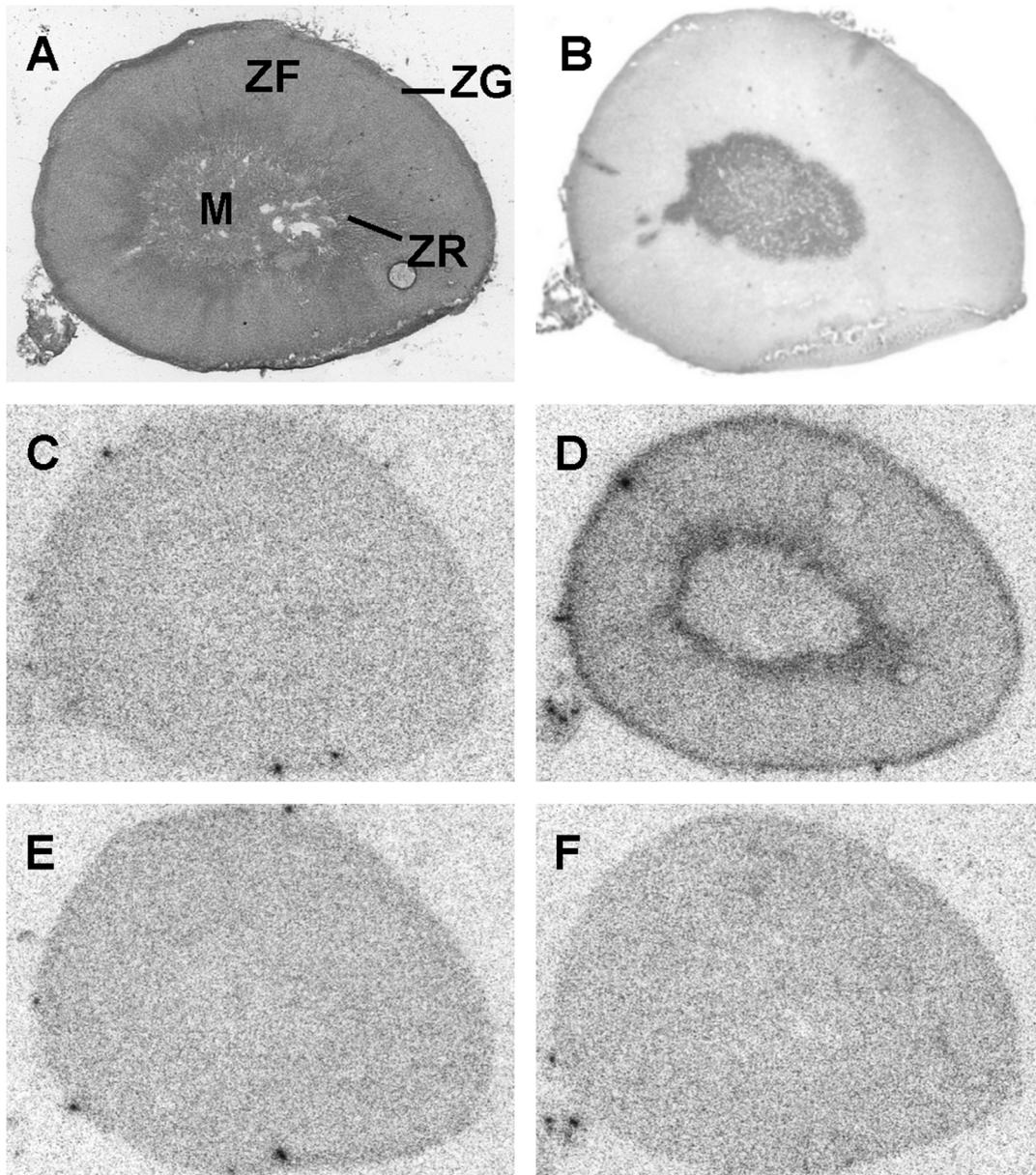
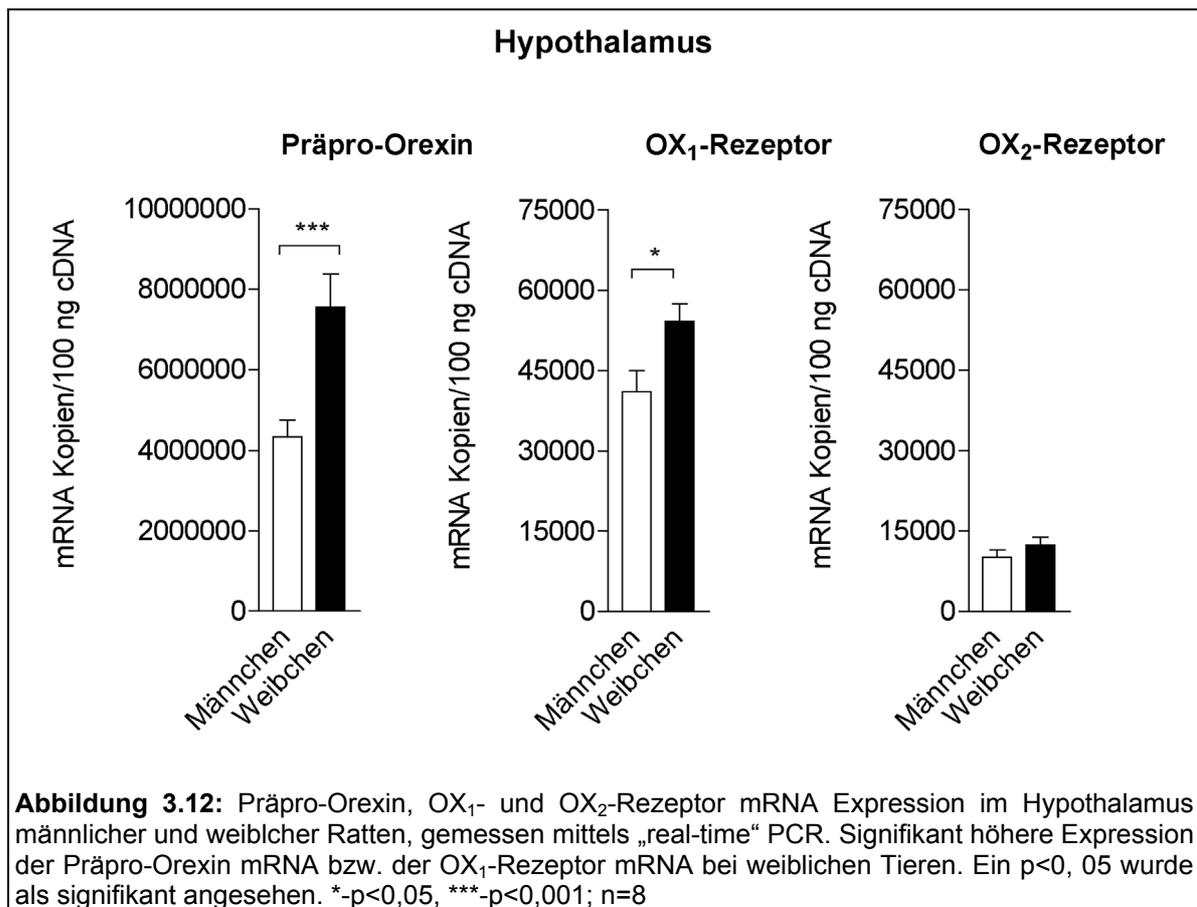


Abbildung 3.11: Film-Autoradiographie zeigt die Lokalisierung der OX_2 -Rezeptor mRNA in Nebennieren von männlichen Ratten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin (A) bzw. einem Antikörper gegen Thyrosin-Hydroxylase (B) angefärbt. *In situ* Hybridisierung mit [^{33}P]-markierten OX_1 - (C) bzw. OX_2 -Rezeptor Antisense-Oligonukleotid-Sonden (D) erbrachte ein Signal für den OX_2 -Rezeptor in der Zona glomerulosa und der Zona reticularis, nicht jedoch in den Zona fasciculata und dem Nebennierenmark. Ein 10facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotidsonden erbrachte sowohl für den (E) OX_1 - als auch den (F) OX_2 -Rezeptor kein positives Signal.

3.5. Vergleich der Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression zwischen weiblichen und männlichen Wistar-Ratten in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere

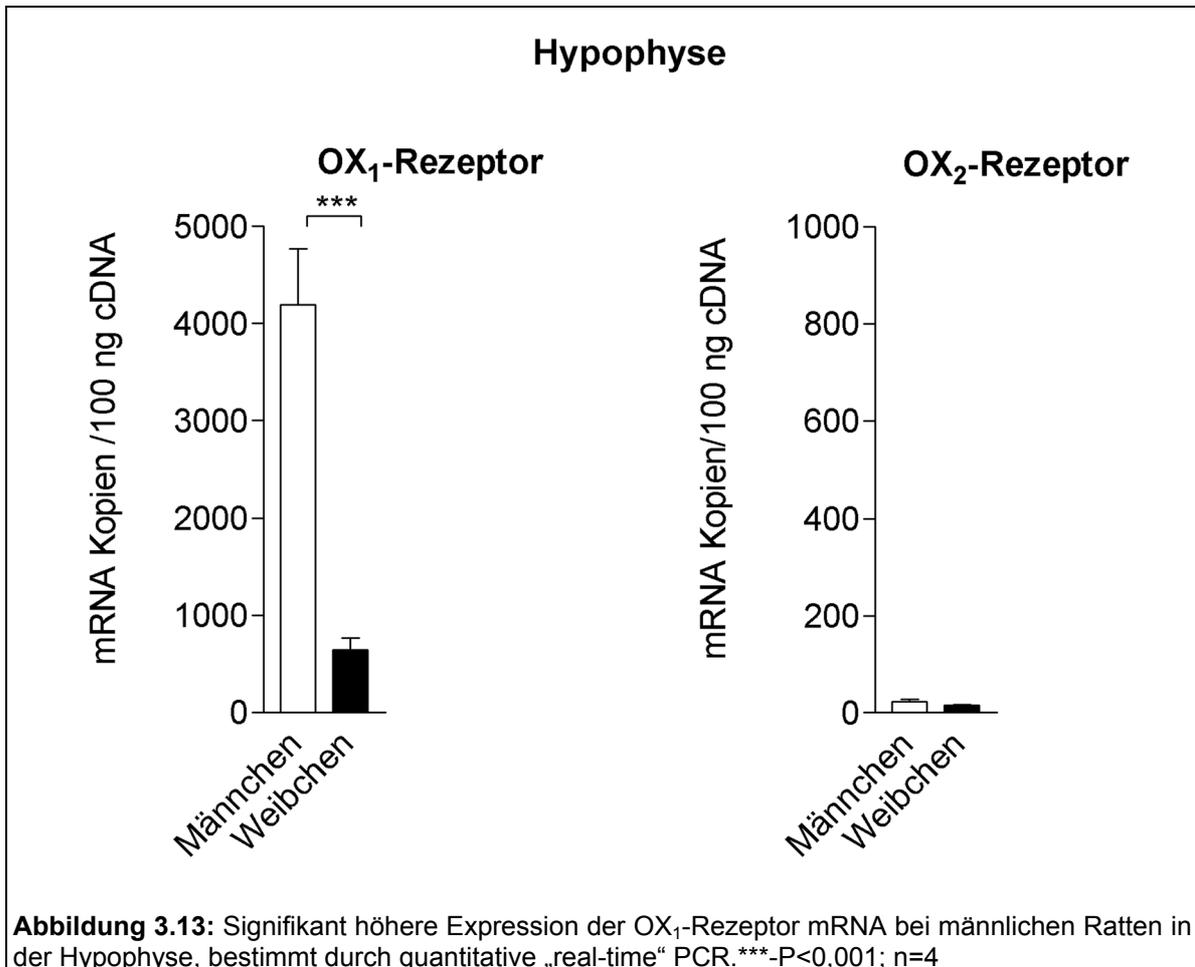
3.5.1. Hypothalamus

Im Hypothalamus weiblicher Wistar-Ratten war die Präpro-Orexin mRNA-Menge etwa 1,5 mal höher als bei den Männchen. Weiterhin zeigte sich eine um 25% erhöhte Expression des OX₁-Rezeptors mRNA bei weiblichen Ratten im Vergleich zu den Männchen. Hinsichtlich der mRNA Menge des OX₂-Rezeptors wurden keine signifikanten Unterschiede detektiert (Abbildung 3.12).



