

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

Direktor: Herr Prof. Dr. med. Markus Schwaninger

---

**Der Einfluss von Orexin A und Orexin B auf die Regulation der Genexpression  
der Enzyme 11 $\beta$ -Hydroxylase, Aldosteronsynthase, 21-Hydroxylase und  
3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 in humanen Nebennierenrindenzellen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Sonja Maria Kagerer

aus Frankfurt am Main

Lübeck 2011

1. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. Johannes Klein
Tag der mündlichen Prüfung:	17.04.2012
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	17.04.2012

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis.....IV

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Biosynthese und Struktur der Bestandteile des Orexin-Systems.....	1
1.2	Verteilung und Wirkung des Orexin-Systems im ZNS.....	4
1.3	Verteilung und Wirkung des peripheren Orexin-Systems.....	6
1.4	Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch Orexin A und B.....	8
1.5	Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde.....	11
1.6	Regulation der Genexpression in eukaryotischen Zellen.....	13
1.7	Zielsetzung.....	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1	<b>Zellkultur.....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Zelllinie.....	15
2.1.2	Zellkultivierung.....	15
2.1.3	Subkultivierung, Aussaat und Stimulation.....	16
2.2	<b>Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion.....</b>	<b>17</b>
2.2.1	RNA-Isolierung und -Messung.....	17
2.2.2	cDNA-Synthese.....	18
2.2.3	Primerauswahl.....	18
2.2.4	Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion.....	19
2.3	<b>mRNA-Stabilitätsuntersuchung nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D.....</b>	<b>22</b>
2.4	<b>Klonierung.....</b>	<b>23</b>
2.4.1	Isolierung genomischer DNA.....	23
2.4.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	23
2.4.3	Primerauswahl.....	24
2.4.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	26
2.4.5	PCR-Optimierung.....	27
2.4.6	Agarosegelelektrophorese.....	28

---

2.4.7	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	29
2.4.8	Ligation .....	30
2.4.9	Transformation .....	32
2.4.10	Plasmid-Präparation .....	34
2.4.11	Restriktion .....	36
2.4.12	Ethanol-fällung und externe Sequenzierung.....	37
<b>2.5</b>	<b>Transfektion.....</b>	<b>38</b>
<b>2.6</b>	<b>Reportergenstudien.....</b>	<b>39</b>
2.6.1	β-Laktamase-Reportergensystem .....	39
2.6.2	Dual-Luziferase-Reportergensystem.....	41
<b>2.7</b>	<b>Zellzahlbestimmung.....</b>	<b>44</b>
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>45</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Wirkung von Orexin A auf die mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen .....</b>	<b>46</b>
3.1.1	Quantitative Auswertung des Effekts von Orexin A auf die mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme .....	46
3.1.2	Spezifität der amplifizierten cDNA-Fragmente .....	47
3.1.3	Einfluss von Orexin A auf die mRNA-Stabilität der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 .....	48
<b>3.2</b>	<b>Promotorklonierung und Konstruktion von Reportergenvektoren.....</b>	<b>49</b>
3.2.1	Optimale Bindungstemperatur der Primerpaare und spezifische Amplifikation der DNA-Fragmente.....	50
3.2.2	Selektion rekombinanter Vektoren mittels Restriktionsanalyse .....	53
3.2.3	Bestätigung der Sequenzen der ausgewählten Plasmide durch externe Sequenzierung .....	60
<b>3.3</b>	<b>Wirkung der Orexine auf die Aktivitäten der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen .....</b>	<b>61</b>
3.3.1	Etablierung des β-Laktamase-Reportergensystems zur Untersuchung der Wirkung von Orexinen auf die Aktivität des HSD3B2-Promotors.....	61
3.3.2	Optimierung des Luziferase-Reportergensystems zur Untersuchung der Aktivitäten der CYP11B1-, CYP11B2-, CYP21- und HSD3B2-Promotoren in rekombinanten pGL4.19-Vektoren .....	66

3.3.3	Effekte der Orexine auf die Aktivitäten der Promotoren der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 im pGL4.19-Reportergenvektor .....	70
3.3.4	Quantitativer Vergleich der Promotoraktivierungen von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 durch Orexin A, Orexin B, Angiotensin II und Forskolin .	74
3.4	<b>Proliferation der NCI-H295R-Zellen unter Orexin-Behandlung .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
4.1	Orexine verändern das Expressionsmuster der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen auf mRNA-Ebene .....	78
4.2	Orexine regulieren die Expression der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen auf Transkriptionsebene.....	79
4.3	Bedeutung der Transkriptionssteigerung selektiver Steroidbiosyntheseenzyme durch Orexine in der NNR auf zellulärer Ebene.....	83
4.4	Orexininduzierte Signaltransduktion und Promotoraktivierung in NCI-H295R-Zellen .....	86
4.5	Modell zur intrazellulären Signalkaskade in NCI-H295R-Zellen .....	89
4.6	Physiologische Rolle der Orexine im Regelkreis der adrenalen Steroidbiosynthese <i>in vivo</i> .....	92
4.7	Fazit und Ausblick.....	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>126</b>
7.1	Vektorkarten der Kontrollvektoren pUC19 und pRL-SV40 .....	126
7.2	Vektorkarten der rekombinanten Plasmide .....	126
7.3	Sequenzen der extern sequenzierten Plasmide.....	130
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>134</b>
<b>10</b>	<b>Veröffentlichungen und Vorträge .....</b>	<b>135</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
AC	Adenylatcyclase
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AS	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Vasopressin
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool (engl.)
bp	Basenpaare
<b>C</b>	Cytosin
CAMK	calcium/calmodulin-dependent kinase (engl.)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (engl.)
CCF2	Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein 2
cDNA	complementary DNA (engl.)
CHAPS	3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio-1-propan sulfonat
CREB/M	cAMP response element binding protein/modulator (engl.)
CRH	Kortikotropin-Releasing-Hormon
$C_t$	Schwellenwert-Zykluszahl
CYP11A1	Cholesterin-20-22-Desmolase
CYP11B1	11 $\beta$ -Hydroxylase
CYP11B2	Aldosteronsynthase
CYP17	17 $\alpha$ -Hydroxylase
CYP21	21-Hydroxylase
<b>DAG</b>	Diacylglycerin
DAX-1	dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1 (engl.)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (engl.)
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
dT	Desoxy-Thymidin
<b>EC<sub>50</sub></b>	mittlere effektive Konzentration

---

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ERK</b>	extracellular signal-regulated kinase (engl.)
<b>FBS</b>	fetal bovine serum (engl.)
<b>G</b>	Guanin
<b>GATA</b>	„GATA“ bindendes Protein
<b>GnRH</b>	Gonadoliberin
<b>HF-Puffer</b>	High-Fidelity-Puffer
<b>HHN-Achse</b>	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
<b>HPLC</b>	high performance liquid chromatography (engl.)
<b>HSD3B2</b>	3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrisphosphat
<b>i.z.v.</b>	intrazerebroventrikulär
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LH</b>	luteinisierendes Hormon
<b>MAPK</b>	mitogen-activated protein kinase (engl.)
<b>MEK</b>	MAPK Kinase
<b>mRNA</b>	messenger RNA (engl.)
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information, USA
<b>NCI-H295</b>	National Cancer Institut, humane Zelllinie Nr. 295
<b>NGFIB</b>	nerve growth factor-induced clone B (engl.)
<b>NN</b>	Nebenniere
<b>NNM</b>	Nebennierenmark
<b>NNR</b>	Nebennierenrinde
<b>NPY</b>	Neuropeptid Y
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>OX<sub>1</sub>R</b>	Orexin-Typ-1-Rezeptor
<b>OX<sub>2</sub>R</b>	Orexin-Typ-2-Rezeptor
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline (engl.)
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (engl.)
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C $\beta$
<b>qPCR</b>	quantitative PCR
<b>Raf</b>	Ratten-Fibrosarkom

---

Ras	Ratten-Sarkom
RIA	radioimmunoassay (engl.)
R <sub>n</sub>	Fluoreszenz-Schwellenwert
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse-Transkriptase
<b>S</b>	sense
SDS	sodiumdodecylsulfate (engl.)
SF-1	steroidogenic factor 1 (engl.)
StAR	steroidogenic acute regulatory protein (engl.)
STAT	signal-transducer and activator of transcription (engl.)
<b>T</b>	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TRH	Thyreoliberin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyreotropin
UbC	Ubiquitin C
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	zentrales Nervensystem

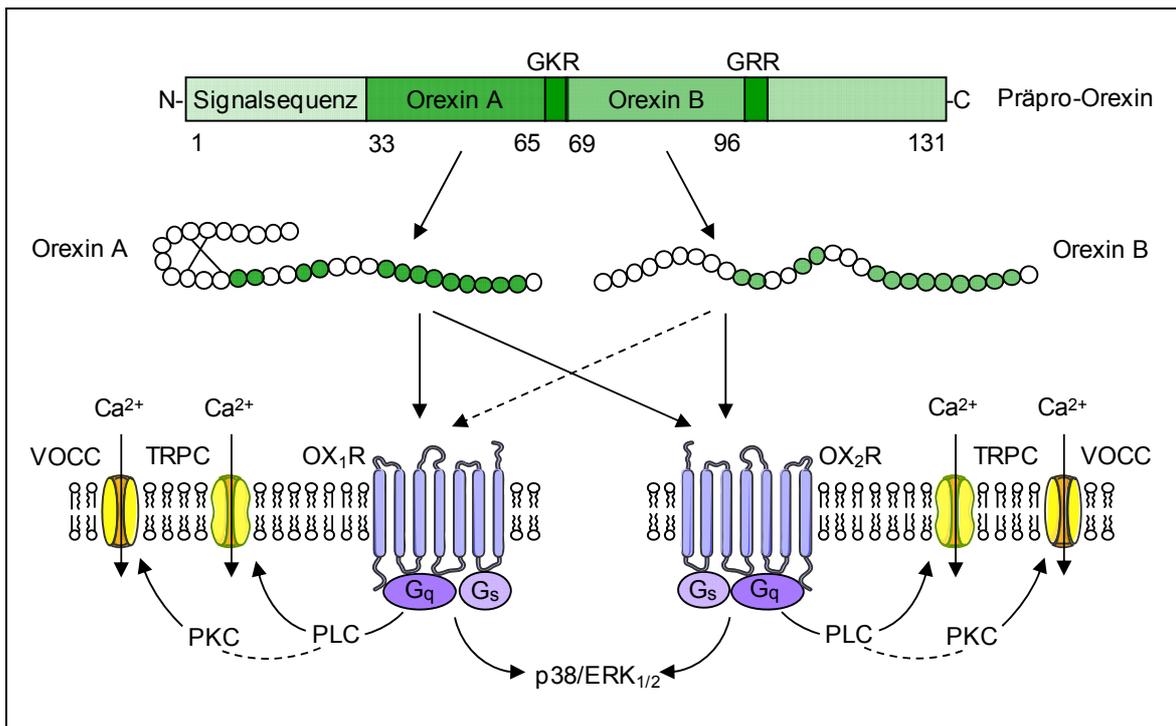
# 1 Einleitung

Die Erstbeschreibung der Neuropeptide Orexin A und Orexin B geht auf das Jahr 1998 zurück. In diesem Jahr gelang der Arbeitsgruppe um Yanagisawa die Isolierung zweier endogener Liganden an G-Protein-gekoppelten Orphan-Rezeptoren, die sie durch das Screening von HPLC-Fractionen aus den Hirnextrakten von Ratten gefunden hatte (226). Sie benannte diese Hormone nach dem griechischen Wort „orexis“ für Appetit Orexin A und Orexin B, da deren zentrale Applikation eine Steigerung der Nahrungsaufnahme bewirkte. Unabhängig hiervon hatte eine andere Forschergruppe zuvor die Klonierung der cDNA eines hypothalamusspezifischen Präpro-Hormons mittels direktonaler PCR-Subtraktion publiziert, welche für zwei damals noch unbekannte Neuropeptide kodierte. Aufgrund ihrer ausschließlichen Expression im *Hypothalamus* und ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit dem Hormon *Sekretin* bezeichneten sie diese als Hypocretin 1 und 2 (51, 69). Es zeigte sich, dass die cDNA-Sequenzen von Präpro-Orexin und Präpro-Hypocretin identisch sind. Die Bezeichnungen Orexin und Hypocretin werden in der Fachliteratur seither synonym eingesetzt. Aus Gründen einheitlicher Begrifflichkeit werden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die von Sakurai et al. eingeführten, auf das griechische Wort „orexis“ zurückgehenden Termini verwendet (226).

## 1.1 Biosynthese und Struktur der Bestandteile des Orexin-Systems

Orexin A und B werden aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein namens Präpro-Orexin gebildet, welches beim Menschen 131 Aminosäuren umfasst und auf Chromosom 17q21 kodiert ist. Dem diskontinuierlichen Präpro-Orexin-Gen, welches sich über eine Länge von 1432 bp erstreckt, ist eine aus 450 bp bestehende Promotorregion mit zahlreichen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen vorgeschaltet (227, 271). Präpro-Orexin besitzt N-terminal eine charakteristische sekretorische Signalsequenz aus 33 Aminosäuren, nach deren Abtrennung Pro-Orexin entsteht, welches durch eine Prohormon-Konvertase in Orexin A und B gespalten wird (s. Abb. 1.1) (226, 270).

Orexin A besteht aus 33 Aminosäuren und erhält posttranslational einen Pyroglutamyl-Rest am N-terminalen und eine Amidgruppe am C-terminalen Ende. Diese für Neuropeptidhormone charakteristischen Modifikationen schützen das Molekül vor dem Abbau durch Proteasen. Zusätzlich wird die Tertiärstruktur durch zwei intramolekulare



**Abbildung 1.1:** Das Orexin-System. Entstehung von Orexin A und B aus dem gemeinsamen Vorläuferpeptid Präpro-Orexin, Bindungsverhalten der Orexine an den Orexin-Rezeptoren (OX<sub>1/2</sub>R) und Signaltransduktion der Rezeptoren. Identische Aminosäuren der Orexin-Moleküle sind grün unterlegt. ERK: „extracellular signal-regulated kinase“; GKR/GRR: Bindungsstellen der Prohormon-Konvertase; G<sub>s</sub>/G<sub>q</sub>: G-Proteine vom Subtyp G<sub>s</sub>/G<sub>q</sub>; p38: MAPK p38; PKC: Proteinkinase C; PLC: Phospholipase C $\beta$ ; TRPC: rezeptorgesteuerter Kalziumkanal; VOCC: spannungsgesteuerter Kalziumkanal

Disulfidbrücken zwischen Cys6-Cys12 und Cys7-Cys14 stabilisiert. Orexin B setzt sich aus 28 Aminosäuren zusammen und liegt in linearer Form vor. Als strukturelles Merkmal weist es wie Orexin A eine C-terminale Amidierung auf. Die Aminosäuresequenzen von Orexin A und Orexin B sind zu 46 % homolog (226). Orexin A ist aufgrund der stärkeren posttranslationalen Veränderungen im Organismus stabiler als Orexin B, wodurch es höhere Gewebs- und Blutkonzentrationen aufweist. Untersuchungen an Mäusen zeigten, dass Orexin A ein sehr lipophiles Molekül ist und somit im Gegensatz zum weit weniger lipophilen Orexin B nach intravenöser Injektion schnell die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins ZNS gelangen kann (120). Die Aminosäuresequenz von Orexin A ist bei Mensch, Ratte, Maus, Hund, Kuh, Schaf und Schwein identisch, während die entsprechenden Sequenzen von Orexin B nur eine 92-96 %ige Homologie aufweisen (55, 135, 225).

Der Orphan-Rezeptor, als dessen Liganden die Orexine ursprünglich von Sakurai et al. isoliert wurden, erhielt die Bezeichnung Orexin-Typ-1-Rezeptor (OX<sub>1</sub>R). Mittels einer BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“)-Durchsuchung der GenBank-Datenbasis wurde durch eine 64 %ige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen mit dem OX<sub>1</sub>R der Orexin-Typ-2-Rezeptor (OX<sub>2</sub>R) identifiziert. Beide Rezeptoren gehören zur Klasse der G-

Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen, welche die größte Gruppe von Zellmembranrezeptoren bildet (200, 226). Der OX<sub>1</sub>R hat eine Länge von 425 Aminosäuren und ist beim Menschen auf Chromosom 1p33 kodiert, während der OX<sub>2</sub>R 444 Aminosäuren umfasst und auf Chromosom 6p11-q11 lokalisiert werden konnte (226). Während Orexin A und B mit etwa gleicher Affinität an den OX<sub>2</sub>R binden (EC<sub>50</sub> Orexin A: 34 nM, Orexin B: 60 nM), verfügt Orexin A am OX<sub>1</sub>R über eine um 2 Potenzen größere Bindungsaffinität als Orexin B (EC<sub>50</sub> Orexin A: 30 nM, Orexin B: 2500 nM). Daher wird angenommen, dass der OX<sub>1</sub>R selektiv für Orexin A, der OX<sub>2</sub>R hingegen unselektiv ist (226). Vom OX<sub>2</sub>R der Maus sind mittlerweile zwei Spleißvarianten, OX<sub>2α</sub>R und OX<sub>2β</sub>R, mit gewebespezifischer Verteilung bekannt (42). Die Aminosäuresequenzen der humanen Orexin-Rezeptoren weisen eine 91-98 %ige Übereinstimmung mit den Sequenzen der klonierten Rezeptoren von Maus, Ratte, Hund und Schwein auf (135, 226).

In Untersuchungen an kultivierten neuronalen Zellen von Ratten sowie an einer Zelllinie aus chinesischen Hamster-Ovarien, die rekombinante Orexin-Rezeptoren exprimiert, bewirkten die Orexine einen konstanten Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration (148, 226, 267, 268). Dies hat zu der Annahme geführt, dass die Orexin-Rezeptoren an G-Proteine vom Subtyp G<sub>q/11</sub> gekoppelt sind (s. Abb. 1.1) (148, 226, 268). Das Protein G<sub>q/11</sub> aktiviert nach der Bindung von Orexin an den Rezeptor die Phospholipase Cβ (PLC), die Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) aus Phospholipiden der Zellmembran bildet. IP<sub>3</sub> setzt seinerseits Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern frei, während DAG die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, die wiederum spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (VOCC) in der Zellmembran öffnet (17, 135, 161, 234, 245, 265, 268). Darüber hinaus werden über die PLC nach Orexin-Bindung noch rezeptorgesteuerte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom Typ der „transient receptor potential channels“ (TRPC) in der Zellmembran geöffnet (60, 135, 139, 148, 149). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Ligandenbindung an beiden Orexin-Rezeptoren außerdem über noch nicht eindeutig geklärte Mechanismen verschiedene „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK)-Signalwege aktiviert, darunter die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) 1- und 2- sowie die p38-MAPK-Kaskade, die vor allem in Prozesse des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung involviert sind (5, 60, 211, 250, 275). Ob die Orexin-Rezeptoren auch an G-Proteine vom Typ G<sub>s</sub> oder G<sub>i</sub> koppeln, welche die cAMP-Bildung in der Zelle regulieren, wird derzeit noch kontrovers diskutiert, wobei sich besonders die Hinweise auf eine zusätzliche Kopplung an G<sub>s</sub> häufen (101, 135, 149, 153, 162, 211, 212, 275, 287). Als Erklärung für die zum Teil differierenden Befunde wird einerseits eine zell- bzw. gewebespezifische Expression der

G-Protein-Subtypen und andererseits eine Abhängigkeit ihrer Aktivierung von der Ligandenkonzentration vermutet (5, 17, 101, 135, 139).