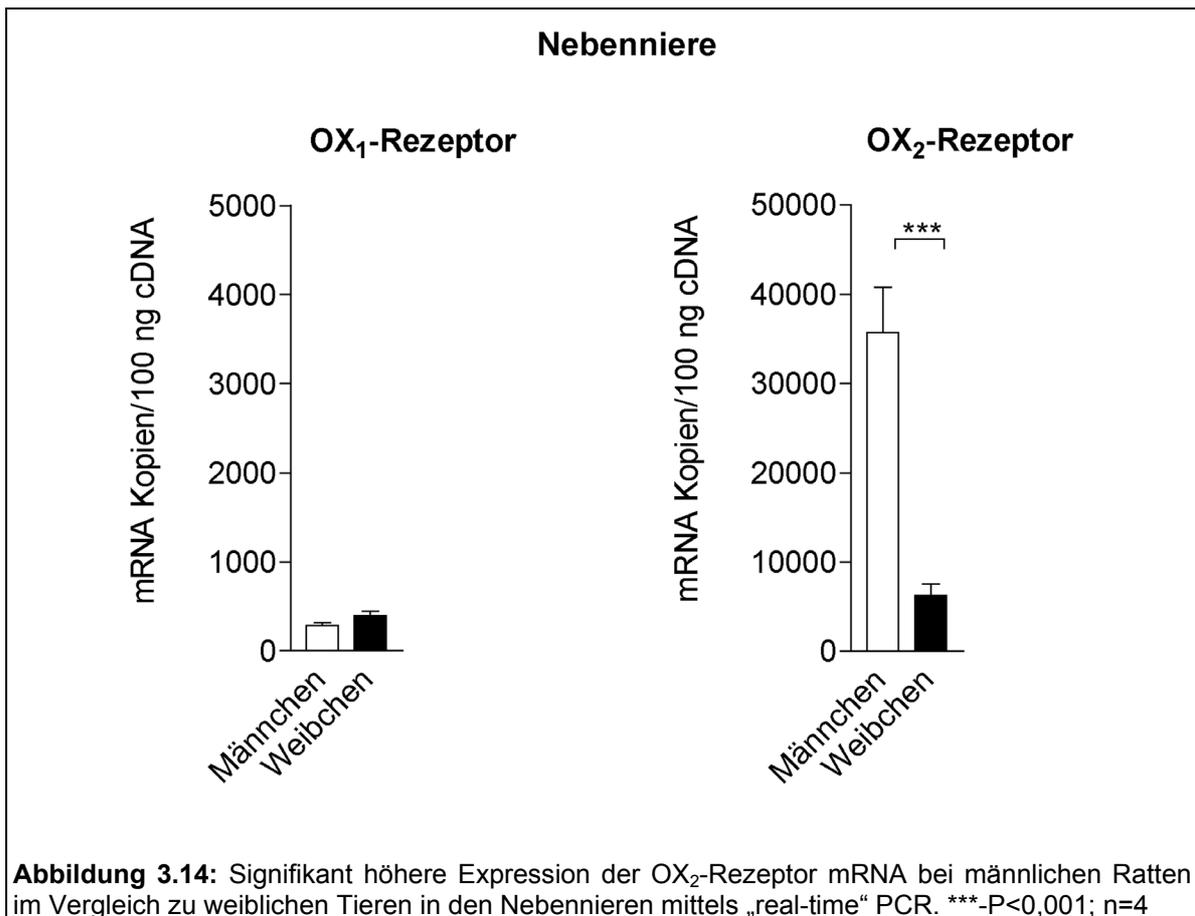
3.5.2. Hypophyse

Bei männlichen Ratten ist in der Hypophyse die mRNA Menge des OX₁-Rezeptors mehr als 5mal höher als bei den Weibchen. Für den OX₂-Rezeptor wurden keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression detektiert (Abbildung 3.13).

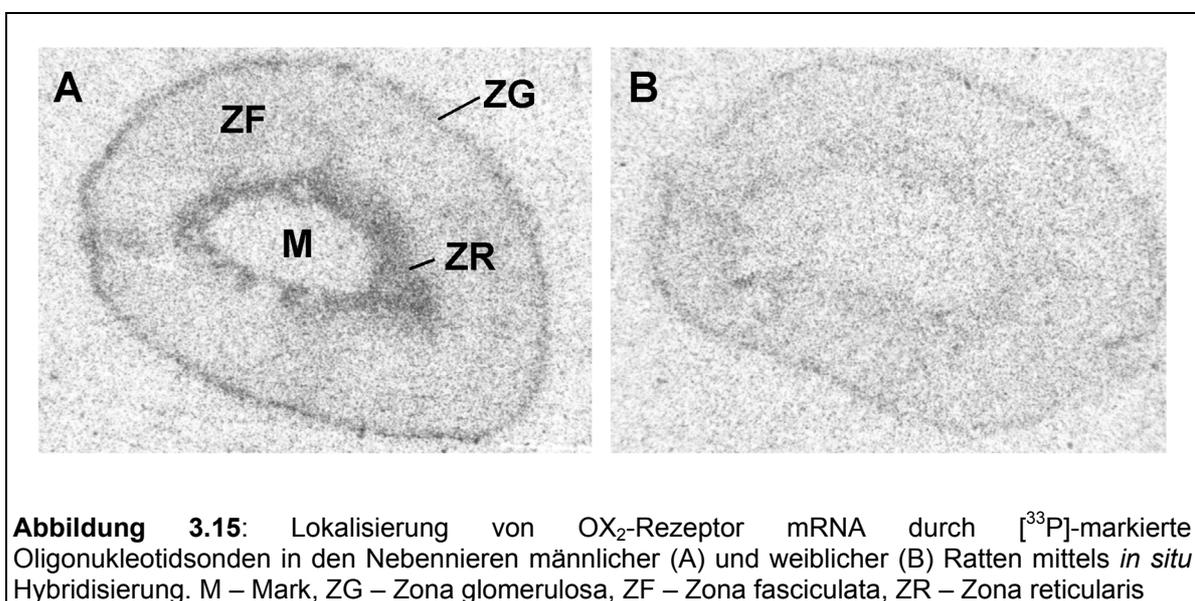


3.5.3. Nebenniere

In der Nebenniere ist der OX₂-Rezeptor bei den Männchen deutlich höher (mehr als 5mal so hoch) exprimiert als bei den Weibchen. Keine geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden für den OX₁-Rezeptor detektiert (Abbildung 3.14).



Durch *in situ* Hybridisierung mit Oligonukleotid-Antisense Sonden wurde OX₂-Rezeptor mRNA in der Nebenniere männlicher Ratten in der Zona glomerulosa und Zona reticularis lokalisiert (Abbildung 3.15A). Bei den weiblichen Ratten war die OX₂-Rezeptor mRNA Menge in der Nebenniere im Vergleich zu den männlichen Ratten deutlich reduziert (Abbildung 3.15B).



3.6. Orexin A Spiegel im Plasma

Die Plasma Orexin A Spiegel wurden durch einen kommerziellen RIA der Firma Peninsula Laboratories, Inc., Belmont, Californien, bestimmt. Im Plasma männlicher Ratten betrug der Orexin A Gehalt $11,5 \pm 1,0$ pg/ml, im Plasma der Weibchen $13,6 \pm 1,1$ pg/ml. Die Mittelwerte unterschieden sich nicht signifikant.

4. Diskussion

Orexin wird zentral im lateralen Hypothalamus gebildet. Die ausgedehnten Projektionen der orexin-immunopositiven Fasern innerhalb des ZNS und der Nachweis der Rezeptoren im Gehirn ließ zunächst vermuten, dass Orexin vor allem zentrale Funktionen hat. Orexin-Rezeptoren wurden daneben auch in der Hypophyse, Nebenniere und im Darm gefunden, was die Frage nach der Existenz eines peripheren Orexinsystems aufkommen ließ (17,45,52,55). Diese Arbeit zeigt erstmalig die Expression von OX₁-Rezeptor mRNA in Schilddrüse, Darm, Hoden und Niere, sowie des OX₂-Rezeptors in der Lunge. Bestätigt und erstmalig quantitativ erfasst mittels „real-time“ PCR wurde dabei die hohe mRNA-Expression des OX₁-Rezeptors in der Hypophyse bzw. von OX₂-Rezeptor mRNA in der Nebenniere, welche einen Einfluss von Orexin auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse nahe legen. Die dabei detektierten geschlechtsspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Rezeptor mRNA Expression, die Expression von Präpro-Orexin-m-RNA im Hoden, nicht aber in den Ovarien sowie die höhere Expression der Präpro-Orexins-m-RNA im Hypothalamus weiblicher Tiere deuten auf eine geschlechtsspezifische Funktion des Orexins hin.

4.1. Peripheres Orexinsystem

4.1.1. Präpro-Orexin

Hoden

In dieser Arbeit wurde mittels PCR die von Sakurai et al. nachgewiesene Expression von Präpro-Orexin mRNA im Hoden bestätigt (89). Auch auf Proteinebene konnten Mitsuma et al., 2000 mit Hilfe eines RIA Orexin A im Hoden von Ratten nachweisen, nicht jedoch in anderen peripheren Organen (siehe auch Tabelle 4.1) (60). Andere Arbeitsgruppen dagegen waren nicht in der Lage, Präpro-Orexin mRNA oder Orexin A im Hoden zu detektieren (19,104). Ursächlich hierfür könnte die geringere Sensitivität der verwendeten Methoden bzw. der

Nachweis unterschiedlicher Substrate mittels der verschiedenen Methoden sein (RIA, „Northern Blot“). Durch konventionelle RT-PCR konnte in dieser Arbeit Präpro-Orexin mRNA zwar im Hoden, nicht jedoch in Ovarien detektiert werden. Die „real-time“ PCR zeigte eine deutlich geringere Expression von Präpro-Orexin-mRNA im Hoden als im Gehirn. So konnte auch mit den in der *in situ* Hybridisierung verwendeten Oligonukleotid-Sonden kein deutliches Signal für die Präpro-Orexin mRNA im Hoden detektiert werden (Jöhren, unveröffentlichte Ergebnisse). Auch wenn es bezüglich der Expression von Orexin im Hoden unterschiedliche Ergebnisse gibt, so ist doch hervorzuheben, dass in keiner Studie Orexin in Ovarien detektiert werden konnte.

Magen/Darm

Kirchgessner et al., 1999 wiesen Präpro-Orexin mRNA in der longitudinalen Muskelschicht im Plexus myentericus von Ratten nach (45). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden war kein Nachweis von Präpro-Orexin im Darm von Ratten möglich. Der Grund für die Diskrepanz der detektierten Ergebnisse ist nicht ganz klar. Möglich scheint, dass in dem hier untersuchten Jejunum Teile des Plexus myentericus präparationsbedingt verlorengegangen sind.