## 1.2 Verteilung und Wirkung des Orexin-Systems im ZNS

Die mRNA des Präpro-Orexins konnte im Gehirn mittels *in situ* Hybridisierung und Northern Blotting bisher ausschließlich im lateralen Hypothalamus, in den angrenzenden paraventriculären, perifornikalen und dorsalen Kerngebieten sowie in weitaus geringerer Menge im Ependym detektiert werden (69, 136, 198, 226, 256). Hiermit übereinstimmend konnten orexinimmunoreaktive Neuronen-Zellkörper ebenfalls nur in diesen Regionen nachgewiesen werden (45, 50, 51, 176). Mittels Immunhistochemie wurden im ZNS die weitgefächerten Projektionen der orexinproduzierenden Neurone verfolgt. Besonders ausgeprägt verlaufen diese Fasern innerhalb des Hypothalamus sowie zwischen dem lateralen Hypothalamus und verschiedenen Kerngebieten in Thalamus, Mittelhirn, Hirnstamm und Rückenmark. Darüber hinaus ziehen die Axone der Orexin-Neurone aus dem lateralen Hypothalamus zum Bulbus olfactorius, zum limbischen System, zur Hypophyse, zum Kortex und zum Kleinhirn (40, 45, 49-51, 176, 199, 267). Die Expression der Orexin-Rezeptoren entspricht dem Verlauf dieser Projektionen, wie durch *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie gezeigt werden konnte. Die Rezeptor-Subtypen werden dabei teilweise in unterschiedlichen und komplementären Gebieten exprimiert, weshalb von verschiedenen physiologischen Rollen der Rezeptoren ausgegangen wird (43, 92, 154, 264).

Die hohe Konzentration orexinproduzierender Zellen im lateralen Hypothalamus, dem „Hungerzentrum“ des ZNS, korreliert mit dem Befund, dass Orexin A und B nach intrazerebroventrikulärer (i.z.v.) Injektion die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme von Ratten steigern (16, 54, 56, 89, 137, 202, 226, 258). Hierdurch kommt es jedoch nicht zu einer Körpergewichtszunahme, da gleichzeitig der Energieverbrauch über eine Erhöhung der motorischen Aktivität und der Ruhestoffwechselrate gesteigert und die Nahrungsaufnahme während der Nacht bei längerfristiger Orexin-Behandlung reduziert wird (36, 86, 89, 103, 147, 230, 272, 273, 284).

Aufgrund der neuroanatomischen Verteilung des Orexin-Systems wurde außerdem ein Einfluss der Peptide auf das Schlaf-Wach-Verhalten vermutet. Mittlerweile ist bekannt, dass die Orexine nach zentraler Infusion nicht nur den Schlaf unterdrücken sowie den Wachheits- und Aktivitätsgrad steigern, sondern auch bei Nagetieren, Hunden und

Menschen eine ätiologische Rolle im Krankheitsbild der Narkolepsie spielen (39, 81, 144, 201). In Untersuchungen an Patienten wurden bei bis zu 90 % der Narkoleptiker verminderte Orexin-Liquorspiegel und eine verringerte Anzahl orexinproduzierender Neurone im Hypothalamus nachgewiesen (182, 198, 262). Diese Degeneration der Orexin-Neurone beruht nach derzeitiger Ansicht sehr wahrscheinlich auf autoimmunen Prozessen, wodurch die seit langem bestehende Autoimmun-Hypothese der Narkolepsie untermauert wird (37, 165, 259).

Nach heutigen Erkenntnissen nimmt das Orexin-System darüber hinaus direkten Einfluss auf die hypothalamisch-hypophysäre Hormonausschüttung. Die Orexine und ihre Rezeptoren wurden in der Adenohypophyse, der Eminentia mediana und in den Releasing-Hormon-produzierenden Nuclei arcuati et tuberales nachgewiesen. Zusätzlich existieren diese Gebiete verbindende orexinführende Fasern (40, 49, 154, 199, 286). An Hypothalamus-Explantaten von Ratten führten die Orexine zu einer erhöhten Freisetzung von GnRH. *In vivo* modulierten sie allerdings die GnRH-vermittelte LH-Freisetzung bei weiblichen Ratten in Abhängigkeit von der jeweiligen Sexualzyklusphase, da die Expression der zentralen Orexin-Rezeptoren von den ovariellen Steroiden reguliert wird (106, 203, 220, 240, 261). Die Plasmaspiegel von Prolaktin und Somatotropin sanken nach i.z.v. Applikation von Orexin A und B bei Ratten signifikant ab (81, 113, 218). Die TRH-vermittelte TSH-Ausschüttung wurde durch Orexin A vermindert, durch Orexin B hingegen erhöht, wovon die Plasmaspiegel der Schilddrüsenhormone allerdings nicht beeinflusst wurden (113, 169, 221).

Das Orexin-System interagiert ferner über die Innervation der präganglionären sympathischen und parasympathischen Neurone im Hirnstamm und Rückenmark mit dem autonomen Nervensystem (48, 267). Nach Injektion in die Liquorräume führten die Orexine bei Ratten zu einem dosisabhängigen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz, des Plasma-Katecholaminspiegels und des Sympathikotonus, der als „renal sympathetic nerve activity“ gemessen wurde (41, 160, 231, 238). Orexin A bewirkte außerdem eine vagal vermittelte Steigerung der Magensäureproduktion (260).

Nach neueren Untersuchungen sind die Orexine auch an der Entstehung von Suchtverhalten beteiligt, wie die orexinerge Innervation des Nucleus accumbens, des ventralen Tegmentum und des Lobus insularis vermuten ließ, die Einfluss auf die Ausbildung belohnungs- und abhängigkeitsassoziierten Verhaltens nehmen (129, 130, 132, 178, 199, 253). Demgemäß entwickelten orexinefiziente Mäuse eine weniger stark ausgeprägte Morphinabhängigkeit als eine genetisch unveränderte Kontrollgruppe und die

Blockade des  $OX_1R$  schwächte bei Ratten eine zuvor erzeugte Nikotinabhängigkeit ab (72, 100, 179). Ferner zeigten kokain- oder morphinentwöhnte Ratten unter zentraler Aktivierung des Orexin-Systems signifikant erhöhte Rückfallquoten (26, 87).

### 1.3 Verteilung und Wirkung des peripheren Orexin-Systems

Die Detektion von orexinproduzierenden Zellen und Orexin-Rezeptoren in zahlreichen peripheren Geweben sowie der Nachweis von Orexin A im Plasma von Ratte und Mensch haben dazu geführt, dass heute von einem eigenständigen peripheren Orexin-System ausgegangen wird (s. Abb. 1.2) (7, 91, 112). Der Ursprung des Plasma-Orexins ist nach wie vor unklar, es scheint jedoch zumindest teilweise von der zentralen Produktion unabhängig zu sein (46, 91).

Zu den peripheren Wirkungsorten des Orexin-Systems gehört der Magen-Darmtrakt. In diesem wurden bei Mensch, Ratte und Schwein orexinproduzierende Zellen, orexinimmunoreaktive Axone und Orexin-Rezeptoren in verschiedenen Wandschichten, wie in der Ringmuskulatur, in den submukösen und myenterischen Ganglien sowie in den neuroendokrinen Zellen, nachgewiesen (58, 125, 180). Diese Verteilung der

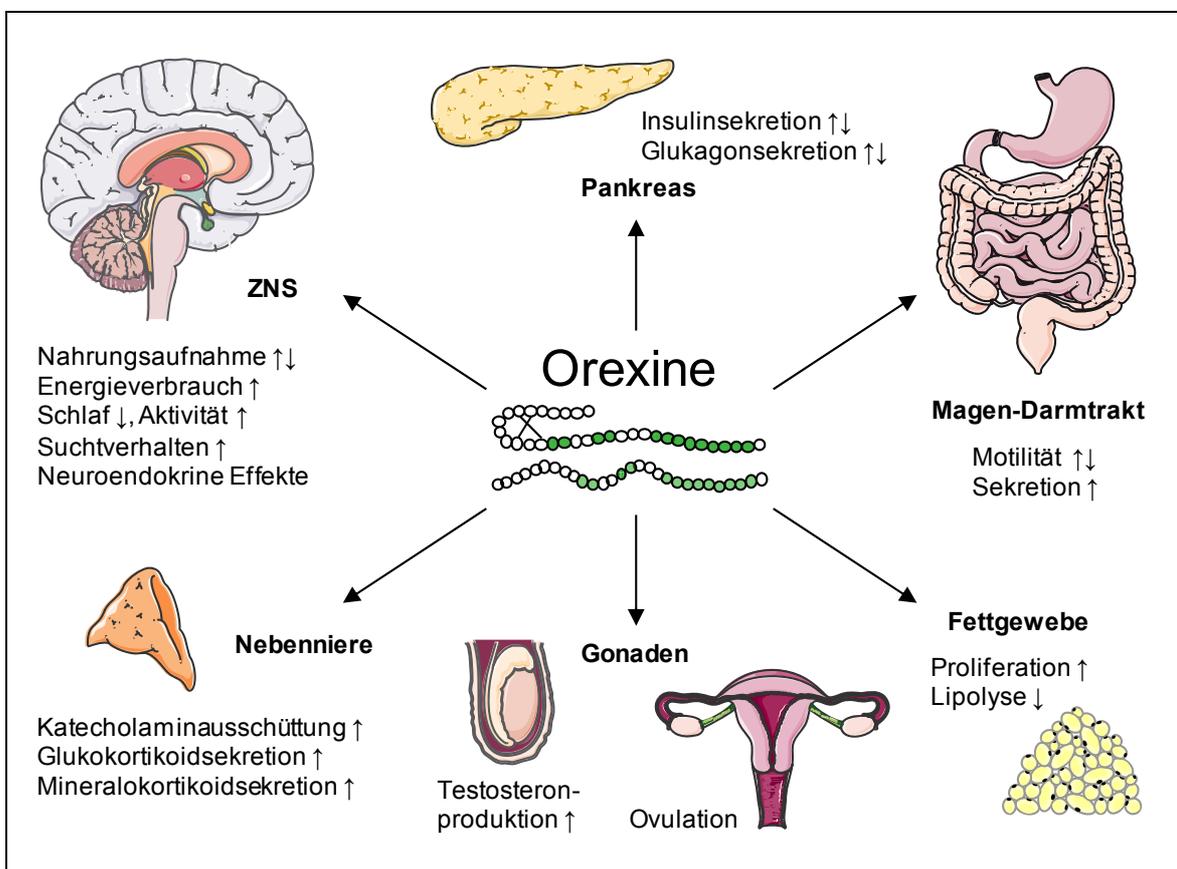


Abbildung 1.2: Zielorgane und Effekte der Orexine

orexinproduzierenden Zellen und die Koexpression anderer lokaler Hormone, wie Gastrin, VIP oder Serotonin, in diesen Zellen haben die Vermutung nahegelegt, dass die Orexine an der Regulation von Darmmotilität, Sekretion und Nahrungsresorption beteiligt sind. Hiermit konform wird die Aktivität und Expression des enteralen Orexin-Systems durch Fasten heraufreguliert und die Magensäuresekretion nach intravenöser Gabe eines selektiven OX<sub>1</sub>R-Antagonisten inhibiert (59, 125). Während Orexin A und B in *in vitro*-Studien die Magen-Darmmotilität steigern konnten, wurde diese in *in vivo*-Studien mit intravenös infundierten Orexinen gehemmt (58, 125, 131, 180).

Auch die insulinproduzierenden  $\beta$ - und glukagonproduzierenden  $\alpha$ -Zellen des Pankreas enthalten Orexin und exprimieren OX<sub>1</sub>-Rezeptoren (76, 125, 191). Die OX<sub>2</sub>-Rezeptoren konnten in den Langerhansinseln gefunden werden (185). Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Kirchgessner legten nahe, dass Orexine die blutglukoseabhängige Sekretion der Pankreas-Hormone vermitteln. So führten intravenöse Injektionen von Orexin A zu einem Anstieg des Plasma-Glukagon- und -Glukosespiegels und zu einem Absinken des Insulinspiegels. Analog wurde die Orexin-Produktion in Pankreasinsel-Zellen durch niedrige Glukosespiegel getriggert und durch hohe inhibiert (191). In anderen Studien hingegen stieg bei Ratten und Menschen nach Orexin-Behandlung der Insulinspiegel dosisabhängig an, während die Glukagon-Sekretion der  $\alpha$ -Zellen *in vitro* durch Orexin A inhibiert werden konnte (58, 76, 184, 185).

Die mRNA des Präpro-Orexins und der Orexin-Rezeptoren konnte überdies bei Ratten und Hühnern in den Gonaden detektiert werden (112, 188, 226). Mitsuma et al. wiesen mittels RIA in Rattenhoden zusätzlich die Expression von Orexin A und B nach (167, 168). Innerhalb des Hodens konnten der OX<sub>1</sub>- und OX<sub>2</sub>-Rezeptor durch Immunfluoreszenz auf den Leydig-Zellen lokalisiert werden (117). Orexin A steigerte sowohl *in vitro* als auch nach lokalen Injektionen *in vivo* die Testosteron-Produktion in Rattenhoden (9). Das Orexin-System in den Ovarien scheint wie im ZNS weiblicher Ratten in Abhängigkeit vom Sexualhormonstatus exprimiert zu werden und an der Regulation der Ovulation beteiligt zu sein (241).

Des Weiteren wurden beide Orexin-Rezeptoren im Nebennierenmark (NNM) von Ratte, Schwein und Mensch gefunden (145, 162, 177). In Versuchen an NNM-Zellen von Schweinen sowie an humanen Phäochromozytom-Präparaten führte Orexin A zu einem signifikanten Anstieg der Adrenalin- und Noradrenalin-Sekretion (161, 177).

Kürzlich wurden die Orexin-Rezeptoren auch im subkutanen und omentalen Fettgewebe detektiert, in welchem ihre Liganden Einfluss auf die Zellproliferation und den Zellmetabolismus nehmen können (53).

#### **1.4 Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse durch Orexin A und B**

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) ist durch die gegenseitige Regulation des Nucleus paraventricularis des Hypothalamus, des Hypophysenvorderlappens und der Nebennierenrinde (NNR) definiert. Die parvozellulären Neurone des Nucleus paraventricularis bilden Kortikotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Vasopressin (AVP), die stärksten endogenen Stimulatoren der hypophysären ACTH-Produktion. Nach der Einschleusung dieser Hormone in den hypophysären Pfortaderkreislauf an der Eminentia mediana kommt es zu einer erhöhten ACTH-Ausschüttung aus der Adenohypophyse, die in der Folge die Produktion von Kortikosteroiden in der NNR anregt. Kortisol übt in diesem Regelkreis eine negative Rückkopplung auf Hypothalamus und Hypophyse aus. Der Hypothalamus ist zusätzlich mit höheren kortikalen Zentren verbunden, die unter physischem und psychischem Stress die Aktivität der HHN-Achse heraufregulieren (6, 62, 130, 164). In den letzten Jahren gab es zunehmend Hinweise darauf, dass auch die Orexine sowohl über einen zentralen als auch über einen peripheren Ansatzpunkt Anteil an der Steuerung der HHN-Achse haben. Sowohl im Nucleus paraventricularis als auch in der Eminentia mediana und im Hypophysenvorderlappen wurden Orexin-Rezeptoren und orexinimmunoreaktive Fasern gefunden (49, 50, 154, 176, 286). Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass i.z.v. Injektionen von Orexinen zu einem Anstieg von ACTH und Kortikosteron im Plasma führen (3, 32, 81, 104, 107, 138, 219). Umgekehrt fanden sich bei Narkoleptikern, die einen Mangel an Orexin-Neuronen im Hypothalamus aufweisen, erniedrigte ACTH-Plasmaspiegel (127). Der stimulierende Effekt der Orexine auf die ACTH-Sekretion wird vermutlich über CRH und AVP vermittelt. So wurde durch die zentrale Applikation von Orexin A der mRNA-Gehalt sowohl von CRH und AVP als auch des Zellaktivierungsmarkers c-fos im Nucleus paraventricularis erhöht (3, 32, 138). Außerdem führte Orexin A nach zentraler Infusion zu einem Anstieg von AVP im Plasma und zu einer gesteigerten CRH-Freisetzung aus Hypothalamus-Explantaten von Ratten (160, 219). Ein CRH-Rezeptor-Antagonist konnte die orexinabhängige Steigerung der Plasma-

Kortikosteron- und -ACTH-Spiegel *in vivo* blockieren (107, 233). Ferner vermochten die Orexine die basale ACTH-Ausschüttung durch direkte Wirkung auf Hypophysenvorderlappenzellen *in vitro* nicht zu steigern (232). Die Wirkung der Orexine auf die CRH-Ausschüttung im Hypothalamus scheint ihrerseits wiederum an Neuropeptid Y (NPY) gekoppelt zu sein. Verschiedene NPY-Antagonisten konnten sowohl den orexininduzierten Anstieg von Plasma-Kortikosteron *in vivo* als auch die orexinbedingte Zunahme der CRH-Freisetzung aus Hypothalamus-Präparaten *in vitro* inhibieren (108, 219).

In umfangreichen Studien an NNR-Gewebe von Ratten und Menschen konnte die Expression der Orexin-Rezeptoren sowohl in NNR-Homogenaten als auch in frisch dispergierten oder kultivierten NNR-Zellen mittels RT-PCR, qPCR oder Western Blot demonstriert werden (25, 110, 112, 118, 119, 150, 151, 162, 211, 212, 249, 250, 275, 288). Einige Arbeitsgruppen konnten hierbei eine deutliche Überexpression jeweils eines der beiden Rezeptorsubtypen in NNR-Material von Menschen oder Ratten nachweisen (25, 110, 112, 119, 212). Als Erklärung für die Divergenz dieser Ergebnisse lässt sich einerseits anführen, dass einige Arbeitsgruppen RT-PCR-Produkte bei sehr hohen Zyklen-Anzahlen generierten, obwohl die Spezifität der RT-PCR nur während der exponentiellen Amplifikationsphase bis zu einer maximalen Zyklus-Anzahl von etwa 25-30 als gesichert gilt (118, 150, 151, 162, 205, 275). In anderen Studien wurden für immunhistochemische Nachweismethoden Orexin-Rezeptor-Antikörper verwendet, deren Spezifität nicht immer gesichert ist (25, 119, 212). Da in NN-Gewebe von Ratten bereits eine Abhängigkeit der Orexin-Rezeptor-Expression sowohl vom Geschlecht als auch vom Ernährungszustand der untersuchten Tiere entdeckt wurde, müssen Unterschiede in der Rezeptorverteilung nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch innerhalb einer Spezies erwogen werden (112, 118). Hinsichtlich der Verteilung der Rezeptorsubtypen auf die einzelnen Schichten der NNR besteht ebenfalls noch eine erhebliche Diskrepanz zwischen den Ergebnissen einzelner Arbeitsgruppen, wobei beide Rezeptoren bereits in allen drei Schichten lokalisiert werden konnten (25, 110, 112, 162, 212). Ob Orexine in der NNR in para- oder sogar autokriner Weise wirken können, ist derzeit noch fraglich, da Untersuchungen zur Expression von Präpro-Orexin und Orexin A in NNR-Zellen von Ratten, Schweinen und Menschen zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben (112, 119, 145, 175, 212, 249).

Zahlreiche weiterführende Studien zeigten, dass Orexin A die Kortisol- oder Kortikosteronfreisetzung aus NNR-Zellen von Ratten, Schweinen und Menschen nach

1-24 Stunden Inkubationszeit signifikant steigert (153, 162, 177, 249, 275, 288). Ebenso führten subkutane Orexin A- und zum Teil auch Orexin B-Injektionen bei Ratten zu erhöhten Kortikosteron-Plasmaspiegeln, die frühestens nach einer Wirkungsdauer von 1 Stunde bestimmt wurden (150, 151, 153). Die Wirkung der Orexine auf die NNR scheint hierbei von CRH und ACTH unabhängig zu sein, da einerseits nur die basale, nicht aber die ACTH-stimulierte Kortikosteronausschüttung erhöht wurde und andererseits die Orexin-Wirkung durch einen ACTH-Antagonisten nicht abgeschwächt werden konnte (153, 162). Außerdem konnte in einem Langzeitversuch nach einwöchiger subkutaner Orexin-Behandlung neben gestiegenen Kortikosteron- und Aldosteronspiegeln kein Anstieg des Plasma-ACTH gemessen werden (150). Eine erhöhte Aldosteronfreisetzung unter Orexin-Behandlung wurde von Nanmoku et al. in einer *in vitro*-Studie an NNR-Zellen von Schweinen bestätigt, während Malendowicz et al. *in vitro* keine erhöhte Aldosteronausschüttung aus Ratten-NNR-Zellen beobachteten (177).

Ob Orexine neben der Steroidproduktion auch die Proliferation der NNR-Zellen beeinflussen, kann auf der Grundlage der bisher erhobenen Daten nicht abschließend geklärt werden. Während beide Orexine einen proliferationssteigernden Effekt auf NNR-Zellen von gesunden Ratten-Jungtieren sowie von NNR-Adenom-Patienten besaßen, sank der Metaphaseindex in regenerierenden NNR-Zellen von adulten Ratten unter Orexinen ab (151, 249, 249). Auch die Proliferationsrate kultivierter NNR-Zellen von adulten Ratten ohne NNR-Pathologie wurde einerseits durch Orexin A gesteigert, andererseits jedoch durch Orexin B gemindert (250). Weitere Studien sind nötig, um eine sichere Aussage über den Einfluss der Orexine auf die Proliferation von NNR-Zellen treffen zu können.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass im Blut zirkulierende Orexine die Steroidproduktion in der Zona glomerulosa und fasciculata der NNR durch Bindung an die lokal exprimierten Orexin-Rezeptoren direkt stimulieren können. Hierbei scheinen die Orexine die Kortikoidkonzentrationen nicht über eine kurzfristige Aktivierung der Steroidbiosyntheseenzyme, sondern ausschließlich über eine Langzeit-Regulation zu steigern, da bei peripherer Applikation nach nur dreißigminütiger Latenz weder *in vivo* noch *in vitro* ein messbarer Anstieg der Kortikosteronwerte verzeichnet wurde (107, 237, 275). Der molekulare Mechanismus, über den Orexine in die Biosynthese der Kortikosteroide eingreifen, ist indessen noch ungeklärt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hierzu zeigten, dass es nach Orexin A-Behandlung in humanen NNR-Zellen (NCI-H295R) zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Kopien selektiver Enzyme der

Steroidbiosynthese kommt, wobei ein Expressionsmaximum nach 12 Stunden Stimulation erkennbar war (275).

## 1.5 Steroidbiosynthese in der Nebennierenrinde

Die Produktionsstätte der Kortikosteroide ist die Nebennierenrinde, die aus drei morphologisch sowie biochemisch unterschiedlichen Schichten besteht. In der subkapsulären Zona glomerulosa werden vornehmlich Mineralokortikoide, in der angrenzenden Zona fasciculata Glukokortikoide und in der marknahen Zona reticularis hauptsächlich Androgene gebildet (217). Die wichtigsten Stimulatoren der Steroidsynthese in der Zona glomerulosa sind Angiotensin II und Kalium, während in der Zona fasciculata und reticularis die Hormonproduktion hauptsächlich durch ACTH aktiviert wird (66, 209). An der Synthese der humanen NNR-Steroide sind insgesamt sechs Enzyme beteiligt, die unterschiedlich auf die drei Zonen der NNR verteilt und intrazellulär teils intramitochondrial, teils im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind (195).

Das Substrat aller Kortikosteroide ist Cholesterin, welches intrazellulär als Ester in Lipidtröpfchen gespeichert werden kann (s. Abb. 1.3) (166). Die Steroidbiosynthese wird eingeleitet, indem Cholesterin durch das „steroidogenic acute regulatory protein“ (StAR-Protein) von der äußeren an die innere Mitochondrienmembran transloziert wird. Dort wird es anschließend durch das Enzym CYP11A1 zu Pregnenolon oxidiert (Abkürzungen der Enzymnamen s. Legende in Abb. 1.3). Beide Prozesse sind grundlegend für die Produktion aller NNR-Hormone und limitieren damit die Syntheserate der adrenokortikalen Zellen (195, 247). Die weitere Synthese läuft teils in den Mikrosomen des glatten endoplasmatischen Retikulums, teils in den Mitochondrien ab.

Im Anschluss kann Pregnenolon vom Enzym HSD3B2 zu Progesteron dehydriert werden. Dieses Enzym katalysiert darüber hinaus die Dehydrierung von  $17\alpha$ -Hydroxypregnenolon zu  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron und von Dehydroepiandrosteron zu Androstendion, wodurch es für die Synthese aller Kortikosteroide essenziell ist. Entsprechend konnte die HSD3B2 bereits in allen drei Schichten der Nebennierenrinde nachgewiesen werden (196). In der Zona glomerulosa und fasciculata werden Progesteron bzw.  $17\alpha$ -Hydroxyprogesteron durch das Enzym CYP21 zu 11-Desoxykortikosteron bzw. 11-Desoxykortisol hydroxyliert (195). In der Zona fasciculata hydroxyliert die CYP11B1-Monooxygenase 11-Desoxykortisol schließlich am C11-Atom zu Kortisol. Die Aldosteronsynthese wird durch das ausschließlich in der Zona glomerulosa exprimierte Enzym CYP11B2

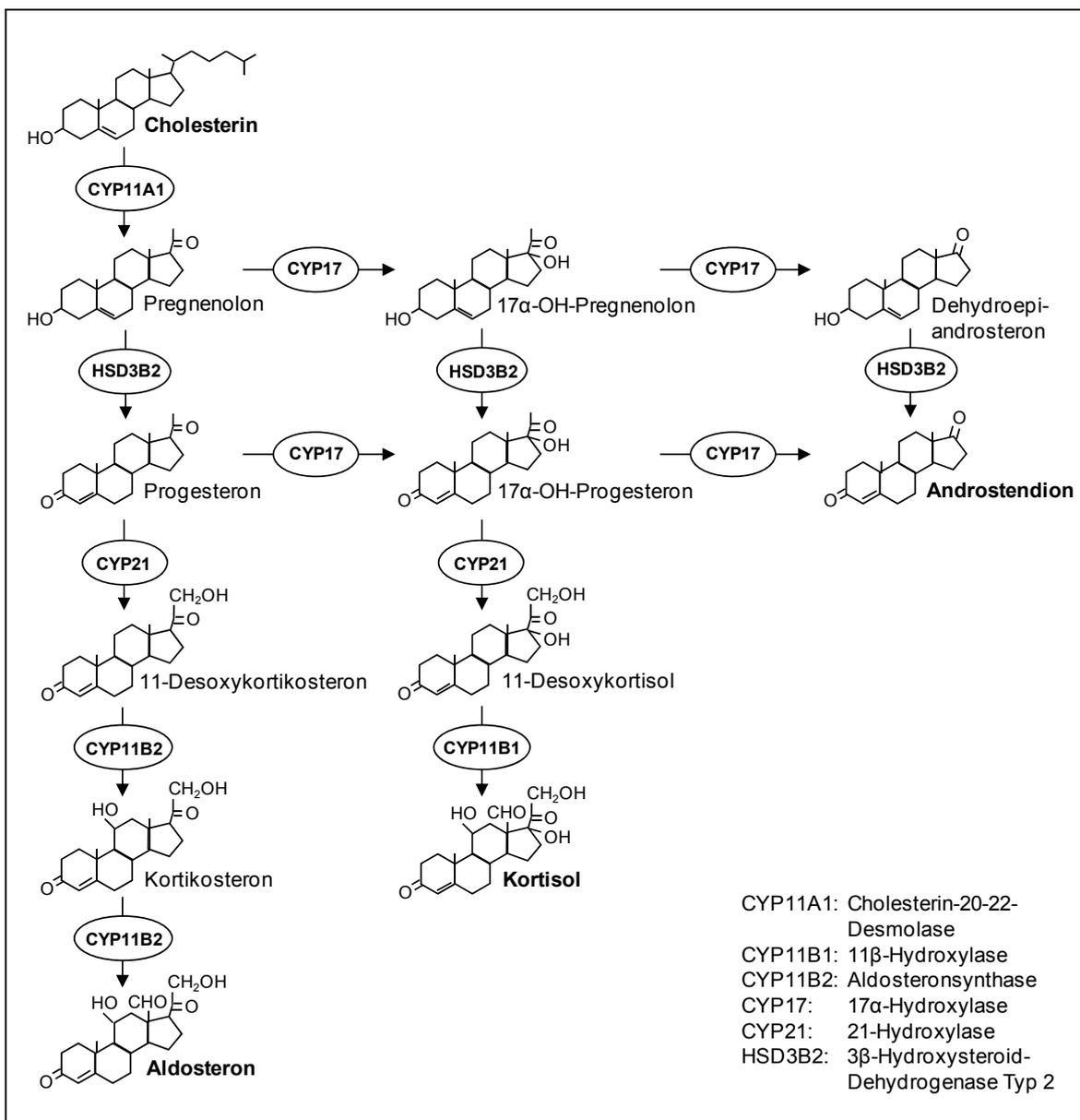


Abbildung 1.3: Die Steroidbiosynthese in der humanen Nebennierenrinde

abgeschlossen, welches 11-Desoxykorticosteron über zwei Hydroxylierungen und eine Oxidation zu Aldosteron umwandelt (123, 207).

Die mischfunktionelle Monooxygenase CYP17 ist in der Zona fasciculata und reticularis lokalisiert und hydroxyliert hier Pregnenolon und Progesteron zunächst zu 17α-Hydroxypregnenolon bzw. 17α-Hydroxyprogesteron. Anschließend entstehen durch Spaltung der C17-20-Bindung die C19-Steroide Dehydroepiandrosteron und Androstendion (195).

Da es sich bei den Kortikosteroiden um sehr lipophile Moleküle handelt, existieren für diese Hormone intrazellulär keine geeigneten Speicher. Sie werden daher nach ihrer Synthese direkt ins Blut abgegeben, wodurch ihre Blutkonzentrationen die aktuellen Syntheseraten widerspiegeln (211, 217).

## 1.6 Regulation der Genexpression in eukaryotischen Zellen

In eukaryotischen Zellen kann die Expression eines Gens auf allen Ebenen der Proteinbiosynthese reguliert werden. So kann durch die Modifizierung von Prozessierung, Stabilität und Transport der mRNA sowie von Translation und posttranslationalen Vorgängen die spezifische Genaktivität in einer Zelle an die Bedürfnisse des Organismus angepasst werden. Der wesentliche Mechanismus liegt jedoch in der Steuerung der Geschwindigkeit von Initiationskomplexbildung und Transkription (14, 140).

Die basale Transkription eines Gens wird in der Regel durch Protein-DNA-Interaktionen in einem Sequenzbereich von einigen Dutzend Basenpaaren vor dem Transkriptionsstartpunkt gesteuert. Dieser DNA-Abschnitt wird als Kernpromotor bezeichnet und beinhaltet die Initiationsregion und meist eine sogenannte TATA-Box, eine AT-reiche Sequenz. Erst nach Anlagerung allgemeiner, das heißt ubiquitär vorkommender, Transkriptionsfaktoren an den TATA-Box-Bereich kann die RNA-Polymerase II an die Initiationsregion binden. Anschließend wird der Initiationskomplex durch die Anlagerung weiterer allgemeiner Transkriptionsfaktoren komplettiert, wodurch die RNA-Polymerase II aktiviert und die Transkription gestartet wird (14, 82).

Da die auf diese Weise gestartete basale Transkription *in vivo* nur in vernachlässigbarer Geschwindigkeit abläuft, hängt die Syntheserate eines Genproduktes hauptsächlich von sogenannten spezifischen Transkriptionsfaktoren ab. Diese binden an genspezifische Erkennungselemente in einem DNA-Bereich von meist etwa einer Kilobase Länge in 5'-Richtung des Kernpromotors und regulieren die Geschwindigkeit von Initiationskomplexbildung und DNA-Ablesung (78, 82). Dieser DNA-Abschnitt bildet zusammen mit dem Kernpromotor den gesamten Promotorbereich eines Gens.

Für jedes Gen existiert eine Vielzahl solcher spezifischer Transkriptionsfaktoren, die zum Teil erst nach komplexen Wechselwirkungen untereinander oder mit weiteren Kofaktoren mit der RNA-Polymerase II interagieren können. Die Aktivität der spezifischen Transkriptionsfaktoren kann auf Transkriptionsebene reguliert werden. Im Rahmen einer akuten Zellantwort auf einen Stimulus wird sie jedoch vor allem über posttranslationale Mechanismen, wie Phosphorylierung oder Ligandenbindung, gesteuert (14, 28, 116, 140). Auch in den Promotorbereichen der Steroidbiosyntheseenzyme wurden bereits zahlreiche Bindungsstellen für spezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert, über welche die Expression dieser Enzyme reguliert werden kann (157, 170, 192, 197, 237, 242).

## 1.7 Zielsetzung

Wie in den vorangehenden Abschnitten ausgeführt, können die Orexine die Produktion von Mineralo- und Glukokortikoiden in der NNR direkt über die lokal exprimierte Orexin-Rezeptoren im Sinne einer Langzeit-Regulation stimulieren. Auf welche Weise sie hierbei Einfluss auf die Kortikosteroidsynthese nehmen, ist gegenwärtig jedoch noch unzureichend erforscht. Diesbezügliche Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Orexin A in NCI-H295R-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Kopien der Steroidbiosyntheseenzyme 11 $\beta$ -Hydroxylase, Aldosteronsynthase, 21-Hydroxylase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 führt.

Hieran anknüpfend war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Regulation der Genexpression der Steroidbiosyntheseenzyme 11 $\beta$ -Hydroxylase, Aldosteronsynthase, 21-Hydroxylase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 durch Orexin A und Orexin B in NCI-H295R-Zellen molekularbiologisch zu analysieren. Hierzu sollte zunächst der beobachtete Effekt von Orexin A auf das Expressionsmuster der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen nach 12 Stunden Stimulation mittels quantitativer „real-time“ PCR bestätigt werden. Sodann sollte durch eine Transkriptionsblockade mit Actinomycin D verifiziert werden, ob die mRNA-Stabilität der Steroidbiosyntheseenzyme 11 $\beta$ -Hydroxylase, Aldosteronsynthase, 21-Hydroxylase und 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 in NCI-H295R-Zellen unter Orexin A erhöht wird. Darüber hinaus sollte die Transkriptionsaktivität der Gene dieser Steroidbiosyntheseenzyme mit Hilfe von Reporterstudien unter Orexin A- und Orexin B-Behandlung in NCI-H295R-Zellen untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die Promotoren der Gene der ausgewählten Steroidbiosyntheseenzyme in Expressionsvektoren kloniert werden. Mit Hilfe dieser rekombinanten Vektoren sollten alsdann die Aktivitäten der Promotoren unter Orexin A und Orexin B in einem Reporterensystem analysiert werden. Abschließend sollte der bisher noch kontrovers diskutierte Einfluss von Orexin A und Orexin B auf die Proliferation von NNR-Zellen mit einer Zellzahlmessung in der NCI-H295R-Zelllinie ermittelt werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinie**

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden an Zellen der humanen Nebennierenrinden-Zelllinie NCI-H295R durchgeführt (bezogen über Dr. Ehrhart-Bornstein, Molekulare Endokrinologie, MK III, Universitätsklinikum der TU Dresden). Die genannte Zelllinie wurde im Jahr 1980 aus einem Nebennierenrinden-Karzinom einer 48-jährigen afroamerikanischen Patientin etabliert (70). Im Unterschied zur intakten menschlichen Nebennierenrinde, in der Mineralokortikoide, Glukokortikoide und C19-Steroide jeweils von spezialisierten Zellen in drei entsprechenden Zonen produziert werden, besitzt diese pluripotente Zelllinie die Fähigkeit zur Synthese aller drei genannten Steroidklassen (209).

Zur Vereinfachung experimenteller Untersuchungen wurde von der ursprünglich isolierten Zelllinie NCI-H295, die nur in Suspension wächst, die adhärente Zelllinie NCI-H295R in einem dreimonatigen Selektionsprozess abgeleitet (209).

#### **2.1.2 Zellkultivierung**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellkulturschrank (Heraus, Hanau, Deutschland) bei 37,0 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen in einer 1:1-Mischung aus „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM) und Ham's F-12 Medium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) angezüchtet. Das Nährmedium enthielt zusätzlich 2 % FBS und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) sowie 3,62 ng/ml Hydrocortison, 1 µg/ml apo-Transferrin, 5 ng/ml Natriumselenit, 2,72 ng/ml β-Estradiol und 0,38 µg/ml Insulin (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland). Das Medium wurde in Abhängigkeit von der erreichten Zelldichte und dem daraus resultierenden Mediumverbrauch alle 3-5 Tagen gewechselt.