Orexin-immunopositive Neurone konnten im myenterischen und submukösen Plexus, in Nervenenden, in neuroendokrinen Zellen, die synaptische Kontakte mit Orexin-Neuronen eingehen, der zirkulären Muskelschicht und in der Lamina propria des Darms einiger Nagetierspezies und des Menschen nachgewiesen werden (45). Auch in endokrinen gastralen Zellen embryonaler Mäuse wurde Orexin A-Immunoreaktivität ab dem 14. Gestationstag gefunden (20). Die ausgedehnte Verbreitung der Orexin-Neurone legt einen Einfluss der Orexine auf zahlreiche Funktionen des Darms wie z. B. Sekretion und Aufnahme von Darmsekreten, Beeinflussung der Motilität und endokrine Sekretion nahe. Die Koexpression anderer neuroendokriner Marker wie VIP oder Cholin-Acetyltransferase lässt eine komplexe Interaktion mit anderen Neuronen und Neurotransmittern vermuten (44,45,48,69). Fasten erhöht die Zahl der submukösen Orexin A-immunopositiven Neurone beim Meerschwein (45) und stimuliert somit neben zentralen auch periphere Orexinneurone.

Pankreas

Ouedraogo et al., 2003 wiesen eine Freisetzung von Orexin A aus Pankreasgewebe sowie eine erhöhte Freisetzung von Orexin A bei niedrigen Glukosespiegeln nach und postulieren eine „glukosensitive Freisetzung“ von Orexin A (74). In dieser Arbeit konnte keine Präpro-Orexin mRNA im Pankreas der Ratten nachgewiesen werden.

Nebennieren

In dieser Arbeit konnte keine Präpro-Orexin mRNA in Nebennieren der Ratte nachgewiesen werden, übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien in murinen oder menschlichen Nebennieren (52,67,68). Andererseits wurde Präpro-Orexin- und Orexin A-Immunreaktivität jedoch in menschlichen Nebennieren nachgewiesen (43,80). Deshalb ist unklar, ob Orexin auf auto- oder parakrinem Wege oder durch Zirkulation im Plasma auf die Nebenniere wirkt.

Plasmaorexin

Orexin konnte im menschlichem Plasma in geringen Mengen nachgewiesen werden (5). Ähnlich niedrige Plasma-Spiegel von Orexin wurden in der vorliegenden Arbeit bei der Ratte gefunden. Orexin könnte somit auch durch Zirkulation im Plasma seine Wirkung an den Zielorganen entfalten. Die Quelle des Plasma-Orexins ist bisher nicht geklärt. In Frage kommen periphere Neurone oder Orexin-bildende Zellen des Darms, der Nebennieren, des Pankreas bzw. der Hoden (42,44,74,80,89). Als weiterer Ursprung des Plasmaorexins wird im Hypothalamus gebildetes Orexin diskutiert. Date et al., 2000 zeigten, dass Orexin immunopositive Neurone in die Eminencia mediana der Hypophyse projizieren (17). Im Hypothalamus gebildetes Präpro-Orexin könnte in den portalen Kreislauf der Hypophyse freigesetzt werden. Da sich die Orexin Plasma-Spiegel männlicher und weiblicher Ratten nicht signifikant unterscheiden, scheint im Hoden gebildetes Präpro-Orexin wenn überhaupt nur in geringen Mengen in die Blutbahn freigesetzt zu werden. Auf der anderen Seite konnte in dieser Arbeit eine höhere Präpro-Orexin mRNA Expression im Hypothalamus weiblicher Tiere detektiert werden. Möglich scheint daher auch, dass im Vergleich zu weiblichen Tieren im Hoden gebildetes und freigesetztes Orexin die verminderte hypothalamische Sekretion in

männlichen Ratten ausgleicht. Neben der Theorie, dass im Plasma zirkulierendes Orexin auf die peripheren Rezeptoren wirkt, besteht auch die Möglichkeit, dass andere Neurotransmitter mit den Orexinrezeptoren interagieren können.

Tabelle 4.1: Präpro-Orexin, Orexin A und Orexin B Expression in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. PCR=Polymerasekettenreaktion, ISH=*in situ* Hybridisierung, IHC=Immunhistochemie, RIA="Radioimmunoassay", NB= Northern Blot, WB= Western Blot, +=detektiert, -= nicht detektiert

Gewebe	Methode	Präpro-Orexin	Orexin A	Orexin B	Spezies	Referenz
Gehirn	ISH	+	-	-	Ratte	(89)
	IHC	+	+	+	Ratte	(78), (15), (18)
	PCR	+	-	-	Ratte	eigene Befunde
	RIA	-	+	-	Ratte	(60)
Rückenmark	IHC	-	+	-	Ratte	(110)
Hypophyse	RIA	-	+	+	Ratte	(17)
	IHC	-	+	+	Ratte	(17)
Nebennieren	WB	+	+	-	Ratte, Mensch	(43,80)
Hoden	PCR	+	-	-	Ratte	eigene Befunde
	NB	+	-	-	Ratte	(89)
	RIA	-	+	-	Ratte	(60)
Magen/Darm	IHC	-	+	-	Ratte, Maus Meerschwein, Mensch	(45)
	PCR	+	-	-	Meerschwein, Ratte	(45), eigene Befunde (nur im Darm)
Pankreas	IHC	-	+	-	Ratte, Meerschwein	(45)
Plasma	RIA	-	+	-	Ratte, Mensch	(5), eigene Befunde

4.1.2. Orexin-Rezeptoren

Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Die in dieser Arbeit bestätigte Expression von Präpro-Orexin mRNA im Hypothalamus bzw. der Nachweis des OX₁-Rezeptors in der Hypophyse und des OX₂-Rezeptors in der Nebenniere lassen einen Einfluss der Orexine auf endokrine Regelkreise, speziell auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, vermuten.

Neuroanatomische Studien zeigen, dass es ausgeprägte Projektionen von Orexin-immunopositiven Fasern zu Kerngebieten des Hypothalamus gibt, in denen auch die Releasing-Hormone der Hypothalamus-Hypophysen-Achse wie z. B. GnRH gebildet werden (15,18,37,39). Orexin A-immunopositive-Fasern, OX₁-mRNA und Immunoreaktivität wurden im septalen und medialen Nucleus präopticus nachgewiesen, in welchen auch GnRH Neurone lokalisiert sind (10,34,78,108). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte OX₁-Rezeptor mRNA im Hypothalamus detektiert werden. Orexin Neurone gehen dabei neuronale Verbindungen mit den GnRH-Neuronen ein, wobei bis zu 85% der GnRH-Neurone OX₁-Rezeptoren exprimieren (10,37). Von einer direkten Interaktion von Orexin mit neuroendokrinen Neuronen des Hypothalamus ist daher auszugehen. *In vitro* Studien mit Hypothalamus-Explantaten zeigen einen stimulierenden Effekt von Orexin auf die Freisetzung einiger Releasing-Hormone, wie z. B. GnRH (85,87). Weitere Studien zeigten einen stimulierenden Effekt zentral injizierten Orexins auf die LH-Freisetzung, abhängig von der Anwesenheit ovarieller Steroidhormone (25,79,106). Die LH Freisetzung scheint somit indirekt über die GnRH-Neurone vermittelt zu sein. In Abwesenheit von ovariellen Steroidhormonen inhibiert Orexin die LH-Freisetzung (106). Es scheint also auch eine inhibitorische Komponente zu geben, welche vermutlich über andere oder zwischengeschaltete Neurone vermittelt ist.

Nach i.c.v. Injektion von Orexin stiegen auch die Plasma-Spiegel von Corticosteron und ACTH an (28,50). Dieser Effekt scheint durch direkte Wirkung auf im Hypothalamus gebildetes CRH zurückzuführen zu sein. So führt Orexin zu

einer CRH-Freisetzung aus Hypothalamus-Präparaten *in vitro* und die zentrale Injektion von Orexin zu einer Erhöhung der CRH mRNA Spiegel im Nucleus paraventricularis (50,87). Die Erhöhung der ACTH-Plasmaspiegel nach zentraler Injektion von Orexin konnte außerdem durch einen CRH-Antagonisten geblockt werden (92). Diese Ergebnisse deuten auf einen Einfluß der Orexine bei der Regulation und Ausschüttung von Stress-Hormonen hin.

Nach i.c.v. Injektion von Orexin war zudem eine Verminderung der Prolaktin-Plasmaspiegel zu beobachten, welche unabhängig von Dopamin vermittelt zu sein scheint. Dopamin hemmt als sogenannter „Prolactin-inhibitory-factor“ die Prolaktinsekretion (28,85). Orexin hat keinen direkten Effekt auf die basale oder TRH induzierte Prolaktin-Sekretion an Adenohypophysen-Zellsuspensionen (85). Auch hier ist von einer Beeinflussung der Prolaktinsezernierung über den Hypothalamus und nicht durch direkte Wirkung an der Hypophyse auszugehen. Orexin A-immunopositive Neurone projizieren auch zu monaminergen Neuronen im Hirnstamm, wo auch der OX₁-Rezeptor exprimiert wird (18,28,78,108). Die inhibitorische Wirkung des Orexins auf die Plasmaprolaktin-Freisetzung könnte auch indirekt über monaminerge Neurone vermittelt sein.

Auch die von Mitsuma et al., 1999 beobachtete Hemmung der TSH-Freisetzung nach i.v. Injektion von Orexin scheint hypothalamisch über Hemmung des TRH reguliert zu sein (61).

Hypophyse

Mehrere Autoren beschrieben Effekte auf die Freisetzung der Hypophysenhormone ACTH, GH, TSH, PRL und LH durch Orexin (28,50,61,79,85,91,106). In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl OX₁- als auch OX₂-Rezeptor mRNA in der Hypophyse von Ratten nachgewiesen werden, wobei die mRNA-Expression des OX₁-Rezeptors deutlich höher war als die des OX₂-Rezeptors. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen von Date et al. überein, welche in der Hypophyse von Ratten ebenfalls OX₁-Rezeptoren fanden (17). Auch in menschlichen Hypophysen wurde sowohl der OX₁- als auch der OX₂-Rezeptor nachgewiesen (8).

Das Vorkommen der Rezeptoren in der Hypophyse lässt einen biologischen Effekt des Orexins an der Hypophyse vermuten. Ein direkter Orexin-Effekt auf die Hypophyse konnte für die CRH-induzierte ACTH-Freisetzung gezeigt werden (91).

Auch Xu et al., 2002 zeigten einen direkten, sekretionssteigernden Effekt von Orexin in Hypophysenzellen. Orexin A steigerte in kultivierten, somatotropen Hypophysenzellen aus Schafen über eine Protein-Kinase C vermittelte Signaltransduktion die durch GHRH induzierte Sekretion von Wachstumshormon und Orexin B führte sogar direkt zu einer dosisabhängigen GH-Sekretion in diesen Zellen (115,116). Das Überwiegen des OX₁-Rezeptors im Hypophysenvorderlappen und die Tatsache, dass Orexin A eine zweifach höhere Affinität zum OX₁-Rezeptor aufweist lassen vermuten, dass dieser Effekt über den OX₁-Rezeptor vermittelt ist (89).

Samson et al., 2001 dagegen zeigten, dass zentral appliziertes Orexin in erster Linie zu einer Aktivierung der HPA-Achse auf hypothalamischer Ebenen führt und keinen direkten Effekt auf die Freisetzung der Hypophysenhormone GH, TSH, ACTH, LH und Prolaktin an kultivierten Hypophysenzellen *in vitro* hat (91). Orexin beeinflusste auch nicht die Sekretion von GH, PRL und LH nach vorheriger Stimulation durch GnRH, TRH und LHRH (91).

Die Orexin-Effekte auf die HPA-Achse scheinen in erster Linie also zentral vermittelt zu sein, wobei daneben auch direkte Effekte des Orexins auf die Hypophyse, vermutlich über den OX₁-Rezeptor vermittelt, gefunden wurden.

Nebenniere

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl OX₁- als auch OX₂-Rezeptor mRNA in den Nebennieren nachgewiesen. Mit Hilfe der quantitativen „real-time“ PCR wurde erstmalig gezeigt, dass die OX₂-Rezeptor mRNA Expression in den Nebennieren von männlichen Ratten etwa vier mal so hoch ist wie die im Gehirn.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Expression der Orexin-Rezeptoren in den Nebennieren veröffentlicht (7,43,52,59,67,80). Es wurden jedoch auch unterschiedlichste Techniken und verschiedene Spezies zum Nachweis der Orexin-Rezeptoren verwendet.

Bei der Ratte wurde OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA sowohl in der Nebennierenrinde als auch im Nebennierenmark nachgewiesen (52,59). Auch in kultivierten Schweine-Nebennieren wurde OX₁-Rezeptor mRNA sowohl in der Rinde als auch im Mark gefunden (67). In adulten menschlichen Nebennieren konnte OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA in Mark und Rinde (59,80), in fetalen

Nebennieren OX_2 -Rezeptor mRNA im Nebennierenmark detektiert werden (43). Zuverlässige Aussagen zur Menge der gemessenen mRNA können nur während der exponentiellen Phase der Amplifikation getroffen werden, also ungefähr bei 25-30 Zyklen. Keine konklusiven Aussagen sind bei höheren Zykluszahlen möglich (113). Dies könnte die widersprüchlichen Ergebnisse bezüglich der OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA Expression erklären. Um die Diskrepanz der Ergebnisse der RT-PCR zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit erstmalig eine quantitative „real-time“ PCR durchgeführt. Diese Arbeit zeigt eine hohe Expression der OX_2 -Rezeptor mRNA in den Nebennieren (höher als im Gehirn) und eine niedrige Expression der OX_1 -Rezeptor mRNA. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die auch auf Proteinebene eine OX_2 -Rezeptor-selektive Expression in fetalen und adulten menschlichen Nebennieren mittels RT-PCR und Western Blot nachwiesen (43,80). Randeva et al., 2001 lokalisierten den OX_2 -Rezeptor mit *in situ* Hybridisierung und „Immunoblot“ in der Zona glomerulosa und retikularis menschlicher Nebennieren (80). Konträr dazu zeigte eine andere Arbeitsgruppe ein OX_1 -immunopositives Signal in der Rinde und ein OX_2 -immunopositives Signal im Mark menschlicher Nebennieren (7). OX_1 - und OX_2 -Rezeptor-positive-Innumoreaktivität fanden Lopez et al., 1999 im Nebennierenmark der Ratte (52). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die unterschiedliche Spezifität der verwendeten Antikörper zurückzuführen sein.

Die Expression der Rezeptoren in der Nebennierenrinde und im Nebennierenmark lässt einen Einfluss von Orexin sowohl auf die Steroidhormone als auch auf die Katecholamine vermuten. Tatsächlich stimulieren Orexine die Freisetzung von Corticosteron bzw. Cortisol und von Aldosteron bei Ratte, Schwein und Mensch aus Nebennieren *in vitro* (54,55,59,67). Dieser Effekt scheint unabhängig von ACTH vermittelt zu sein, da der ACTH-Rezeptor-Antagonist „Corticotropin-Inhibitor-Protein“ (CIP) die Steroid-Freisetzung nach Orexin-Stimulation nicht inhibiert (55,59). Orexin scheint seine Wirkung über Aktivierung einer adenylatcyclase- bzw. proteinkinase-A-abhängigen Kaskade zu vermitteln. Dafür spricht, dass die Orexin induzierte Cortisol/Corticosteron-Freisetzung sowohl durch den Adenylatcyclase-Inhibitor SQ-22536 bzw. den Proteinkinase-A-Inhibitor H-89 unterbunden wird (55,59). Orexin und ACTH scheinen den gleichen Mechanismus für die Glucocorticoid-Freisetzung zu benutzen (59). Konträr dazu

konnten Jaszberenyi et al., 2000 keinen sofortigen direkten Orexin-Effekt auf Nebennieren nach intraperitonealer Injektion nachweisen (40). Die systemische Langzeitexposition mit Orexin über 7 Tage führte zu einer Erhöhung der Corticosteron- und Aldosteron-Plasmaspiegel. Die CRH und ACTH Plasmaspiegel blieben unbeeinflusst (54). Möglicherweise bedingt erst eine Langzeitexposition mit Orexin einen direkten Effekt auf die Hormone der Nebennierenrinde.

Die i.c.v. Injektion von Orexin führt bei Ratten zu einer Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Epinephrin und Norepinephrin (97). Es wurde auch eine Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark von Schweinen nach Orexin-Stimulation beobachtet (67). Andererseits inhibiert Orexin die Katecholamin-Synthese und Freisetzung aus PC-12 Phäochromocytom-Zelllinien von Ratten (68). Orexin scheint durch direkte Wirkung an der Nebenniere Einfluss auf Steroid- und Katecholaminsynthese zu nehmen.

Schilddrüse

In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von OX₁-Rezeptor mRNA in der Schilddrüse nachgewiesen. Ob zirkulierendes Orexin an der Schilddrüse wirkt, ist unklar. Es wurde gezeigt, dass peripher injiziertes Orexin zu einem Absinken der TSH-Plasmaspiegel führt (28,61). Die Plasmaspiegel von TSH sinken auch nach zentraler Injektion von Orexin ab (88). Ursächlich hierfür scheint wiederum eine verminderte Freisetzung von TRH nach i.c.v. Gabe von Orexin und nicht eine direkte Wirkung von Orexin an der Hypophyse zu sein (61). Trotz Absinken des TSH blieben die Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ innerhalb der ersten Stunden unbeeinflusst (61). Hagan et al., 1999 konnten dagegen keinen Effekt auf das Plasma-TSH nach zentraler Orexin-Injektion nachweisen (28). Wie oben bereits erwähnt, hat Orexin einen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse, und Glucocorticoide ihrerseits wiederum hemmen TSH (28,86). Die erhöhten Corticosteronspiegel nach i.c.v. Gabe von Orexin könnten also für das Absinken des TSH verantwortlich sein. Da der Schilddrüsenhormon-Metabolismus langsam ist, ist eine verzögerte Wirkung auf die Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone denkbar. Die chronische Injektion von Orexin in den PVN führte zu keiner Änderung der TSH-Plasmaspiegel (88). Zusammenfassend ist ein bedeutender Einfluss der Orexine auf die Schilddrüsenhormone fraglich.

Gastrointestinaltrakt

Magen

Es konnten keine Orexin-Rezeptoren im Magen nachgewiesen werden. Takahashi et al., 1999 zeigten, dass die intracisternale Injektion von Orexin A die Magensäuresekretion anregt, während die intraperitoneale Applikation keinen Effekt hat (105). Vagotomie bzw. Atropingabe heben den Orexin-Effekt auf die Magensäuresekretion auf (105). Orexin scheint also die Magensäuresekretion zentral vermittelt zu beeinflussen und nicht über direkte Interaktion über magenständige Rezeptoren.

Darm

In der vorliegenden Arbeit wurde OX_1 - nicht jedoch OX_2 -Rezeptor mRNA im Dünndarm der Ratte nachgewiesen. Kirchgessner et al., 1999 dagegen detektierten OX_1 - und OX_2 -Rezeptor mRNA im Magen/Darmtrakt von Ratten, Meerschweinen und Menschen (45). OX_1 -Rezeptor-Immunoreaktivität wurde in der Submukosa, der zirkulären Muskelschicht sowie im Darmplexus und OX_2 -Rezeptor-Immunoreaktivität in der Längsmuskelschicht des Darms nachgewiesen (45,48,65,111). OX_2 -Rezeptor-Immunoreaktivität wurde vor allem in Enterochromaffinzellen des Darms gefunden, welche engen Kontakt zu Orexin-Neuronen haben (45,69).

Verschiedene Studien belegen einen Einfluss der Orexine auf zahlreiche Funktionen des Darms wie Beeinflussung der Motilität, endokriner Sekretion etc., welche über die dort lokalisierten Rezeptoren vermittelt zu sein scheint (44,45,69,111).

Pankreas

Mit den von uns verwendeten Methoden konnte keine Orexin-Rezeptor mRNA im Pankreas nachgewiesen werden. Dennoch gibt es Hinweise auf den Einfluss der Orexine auf die Pankreas-Funktion.

Kirchgessner et al., 1999 konnten Orexin-Rezeptor mRNA im Pankreas nachweisen (45). Orexin A- und Orexin-Rezeptor-Immunoreaktivität wurden in Insulin- und Glukagon-immunopositiven Zellen des Pankreas detektiert (45,65). Orexin A induziert an isoliertem Pankreas eine Insulin-Freisetzung in vitro und die

s.c. Injektion von Orexin bedingt ein Ansteigen der Insulin- und Glukose-Plasmaspiegel (71). Die Orexin-Freisetzung aus Pankreazellen wird durch niedrige Blutglukosespiegel stimuliert und durch erhöhte Blutglukosespiegel inhibiert (74). Orexin A stimuliert die Glukagon-Freisetzung bzw. vermindert die durch Glukose stiumulierte Insulin-Freisetzung an isolierten Pankreas-Zellen (74). Orexin-positive Pankreazellen scheinen als „Glukosesensoren“ zu fungieren und die Sekretion der Pankreas-Hormone in Abhängigkeit vom Blutglukosespiegel zu beeinflussen.

Lunge/Niere

Der OX₁-Rezeptor ist in der Niere relativ niedrig exprimiert, während der OX₂-Rezeptor in der Lunge höher exprimiert ist. Dies deutet auf eine spezifische Funktion der Orexine in diesen Organen hin.