### 2.1.3 Subkultivierung, Aussaat und Stimulation

Nachdem die Zellen eine nahezu vollständige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie entweder subkultiviert oder für eine anschließende Stimulation oder Transfektion in 24-Well-Platten ausgesät.

Zunächst wurde das verbrauchte Medium entfernt. Die Zellen wurden sodann zweimal mit 10 ml PBS (KCl 0,2 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,15 g/l, PAA Laboratories) gewaschen, anschließend durch Hinzufügung von 5 ml Accutase (PAA Laboratories) abgelöst und 6-7 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Ablösung wurden die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 6 Minuten bei 172 g zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden 4 Minuten im Brutschrank mit 100  $\mu\text{l}$  AccuMax (PAA Laboratories) inkubiert, bevor sie in 8 ml frischem Nährmedium resuspendiert wurden.

Für eine Subkultivierung wurde hiernach je 1 ml dieser Zellsuspension in zwei neue Kulturflaschen pipettiert, die jeweils bereits 13 ml frisches Medium enthielten. Anschließend wurden die Zellen zum weiteren Wachstum wieder im Brutschrank inkubiert.

Für eine Stimulation oder Transfektion wurden 4 ml der genannten Zellsuspension mit frischem Medium verdünnt bis eine Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml (Stimulation) bzw.  $4 \times 10^5$  Zellen/ml (Transfektion) erreicht wurde. Von dieser Suspension wurden grundsätzlich 500  $\mu\text{l}$  pro Well in 24-Well-Platten, für die Zellzahlmessungen jedoch 100  $\mu\text{l}$  pro Well in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden 2-4 Tage bis zur erwünschten Konfluenz kultiviert. In Vorbereitung einer Transfektion mit dem pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor wurde einen Tag nach der Aussaat zusätzlich ein Mediumwechsel mit antibiotikafreiem Medium durchgeführt. Für eine Transfektion mit dem pGL4.19-Vektor wurden die Zellen stattdessen direkt in antibiotikafreiem Medium ausgesät.

Die Stimulationen erfolgten je nach Versuch mit einer Auswahl verschiedener Substanzen, welche Orexin A und Orexin B (beide von Bachem, Weil, Deutschland) sowie als Positivkontrollen Angiotensin II und Forskolin (beide von Sigma-Aldrich) in Konzentrationen von 0,1-25  $\mu\text{M}$  umfasste. Forskolin, welches wie ACTH die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, wird in der relativ ACTH-resistenten Zelllinie NCI-H295R an dessen Stelle als Positivkontrolle eingesetzt (209). Es wurden Behandlungszeiträume von 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden gewählt.

Die Stimulationen wurden durch Absaugen des Stimulationsmediums und darauf folgende Zell-Lyse mittels eines Lyse-Puffers, der entsprechend der weiteren Verwendung der Proben gewählt wurde (s. Kap. 2.2.1, 2.3, 2.6.1, 2.6.2), beendet.

## **2.2 Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion**

### **2.2.1 RNA-Isolierung und -Messung**

Nach der Stimulation mit Orexin A über einen Zeitraum von 12 Stunden wurden die Zellen mit 500 µl einer 1:1 Mischung aus PBS und 2x „Nucleic Acid Purification Lysis Solution“ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) lysiert. Die RNA-Isolierung erfolgte anschließend mit der „ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation“, die wie alle genannten Reagenzien ebenfalls von Applied Biosystems bezogen wurde. Zur RNA-Extraktion aus dem Zell-Lysat wurden in einem ersten Schritt die Filterplatten des Gerätes, an deren Oberflächen sich eine RNA-bindende Membran befindet, mit 40 µl „RNA Purification Wash Solution“ 1 benetzt und mit den Proben beladen. In mehreren nachfolgenden Schritten wurde die an die Membran gebundene RNA mit Hilfe der „RNA Purification Wash Solutions“ 1 und 2 gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zuletzt wurde die RNA mit 150 µl „Nucleic Acid Purification Elution Solution“ aus der Membran eluiert.

Die RNA wurde mit dem „RiboGreen RNA Reagent Kit“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) zur Messung von RNA-Konzentrationen im Bereich von 20 ng/ml bis 1 µg/ml quantifiziert. RiboGreen zeichnet sich im Vergleich zu anderen gängigen Farbstoffen durch eine besonders hohe Sensitivität sowie einen außergewöhnlich großen dynamischen Messbereich aus (114). Zunächst wurde der RiboGreen-Farbstoff mit 1x TE-Puffer (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) im Verhältnis 1:200 verdünnt. Des Weiteren wurde der zum Kit gehörende ribosomale RNA-Standard für die Erstellung einer Standardkurve mit 1x TE-Puffer auf 2 µg/ml verdünnt. Durch das Vermischen von 100 µl der Farbstoff-Lösung mit dem RNA-Standard und dem 1x TE-Puffer in unterschiedlichen Anteilen wurden 4 verschiedene Endkonzentrationen des RNA-Standards sowie ein Leerwert hergestellt (0, 20, 100, 500 und 1000 ng/ml). Die Proben der frisch isolierten RNA wurden mit 1x TE-Puffer im Verhältnis 1:50 verdünnt und mit 100 µl RiboGreen-Farbstoff versetzt. Alle Proben und Standards wurden nach dem Hinzufügen des Farbstoffs im Messgerät 5 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der

Fluoreszenz wurde mit einem FLUOstar Optima Fluorometer (BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die RNA-Proben bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Die isolierte RNA wurde im nächsten Schritt durch die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in cDNA umgeschrieben, welche als Ausgangsprodukt für die Polymerase-Kettenreaktion dient.

Für die cDNA-Synthese wurde das „Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit“ der Firma Invitrogen eingesetzt, welches mit dem Enzym AMV Reverse Transkriptase arbeitet. Dieses Enzym zeichnet sich im Vergleich zu anderen gängigen reversen Transkriptasen durch besondere Stabilität sowie volle Aktivität bei Temperaturen von bis zu 55 °C aus, bei welchen die Synthese beeinträchtigende Sekundärstrukturen der RNA besser überwunden werden können (30, 67).

Je 9 µl der isolierten RNA wurden mit 1 µl Oligo(dT)<sub>20</sub>-Primer (50 µM) und 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM) versetzt und in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) 5 Minuten auf 65 °C erhitzt, wodurch die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen wurden. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, sodass die Primer an die RNA binden konnten. Im nächsten Schritt wurden pro Reaktionsansatz 4 µl 5x cDNA Synthese Puffer (250 mM Trisacetat (pH 8,4), 375 mM Kaliumacetat, 40 mM Magnesiumacetat, 20 µg/ml Rinderserumalbumin), 1 µl Dithiothreitol (0,1 M), 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl), 1 µl DEPC-behandeltes Wasser und 1 µl Cloned AMV Reverse Transkriptase (15 U/µl) zugesetzt und die Ansätze danach 60 Minuten bei 50 °C im Thermocycler inkubiert. Abschließend wurde die reverse Transkriptase 5 Minuten bei 85 °C inaktiviert. Die cDNA wurde im Verhältnis 1:2 mit DEPC-Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.3 Primerauswahl

Ausgehend von den Nukleotidsequenzen, die in den Genbank-Dateien des NCBI (Bethesda, USA) veröffentlicht sind, wurden mit Hilfe der PrimerExpress 2 Software von Applied Biosystems spezifische Primerpaare für die cDNA-Abschnitte der Enzyme

CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP21 und HSD3B2 konstruiert. Die Spezifität dieser Oligonukleotid-Primer wurde durch einen „BLAST-Search“ der Nucleotid-Datenbasis des NCBI überprüft (4). Die Primer wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert.

**Tabelle 2.1:** Nukleotidsequenzen der Primer für die quantitative „real-time“ PCR

Enzym	Orientierung	Sequenz 5'→3'	PCR- Produkt (bp)
<b>CYP11A1*</b>	sense	GAAGCAACCCAGCAGTGATCA	140
	antisense	ATTCAACCTGCTGAGCAGGCT	
<b>CYP11B1*</b>	sense	TTTCTCCAGCAAGCACTGTCC	102
	antisense	GGACAAAACCACAGCACCCCTT	
<b>CYP11B2*</b>	sense	AAAGGCCCTGTGGTCACTTA	126
	antisense	GACCTGGTCCATGAAAGACGA	
<b>CYP17*</b>	sense	TGGCCCCATCTATTCTGTTCG	127
	antisense	TAGAGTTGCCATTTGAGGCCG	
<b>CYP21*</b>	sense	CCTTCGGAGACAAGATCAAGGA	108
	antisense	TCACGTCCACAATTTGGATGG	
<b>HSD3B2*</b>	sense	CTCCTATCAACCCCCCTTCAA	133
	antisense	GGTTTTCTGCTTGGCTTCCTC	

\*GenBank-Zugangsnummern und Erstveröffentlichungen der Gensequenzen: CYP11A1: NM\_000781 (254), CYP11B1: NM\_000497 (122), CYP11B2: NM\_000498 (121), CYP17: NM\_000102 (254), CYP21: NM\_000500 (93, 276), HSD3B2: NM\_000198 (213)

#### 2.2.4 Quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR (s. Kap. 2.4.4), einem enzymatischen Verfahren zur exponentiellen Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte. Bei der herkömmlichen PCR ist eine Quantifizierung der entstandenen DNA-Kopien lediglich durch aufwendige und wenig sensitive Endpunktanalysen möglich. Eine sichere Aussage über die zu Beginn eingesetzten mRNA-Kopien lässt sich daraus aufgrund des nicht-exponentiellen Produkt-Anstiegs während der letzten PCR-Zyklen nicht ableiten. Ein wesentlicher Vorteil der „real-time“ PCR gegenüber der herkömmlichen PCR besteht darin, dass die amplifizierten DNA-Kopien nach jedem Zyklus, das heißt auch während der exponentiellen Phase der Amplifizierung, photometrisch bestimmt werden können (94, 95,

189). Durch die zusätzliche Verwendung einer Standardreihe von DNA-Proben bekannter Konzentration kann schlussendlich auf die ursprünglich eingesetzten mRNA-Kopien geschlossen werden (34).

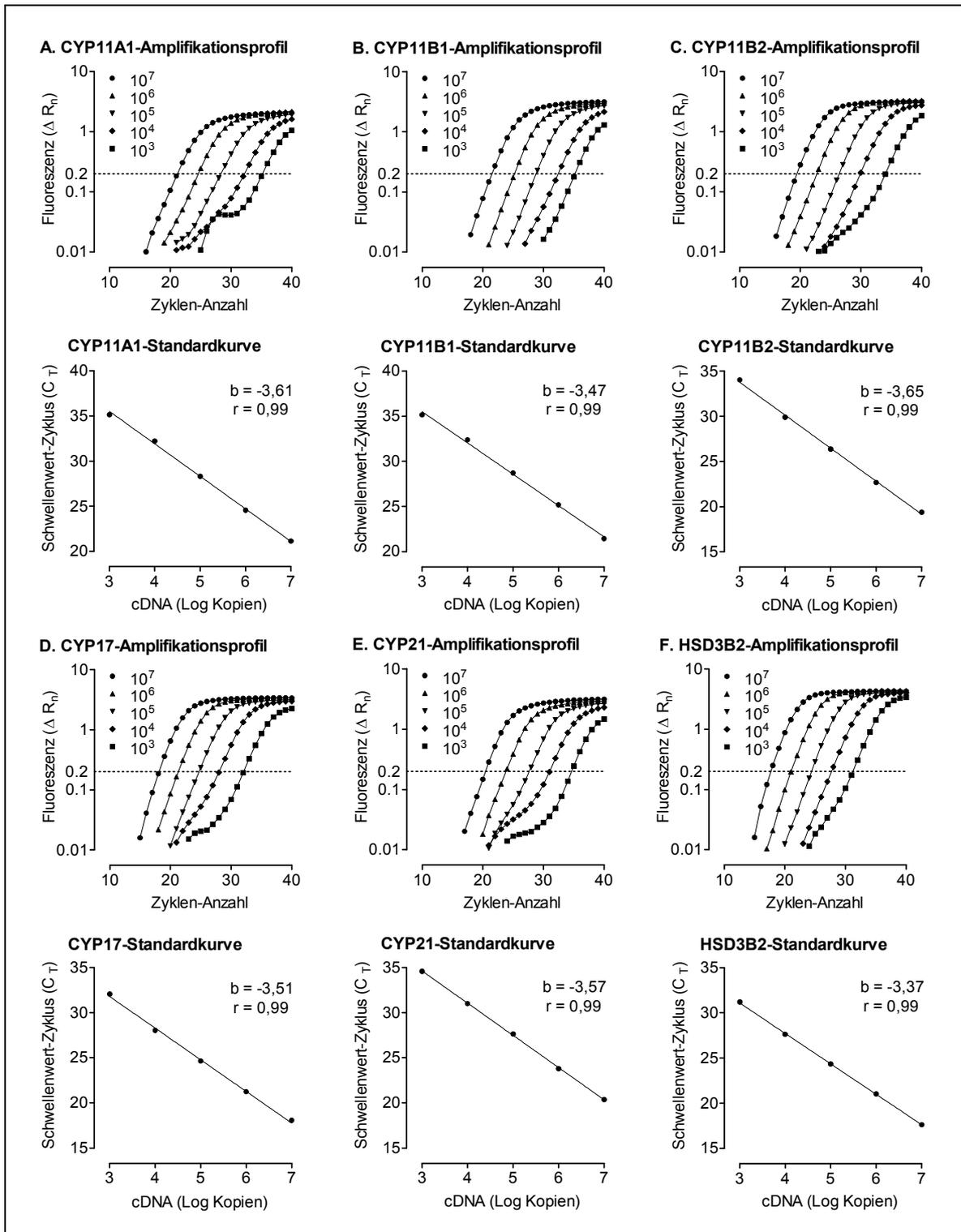
Die „real-time“ PCR wurde mit dem „ABI Prism 7000 Sequence Detection System“ der Firma Applied Biosystems unter Verwendung des „qPCR Core Kit for SYBR Green I“ der Firma Eurogentec (Köln, Deutschland) durchgeführt.

Die Fluoreszenz-Intensität des hierbei eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SybrGreen I nimmt durch seine unspezifische Interkalation in doppelsträngige DNA um das etwa 800-1000fache zu, wodurch eine sehr sensitive Detektion von DNA-Fragmenten ermöglicht wird (34, 172). SybrGreen I wird mit einer Wellenlänge von 497 nm angeregt und emittiert bei 520 nm. Die gemessene Signalstärke des Fluoreszenzfarbstoffes ist direkt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes.

Ein Reaktionsansatz von 25 µl enthielt folgende Komponenten: 2 µl cDNA aus der RT-Reaktion, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 9,0 bei 25 °C), 50 mM KCl), 1 µl dNTP-Mix (je 5 mM), 1,62 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0,75 µl sense Primer (10 pmol/µl), 0,75 µl antisense Primer (10 pmol/µl), 0,75 µl SybrGreen I (1/2000 Verdünnung in Dimethylsulfoxid), 0,13 µl Hot Goldstar Enzym (5 U/µl) und 15,50 µl DEPC-Wasser.

Auf eine zehnmütige Denaturierung bei 95 °C folgten 40 Amplifikationszyklen. Jeder Zyklus bestand aus 2 Phasen. In der ersten Phase wurde die DNA 15 Sekunden bei 95 °C denaturiert. In der zweiten Phase fanden bei 60 °C Primerbindung und Elongation während 60 Sekunden parallel statt.

Die Quantifizierung der in den Proben ursprünglich enthaltenen mRNA-Kopien erfolgte nach der Zyklus-Schwellenwert-Methode (95). Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von klonierten cDNA-Standardproben der zu untersuchenden Enzyme (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17, CYP21, HSD3B2) mit bekannter Ausgangskonzentration angefertigt ( $10^3$ - $10^7$  Kopien/2 µl) und in Doppelbestimmung mit den jeweiligen PCR-Ansätzen amplifiziert. Als Negativkontrolle wurde DEPC-Wasser eingesetzt. Die Fluoreszenz der Standardproben wurde nach jedem Zyklus gemessen und für jede Probe wurde mit der ABI PRISM 7000 Software rechnerisch die Schwellenwert-Zykluszahl ( $C_t$ ) bestimmt, bei der der Fluoreszenz-Schwellenwert von 0,2 ( $R_n$ ) erreicht wurde. Mittels linearer Interpolation wurden aus diesen Werten für die einzelnen Enzyme Eichgeraden erstellt, die die  $C_t$ -Werte mit den entsprechenden cDNA-Ausgangskopienanzahlen korrelieren (s. Abb. 2.1). Je kleiner der  $C_t$ -Wert ist, desto größer ist die eingesetzte cDNA-Menge (73, 90). Anhand dieser Eichkurven konnte die eingesetzte cDNA-Kopienanzahl in allen untersuchten



**Abbildung 2.1:** Fluoreszenzkurven der Amplifizierung klonierter CYP11A1- (A), CYP11B1- (B), CYP11B2- (C), CYP17- (D), CYP21- (E) und HSD3B2-cDNA-Standardproben (F) mittels quantitativer „real-time“ PCR sowie daraus ermittelte Standardkurven (jeweils unterhalb). b: Steigung; r: Korrelationskoeffizient

Proben über ihren jeweiligen  $C_T$ -Wert berechnet werden (222). Diese Anzahl entspricht den jeweils ursprünglich eingesetzten mRNA-Kopien unter der Voraussetzung, dass die RT-Reaktion vollständig abgelaufen ist. Die auf diese Weise berechnete Kopienanzahl wurde mit dem Gesamt-RNA-Gehalt der einzelnen Proben normalisiert, um einerseits

Unterschiede im anfänglichen RNA-Gehalt der einzelnen Proben auszugleichen sowie andererseits eine universellere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Diese Methode der Normalisierung gilt seit einiger Zeit in der Fachliteratur als verlässlichstes Verfahren, da heute bekannt ist, dass die Expression der früher hierfür standardmäßig eingesetzten „housekeeping“ Gene entgegen ursprünglicher Annahmen von den experimentellen Bedingungen durchaus beeinflusst werden kann (34, 35). Die Normalisierung mit dem Gesamt-RNA-Gehalt der Proben erfordert allerdings eine sehr exakte Messung der RNA-Konzentrationen, wie sie zum Beispiel mit dem hier verwendeten hoch sensitiven RiboGreen-Farbstoff möglich ist (s. Kap. 2.2.1) (35).

### **2.3 mRNA-Stabilitätsuntersuchung nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D**

Zur Untersuchung der Stabilität der mRNA von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 nach Orexin A-Stimulation wurde eine Transkriptionsblockade mit Actinomycin D durchgeführt. Dieses Zytostatikum verhindert durch Interkalation in die GC-Basenpaare doppelsträngiger DNA deren Ablesung. Hierdurch kann der Abbau der nach Orexin A-Behandlung entstandenen mRNA-Kopien ohne störende Neosynthese über einen bestimmten Zeitraum gemessen werden (133).

Die NCI-H295R-Zellen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde ein Mediumwechsel mit antibiotikafreiem Medium durchgeführt. Nach einer zwölfstündigen Stimulation mit Orexin A in einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  wurde pro Well  $1 \mu\text{l}$  Actinomycin D ( $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ , Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Zur Beendigung des Versuchs wurden die Zellen zu den Zeitpunkten 0, 1, 3 oder 6 Stunden durch Absaugen des Mediums und Zugabe von  $500 \mu\text{l}$  einer 1:1 Mischung aus PBS und 2x Nucleic Acid Purification Lysis Solution lysiert. Anschließend wurde zur Quantifizierung der mRNA der einzelnen Proben eine quantitative „real-time“ Polymerase-Kettenreaktion wie in Kap. 2.2 beschrieben durchgeführt (Primer s. Tabelle 2.1).

## 2.4 Klonierung

### 2.4.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Klonierung der Promotor-Regionen der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 wurde aus NCI-H295R-Zellen zunächst genomische DNA extrahiert. Hierfür wurde das „DNeasy Tissue Kit“ der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet.

Zwei Tage vor Beginn der DNA-Isolierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 5 ml Kulturmedium ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden erneut 5 ml PBS in die Flaschen pipettiert und der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt und 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert und 20  $\mu$ l RNase A (10 mg/ml) wurden hinzupipettiert. Die Zellsuspension wurde 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20  $\mu$ l Proteinase K und 200  $\mu$ l DNA-Lyse Puffer AL hinzugefügt, um sowohl die Zell- als auch die Kernmembranen aufzulösen. Die Probe wurde 15 Sekunden gemischt und 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Sodann wurden 200  $\mu$ l 100 % Ethanol hinzupipettiert und die Probe erneut 15 Sekunden gemischt. Die gesamte Probe wurde nunmehr auf die DNA-adsorbierende Silica-Membran einer Zentrifugen-Säule pipettiert und 1 Minute bei 6 000 g (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf) zentrifugiert. In mehreren darauf folgenden Schritten wurde die gebundene DNA mit Hilfe der Waschpuffer AW1 und AW2 gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt und zum Schluss mit 200  $\mu$ l Puffer AE aus der Membran in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß eluiert.

### 2.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten DNA wurde mit einem SmartSpec 3000 Spektralphotometer der Firma BioRad (München, Deutschland) gemessen. Mit DEPC-Wasser wurde eine 1:2 Verdünnung der DNA-Lösung angefertigt, welche in eine Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke überführt wurde. Die optische Dichte (OD) der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen einen entsprechenden Leerwert gemessen. Die Konzentration der DNA in der ursprünglichen Lösung errechnete sich anschließend als das Produkt aus dem Verdünnungsfaktor, der gemessenen Extinktion bei

260 nm und einem für dsDNA spezifischen Multiplikationsfaktor von 50 µg/ml, welcher der dsDNA-Konzentration bei einer Extinktion von 1 entspricht (228).

Zur Bestimmung des Reinheitsgrads der Proben wurde zusätzlich deren Extinktion bei 280 nm gemessen und das Verhältnis  $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$  errechnet. Dieser Wert liegt für ausreichend reine DNA zwischen 1,8-2,0. Kleinere Werte weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine oder Phenol hin, größere Werte auf eine Kontamination mit RNA.

### 2.4.3 Primerauswahl

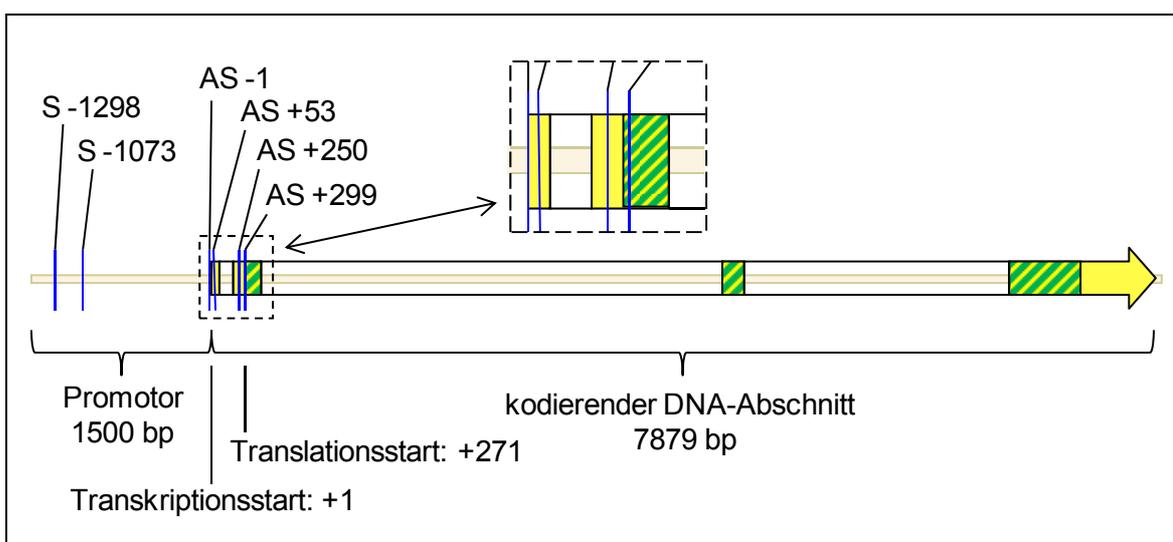
Für die anschließende PCR wurden mit Hilfe der Vector NTI 10 Software (Invitrogen) unter Verwendung der veröffentlichten Nukleotidsequenzen (13, 105) spezifische Primer für die DNA-Abschnitte der Promotor-Regionen der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 konstruiert. Die Synthese der Primer erfolgte abermals durch die Firma Invitrogen.

**Tabelle 2.2:** Nukleotidsequenzen der Primer für die PCR. Die Position +1 entspricht dem Transkriptionsstart. AS: antisense; S: sense

Promotor	Orientierung und Position	Sequenz 5'→3'	PCR-Produkt (bp)
<b>CYP11B1</b>	S -1099	ACGTCTGGTATAATTCGGCTGT	1103
	AS +4	AATGCTCCCTCCACCCTGTT	
<b>CYP11B2</b>	S -1499	CCGAGATCACACCATTGCAC	1499
	AS -1	AATGCTCCCTCCACCCTGTT	
<b>CYP21</b>	S -999	CTTCTGGGGACTTTGGACT	1014
	AS +15	TTCAGGTACCCTCCCACCGA	
<b>HSD3B2</b>	S -1073	GGAAAATATAGGAATAAAGTGGGAACTCT	1126
	AS +53	CGTAACTTAGATTGTTAAAAGCTGGACAG	
	S -1298	TATGCTTTTATCATAAGAACCCTGAAAA	1548
	AS +250	AGGAAACACTTGCCAGGAAACAGA	
S -1298	TATGCTTTTATCATAAGAACCCTGAAAA	1298	
AS -1	ATCCCTGGAGGAAGGACTGGAG		
S -1298	TATGCTTTTATCATAAGAACCCTGAAAA	1597	
AS +299	GCTCCTGTCACAAGGCAGCT		

Die in der Tabelle angegebenen Primersequenzen für den HSD3B2-Promotor wurden zur Synthese der Promotorabschnitte verwendet, die anschließend in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor kloniert wurden. Zur Klonierung in die pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektoren wurden die in der Tabelle aufgeführten Primer der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2 und CYP21 verwendet sowie das Primerpaar S -1073/+53 AS für den HSD3B2-Promotor. Für diese Klonierung enthielten die entsprechenden Primersequenzen am 5'-Ende zusätzlich die Schnittstellen für folgende Restriktionsenzyme: Die sense Primer wiesen die Erkennungssequenz 5'-GGTACC-3' für *Kpn* I auf, die antisense Primer die Sequenz 5'-CTCGAG-3' für *Xho* I. Die Gesamtgröße der PCR-Produkte nahm hierdurch um 12 bp zu.

Für den Promotor von HSD3B2 wurde anfänglich das Primerpaar S -1073/+53 AS konstruiert, welches von anderen Arbeitsgruppen bereits beschrieben wurde (156). Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Aktivierbarkeit der hiermit klonierten Vektoren im  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem wurden sukzessive vier weitere Primer für diesen Promotor entworfen. In Abbildung 2.2 sind die Positionen aller verwendeten HSD3B2-Promotor-Primer auf dem HSD3B2-Genabschnitt dargestellt (Abbildung erstellt mit Hilfe des „MAP Viewers“ des NCBI). Wie aus der Abbildung ersichtlich, liegt der Primer AS +299 stromabwärts des Translationsstartpunktes bei +271. Die mit dem Primerpaar S -1298/+299 AS amplifizierten Promotorsegmente enthielten daher ein Start-Codon und



**Abbildung 2.2:** HSD3B2-Genabschnitt mit den verwendeten Promotor-Primern. Im Hintergrund ist die DNA zu erkennen. Stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts bei +1 ist ein 1500 bp umfassender Promotorabschnitt dargestellt und stromabwärts die 7879 bp lange kodierende Sequenz. Die mRNA-kodierende Sequenz ist als Pfeil dargestellt, dessen gelb markierte Segmente den Exons entsprechen. Die grün schraffierten Bereiche innerhalb der Exons entsprechen der proteinkodierenden Sequenz. In der Vergrößerung lässt sich erkennen, dass der AS-Primer +299 innerhalb der proteinkodierenden Sequenz und somit hinter dem Start-Codon bei +271 liegt.

konnten folglich nicht in Reporterstudien eingesetzt werden. Dieses Primerpaar wurde ausschließlich im ersten Schritt einer sogenannten „nested“ PCR (verschachtelten PCR) genutzt, bei der im zweiten Schritt mit den Primerpaaren S -1298/+250 AS und S -1298/-1 AS kürzere Promotorsegmente für die anschließende Verwendung in Reporterstudien erzeugt wurden (s. Kap. 2.4.4).

#### 2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein enzymatisches Verfahren zur Vermehrung spezifischer DNA-Abschnitte *in vitro*. Sie wird eingesetzt, um kleinste Mengen DNA innerhalb weniger Stunden milliardenfach zu vervielfältigen, wodurch die amplifizierte DNA anschließend laborchemisch nachgewiesen, untersucht und weiterverwendet werden kann. Diese 1984 von Kary Mullis erdachte Methode ist derzeit eine der am häufigsten verwendeten Standardmethoden der Molekularbiologie (63, 174).

Das Grundelement der PCR ist ein Reaktionszyklus, der aus folgenden 3 Schritten besteht: thermische Denaturierung der DNA durch Temperaturerhöhung, Absenken der Temperatur zur Bindung der Primer an die DNA-Einzelstränge (sogenanntes „Annealing“) und erneute Temperaturerhöhung zur Elongation der Primer durch die DNA-Polymerase. Dieser Reaktionszyklus wird während einer PCR 25-50 Mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Fragments kommt.

Zweck der hier durchgeführten PCR war es, die DNA-Abschnitte der Promoterregionen von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 zu amplifizieren, um diese anschließend in Plasmide ligieren zu können. Die PCR wurde in einem TGradient Thermocycler der Firma Biometra mit den Reagenzien aus dem „Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ der Firma Invitrogen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt folgende Komponenten: 0,2 µl Platinum Taq Polymerase High Fidelity (5 U/µl), 5 µl 10x HF-Puffer (600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8,9), 180 mM Ammoniumsulfat), 2 µl MgSO<sub>4</sub> (50 mM), 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1 µl sense Primer (10 pmol/µl), 1 µl antisense Primer (10 pmol/µl), 100 ng genomische DNA und ergänzend DEPC-Wasser.

Die PCR wurde gestartet, indem der DNA-Doppelstrang im Thermocycler initial 2 Minuten bei 94 °C denaturiert wurde. Es folgten 35 Zyklen aus jeweils 30 Sekunden Denaturierung bei 94 °C, 30 Sekunden Primerbindung bei der für das verwendete Primerpaar jeweils optimalen Temperatur (s. Kap. 3.2.1) und 2 Minuten Elongation bei 68 °C. Nach Abschluss des letzten Zyklus wurden die Proben für eine finale Elongation

7 Minuten auf 68 °C erhitzt, um noch nicht vollständig replizierte DNA-Moleküle durch die DNA-Polymerase komplettieren zu lassen.

Da die für die anschließende Ligation in einen TOPO-TA-Vektor benötigten 3'-Desoxyadenosin-Überhänge der PCR-Produkte durch die in der PCR verwendete DNA-Polymerase mit Exonuklease-Aktivität entfernt wurden, mussten diese sogenannten „sticky ends“ vor Beginn der Ligation erneut angehängt werden. Zu diesem Zweck wurde jede Probe direkt nach der PCR mit 0,5 µl Dynazyme II DNA Polymerase (2 U/µl, Finnzymes, Espoo, Finnland), welche keine Exonukleaseaktivität aufweist, versetzt und anschließend 30 Minuten bei 72 °C im Thermocycler inkubiert.

Um die Spezifität der PCR für den HSD3B2-Promotor weiter zu erhöhen, wurde für diesen DNA-Abschnitt zusätzlich eine verschachtelte PCR durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, das PCR-Produkt einer ersten PCR als Matrize für eine zweite PCR mit anderen Primern zu nutzen. Das zweite Primerpaar muss daher innerhalb der Sequenz des ersten PCR-Produktes hybridisieren. Die erste PCR wurde mit dem oben beschriebenen PCR-Programm und dem Primerpaar S -1298/+299 AS durchgeführt. Das Produkt wurde anschließend in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor ligiert (s. Kap. 2.4.8). Für die zweite PCR wurden 100 ng dieses Plasmids als Template eingesetzt. Das Programm der zweiten PCR unterschied sich nur durch eine auf 10 Wiederholungen reduzierte Zykluszahl vom Programm der ersten PCR. Die zweite PCR wurde mit den Primer-Kombinationen S -1298/-1 AS und S -1298/+250 AS durchgeführt. Die auf diese Weise vervielfältigten PCR-Produkte wurden durch eine Gelaufreinigung von der Matrizen-DNA getrennt (s. Kap. 2.4.7). Zur Strangverlängerung mit den 3'-Desoxyadenosin-Überhängen wurden anschließend zu den 20 µl Gelaufreinigungseluat aus dem „Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity Kit“ (s. o.) 2,5 µl 10x HF-Puffer, 0,5 µl dNTP-Mix und 1 µl MgSO<sub>4</sub> sowie zusätzlich 0,5 µl Dynazyme II DNA-Polymerase (2 U/µl, Finnzymes) hinzugegeben und die Ansätze 30 Minuten im Thermocycler bei 72 °C inkubiert.

#### **2.4.5 PCR-Optimierung**

Die Temperatur, bei der die Primer an die Einzelstrang-DNA binden, ist für jeden Primer spezifisch. Sie ist unter anderem abhängig von der Länge des Primers sowie von seinem GC-Gehalt und lässt sich näherungsweise aus der Schmelztemperatur ableiten, welche bei der Primer-Konstruktion berechnet werden kann.

Die optimale Bindungstemperatur jedes Primerpaares lässt sich allerdings nur empirisch sicher bestimmen. Hierzu wurde für jedes Primerpaar eine PCR durchgeführt, die während des 30 Sekunden dauernden Primerbindungsschrittes im oben beschriebenen PCR-Programm einen Temperaturgradienten aufwies. Dieser Gradient wurde so gewählt, dass er die näherungsweise bestimmte Bindungstemperatur mittig umfasste und dabei in Schritten von 0,9-2,4 °C anstieg. Das Ergebnis dieser Temperaturoptimierungs-PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Es wurde die Temperatur als Optimum ausgewählt, bei der sowohl die stärkste als auch spezifischste Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments zu erkennen war.

#### **2.4.6 Agarosegelelektrophorese**

Die PCR-Produkte sowie die Produkte der Restriktion der ligierten Plasmide (s. Kap. 2.4.11) wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Zur Herstellung eines 2 %igen Agarosegels wurden 4 g Agarose (Agarose Neo Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in 20 ml 10x TAE-Puffer (400 mM Tris-Acetat, 100 mM EDTA, Invitrogen) und 180 ml Aqua destillata in der Mikrowelle erhitzt bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wurde das flüssige Gel mit 4 µl Ethidiumbromid versetzt und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Nachdem es 45 Minuten ausgehärtet hatte, wurde das Gel in die Pufferkammer des Elektrophorese-Apparates, welche mit 1x TAE-Puffer gefüllt war, eingehängt. Dort wurden die Taschen des Gels mit 10-45 µl der DNA-Proben beladen, welche im Verhältnis 6:1 mit einem Ladepuffer (0,125 % Xylene Cyanol FF der Firma BioRad, 33,3 % Glycerin, 66,6 % DEPC-Wasser) vermischt waren. Danach wurde zur elektrophoretischen Auftrennung der Proben über dem Gel für die Dauer von 20 Minuten eine Spannung von 10-15 V/cm Gellänge angelegt. Da Ethidiumbromid unspezifisch in die DNA der Proben interkaliert und seine Fluoreszenz-Intensität hierdurch um ein Vielfaches ansteigt, konnten die gewanderten Proben anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera fotografiert werden. Um die Größe der PCR-Produkte zu bestimmen, wurden die Banden der Proben mit den Banden eines DNA-Größenstandards (DNA Molecular Weight Marker X oder XIV, 0,25 µg/µl, Roche, Penzberg, Deutschland) abgeglichen.

### 2.4.7 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Sowohl nach der nested PCR (s. Kap. 2.4.4) als auch nach der Restriktion des ligierten pCR4-TOPO-TA-Vektors und des pGL4.19-Leervektors (s. Kap. 2.4.11) waren die weiterzuverwendenden DNA-Abschnitte von den übrigen DNA-Fragmenten im jeweiligen Ansatz zu isolieren, da diese die nachfolgenden Methoden beeinträchtigen könnten. Hierzu wurde eine Gelaufreinigung aus Agarosegelen mit dem „Qiaex II Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein chaotropes Salz eingesetzt, welches einerseits das Agarosegel durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polysaccharidketten auflöst und andererseits durch Störung der Wasserstruktur die Adsorption der DNA an beigefügte Silica-Partikel begünstigt.