Tabelle 4.2: OX₁- und OX₂-Rezeptor Expression in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. PCR=Polymerasekettenreaktion, ISH=*in situ* Hybridisierung, IHC=Immunhistochemie, WB= Western Blott, +=detektiert, -=nicht detektiert

Gewebe	Methode	OX ₁ - Rezeptor	OX ₂ - Rezeptor	Spezies	Referenzen
Gehirn	PCR	+	+	Ratte	(89), (19), eigene Befunde
	ISH	+	+	Ratte	(108), (56)
	IHC	+	+	Ratte	(27)
Rückenmark	IHC	+		Ratte	(34)
Hypophyse	PCR	+	+	Ratte, Mensch	(8), (52), (17) eigene Befunde
	IHC	+	+	Mensch	(8)
	ISH	+	+	Ratte	(17)
Nebenniere	PCR	+	+	Ratte, Mensch, Schwein	(80), (52), (67), (43), (59) eigene Befunde
	ISH	+	+	Ratte, Mensch	(80), (43) eigene Befunde
	IHC	+	+	Ratte, Mensch	(7), (52)
	WB	-	+	Mensch	(43,80)
Hoden	PCR	+	-	Ratte	eigene Befunde
Ovarien	PCR	+	-	Ratte	eigene Befunde
Schilddrüse	PCR	+	-	Ratte	eigene Befunde
Herz	PCR	-	-	Ratte	eigene Befunde
Lunge	PCR	-	+	Ratte	eigene Befunde
Magen	PCR	-	-	Ratte	eigene Befunde
Darm	PCR	+	+	Ratte	(45), eigene Befunde
	IHC	+	+	Meerschwein	(45)
Leber	PCR	-	-	Ratte	eigene Befunde
Milz	PCR	-	-	Ratte	eigene Befunde
Pankreas	PCR	+	+	Ratte	(45)
	IHC	+		Ratte	(74)
Niere	PCR	+	-	Ratte	eigene Befunde
Skelettmuskel	PCR	-	-	Ratte	eigene Befunde

4.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Präpro-Orexin, der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression

4.2.1. Geschlechtsspezifisch höhere Expression von Präpro-Orexin und OX₁-Rezeptor mRNA im Hypothalamus weiblicher Wistar-Ratten

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal mit Hilfe der „real-time“ PCR eine erhöhte Expression der Präpro-Orexin und OX₁-Rezeptor mRNA im Hypothalamus weiblicher Ratten verglichen mit männlichen Ratten nachgewiesen. Dies untermauert die Ergebnisse von Taheri et al., 1999 die erhöhte Spiegel für Orexin A im lateralen und posterioren Hypothalamus weiblicher Ratten fanden (104). Die Hochregulierung von Präpro-Orexin sowie des OX₁-Rezeptors im Hypothalamus weiblicher Tiere deutet auf eine erhöhte Aktivität des hypothalamischen Orexinsystems in weiblichen Tieren hin. Der Grund für die geschlechtsspezifischen Unterschiede der hypothalamischen Präpro-Orexin sowie der Orexin-Rezeptor mRNA Expression ist unklar. Naheliegender ist ein Einfluss von Sexualhormonen auf die Orexin Expression. Andererseits wurde in unserem Labor kürzlich gezeigt, dass Gonadektomie mit oder ohne anschließende Hormonsubstitution nicht zu einem Unterschied der hypothalamischen Präpro-Orexin und OX₁-Rezeptor mRNA Expression führt (41).

Auch Russel et al., 2001 detektierten keinen wesentlichen Einfluss des Zyklusses weiblicher Ratten auf den Präpro-Orexin mRNA Gehalt im Hypothalamus (87). Der Präpro-Orexin mRNA Gehalt männlicher Schafe war ebenfalls unabhängig von Östrogeneinfluss (4). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Präpro-Orexin und OX₁-Rezeptor-mRNA Expression im Hypothalamus nicht unter der Kontrolle durch Sexualhormone stehen, sondern vielmehr durch andere Faktoren reguliert werden.

4.2.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression der Orexin Rezeptoren in der Hypophyse und der Nebenniere

Hypophyse

Mittels „real-time“ PCR wurden in dieser Arbeit signifikant höhere Mengen des OX₁-Rezeptors in der Hypophyse von männlichen verglichen mit weiblichen Wistar-Ratten nachgewiesen. Dies lässt einen Einfluss gonadaler Steroide vermuten. Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt werden, dass der OX₁-Rezeptor in der Hypophyse in ovariectomierten placebosubstituierten Ratten hochreguliert wird, während er in ovariectomierten östrogensubstituierten Ratten herunterreguliert ist (41). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass die niedrigeren OX₁-Rezeptor-mRNA Spiegel bei weiblichen Tieren in der Hypophyse durch einen inhibitorischen Effekt der Östrogene zustande kommen.

Umgekehrt konnte auch ein Einfluss der Orexine auf die Sekretion von Sexualhormonen beobachtet werden. Pu et al., 1998 zeigten eine vom Östrogenstatus der Tiere abhängige LH-Sekretion nach i.c.v. Injektion von Orexin (79). I.c.v. Gabe von Orexin unterdrückt die pulsatile Freisetzung von LH in ovariectomierten Ratten, ein Effekt, der durch Östrogensubstitution verstärkt wird (25,106). Andere Arbeitsgruppen beschrieben einen stimulierenden Effekt i.c.v. injizierten Orexins auf die Freisetzung von LH und Prolaktin (46). Obwohl diese Effekte über zentrale Beeinflussung der LHRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus bedingt zu sein scheinen, ist auch eine direkte Wirkung der Orexine über den OX₁-Rezeptor an der Hypophyse möglich. In östrogen-substituierten Ratten war die LH-Freisetzung bereits nach niedrigen Dosen i.c.v. injizierten Orexins möglich, während hohe Dosen i.c.v. injizierten Orexins sogar einen supprimierenden Effekt auf die LH-Freisetzung in nicht östrogensubstituierten ovariectomierten Ratten zeigten (79,106). In hohen Dosen injiziertes Orexin könnte die Hypophyse also per Diffusion erreichen und durch direkte Wirkung am hochregulierten OX₁-Rezeptor bei östrogen-defizienten Tieren die LH-Sekretion beeinflussen. Orexin scheint die Hypothalamus-Hypophysen-Achse unterschiedlich zu beeinflussen, indem es konträre Effekte an Hypothalamus oder Hypophyse zeigt.

Nebenniere

In Nebennieren konnten wir eine deutlich höhere Expression der OX₂-Rezeptor mRNA Expression in männlichen verglichen mit weiblichen Ratten beobachten. Testosteron scheint dabei den OX₂-Rezeptor in den Nebennieren hochzuregulieren, da eine höhere Expression des OX₂-Rezeptors in den Nebennieren bei Sham-operierten bzw. orchidektomierten testosteron-substituierten Tieren im Vergleich zu orchidektomierten placebogefütterten Tieren beobachtet wurde (41). Der die Expression adrener OX₂-Rezeptoren stimulierende Einfluss von Testosteron und die Hemmung der Expression durch Estradiol weisen auf eine mögliche geschlechtsspezifische Wirkung von Orexinen auf die Funktion der Nebennierenrinde hin. Es wurde gezeigt, dass es eine geschlechtsspezifische Reaktion auf Stress bei Ratten gibt, wobei diese bei weiblichen Tieren stärker ausfällt, im Sinne einer erhöhten Freisetzung von Corticosteron (29,96). Testosteron hemmt die ACTH-stimulierte Freisetzung von Corticosteron aus dispergierten adrenokortikalen Zellen von Ratten, während Estradiol die Corticosteron Freisetzung anregt (72). Hinsichtlich der Orexin-stimulierten Corticosteron-Freisetzung wäre ein steigernder Effekt durch Testosteron zu erwarten, da Testosteron den adrener OX₂-Rezeptor hochreguliert. Eine derartige Reaktion wurde beim Menschen beobachtet, indem Männer bei Hypoglykämie einen stärkeren Cortisol-Anstieg zeigen als Frauen (22). Adrenale Orexin-Effekte über den bei männlichen Ratten höher exprimierten OX₂-Rezeptor könnten zu einer geschlechtsspezifischen endokrinen Reaktion auf Hypoglykämie führen. Weiter Experimente werden diese Zusammenhänge klären müssen.

5. Zusammenfassung

Orexin A und B wurden 1998 als endogene Liganden von G-Protein gekoppelten Rezeptoren beim Screening von HPLC-Fractionen aus Hirnextrakten von Ratten entdeckt. Die Expression ihres Vorläuferproteins Präpro-Orexin ist auf den lateralen Hypothalamus beschränkt. Parallel dazu wurden die beiden G-Protein gekoppelten OX₁- und OX₂- Rezeptoren isoliert. Die ausgedehnten Projektionen der Orexin-Neurone zu Zentren des ZNS, welche Einfluss auf Schlaf-Wach-Verhalten, Energiehomöostase, autonome, aber auch endokrine Funktionen haben und die Existenz von Rezeptoren in diesen Gebieten, deuten auf komplexe Aufgaben und Interaktionen der Orexine innerhalb des ZNS hin. Es wurde gezeigt, dass Orexine Einfluss auf die Freisetzung zentral gebildeter Hormone haben. Des Weiteren wurde ein Anstieg des Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Aktivität des renalen sympathischen Nerven nach i.c.v. Injektion beobachtet. Zudem erhöht Orexin den Wachheitsgrad und Orexin-knockout-Mäuse bzw. Hunde mit einer Mutation im OX₂-Rezeptor weisen Narkolepsie ähnliche Symptome auf.

Kurz nach der Entdeckung der Orexine wurden periphere Effekte auf den Gastrointestinaltrakt aber auch an isolierten Nebennieren nachgewiesen, so dass sich die Frage nach einem peripheren Orexin-System stellte. Aus diesem Grund untersuchten wir die Expression von Präpro-Orexin und der Orexin-Rezeptoren in verschiedenen peripheren Organen von Wistar-Ratten.

In dieser Arbeit konnte erstmalig die Expression der OX₁-Rezeptor mRNA in der Schilddrüse, im Jejunum, in der Niere und in den Hoden sowie der OX₂-Rezeptor mRNA in der Lunge in Wistar-Ratten nachgewiesen werden. Zudem wurde die Expression der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA in der Hypophyse bzw. der Nebenniere bestätigt und erstmals quantitativ erfasst. Es wurde eine hohe Expression des OX₁-Rezeptors in der Hypophyse bzw. des OX₂-Rezeptors in der Nebenniere mittels quantitativer „real-time“ PCR gezeigt. Dabei wurden deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede hinsichtlich der OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression in der Hypophyse bzw. Nebenniere gefunden. Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression der Präpro-Orexin mRNA bei weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Tieren im Hypothalamus nachgewiesen.

Das Vorkommen der Orexin-Rezeptoren in der Hypophyse und Nebennieren lässt vor allem auf endokrine Effekte der Orexine in der Peripherie schließen.

Tatsächlich konnte ein Einfluss der Orexine auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse aber auch auf den Magen-Darm-Trakt nachgewiesen werden. Inwieweit die Orexine dabei Einfluss durch direkte Aktion an ihren peripheren Rezeptoren oder vielmehr über zentrale Beeinflussung nehmen, muss weiter untersucht werden.

Die unterschiedliche Expression von OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA im Hypothalamus sowie Hypophyse und Nebenniere männlicher und weiblicher Ratten deutet auf eine geschlechtsspezifische Regulation der Orexin-Rezeptoren hin. Die Orexine könnten dabei eine spezifische Rolle bei der Beeinflussung endokriner Funktionen vor allem bei Stress im Sinne einer Beeinflussung der Corticosteron-Freisetzung aus den Nebennieren und bei der Regulation der Energiehomöostase spielen.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Al Barazanji, K. A., S. Wilson, J. Baker, D. S. Jessop, and M. S. Harbuz. 2001. Central orexin-A activates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and stimulates hypothalamic corticotropin releasing factor and arginine vasopressin neurones in conscious rats. *J Neuroendocrinol.* 13:421-424.
- 2) Anand, B. K. and J. R. Brobeck. 1951. Hypothalamic control of food intake in cats and rats. *Yale J Biol Med* 24:123-146.
- 3) Angerer, L. M. and R. C. Angerer. 1981. Detection of poly A+ RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative in situ hybridization. *Nucleic Acids Res.* 9:2819-2840.
- 4) Archer, Z. A., P. A. Findlay, S. M. Rhind, J. G. Mercer, and C. L. Adam. 2002. Orexin gene expression and regulation by photoperiod in the sheep hypothalamus. *Regul.Pept.* 104:41-45.
- 5) Arihara, Z., K. Takahashi, O. Murakami, K. Totsune, M. Sone, F. Satoh, S. Ito, and T. Mouri. 2001. Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 22:139-142.
- 6) Bernardis, L. L. and L. L. Bellinger. 1996. The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 20:189-287.
- 7) Blanco, M., T. Garcia-Caballero, M. Fraga, R. Gallego, J. Cuevas, J. Forteza, A. Beiras, and C. Dieguez. 2002. Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul.Pept.* 104:161-165.
- 8) Blanco, M., M. Lopez, T. Garcia-Caballero, R. Gallego, A. Vazquez-Boquete, G. Morel, R. Senaris, F. Casanueva, C. Dieguez, and A. Beiras. 2001. Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin.Endocrinol.Metab* 86:1616-1619.