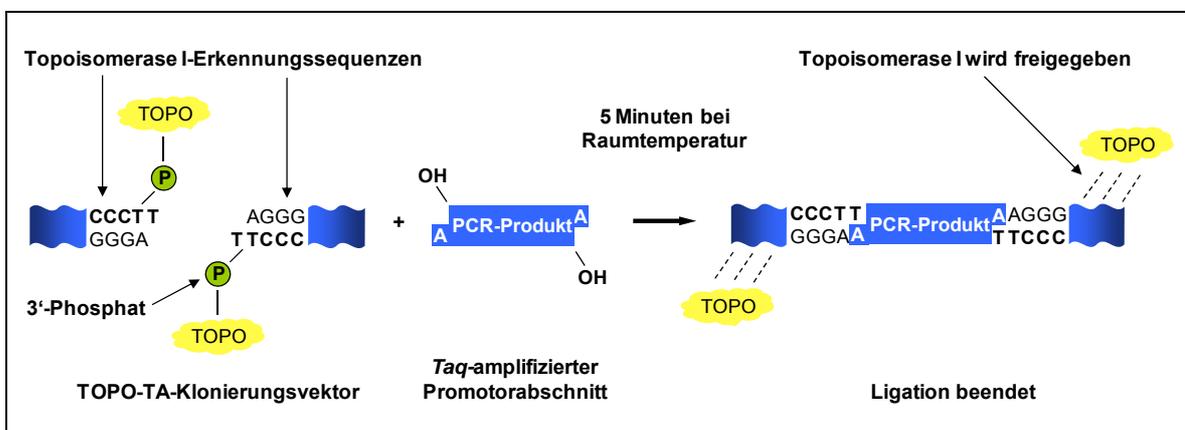
Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Hierbei wurden die Banden des linearisierten pGL4.19-Leervektors in Vorbereitung der anschließenden Ligation jeweils direkt mit einer Bande des einzubauenden Promotorabschnitts in einem Eppendorfgefäß zusammengeführt. Die Gel-Proben wurden gewogen und jedem Ansatz pro 100 mg Gel 300 µl QX1-Puffer zugefügt. Sodann wurde jede Probe mit 20 µl „Qiaex II“ versetzt, welches zuvor 30 Sekunden gemischt worden war, um die darin enthaltenen Silica-Partikel in Suspension zu bringen. Die Proben wurden 10 Minuten bei 50 °C im Heizblock (Schutron Thermoshaker, Wolf Laboratories, York, UK) inkubiert und während der Inkubation alle 2 Minuten erneut gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 30 Sekunden bei 15 700 g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf), wodurch sich die DNA-tragenden Silica-Partikel als Sediment absetzten. Der Überstand wurde verworfen. Zur Entfernung von Agaroserückständen wurden die Silica-Partikel in 500 µl QX1-Puffer resuspendiert und anschließend zur Sedimentation nochmals 30 Sekunden bei 15 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Durch die zweimalige Wiederholung dieses Waschschrilles mit je 500 µl PE-Puffer wurden die Proben im Anschluss von überschüssigem Salz gereinigt. Nach dem letzten Waschschrill wurde das Silica-Partikel-Sediment im Eppendorfgefäß 10-20 Minuten luftgetrocknet, bevor es zur Loslösung der DNA von den Partikeln in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert und 10 Minuten bei 50 °C im Heizblock inkubiert wurde. Abschließend wurde die Suspension 1 Minute bei 15 700 g zentrifugiert und die extrahierte DNA im Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt.

An die aufgereinigten Produkte der nested PCR wurden direkt im Anschluss zunächst 3'-Desoxyadenosin-Überhänge angehängt (s. Kap. 2.4.4), bevor sie für eine Ligation weiterverwendet werden konnten. Die aufgereinigten DNA-Fragmente des pGL4.19-Leervektors und des ausgeschnittenen Promotorsegments aus dem rekombinanten pCR4-TOPO-TA-Vektor konnten hingegen direkt einer Ligation zugeführt werden.

## 2.4.8 Ligation

Die Promotorabschnitte wurden insgesamt in drei unterschiedliche Vektoren kloniert: den pGeneBLAzer-TOPO-TA-, den pCR4-TOPO-TA- oder den pGL4.19-Vektor.

Bei den TOPO-TA-Vektoren wird die Ligation durch das Enzym Topoisomerase I katalysiert, welches sowohl eine Restriktions- als auch eine Ligaseeigenschaft besitzt und dadurch sehr zeitsparend und hocheffizient ligieren kann (239). Durch seine Restriktionsaktivität spaltet das Enzym Topoisomerase I die Phosphodiester-Bindung eines DNA-Einzelstranges spezifisch hinter der Sequenz 5'-CCCTT-3' auf. Da sowohl der pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor als auch der pCR4-TOPO-TA-Vektor diese Sequenz an ihren Klonierungsstellen auf beiden Komplementärsträngen aufweisen, werden sie an dieser Stelle durch die Topoisomerase linearisiert (s. Abb. 2.3). Dabei entstehen an den aufgespaltenen Vektoren 3'-Desoxythymidin-Überhänge mit Phosphatgruppe, welche als „sticky ends“ bezeichnet werden. Die bei der Aufspaltung des DNA-Doppelstranges freigewordene Energie wird durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der Topoisomerase I und dem geschnittenen Strang konserviert. Diese Bindung verhindert die erneute Selbstligation der beiden Stränge und die Topoisomerase nutzt die konservierte Energie zur Katalyse der darauf folgenden Ligation. Hierbei wird ein PCR-Produkt mit



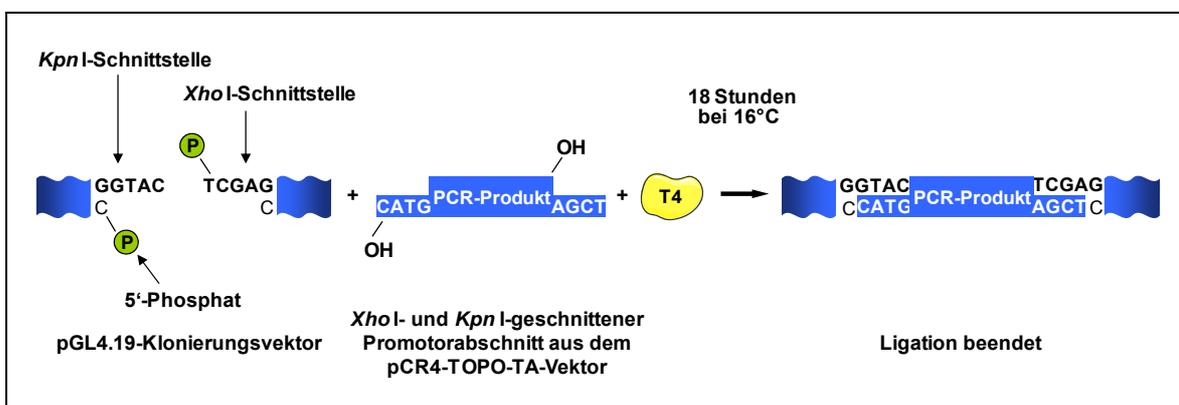
**Abbildung 2.3:** Ligation eines Promotorabschnitts in einen TOPO-TA-Klonierungsvektor mit Hilfe der Topoisomerase. TOPO: Topoisomerase I; OH: Hydroxylgruppe (nach dem Handbuch des Herstellers Invitrogen)

3'-Desoxyadenosin-Überhängen („sticky ends“) und 5'-Hydroxylgruppen unter Ausbildung einer neuen Phosphodiester-Bindung an der Spaltungsstelle in den Vektor integriert, wobei die Topoisomerase wieder freigesetzt wird (s. Abb. 2.3).

Die Ligation der TOPO-TA-Vektoren erfolgte sofort im Anschluss an das Anhängen der 3'-Desoxyadenosin-Überhänge an die jeweiligen PCR-Produkte (s. Kap. 2.4.4). Für die Klonierung der PCR-Produkte in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor wurde das „pGeneBLAzer TOPO TA Expression Kit“ (Invitrogen) verwendet, für die Klonierung in den pCR4-TOPO-TA-Vektor das „TOPO TA Cloning Kit for Sequencing“ (Invitrogen). Zur Ligation wurden je 4 µl des PCR-Produkts, 1 µl Salt Solution (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl des jeweils benötigten TOPO-TA-Vektors zusammengefügt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Ansätze bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt.

Die Ligation eines durch Exonukleasen aus dem pCR4-TOPO-TA-Vektor ausgeschnittenen Promotorabschnitts (s. Kap. 2.4.11) in den pGL4.19-Vektor wurde hingegen mit T4-DNA-Ligase (New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland) durchgeführt. Da sowohl die pGL4.19-Leervektoren als auch die einzubauenden Promotorabschnitte aus den pCR4-TOPO-TA-Vektoren zuvor mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *Kpn* I geschnitten worden waren, wiesen Vektoren und PCR-Fragmente komplementäre Schnittstellen auf (s. Abb. 2.4). Die zur Ligation verwendete T4-DNA-Ligase katalysiert ATP-abhängig die Ausbildung einer neuen Phosphodiester-Bindung zwischen den freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppen an den Schnittstellen der Leervektoren und der einzubauenden PCR-Produkte.

Die Ligation in den pGL4.19-Leervektor wurde direkt im Anschluss an die Gelaufreinigung der beiden Fragmente durchgeführt (s. Kap. 2.4.7). Hierzu wurden 10 µl Gelaufreinigungseluat, 7 µl DEPC-Wasser, 1 µl T4-DNA-Ligase (400 000 cohesive end



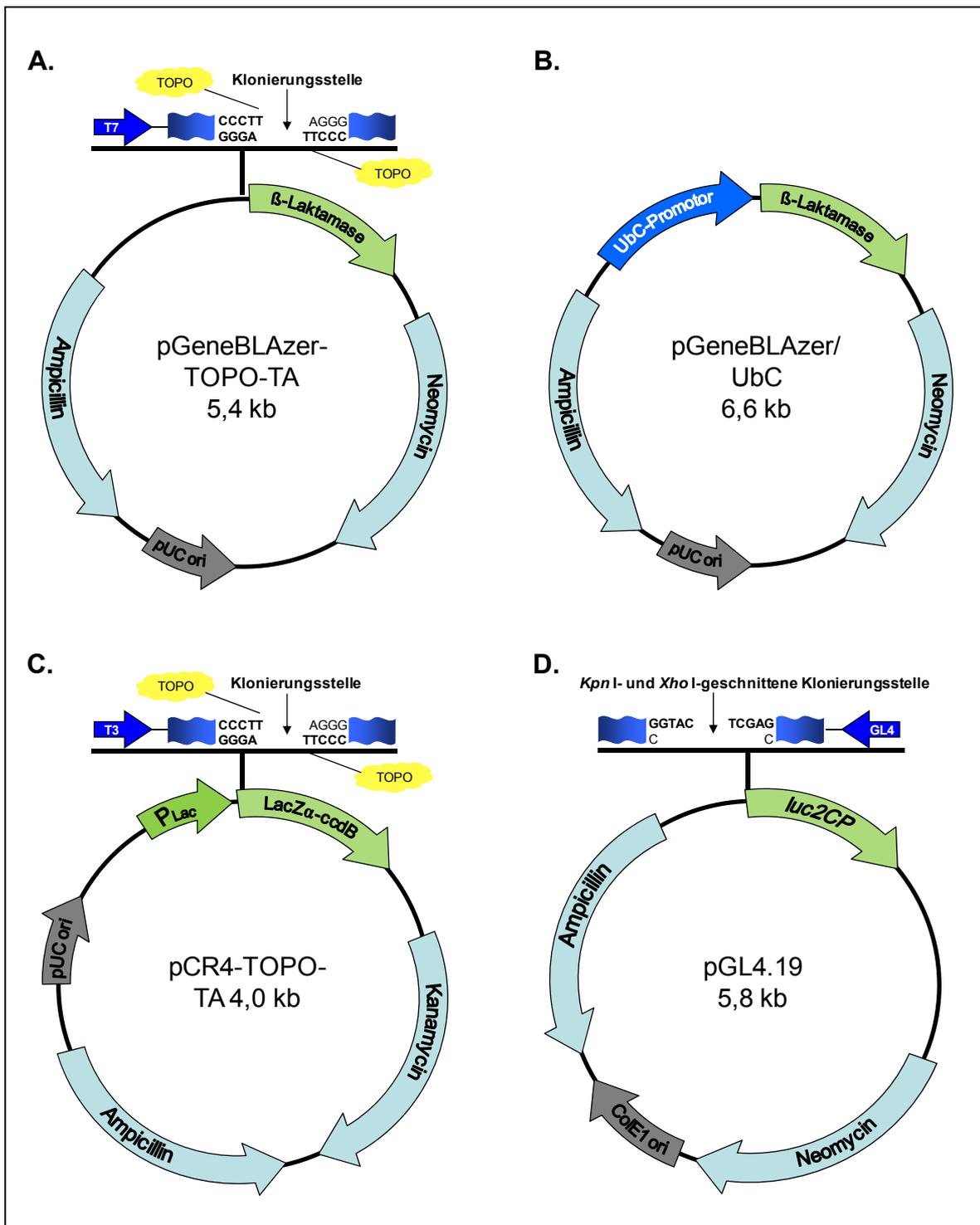
**Abbildung 2.4:** Ligation eines Promotorabschnitts in den pGL4.19-Klonierungsvektor mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. T4: T4-DNA-Ligase; OH: Hydroxylgruppe

units/ml) und 2  $\mu$ l T4-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, pH 7,5 bei 25 °C; New England BioLabs) 18 Stunden im T3-Thermocycler (Biometra) bei 16 °C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend bis zum Beginn der Transformation auf Eis aufbewahrt.

#### 2.4.9 Transformation

Für die Transformation wurden Luria-Bertani-Medium-haltige Agarplatten hergestellt, auf denen die transformierten Bakterien später angezüchtet werden sollten. Zur Herstellung von 20 Agarplatten mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin wurden 32 g LB-Agar-Pulver (10 g Pepton 140, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 12 g Agar, Invitrogen) in 1000 ml Aqua bidestillata gelöst, die Lösung autoklaviert, auf 50 °C abgekühlt und mit 100 mg Ampicillin (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) versetzt. Das Medium wurde zur Polymerisation in Petrischalen gegossen, die bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt wurden.

Die ligierten Vektoren wurden in chemisch kompetente Zellen aus dem „OneShot TOP10 Kit“ der Firma Invitrogen transformiert. Hierzu wurden die chemisch kompetenten Zellen zunächst kurz auf Eis aufgetaut. Danach wurden in jedes Zellröhrchen, welches 50  $\mu$ l Bakterienlösung enthielt, 2  $\mu$ l eines Ligationsansatzes pipettiert und die Ansätze durch vorsichtiges Schütteln vermischt. Die Proben wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend exakt 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C hitzegeschockt und danach wieder auf Eis platziert. Zu jedem Ansatz wurden 250  $\mu$ l SOC-Medium hinzupipettiert (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose) und die Proben sodann 1 Stunde bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute im Schüttelinkubator (GFL 3032, GFL, Burgwedel, Deutschland) horizontal geschüttelt. Danach wurden die Zellen auf den vorbereiteten LB-Agarplatten ausgestrichen, welche anschließend 18 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert wurden. Da sowohl die TOPO-TA-Vektoren als auch der pGL4.19-Vektor ein Resistenzgen gegen Ampicillin besitzen (s. Abb. 2.5), wuchsen nach der Inkubationszeit nur solche Bakterien, die das Plasmid mit dem Resistenzgen aufgenommen hatten. Der pCR4-TOPO-TA-Vektor weist darüber hinaus an seiner Klonierungsstelle als zusätzlichen Selektionsmechanismus das Gen für das zytotoxische Protein ccdB auf (s. Abb. 2.5). Dieses Gen wird durch den Einbau eines DNA-Fragments an der Klonierungsstelle inaktiviert, wodurch bei diesem Vektor nach der Transformation ausschließlich rekombinante Klone angezüchtet werden (15).



**Abbildung 2.5:** Karten der Vektoren. A: pGeneBLazer-TOPO-TA-Vektor mit der TA (Thymin/Adenosin)-Klonierungsstelle zum Einbau des PCR-Produkts, dem β-Laktamase-Gen als Reportergen, dem Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E.coli*-Zellen, dem Neomycin-Resistenzgen zur Selektion stabiler Zelllinien, dem pUC-origins-Gen (pUC ori) als Replikationsursprung für high-copy-Plasmide und der T7-Promotor-Primer-Sequenz zur Sequenzierung (T7); B: pGeneBLazer/UbC-Plasmid als Positivkontrolle von Transfektion und Expression mit dem humanem Ubiquitin C-Promotor an der Klonierungsstelle; C: pCR4-TOPO-TA-Vektor mit der TA-Klonierungsstelle, dem LacZα-ccdB-Fusionsgen unter der Kontrolle des Lac-Promotors (P<sub>Lac</sub>), den Ampicillin- und Kanamycin- Resistenzgenen, dem pUC-Replikationsursprung und der T3-Primer-Sequenz zur Sequenzierung (T3); D: pGL4.19-Vektor mit der *Kpn* I- und *Xho* I-geschnittene Klonierungsstelle, dem *luc2CP*-Luziferase-Reportergen, den Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgenen, dem CoE1-abgeleiteten Replikationsursprung (CoE1 ori) und der GLprimer4-Sequenz zur Sequenzierung (GL4).

Alternativ zur chemischen Transformation wurde eine Elektroporation mit dem Gene Pulser II der Firma BioRad durchgeführt. Hierzu musste die vorangehende Ligation mit einer 1:4 verdünnten Salzlösung vorgenommen werden. Von diesem Ligationsansatz wurden anschließend 2 µl in ein Zellröhrchen pipettiert, welches 50 µl elektrokompente Zellen (OneShot TOP10 electrocompetent *E.coli*, Invitrogen) enthielt. Sodann erfolgte die Elektroporation im „Gene Pulser II“ bei 1,8 kV, 200 Ω und 25 kF. Sofort nach dem Impuls wurden zu jeder Probe 250 µl SOC-Medium hinzupipettiert. Danach wurde wie bei der chemischen Transformation weiterverfahren.

Um die Transformationseffizienz der OneShot TOP10 Zellen zu überprüfen, wurden zusätzlich 50 µl der chemisch bzw. elektrokompenten Zellen mit 1 µl des Kontroll-Plasmids pUC19 (10 pg/µl, Invitrogen) transformiert, welches ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen besitzt (Vektorkarte im Anhang, s. Kap. 7.1).

Darüber hinaus wurden chemisch kompetente Zellen mit dem pGeneBLAzer/UbC-Vektor (Invitrogen) transformiert, um diesen Vektor als Positivkontrolle für die anschließenden Versuche anzuzüchten (s. Abb. 2.5). In diesem Vektor kontrolliert der humane Ubiquitin C (UbC)-Promotor die Expression des β-Laktamase-Gens. Aufgrund seiner ubiquitär hohen Aktivität in Zellkulturzellen eignet sich dieser Promotor als Positivkontrolle von Transfektion und Expression der pGeneBLAzer-Vektoren in den NCI-H295R-Zielzellen (236).