- 9) Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.* 29:23-39.
- 10) Campbell, R. E., K. L. Grove, and M. S. Smith. 2003. Gonadotropin-releasing hormone neurons coexpress orexin 1 receptor immunoreactivity and receive direct contacts by orexin fibers. *Endocrinology* 144:1542-1548.
- 11) Chemelli, R. M., J. T. Willie, C. M. Sinton, J. K. Elmquist, T. Scammell, C. Lee, J. A. Richardson, S. C. Williams, Y. Xiong, Y. Kisanuki, T. E. Fitch, M. Nakazato, R. E. Hammer, C. B. Saper, and M. Yanagisawa. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98:437-451.
- 12) Chen, C. T., S. L. Dun, E. H. Kwok, N. J. Dun, and J. K. Chang. 1999. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci.Lett.* 260:161-164.
- 13) Chen, C. T., L. L. Hwang, J. K. Chang, and N. J. Dun. 2000. Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 278:R692-R697.
- 14) Cox, K. H., D. V. DeLeon, L. M. Angerer, and R. C. Angerer. 1984. Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev.Biol.* 101:485-502.
- 15) Cutler, D. J., R. Morris, V. Sheridhar, T. A. Wattam, S. Holmes, S. Patel, J. R. Arch, S. Wilson, R. E. Buckingham, M. L. Evans, R. A. Leslie, and G. Williams. 1999. Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20:1455-1470.
- 16) Date, Y., M. S. Mondal, S. Matsukura, and M. Nakazato. 2000. Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci.Lett.* 288:87-90.

- 17) Date, Y., M. S. Mondal, S. Matsukura, Y. Ueta, H. Yamashita, H. Kaiya, K. Kangawa, and M. Nakazato. 2000. Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 76:1-6.
- 18) Date, Y., Y. Ueta, H. Yamashita, H. Yamaguchi, S. Matsukura, K. Kangawa, T. Sakurai, M. Yanagisawa, and M. Nakazato. 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:748-753.
- 19) de Lecea, L., T. S. Kilduff, C. Peyron, X. Gao, P. E. Foye, P. E. Danielson, C. Fukuhara, E. L. Battenberg, V. T. Gautvik, F. S. Bartlett, W. N. Frankel, A. N. van den Pol, F. E. Bloom, K. M. Gautvik, and J. G. Sutcliffe. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95:322-327.
- 20) de Miguel, M. J. and M. A. Burrell. 2002. Immunocytochemical detection of orexin A in endocrine cells of the developing mouse gut. *J Histochem.Cytochem.* 50:63-69.
- 21) Delgado, J. M. R. and B. K. Anand. 1953. Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am.J Physiol* 172:162-168.
- 22) Diamond, M. P., T. Jones, S. Caprio, L. Hallarman, M. C. Diamond, M. Addabbo, W. V. Tamborlane, and R. S. Sherwin. 1993. Gender influences counterregulatory hormone responses to hypoglycemia. *Metabolism* 42:1568-1572.
- 23) Dube, M. G., S. P. Kalra, and P. S. Kalra. 1999. Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res.* 842:473-477.
- 24) Edwards, C. M., S. Abusnana, D. Sunter, K. G. Murphy, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1999. The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol.* 160:R7-12.

-
- 25) Furuta, M., T. Funabashi, and F. Kimura. 2002. Suppressive action of orexin A on pulsatile luteinizing hormone secretion is potentiated by a low dose of estrogen in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 75:151-157.
- 26) Gibson, U. E., C. A. Heid, and P. M. Williams. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.
- 27) Greco, M. A. and P. J. Shiromani. 2001. Hypocretin receptor protein and mRNA expression in the dorsolateral pons of rats. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 88:176-182.
- 28) Hagan, J. J., R. A. Leslie, S. Patel, M. L. Evans, T. A. Wattam, S. Holmes, C. D. Benham, S. G. Taylor, C. Routledge, P. Hemmati, R. P. Munton, T. E. Ashmeade, A. S. Shah, J. P. Hatcher, P. D. Hatcher, D. N. Jones, M. I. Smith, D. C. Piper, A. J. Hunter, R. A. Porter, and N. Upton. 1999. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:10911-10916.
- 29) Handa, R. J., L. H. Burgess, J. E. Kerr, and J. A. O'Keefe. 1994. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm.Behav.* 28:464-476.
- 30) Hara, J., C. T. Beuckmann, T. Nambu, J. T. Willie, R. M. Chemelli, C. M. Sinton, F. Sugiyama, K. Yagami, K. Goto, M. Yanagisawa, and T. Sakurai. 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30:345-354.
- 31) Harper, M. E. and L. M. Marselle. 1986. In situ hybridization--application to gene localization and RNA detection. *Cancer Genet.Cytogenet.* 19:73-80.
- 32) Haynes, A. C., B. Jackson, H. Chapman, M. Tadayyon, A. Johns, R. A. Porter, and J. R. Arch. 2000. A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul.Pept.* 96:45-51.

- 33) Haynes, A. C., B. Jackson, P. Overend, R. E. Buckingham, S. Wilson, M. Tadayyon, and J. R. Arch. 1999. Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20:1099-1105.
- 34) Hervieu, G. J., J. E. Cluderay, D. C. Harrison, J. C. Roberts, and R. A. Leslie. 2001. Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103:777-797.
- 35) Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* 11:1026-1030.
- 36) Ida, T., K. Nakahara, T. Katayama, N. Murakami, and M. Nakazato. 1999. Effect of lateral cerebroventricular injection of the appetite-stimulating neuropeptide, orexin and neuropeptide Y, on the various behavioral activities of rats. *Brain Res.* 821:526-529.
- 37) Iqbal, J., S. Pompolo, T. Sakurai, and I. J. Clarke. 2001. Evidence that orexin-containing neurones provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ovine hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 13:1033-1041.
- 38) Irahara, M., T. Tamura, T. Matuzaki, S. Saito, T. Yasui, S. Yamano, M. Kamada, and T. Aono. 2001. Orexin-A suppresses the pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 281:232-236.
- 39) Irving, E. A., D. C. Harrison, A. J. Babbs, A. C. Mayes, C. A. Campbell, A. J. Hunter, N. Upton, and A. A. Parsons. 2002. Increased cortical expression of the orexin-1 receptor following permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurosci.Lett.* 324:53-56.
- 40) Jaszberenyi, M., E. Bujdoso, I. Pataki, and G. Telegdy. 2000. Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol.* 12:1174-1178.

- 41) Jöhren, O., N. Bruggemann, A. Dendorfer, and P. Dominiak. 2003. Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology* 144:1219-1225.
- 42) Jöhren, O., S. J. Neidert, M. Kummer, A. Dendorfer, and P. Dominiak. 2001. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142:3324-3331.
- 43) Karteris, E., H. S. Randevara, D. K. Grammatopoulos, R. B. Jaffe, and E. W. Hillhouse. 2001. Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin.Endocrinol.Metab* 86:4512-4519.
- 44) Kirchgessner, A. L. 2002. Orexins in the brain-gut axis. *Endocr.Rev.* 23:1-15.
- 45) Kirchgessner, A. L. and M. Liu. 1999. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24:941-951.
- 46) Kohsaka, A., H. Watanobe, Y. Kakizaki, T. Suda, and H. B. Schiöth. 2001. A significant participation of orexin-A, a potent orexigenic peptide, in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Brain Res.* 898:166-170.
- 47) Komaki, G., Y. Matsumoto, H. Nishikata, K. Kawai, T. Nozaki, M. Takii, H. Sogawa, and C. Kubo. 2001. Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur.J Endocrinol.* 144:645-651.
- 48) Kukkonen, J. P., T. Holmqvist, S. Ammoun, and K. E. Akerman. 2002. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am.J Physiol Cell Physiol* 283:C1567-C1591.
- 49) Kunii, K., A. Yamanaka, T. Nambu, I. Matsuzaki, K. Goto, and T. Sakurai. 1999. Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res.* 842:256-261.

-
- 50) Kuru, M., Y. Ueta, R. Serino, M. Nakazato, Y. Yamamoto, I. Shibuya, and H. Yamashita. 2000. Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11:1977-1980.
- 51) Lin, L., J. Faraco, R. Li, H. Kadotani, W. Rogers, X. Lin, X. Qiu, P. J. de Jong, S. Nishino, and E. Mignot. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98:365-376.
- 52) Lopez, M., R. Senaris, R. Gallego, T. Garcia-Caballero, F. Lago, L. Seoane, F. Casanueva, and C. Dieguez. 1999. Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 140:5991-5994.
- 53) Lubkin, M. and A. Stricker-Krongrad. 1998. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 253:241-245.
- 54) Malendowicz, L. K., A. Hochol, A. Ziolkowska, M. Nowak, L. Gottardo, and G. G. Nussdorfer. 2001. Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int.J Mol.Med.* 7:401-404.
- 55) Malendowicz, L. K., C. Tortorella, and G. G. Nussdorfer. 1999. Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Steroid Biochem.Mol.Biol.* 70:185-188.
- 56) Marcus, J. N., C. J. Aschkenasi, C. E. Lee, R. M. Chemelli, C. B. Saper, M. Yanagisawa, and J. K. Elmquist. 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435:6-25.
- 57) Matsumura, K., T. Tsuchihashi, and I. Abe. 2001. Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37:1382-1387.

-
- 58) Mazzocchi, G., L. K. Malendowicz, F. Aragona, P. Rebuffat, L. Gottardo, and G. G. Nussdorfer. 2001. Human pheochromocytomas express orexin receptor type 2 gene and display an in vitro secretory response to orexins A and B. *J Clin.Endocrinol.Metab* 86:4818-4821.
- 59) Mazzocchi, G., L. K. Malendowicz, L. Gottardo, F. Aragona, and G. G. Nussdorfer. 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.
- 60) Mitsuma, T., Y. Hirooka, M. Kayama, Y. Mori, Y. Yokoi, N. Rhue, J. Ping, M. Izumi, R. Ikai, K. Adachi, and T. Nogimori. 2000. Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci.* 66:897-904.
- 61) Mitsuma, T., Y. Hirooka, Y. Mori, M. Kayama, K. Adachi, N. Rhue, J. Ping, and T. Nogimori. 1999. Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm.Metab Res.* 31:606-609.
- 62) Moriguchi, T., T. Sakurai, T. Nambu, M. Yanagisawa, and K. Goto. 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.
- 63) Morrison, T. B., J. J. Weis, and C. T. Wittwer. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962.
- 64) Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24:17-27.
- 65) Nakabayashi, M., T. Suzuki, K. Takahashi, K. Totsune, Y. Muramatsu, C. Kaneko, F. Date, J. Takeyama, A. D. Darnel, T. Moriya, and H. Sasano. 2003. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol.Cell Endocrinol.* 205:43-50.