#### **2.4.10 Plasmid-Präparation**

Zur Plasmidisolierung wurden pro Platte vier bis zehn Bakterienkolonien ausgewählt und mit einem sterilen Holzstäbchen in 3 ml LB-Flüssigmedium (LB Broth Base: 1 % Pepton 140, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, Invitrogen) mit 100 µg/ml Ampicillin überimpft. Die Kulturröhrchen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Vor der Zell-Lyse wurden von allen Bakterienstämmen stabile Glycerinkulturen angelegt, indem je 200 µl Bakterienlösung mit 200 µl autoklaviertem Glycerin vermischt und anschließend bei -80 °C eingefroren wurden.

Für die Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Mini-Präp) wurde das „NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit“ der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet, welches auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat („sodiumdodecylsulfate“, SDS) beruht. Bei dieser Methode werden die Bakterien in einem basischen Milieu lysiert, durch welches zunächst sowohl die chromosomale als auch die

Plasmid-DNA der Bakterien denaturieren. Anschließend werden neutrale Bedingungen geschaffen, unter denen die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder hybridisieren, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und mit den Proteinen präzipitiert (23).

Die Übernacht-Kulturen der Bakterienstämme wurden 10 Minuten bei 4500 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf), der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 250 µl RNase-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Danach wurden 250 µl alkalischer, SDS-haltiger Puffer A2 hinzugegeben und die Ansätze 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wurden zum Zell-Lysat 300 µl Puffer A3 hinzupipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und die Zellreste mit der chromosomalen DNA wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 11 000 g entfernt (Zentrifuge 5415 D, Eppendorf). Der die Plasmide enthaltende Überstand wurde anschließend auf eine NucleoSpin-Säule pipettiert und zur Bindung der Plasmide an das darin enthaltene Silica-Gel 1 Minute bei 11 000 g zentrifugiert. Um die Membran von eventuell ebenfalls gebundenen Verunreinigungen, wie löslichen Zellbestandteilen oder Salzen zu reinigen, wurden 450 µl des ethanolhaltigen Waschpuffers AQ auf die Membran gegeben. Durch dreiminütige Zentrifugation bei 11 000 g wurde die Membran anschließend wieder getrocknet. Danach wurde die membrangebundene DNA in 50 µl steriles DEPC-Wasser eluiert.

Für eine Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxi-Präp) wurden die Übernachtskulturen der Bakterienkolonien statt in 3 ml in 50 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert. Zur Isolierung wurden das „NucleoBond PC 500 Kit“ und das „NucleoBond Finalizer Kit“ der Firma Macherey-Nagel verwendet, welche ebenfalls nach dem Prinzip von Birnboim und Doly arbeiten (23). Im erstgenannten Kit wurde das Protokoll für high-copy Plasmide befolgt, da es sich sowohl beim pUC-origin-Gen der pGeneBLAzer-Vektoren als auch beim ColE1-abgeleiteten origin-Gen des pGL4.19-Vektors um Replikationsursprünge für hohe Kopienzahlen handelt (s. Abb. 2.5). Die über Nacht inkubierte Bakteriensuspension wurde in 50 ml-Falkonröhrchen überführt und durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 12 ml S1-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Anschließend wurde die Zell-Lyse durch Hinzufügen von 12 ml S2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % SDS) und vorsichtiges Vermischen eingeleitet. Es folgte eine zwei- bis dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Lyse wurde beendet, indem 12 ml S3-Puffer (2,8 M KAc, pH 5,1) hinzugefügt, die Proben

erneut vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Das dabei entstandene flockige Präzipitat wurde sodann mittels eines mit 200 µl N2-Puffer (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, 0,15 % Triton X-100, pH 6,3) angefeuchteten Filters von der Lösung getrennt. Die klare Lösung wurde auf eine mit 6 ml N2-Puffer äquilibrierte Anionenaustauschersäule gegeben, an welche die DNA beim Durchfließen der Säule gebunden wurde. Nunmehr wurde die Säule mit 32 ml N3-Puffer (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3) gewaschen und die DNA in 15 ml N5-Puffer (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 1 M KCl, pH 8,5) eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol vermischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde mit einer Spritze durch einen Filter gepresst, an dessen Silica-Membran die DNA gebunden wurde. Zur Entfernung störender Salze wurde der Filter mit 70 %igem Ethanol gewaschen und die DNA abschließend in hochkonzentrierter Form in 600 µl TE-Puffer eluiert.

Die Konzentration der isolierten DNA im Eluat wurde in einer 1:50 Verdünnung mit DEPC-Wasser am Smart Spec 3000 Spektralphotometer der Firma Bio-Rad gemessen (s. Kap. 2.4.2).

Bis zur weiteren Verwendung wurden die DNA-Proben bei -20 °C gelagert.

#### 2.4.11 Restriktion

Die aufgereinigten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Plasmide wurden durch Restriktion mit der für diesen Vektor geeigneten Endonuklease *Bgl* II analysiert, welche Doppelstrang-DNA spezifisch innerhalb der pallindromischen Erkennungssequenz 5'-AGATCT schneidet. Hierzu wurde je 1 µg Plasmid mit 20 U *Bgl* II sowie 2 µl NE-Puffer 3 (beide New England BioLabs; NE-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,9 bei 25 °C) versetzt und mit DEPC-Wasser auf 20 µl ergänzt. Die Ansätze wurden eine Stunde im Thermocycler (Biometra) bei 37 °C inkubiert und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese hinsichtlich des Einbaus des PCR-Produktes und dessen Orientierung untersucht.

Da die pGL4.19-Vektoren im Unterschied zu den TOPO-TA-Vektoren nicht linearisiert vorlagen, mussten diese Vektoren nicht nur zur Analyse nach der Ligation, sondern bereits zur Vorbereitung der Ligation durch Endonukleasen aufgespalten werden. Der pGL4.19-Leervektor kann mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Xho* I geschnitten werden, welche die pallindromischen Erkennungssequenzen 5'-GGTACC bzw. 5'-CTCGAG besitzen. Durch die Aufspaltung mit diesen beiden Enzymen entsteht ein linearisierter

Vektor mit zwei unterschiedlichen Sequenzen an seinen beiden Strangenden. Die Ungleichheit dieser Endsequenzen kann zur gerichteten Ligation eines DNA-Fragments in den Vektor genutzt werden. Zu diesem Zweck enthielten die PCR-Primer zur Amplifikation der zu ligierenden Promotorabschnitte an den 5'-Enden ebenfalls die Erkennungssequenzen von *Kpn* I und *Xho* I (s. Kap. 2.4.3). Dadurch erhalten die PCR-Produkte nach der Restriktion die komplementären Schnittstellen zu den offenen Enden der pGL4.19-Leervektoren. Da die Restriktionsenzyme an den distalen Enden eines DNA-Doppelstranges nur sehr ineffizient spalten, ist bei der direkten Restriktion der PCR-Produkte mit den Endonukleasen die Ausbeute an PCR-Produkten mit aufgespaltenen Schnittenden sehr gering. Um die Ausbeute korrekt geschnittener PCR-Produkte zu erhöhen, wurden diese nach dem Anhängen zusätzlicher „sticky-ends“ zunächst in einem Zwischenschritt in den pCR4-TOPO-TA-Vektor kloniert (s. Kap. 2.4.8). Aus diesen rekombinanten pCR4-TOPO-TA-Vektoren konnten die Fragmente anschließend mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Xho* I effizient ausgeschnitten werden, da die Erkennungssequenzen der Enzyme hier inmitten einer doppelsträngigen DNA-Sequenz liegen. Die pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektoren wurden außerdem im Anschluss an die Ligation zur Überprüfung des Einbaus der korrekten Fragmente mit den Endonukleasen *Kpn* I und *Xho* I geschnitten.

Zur Durchführung der Restriktion bei den pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektoren wurden je 1 µg des jeweiligen Plasmids, 20 U *Xho* I, 20 U *Kpn* I, 2 µl BSA (bovines Serumalbumin, 1 µg/µl) und 2 µl NE-Puffer 1 (alle New England BioLabs, NE-Puffer: 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,0 bei 25 °C) mit DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl ergänzt und eine Stunde im Thermocycler (Biometra) bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden anschließend durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert. Zur Subklonierung der PCR-Produkte aus dem pCR4-TOPO-TA- in den pGL4.19-Vektor wurden die DNA-Fragmente des ausgeschnittenen PCR-Produkts und des aufgespaltenen pGL4.19-Leervektors anschließend gemeinsam aus dem Gel isoliert und einer Ligation zugeführt (s. Kap. 2.4.7 und 2.4.8).

#### **2.4.12 Ethanol-fällung und externe Sequenzierung**

Zur weiteren Aufreinigung der DNA wurde eine Ethanol-fällung der im kleinen Maßstab isolierten Plasmide vorgenommen. Von den aufgetauten Proben wurden jeweils 40 µl in

neue Eppendorf-Gefäße überführt. Diese wurden mit 4 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2, Sigma-Aldrich) sowie 80 µl eiskaltem 100 %igem Ethanol (Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande) vermischt und eine Stunde bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die DNA durch dreißigminütige Zentrifugation bei 23 440 g und 4 °C sedimentiert (Mikro 200R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet in 500 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol (Mallinckrodt Baker) resuspendiert und abermals 30 Minuten bei 23 440 g und 4 °C zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde erneut entfernt. Sodann wurde das DNA-Pellet unter dem Abzug 30 Minuten getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 10 µl Tris (10 mM, pH 8,5, steril, Sigma-Aldrich) aufgelöst und die Konzentration der DNA in einer 1:50 Verdünnung mit DEPC-Wasser spektralphotometrisch bestimmt (s. Kap. 2.4.2).

Zur externen Sequenzierung wurden von den Plasmiden Sequenzierungsansätze mit einem Endvolumen von je 7 µl angefertigt. Die Ansätze besaßen eine Plasmid-Endkonzentration von 0,7 µg Plasmid/ml, enthielten 2 µl eines vektorspezifischen Sequenzierungsprimers und wurden mit Tris (10 mM, pH 8,5) auf ein Endvolumen von 7 µl ergänzt. Den Ansätzen der pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren wurde als Sequenzierungsprimer der T7-Promotor-Primer (Invitrogen) zugefügt. Für die pGL4.19-Vektor-Ansätze wurde der GLprimer4 (Sequenz von Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) verwendet, der ebenfalls von Invitrogen synthetisiert wurde. Die Sequenzierung der Plasmide wurde anschließend von den Sequence Laboratories Göttingen (SeqLab, Göttingen, Deutschland) in einem automatisierten, Fluoreszenzfarbstoff-basierten Kettenabbruchverfahren durchgeführt.

## 2.5 Transfektion

Um die anhand der Sequenzierung ausgewählten Plasmide für Reporter-Untersuchungen in die NCI-H295R-Zellen zu schleusen, wurde eine transiente Transfektion mittels kationischer Liposomen durchgeführt. Durch eine Ultraschallbehandlung bilden polykationische Lipide positiv geladene Liposomen, an welche die negativ geladenen Plasmide binden. Die so entstandenen Liposomen-Nukleinsäure-Komplexe können anschließend mit der Zellwand der NCI-H295R-Zellen fusionieren, wodurch die Plasmide ins Zellinnere transportiert werden und von dort zur Expression weiter in den Zellkern gelangen (65, 255).

Nachdem die NCI-H295R-Zellen für die Transfektion eine mindestens 85 %ige Konfluenz erreicht hatten, wurde das verbrauchte Medium in jedem Well durch 400 µl

antibiotikafreies DMEM-Ham's-F12-Nährmedium ersetzt. Zur Transfektion mit den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren wurden pro Ansatz 0,8 µg der entsprechenden isolierten Plasmide mit OptiMEM-Medium (1x, Invitrogen) zu einem Endvolumen von 50 µl ergänzt. Zur Transfektion mit den pGL4.19-Vektoren wurden stattdessen je 0,4 µg der entsprechenden Plasmide in Kotransfektion mit 0,2 ng des synthetischen Renilla-Luziferase-Kontrollvektors pRL-SV40 (Promega, Vektorkarte im Anhang, s. Kap. 7.1) mit OptiMEM-Medium auf ein Gesamtvolumen von 50 µl ergänzt. Anschließend wurden die Ansätze vorsichtig gemischt. Parallel wurden pro Plasmid-Probe jeweils 2 µl Lipofektamin (Lipofectamine 2000, Invitrogen) zu 48 µl OptiMEM-Medium hinzupipettiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurde jede 50 µl-Plasmid-Probe mit einem 50 µl-Lipofektamin-OptiMEM-Ansatz vereint und das Gemisch zur Bildung der Liposomen-Plasmid-Komplexe 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde jedes Well der NCI-H295R-Zellen mit einem 100 µl-Ansatz der Liposomen-Plasmid-Komplexe versetzt und 5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Beendigung der Transfektion wurde nach der Inkubationszeit das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 500 µl frisches DMEM-Ham's-F12-Kulturmedium (5 % FBS, ohne Antibiotika) ersetzt. Die Zellen wurden vor der anschließenden Stimulation über Nacht bei 37 °C inkubiert.

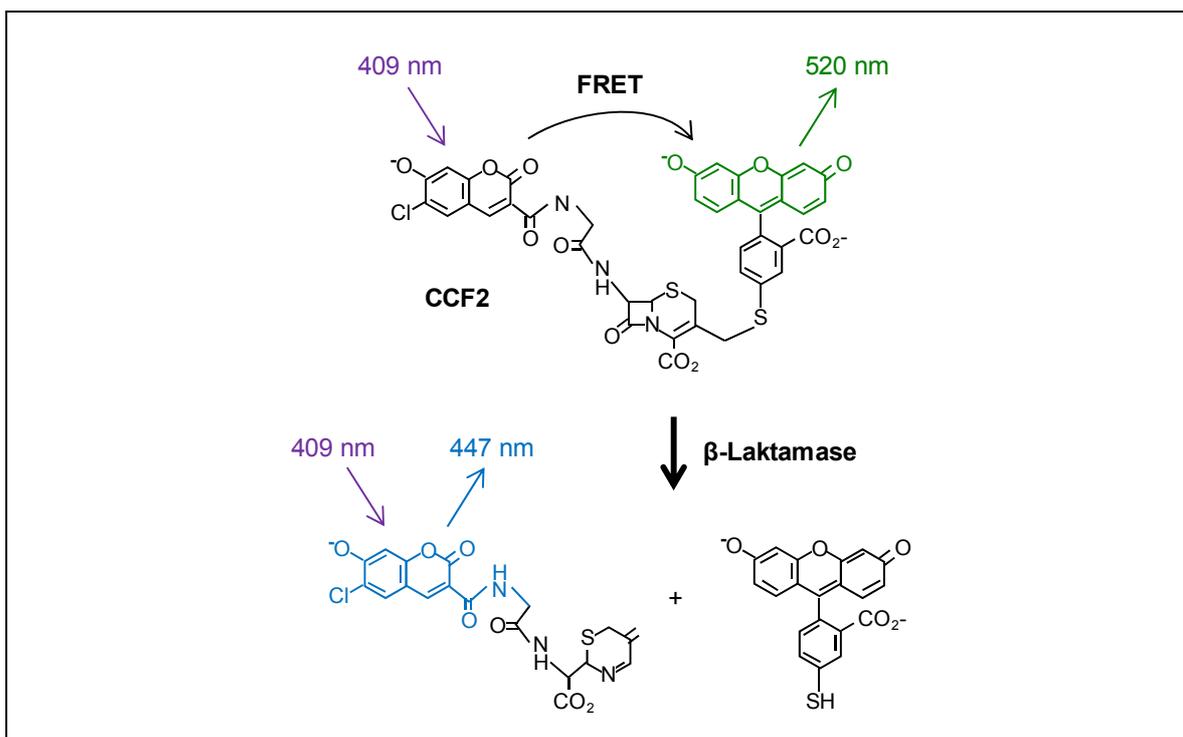
## 2.6 Reporterstudien

Reportergene sind Gene, die für leicht nachweisbare Proteine kodieren und in speziellen, für Promotoraktivitäts-Studien konzipierten Expressionsvektoren der Klonierungsstelle nachgeschaltet sind, wodurch sie bei Aktivierung des eingebauten Promotors verstärkt exprimiert werden. Das Produkt eines Reportergens darf in der Zielzelle, in der es exprimiert werden soll, endogen nicht vorkommen und die Zelle nicht toxisch schädigen. Zur Untersuchung der Promotoraktivität selektiver Steroidbiosyntheseenzyme wurden zwei unterschiedliche Reporterensysteme verwendet.

### 2.6.1 $\beta$ -Laktamase-Reporterensystem

Im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor dient das dem eingebauten Promotor nachgeschaltete  $\beta$ -Laktamase-Gen aus *E.coli*-Zellen als Reporter (s. Abb. 2.5) (257). Dieses Enzym dient in seinen Ursprungszellen dazu,  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu spalten und dadurch zu inaktivieren. In eukaryotischen Zellen wird es endogen nicht exprimiert. Der speziell

konzipierte Fluoreszenz-Farbstoff Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein 2 (CCF2) kann von der  $\beta$ -Laktamase hydrolysiert werden, wodurch es zu einer messbaren Änderung der Emissionswellenlänge kommt. Dies liegt daran, dass das intakte CCF2-Farbstoffmolekül die Fähigkeit zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) besitzt. Regt man das Substrat mit 409 nm an, überträgt ein Donor-Fluochrom die Energie strahlungslos auf ein Akzeptor-Fluochrom, dessen Emission dann bei 520 nm (grün) gemessen werden kann (s. Abb. 2.6). Werden Donor und Akzeptor jedoch durch die Hydrolyse räumlich voneinander getrennt, findet kein Energie-Transfer mehr statt und bei einer Anregung mit 409 nm wird nun direkt die Emissionswellenlänge des Donor-Fluochroms von 447 nm (blau) gemessen (289). Eine vermehrte Bildung der  $\beta$ -Laktamase in den Zellen führt daher zum Ansteigen der Emission der Proben bei 447 nm, während die Emission bei 520 nm parallel dazu absinkt. Die Aktivität der  $\beta$ -Laktamase wird für jedes Well als Verhältnis von blauer zu grüner Fluoreszenz-Signalintensität berechnet. Dies ist im Vergleich zu anderen Reportersystemen ein methodischer Vorteil, da durch diese „Verhältnis-Quantifizierung“ technische Variablen wie Unterschiede zwischen den einzelnen Proben in Signalintensität, Emissionssensitivität oder Substratkonzentration korrigiert werden (85, 126, 204, 289). Das  $\beta$ -Laktamase-Reportergenassay zeichnet sich überdies durch eine hohe Sensitivität aus, da bereits 50  $\beta$ -Laktamase-Moleküle in einer Zelle ausreichen, um das Emissions-Verhältnis signifikant zu ändern (289).