-
- 66) Nambu, T., T. Sakurai, K. Mizukami, Y. Hosoya, M. Yanagisawa, and K. Goto. 1999. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 827:243-260.
- 67) Nanmoku, T., K. Isobe, T. Sakurai, A. Yamanaka, K. Takekoshi, Y. Kawakami, K. Goto, and T. Nakai. 2002. Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul.Pept.* 104:125-130.
- 68) Nanmoku, T., K. Isobe, T. Sakurai, A. Yamanaka, K. Takekoshi, Y. Kawakami, K. Ishii, K. Goto, and T. Nakai. 2000. Orexins suppress catecholamine synthesis and secretion in cultured PC12 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 274:310-315.
- 69) Naslund, E., M. Ehrstrom, J. Ma, P. M. Hellstrom, and A. L. Kirchgessner. 2002. Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am.J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 282:G470-G479.
- 70) Nishino, S., B. Ripley, S. Overeem, G. J. Lammers, and E. Mignot. 2000. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355:39-40.
- 71) Nowak, K. W., P. Mackowiak, M. M. Switonska, M. Fabis, and L. K. Malendowicz. 2000. Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci.* 66:449-454.
- 72) Nowak, K. W., G. Neri, G. G. Nussdorfer, and L. K. Malendowicz. 1995. Effects of sex hormones on the steroidogenic activity of dispersed adrenocortical cells of the rat adrenal cortex. *Life Sci.* 57:833-837.
- 73) Nudel, U., R. Zakut, M. Shani, S. Neuman, Z. Levy, and D. Yaffe. 1983. The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic beta-actin gene. *Nucleic Acids Res.* 11:1759-1771.
- 74) Ouedraogo, R., E. Naslund, and A. L. Kirchgessner. 2003. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52:111-117.

-
- 75) Palkovits, M. and M. J. Brownstein. *Maps and guide to microdissection of the rat brain*. Elsevier, New York.
- 76) Pardue, M. L. and J. G. Gall. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 64:600-604.
- 77) Peyron, C., J. Faraco, W. Rogers, B. Ripley, S. Overeem, Y. Charnay, S. Nevsimalova, M. Aldrich, D. Reynolds, R. Albin, R. Li, M. Hungs, M. Pedrazzoli, M. Padigaru, M. Kucherlapati, J. Fan, R. Maki, G. J. Lammers, C. Bouras, R. Kucherlapati, S. Nishino, and E. Mignot. 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.
- 78) Peyron, C., D. K. Tighe, A. N. van den Pol, L. de Lecea, H. C. Heller, J. G. Sutcliffe, and T. S. Kilduff. 1998. Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci.* 18:9996-10015.
- 79) Pu, S., M. R. Jain, P. S. Kalra, and S. P. Kalra. 1998. Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul.Pept.* 78:133-136.
- 80) Randeva, H. S., E. Karteris, D. Grammatopoulos, and E. W. Hillhouse. 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.
- 81) Ripley, B., S. Overeem, N. Fujiki, S. Nevsimalova, M. Uchino, J. Yesavage, D. Di Monte, K. Dohi, A. Melberg, G. J. Lammers, Y. Nishida, F. W. Roelandse, M. Hungs, E. Mignot, and S. Nishino. 2001. CSF hypocretin/orexin levels in narcolepsy and other neurological conditions. *Neurology* 57:2253-2258.

-
- 82) Ririe, K. M., R. P. Rasmussen, and C. T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.* 245:154-160.
- 83) Rodgers, R. J., J. C. Halford, R. L. Nunes de Souza, A. L. Canto de Souza, D. C. Piper, J. R. Arch, and J. E. Blundell. 2000. Dose-response effects of orexin-A on food intake and the behavioural satiety sequence in rats. *Regul.Pept.* 96:71-84.
- 84) Rodgers, R. J., J. C. Halford, R. L. Nunes de Souza, A. L. Canto de Souza, D. C. Piper, J. R. Arch, N. Upton, R. A. Porter, A. Johns, and J. E. Blundell. 2001. SB-334867, a selective orexin-1 receptor antagonist, enhances behavioural satiety and blocks the hyperphagic effect of orexin-A in rats. *Eur.J Neurosci.* 13:1444-1452.
- 85) Russell, S. H., M. S. Kim, C. J. Small, C. R. Abbott, D. G. Morgan, S. Taheri, K. G. Murphy, J. F. Todd, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2000. Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol.* 12:1213-1218.
- 86) Russell, S. H., C. J. Small, C. L. Dakin, C. R. Abbott, D. G. Morgan, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 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.
- 87) Russell, S. H., C. J. Small, A. R. Kennedy, S. A. Stanley, A. Seth, K. G. Murphy, S. Taheri, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 2001. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology* 142:5294-5302.
- 88) Russell, S. H., C. J. Small, D. Sunter, I. Morgan, C. L. Dakin, M. A. Cohen, and S. R. Bloom. 2002. Chronic intraparaventricular nuclear administration of orexin A in male rats does not alter thyroid axis or uncoupling protein-1 in brown adipose tissue. *Regul.Pept.* 104:61-68.

-
- 89) Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma, and M. Yanagisawa. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573-585.
- 90) Samson, W. K., B. Gosnell, J. K. Chang, Z. T. Resch, and T. C. Murphy. 1999. Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res.* 831:248-253.
- 91) Samson, W. K. and M. M. Taylor. 2001. Hypocretin/orexin suppresses corticotroph responsiveness in vitro. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 281:R1140-R1145.
- 92) Samson, W. K., M. M. Taylor, M. Follwell, and A. V. Ferguson. 2002. Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul.Pept.* 104:97-103.
- 93) Scammell, T. E., I. V. Estabrooke, M. T. McCarthy, R. M. Chemelli, M. Yanagisawa, M. S. Miller, and C. B. Saper. 2000. Hypothalamic arousal regions are activated during modafinil-induced wakefulness. *J Neurosci.* 20:8620-8628.
- 94) Schuld, A., J. Hebebrand, F. Geller, and T. Pollmacher. 2000. Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 355:1274-1275.
- 95) Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley, and D. G. Baskin. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- 96) Sencar-Cupovic, I. and S. Milkovic. 1976. The development of sex differences in the adrenal morphology and responsiveness in stress of rats from birth to the end of life. *Mech.Ageing Dev.* 5:1-9.

-
- 97) Shirasaka, T., M. Nakazato, S. Matsukura, M. Takasaki, and H. Kannan. 1999. Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am.J Physiol* 277:R1780-R1785.
- 98) Smart, D. 1999. Orexins: a new family of neuropeptides. *Br.J Anaesth.* 83:695-697.
- 99) Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert, and S. F. Leibowitz. 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189-1192.
- 100) Steffens, A. B. 1975. Influence of reversible obesity on eating behavior, blood glucose, and insulin in the rat. *Am.J Physiol* 228:1738-1744.
- 101) Stellar, E. 1954. The physiology of motivation. *Psychol.Rev.* 61:5-22.
- 102) Sutcliffe, J. G. and L. de Lecea. 2000. The hypocretins: excitatory neuromodulatory peptides for multiple homeostatic systems, including sleep and feeding. *J Neurosci.Res.* 62:161-168.
- 103) Sweet, D. C., A. S. Levine, C. J. Billington, and C. M. Kotz. 1999. Feeding response to central orexins. *Brain Res.* 821:535-538.
- 104) Taheri, S., M. Mahmoodi, J. Opacka-Juffry, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1999. Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Lett.* 457:157-161.
- 105) Takahashi, N., T. Okumura, H. Yamada, and Y. Kohgo. 1999. Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 254:623-627.
- 106) Tamura, T., M. Irahara, M. Tezuka, M. Kiyokawa, and T. Aono. 1999. Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 264:759-762.

-
- 107) Thannickal, T. C., R. Y. Moore, R. Nienhuis, L. Ramanathan, S. Gulyani, M. Aldrich, M. Cornford, and J. M. Siegel. 2000. Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27:469-474.
- 108) Trivedi, P., H. Yu, D. J. MacNeil, L. H. Van der Ploeg, and X. M. Guan. 1998. Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett.* 438:71-75.
- 109) van den Pol, A. N. 1982. Lateral hypothalamic damage and body weight regulation: role of gender, diet, and lesion placement. *Am.J Physiol* 242:R265-R274.
- 110) van den Pol, A. N. 1999. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci.* 19:3171-3182.
- 111) Voisin, T., P. Rouet-Benzineb, N. Reuter, and M. Laburthe. 2003. Orexins and their receptors: structural aspects and role in peripheral tissues. *Cell Mol.Life Sci.* 60:72-87.
- 112) Volkoff, H., J. M. Bjorklund, and R. E. Peter. 1999. Stimulation of feeding behavior and food consumption in the goldfish, *Carassius auratus*, by orexin-A and orexin-B. *Brain Res.* 846:204-209.
- 113) Weiss, J. and N. Albermann. 2003. Quantification of mRNA levels with reverse transcription-polymerase chain reaction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 311:561-562.
- 114) Willie, J. T., R. M. Chemelli, C. M. Sinton, and M. Yanagisawa. 2001. To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu.Rev.Neurosci.* 24:429-458.
- 115) Xu, R., S. G. Roh, C. Gong, M. Hernandez, Y. Ueta, and C. Chen. 2003. Orexin-B augments voltage-gated L-type Ca(2+) current via protein kinase C-mediated signalling pathway in ovine somatotropes. *Neuroendocrinology* 77:141-152.

-
- 116) Xu, R., Q. Wang, M. Yan, M. Hernandez, C. Gong, W. C. Boon, Y. Murata, Y. Ueta, and C. Chen. 2002. Orexin-A augments voltage-gated Ca²⁺ currents and synergistically increases growth hormone (GH) secretion with GH-releasing hormone in primary cultured ovine somatotropes. *Endocrinology* 143:4609-4619.
- 117) Yamada, H., T. Okumura, W. Motomura, Y. Kobayashi, and Y. Kohgo. 2000. Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 267:527-531.
- 118) Yamamoto, Y., Y. Ueta, Y. Hara, R. Serino, M. Nomura, I. Shibuya, A. Shirahata, and H. Yamashita. 2000. Postnatal development of orexin/hypocretin in rats. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 78:108-119.
- 119) Yamanaka, A., K. Kunii, T. Nambu, N. Tsujino, A. Sakai, I. Matsuzaki, Y. Miwa, K. Goto, and T. Sakurai. 2000. Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res.* 859:404-409.
- 120) Yamanaka, A., T. Sakurai, T. Katsumoto, M. Yanagisawa, and K. Goto. 1999. Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res.* 849:248-252.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

α MSH	„ α -Melanocyte-stimulating-Hormone“, α -Melanocyten-stimulierendes-Hormon
°C	Grad Celsius
μ	Mikro (10^{-6})
14 C	radioaktiver Kohlenstoff
33 P	radioaktiver Phosphor
35 S	radioaktiver Schwefel
A ₂₆₀	Absorption bei 260nm Wellenlänge
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
AluI	Restriktionsenzym
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Vasopressin
BMI	"body mass" Index
Bp	Basenpaar
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ca.	circa
Canarc-1-Gen	"Canine-Narcolepsy-1-Gen"
CART	"Cocaine- and Amphetamine-Regulated-Transcript", Kokain- und Amphetamin-regulierendes-Transkript
cDNA	"copy" DNA aus RNA durch reverse Transkription
c-fos	Gen aus der Familie der „intermediate early genes“
CoCl ₂	Cobaltchlorid
CRH	„Corticotropin Releasing Hormon“, Kortikotropin freisetzendes Hormon
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	deoxy-Nukleosidtriphosphat
dT	Deoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GHRH	„Growth Hormon Releasing Hormon“, Wachstumshormon freisetzendes Hormon
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GnRH	Gonadotropin freisetzendes Hormon
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HPLC	"High-Performance-Liquid-Chromatography"

i. c. v.	intracerebroventrikulär
i. v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LH	lutenisierendes Hormon
LHRH	entspricht GnRH
m	Milli (10^{-3}) oder Meter
M	Molar
MCH	„Melanin-Concentrating-Hormon“, Melanin-konzentrierendes-Hormon
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	„Messenger“ Ribonukleinsäure
n	Nano (10^{-9}) bzw. Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄	Ammonium-Ion
nm	Nanometer
NPY	Neuropeptid Y
OX ₁ -Rezeptor	Orexin-1-Rezeptor
OX ₂ -Rezeptor	Orexin-2-Rezeptor
p	Piko (10^{-12})
PBS	„Phosphate Buffered Saline“, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Personalcomputer
PC12	Phäochromocytom Zelllinie
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase Kettenreaktion
pmol	Pikomol
PPO	Präpro-Orexin
PVN	Nucleus paraventricularis
Pvu II	Restriktionsenzym
RIA	Radio-Immuno-Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SOC-Medium	Transformationsmedium
Sybr-Green I	Fluoreszenzfarbstoff
T3/T4	Trijodthyronin/Thyroxin
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TTP	Thyrosintriphosphat
TRH	Thyreotropin freisetzendes Hormon
U	Unit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
VIP	Vaso-Intestinales-Peptid

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1:** Flussschema der cDNA Klonierung 15
- Abbildung 2.2:** Dargestellt sind die Standardkurven nach Amplifizierung unterschiedlicher Mengen klonierter Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA mittels „real-time“ PCR (A,C,E). Die Schwellenwert-Zykluszahl (C_T) wurde für jede Probe bei einem Fluoreszenzschwellenwert von 0,3 bestimmt und die entsprechende Anzahl der Kopien der cDNA berechnet (B,D,F)..... 20
- Abbildung 3.1:** Auftrennung der PCR-Produkte von verschiedenen peripheren Geweben männlicher Wistar-Ratten in der Agarose-Gelelektrophorese. Keine Banden waren in der Gelelektrophorese sichtbar, wenn die Reverse Transkriptase während der RT-Reaktion durch Wasser ersetzt wurde und somit keine cDNA während der PCR-Reaktion amplifiziert werden konnte. 28
- Abbildung 3.2:** Restriktionsanalyse der amplifizierten DNA-Fragmente von Präpro-Orexin- durch Pvu II ergab zwei Fragmente von 136 und 167 Bp (Abb. 3.2A). Die DNA Fragmente des OX₁- und OX₂-Rezeptors wurden mit Alu I verdaut. Im Fall des OX₁-Rezeptors entstanden vier Fragmente von 20, 51, 59 und 130 Bp (Abb. 3.2B), der OX₂-Rezeptor wurde in zwei 89 und 225 Bp große Fragmente verdaut (Abb. 3.2C). 29
- Abbildung 3.3:** β-Aktin spezifische DNA Fragmente der erwarteten Größe von 380 Bp konnten in allen Geweben amplifiziert werden. 30
- Abbildung 3.4:** Expression von Präpro-Orexin in verschiedenen peripheren Geweben männlicher Ratten, dargestellt durch RT-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese..... 31
- Abbildung 3.5:** Nachweis der Expression von Präpro-Orexin mRNA in Hoden, nicht jedoch in Ovarien; β-Aktin DNA als Nachweis für die Integrität der RNA konnte in beiden Organen amplifiziert werden. 31

Abbildung 3.6: Expression der OX₁- (A) und OX₂-Rezeptors mRNA (B) in verschiedenen peripheren Organen von männlichen Ratten, dargestellt durch RT-PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese..... 32

Abbildung 3.7: Agarosegelelektrophorese und Schmelzkurvenanalyse der mittels „real-time“ PCR amplifizierten OX₁- und OX₂-Rezeptor cDNA Fragmente. M-Marker, TE-Leerprobe, #1 bzw. #2-Proben 34

Abbildung 3.8: Nachweis von Präpro-Orexin mRNA im Gehirn und peripheren Organen von männlichen Ratten mittels quantitativer „real-time“ PCR (A, B, C). Hohe Mengen an mRNA wurden im Gehirn (300000 Kopien/100 ng cDNA) und Hoden detektiert (B). Niedrige Mengen an mRNA wurden in anderen peripheren Organen detektiert (C). n=4..... 35

Abbildung 3.9: OX₁-Rezeptor mRNA Gehalt in verschiedenen peripheren Geweben männlicher Ratten mittels „real-time“ PCR. Nachgewiesen wurden hohe Kopienzahlen des OX₁-Rezeptors im Gehirn und der Hypophyse, niedrigere in Niere, Schilddrüse und Hoden (B). Keine bzw. nur Spuren von mRNA wurden in den anderen aufgeführten Geweben detektiert (C). n=4 36

Abbildung 3.10: Darstellung des mRNA Gehalts des OX₂-Rezeptors in verschiedenen Organen der Ratte mittels „real-time“ PCR. Sehr hohe Mengen wurden in Gehirn und Nebenniere detektiert, gefolgt von niedrigeren Mengen in Lunge und Hypophyse (B). Sehr niedrige Kopienzahlen wurden in anderen peripheren Geweben gefunden (C). n=4 37

Abbildung 3.11: Film-Autoradiographie zeigt die Lokalisierung der OX₂-Rezeptor mRNA in Nebennieren von männlichen Ratten. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin (A) bzw. einem Antikörper gegen Thyrosin-Hydroxylase (B) angefärbt. *In situ* Hybridisierung mit [³³P]-markierten OX₁- (C) bzw. OX₂-Rezeptor Antisense-Oligonukleotid-Sonden (D) erbrachte ein Signal für den OX₂-Rezeptor in der Zona glomerulosa und der Zona reticularis, nicht jedoch in den Zona fasciculata und dem Nebennierenmark. Ein 10facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotidsonden erbrachte sowohl für den (E) OX₁- als auch den (F) OX₂-Rezeptor kein positives Signal. 39

Abbildung 3.12: Präpro-Orexin, OX₁- und OX₂-Rezeptor mRNA Expression im Hypothalamus männlicher und weiblicher Ratten, gemessen mittels „real-time“ PCR. Signifikant höhere Expression der Präpro-Orexin mRNA bzw. der OX₁-Rezeptor mRNA bei weiblichen Tieren. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. *- $p < 0,05$, ***- $p < 0,001$; n=8..... 40

Abbildung 3.13: Signifikant höhere Expression der OX₁-Rezeptor mRNA bei männlichen Ratten in der Hypophyse, bestimmt durch quantitative „real-time“ PCR. ***- $P < 0,001$; n=4..... 41

Abbildung 3.14: Signifikant höhere Expression der OX₂-Rezeptor mRNA bei männlichen Ratten im Vergleich zu weiblichen Tieren in den Nebennieren mittels „real-time“ PCR. ***- $P < 0,001$; n=4..... 42

Abbildung 3.15: Lokalisierung von OX₂-Rezeptor mRNA durch [³³P]-markierte Oligonukleotidsonden in den Nebennieren männlicher (A) und weiblicher (B) Ratten mittels *in situ* Hybridisierung. M – Mark, ZG – Zona glomerulosa, ZF – Zona fasciculata, ZR – Zona reticularis 42

7.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Nukleotidsequenzen der Primer..... 13

Tabelle 2.2: Nukleotidsequenzen der Antisense-Oligonucleotid-Primer des OX₁- und OX₂-Rezeptors 22

Tabelle 4.1: Präpro-Orexin, Orexin A und Orexin B Expression in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. PCR=Polymerasekettenreaktion, ISH=*in situ* Hybridisierung, IHC=Immunhistochemie, RIA=“Radioimmunoassay“, NB= Northern Blot, WB= Western Blot, +=detektiert, -= nicht detektiert 47

Tabelle 4.2: OX₁- und OX₂-Rezeptor Expression in verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies. PCR=Polymerasekettenreaktion, ISH=*in situ* Hybridisierung, IHC=Immunhistochemie, WB= Western Blott, +=detektiert, -=nicht detektiert 55

7.4. Danksagung

Danken möchte Herrn Prof. Dr. P. Dominiak für die Überlassung des Themas und der Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. O. Jöhren für die kompetente und in allen Belangen hilfreiche Unterstützung dieses Forschungsprojekts.

Mein Dank gilt auch Frau Alexandra Thornagel, Frau Constanze Siggel, Frau Gudrun Vierke und Herrn Marco Kummer für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Danken möchte ich noch Herrn Prof. Dr. G. Sczakiel aus dem Institut für Molekulare Medizin für die Möglichkeit der Nutzung des „GeneAmp 5700 sequence detection system“.

7.5. Lebenslauf

Stefanie Julia Neidert

Paulustor 6a

36037 Fulda

E-Mail: st.neidert@web.de

Tel.: +49-661-22366

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 06. Januar 1977
Geburtsort: Fulda
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

BILDUNGSGANG

08/83-07/87 Adolf-von-Dalberg Schule in Fulda, Grundschule
08/87-06/96 Winfriedschule Fulda, Neusprachliches Gymnasium
06/96 Abitur

STUDIUM

10/96 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen Universität zu Lübeck
08/98 Physikum (ärztliche Vorprüfung)
08/99 1. Staatsexamen
09/01 2. Staatsexamen
05/03 3. Staatsexamen

FAMULATUREN

02/99-03/99 Anästhesie am St. Elisabeth Krankenhaus in Hünfeld,
Deutschland
02/00-03/00 Pharmakologie und Toxikologie an der Medizinischen
Universität zu Lübeck, Deutschland
03/00-04/00 Innere Medizin, Schwerpunkt Kardiologie,
Klinikum Westend in Berlin, Deutschland
07/00-08/00 Innere Medizin, Erne Hospital in Enniskillen, Nordirland
09/00 Medizinische Notfallaufnahme an der Medizinischen
Universität zu Lübeck, Deutschland
02/01-03/01 Neurologie am Städtischen Krankenhaus in Fulda,
Deutschland

PRAKTISCHES JAHR

04/02-07/02	Medizin am Kantonsspital Luzern, Schweiz
08/02-11/02	Neurologie am „Institute of Neurology“ des United College London, Grossbritannien
12/02-01/03	Chirurgie am Regionalkrankenhaus Bozen, Italien
02/03-04/03	Chirurgie am Spital Langenthal, Schweiz

STELLEN

07/03-12/03	Innere Medizin, Herz-Jesu-Krankenhaus, Fulda
01/04-12/04	Innere Medizin, Kantonsspital Nidwalden, Schweiz
seit 04/05	Innere Medizin, Kantonsspital Luzern, Schweiz

SPRACHKENNTNISSE

- Englisch in Wort und Schrift, gute Französisch Kenntnisse, Grundkenntnisse in Italienisch

FREIZEITAKTIVITÄTEN

Reiten (früher als Turniersport), Alpinsport, Badminton, Lesen

7.6. Originalarbeiten

- Kummer, M., S.J. Neidert, O. Jöhren, and P. Dominiak. Orexin (hypocretin) gene expression in rat ependymal cells. *NeuroReport*, 2001 Jul 20;12(10):2117-20
- Jöhren, O., S.J. Neidert, M. Kummer, A. Dendorfer and P. Dominiak. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rat. *Endocrinology*, 2001 Aug;142(8):3324-31
- Jöhren, O., S.J. Neidert, M. Kummer and P. Dominiak. Sexually dimorphic expression of prepro-orexin mRNA in the rat hypothalamus. *Peptides*, 2002, 23,1177-1180