**Abbildung 2.6:** Schema der von der  $\beta$ -Laktamase katalysierten Reaktion mit den Emissionswellenlängen des CCF2-Farbstoffmoleküls und der hydrolysierten Produkte bei Anregung mit einer Wellenlänge von 409 nm

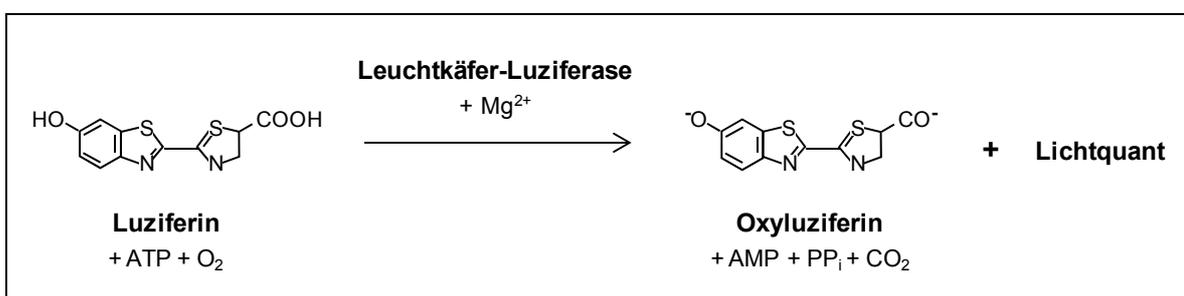
Nachdem die transfizierten Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert worden waren, wurden sie für die Dauer von 3, 6, 12 oder 24 Stunden mit Orexin A (1 µM) sowie in einigen Versuchen auch mit Angiotensin II (0,1 µM) oder Forskolin (25 µM) behandelt. Um die Stimulation zu beenden, wurde anschließend das Medium abgesaugt und die Zellen wurden mit 200 µl CHAPS-Lyse-Puffer (50 mg C<sub>32</sub>H<sub>58</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S in 10 ml Aqua destillata, Sigma-Aldrich) lysiert. Für die Messung wurden von jeder Probe 90 µl in ein Well einer 96-Well-Platte überführt und 10 µl des säurefreien, wasserlöslichen Farbstoff-Derivats CCF2-FA (100 µM) hinzugegeben. Unmittelbar danach wurde die Emissions-Fluoreszenz der Proben bei 520 und 460 nm in fünfminütigen Abständen über eine Gesamtdauer von 45, 90 oder 105 Minuten im FLUOstar Optima Fluorometer (BMG Labtech) bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm gemessen. Zur Auswertung der Daten wurden in jeder Gruppe die Messwerte der Fluoreszenz bei 460 nm ins Verhältnis zu denjenigen bei 520 nm gesetzt. Von diesen Werten wurden zur Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung anschließend diejenigen eines Vektors mit falscher Orientierung des eingebauten Promotors abgezogen.

## 2.6.2 Dual-Luziferase-Reportersystem

Das „Dual Luciferase Reporter Assay System“ von Promega beruht auf dem Phänomen der Biolumineszenz, das heißt der Fähigkeit von Lebewesen, durch chemische Reaktionen Licht zu erzeugen. Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, werden als Luziferasen bezeichnet und kommen in menschlichen Zellen natürlicher Weise nicht vor. Es handelt sich insofern um ein „duales“ System, als dass die Zielzellen in diesem System gleichzeitig mit zwei verschiedenen Plasmiden kotransfiziert werden, dem pGL4.19-Vektor als experimentellen Vektor und dem pRL-SV40-Vektor als Kontrollvektor, wobei die Vektoren für zwei unterschiedliche Luziferasen kodieren.

Der pGL4.19-Vektor dient als experimenteller Vektor, in den der gewünschte Promotorabschnitt zur Untersuchung seiner Aktivität integriert wird (s. Kap. 2.4.8). Der Klonierungsstelle des pGL4.19-Vektors ist das Luziferase-Gen *luc2CP* als Reportergen nachgeschaltet (s. Abb. 2.5), welches in seiner ursprünglichen Form aus Leuchtkäfern isoliert wurde. Dort katalysiert das Enzym unter Verbrauch von Sauerstoff, Mg<sup>2+</sup> und ATP die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin. Die bei dieser Reaktion freiwerdende Energie wird in Form von sichtbarem Licht emittiert, welches *in vivo* typischerweise im gelbgrünen Wellenlängenbereich von etwa 550-570 nm liegt (s. Abb. 2.7). Die Messung dieser

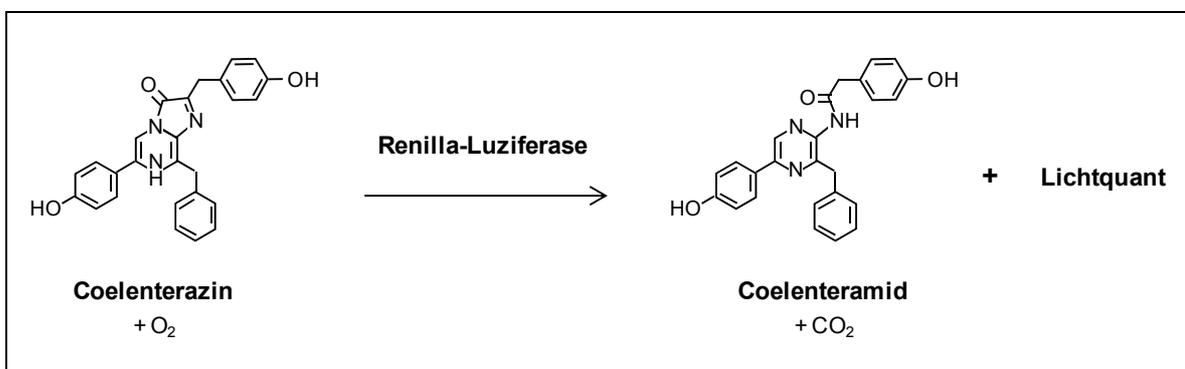
elektromagnetischen Strahlung als Maß für die Enzymaktivität ist nahezu unmittelbar nach der Translation möglich, da das Protein für seine Funktionsfähigkeit keine posttranslationalen Modifikationen benötigt. Um die Eignung der Leuchtkäfer-Luziferase als Reporter gen für humane Zelllinien noch zu steigern, wurde durch einige Veränderungen der Gensequenz das synthetische *luc2CP*-Reporter gen von der ursprünglichen Leuchtkäfer-Luziferase abgeleitet. Zu diesen Änderungen zählen das Anhängen einer C-terminalen Sequenz, welche die Akkumulation des Proteins in den Peroxisomen verhindert, sowie die Entfernung kryptischer regulatorischer DNA-Sequenzen zur Reduktion störender Einflüsse auf die Expression unter Beibehaltung der kodierten Aminosäuresequenz. Des Weiteren wurde eine Codon-Optimierung durchgeführt, bei der die Codons der Leuchtkäfer-Luziferase durch die in menschlichen Zellen am häufigsten verwendeten Codons für diese Aminosäuren ausgetauscht wurden, wodurch die Expression des Reporter gens in humanen Zellen erhöht wird. Als Besonderheit wurden dem Luziferase-Gen zusätzlich zwei Sequenzen angehängt, CL1 und PEST, die den Abbau des fertigen Proteins beschleunigen (74, 215). Der Vorteil dieser Enzym-Destabilisierung liegt darin, dass es in der Folge zu einer geringeren Akkumulation der Luziferase kommen kann, wodurch zwar die Signalintensität insgesamt etwas abnimmt, aber bereits kleinere Änderungen der Expressionsrate messbar werden. Destabilisierte Reporterproteine reagieren daher präziser und schneller auf zelluläre Stimuli und können so die Expressionsdynamik exakter reflektieren. Hervorzuheben ist darüber hinaus noch die hohe Sensitivität des Leuchtkäfer-Luziferase-Systems, das eine Detektion von bis zu 10 Leuchtkäfer-Luziferase-Molekülen pro Zelle ermöglicht (279).



**Abbildung 2.7:** Schema der von der von der Leuchtkäfer-Luziferase katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion. Bei der Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin wird Energie in Form von sichtbarem Licht freigesetzt.

Der pRL-SV40-Vektor dient im Dual-Luziferase-System als interner Kontrollvektor, der mit den rekombinanten pGL4.19-Vektoren in die Zielzellen kotransfiziert wird. Der pRL-SV40-Vektor kodiert für das Gen der Renilla-Luziferase aus der Weichkoralle *Renilla*

*reniformis*, dem der SV40-Early-Enhancer/Promotor aus dem Simian-Virus 40 vorgeschaltet ist, welcher in humanen Zellen keiner Regulation unterliegt und dadurch eine hohe konstitutive Expression der Renilla-Luziferase in einer Vielzahl von Zellen bewirkt (Vektorkarte im Anhang, s. Kap. 7.1). Die Renilla-Luziferase katalysiert sauerstoffabhängig die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid, wobei sichtbares Licht im bläulichen Wellenlängenbereich von 480 nm emittiert wird (s. Abb. 2.8). Wie die Leuchtkäfer-Luziferase benötigt auch die Renilla-Luziferase für ihre Funktionsfähigkeit keine posttranslationalen Modifikationen, weshalb ihre enzymatische Aktivität ebenfalls direkt nach der Translation gemessen werden kann.



**Abbildung 2.8:** Schema der von der Renilla-Luziferase katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion. Bei der Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid wird Energie in Form von sichtbarem Licht freigesetzt.

Da die beiden Luziferasen in den kotransfizierten Zellen zwei voneinander unabhängige Reaktionen mit unterschiedlichen Substraten katalysieren, können ihre Aktivitäten im Anschluss an die Zell-Lyse sequenziell in einer Probe bestimmt werden. Hierzu wird dem Zell-Lysat zunächst das Substrat der Leuchtkäfer-Luziferase hinzugefügt und anschließend die emittierte Lumineszenz gemessen. Danach wird diese erste Reaktion durch Zugabe eines speziellen Reagenzes, welches eine Substanz zur Lumineszenz-Löschung enthält, beendet. Da dieses Reagenz gleichzeitig das Substrat der Renilla-Luziferase enthält, kann die Lumineszenz aus dieser zweiten Reaktion unmittelbar anschließend detektiert werden. Die nachfolgende Bildung des Verhältnisses der Lumineszenzwerte aus der Leuchtkäfer-Luziferase- und der Renilla-Luziferase-Reaktion dient der Normalisierung der Aktivität der Leuchtkäfer-Luziferase und korrigiert schwer zu beeinflussende systemische Fehler. Hierbei handelt es sich um Unterschiede zwischen den Proben in Transfektionseffizienz, Zelldichte und Zellfunktionstüchtigkeit sowie in der Effizienz der Zell-Lyse und in den zur Messung eingesetzten Proben-Volumina (279). Diese Normalisierung ist neben der

dynamischen Reaktion der Luziferase-Aktivität auf Expressionsänderungen als Hauptvorteil dieses Systems gegenüber anderen Systemen anzusehen.

Die kotransfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden mit Orexin A (1 µM), Orexin B (1 µM), Angiotensin II (1 µM) oder Forskolin (10 µM) stimuliert. Um die Behandlung zu beenden, wurden die Zellen zunächst mit 500 µl PBS (PAA Laboratories) pro Well gewaschen. Danach wurden zur Zell-Lyse in jedes Well 100 µl Passiv-Lysis-Puffer (Promega) pipettiert und die Platten bei Raumtemperatur 15 Minuten auf einem Kreisschüttler (DSG 304, Heidolph, Schwabach, Deutschland) gerüttelt. Von den Zell-Lysaten wurden je 20 µl in ein Well einer 96-Well-Platte überführt. Diese wurde zur Messung in das FLUOstar Optima Fluorometer (BMG Labtech) eingesetzt. Sodann wurden jeder Probe 100 µl „Luciferase Assay Reagent II“ (Promega) hinzupipettiert. Nach einer Verzögerung von 1 Sekunde wurde die Lumineszenz aus der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion über 10 Sekunden gemessen. Direkt im Anschluss wurden pro Well 100 µl „Stop & Glo Reagent“ (Promega) hinzugefügt. Nach einer erneuten Verzögerung von 1 Sekunde wurde die Lumineszenz aus der Renilla-Luziferase-Reaktion über 10 Sekunden detektiert. Aus den Lumineszenzwerten der einzelnen Luziferase-Reaktionen wurden die Mittelwerte gebildet, welche zur oben beschriebenen Normalisierung ins Verhältnis zueinander gesetzt wurden. Hiernach wurden zur Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung von den Werten der rekombinanten Vektoren diejenigen entsprechend behandelte pGL4.19-Leervektoren abgezogen.

## 2.7 Zellzahlbestimmung

Eine gesteigerte Zellproliferation kann durch die frühere Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten die Differenzierung der Zellen induzieren, wodurch die Expression selektiver Gene in der Zelle gesteigert oder auch gehemmt wird (194). Daher könnte der beobachtete Effekt von Orexin A auf die Expression von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 durch eine gesteigerte Proliferationsrate und damit einhergehende adrenokortikale Differenzierung der NCI-H295R-Zellen verursacht werden. Um eine Auswirkung von Orexin A oder B auf die Proliferation der NCI-H295R-Zellen zu untersuchen, wurde die relative Zellzahl orexinbehandelter Zellen im Vergleich zur Zahl unbehandelter Zellen mit dem „CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ (Promega) bestimmt. Das bei dieser Methode verwendete „CellTiter 96 AQueous One Solution“-Reagenz enthält das Mono-Tetrazoliumsalz MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-

carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), welches in Anwesenheit des Elektronenüberträgers Phenazinethosulfat (PES) von den Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert wird. Dieses kann durch Absorption bei 490 nm quantifiziert werden, wobei sich seine Konzentration zur Stoffwechselaktivität und damit zur Anzahl vitaler Zellen in der Kultur direkt proportional verhält.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/ml in 96-Well-Platten ausgesät, bis zu einer etwa 80 %igen Konfluenz kultiviert und anschließend 12 oder 24 Stunden mit Orexin A ( $1 \mu\text{M}$ ) oder Orexin B ( $1 \mu\text{M}$ ) stimuliert. Direkt nach dieser Behandlung wurden die Zellen pro Well mit 20  $\mu\text{l}$  des MTS-Reagenzes versetzt und erneut 3 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Absorption des Formazans wurde hiernach ohne Verzögerung im FLUOstar Optima Fluorometer (BMG Labtech) bei 490 nm gemessen.

## 2.8 Statistische Auswertung

Die Daten der durchgeführten Versuche wurden wie folgt mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) analysiert:

Die Ergebnisse der Reporterstudien wurden mittels einfaktorieller Varianzanalysen (ANOVA) ausgewertet. Hierzu wurden die Mittelwerte aus jeweils fünf bis sieben unabhängigen Versuchen herangezogen. Zum Vergleich der Mittelwerte aus den einzelnen Behandlungsgruppen mit dem Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe wurde anschließend ein Dunnett's Post-Test durchgeführt. Zur Testung von Mittelwerten gegen einen hypothetischen Wert (z. B. 0) wurde der Einstichproben t-Test angewandt. Innerhalb der Regressionsanalyse wurde zur Untersuchung des Unterschieds zwischen den Steigungen zweier Geraden die in das Programm integrierte zweiseitige Testung der Nullhypothese nach Zar durchgeführt (285). In allen Testverfahren wurden die Ergebnisse als signifikant erachtet, wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % verworfen werden konnte ( $p < 0,05$ ).

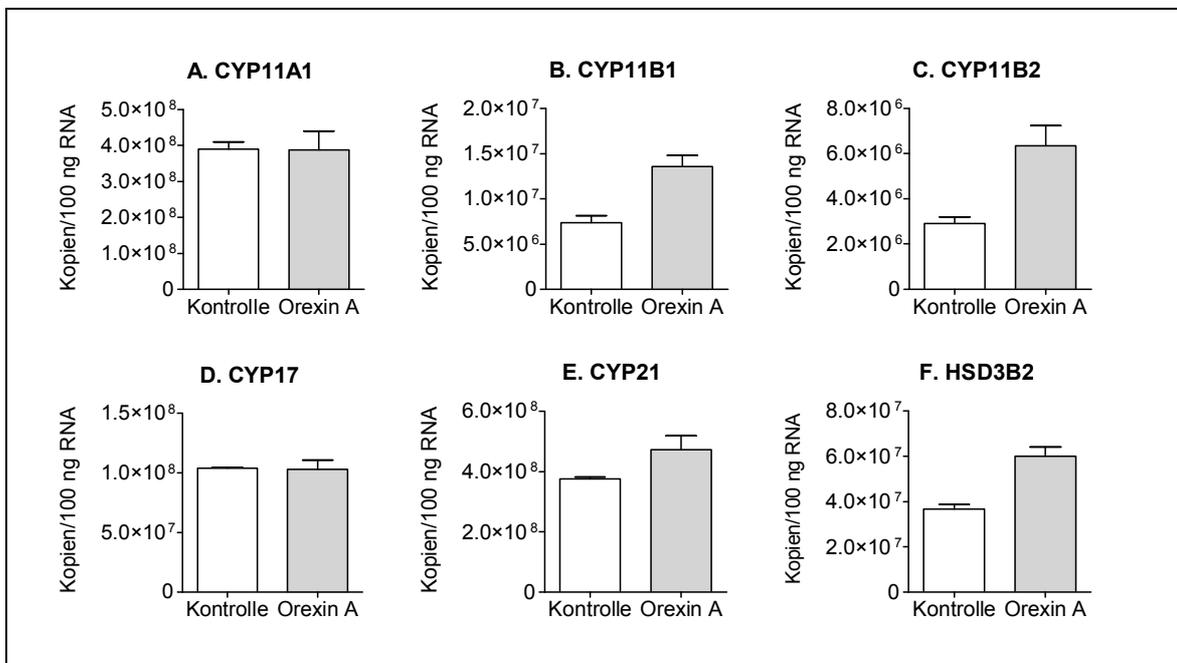
Die GraphPad Prism Software wurde außerdem zur Erstellung sämtlicher Graphen verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Wirkung von Orexin A auf die mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen

##### 3.1.1 Quantitative Auswertung des Effekts von Orexin A auf die mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme

Nach 12 Stunden Behandlung mit Orexin A ( $1 \mu\text{M}$ ) zeigte sich durch Analyse mittels quantitativer „real-time“ PCR ein Anstieg der mRNA-Spiegel von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Hierbei fand sich bei CYP11B1 eine Zunahme der mRNA-Kopien um annähernd 84 % ( $13,6 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$  vs.  $7,4 \times 10^6 \pm 7,8 \times 10^5$  Kopien pro 100 ng Gesamt-RNA) und bei CYP11B2 um ungefähr 120 % ( $6,4 \times 10^6 \pm 8,8 \times 10^5$  vs.  $2,9 \times 10^6 \pm 3,0 \times 10^5$  Kopien pro 100 ng Gesamt-RNA) im Vergleich zur Kopienanzahl in unbehandelten Zellen (s. Abb. 3.1). Die mRNA-Kopien des HSD3B2-Gens nahmen unter Orexin A um etwa zwei Drittel zu ( $60,0 \times 10^6 \pm 4,1 \times 10^6$  vs.

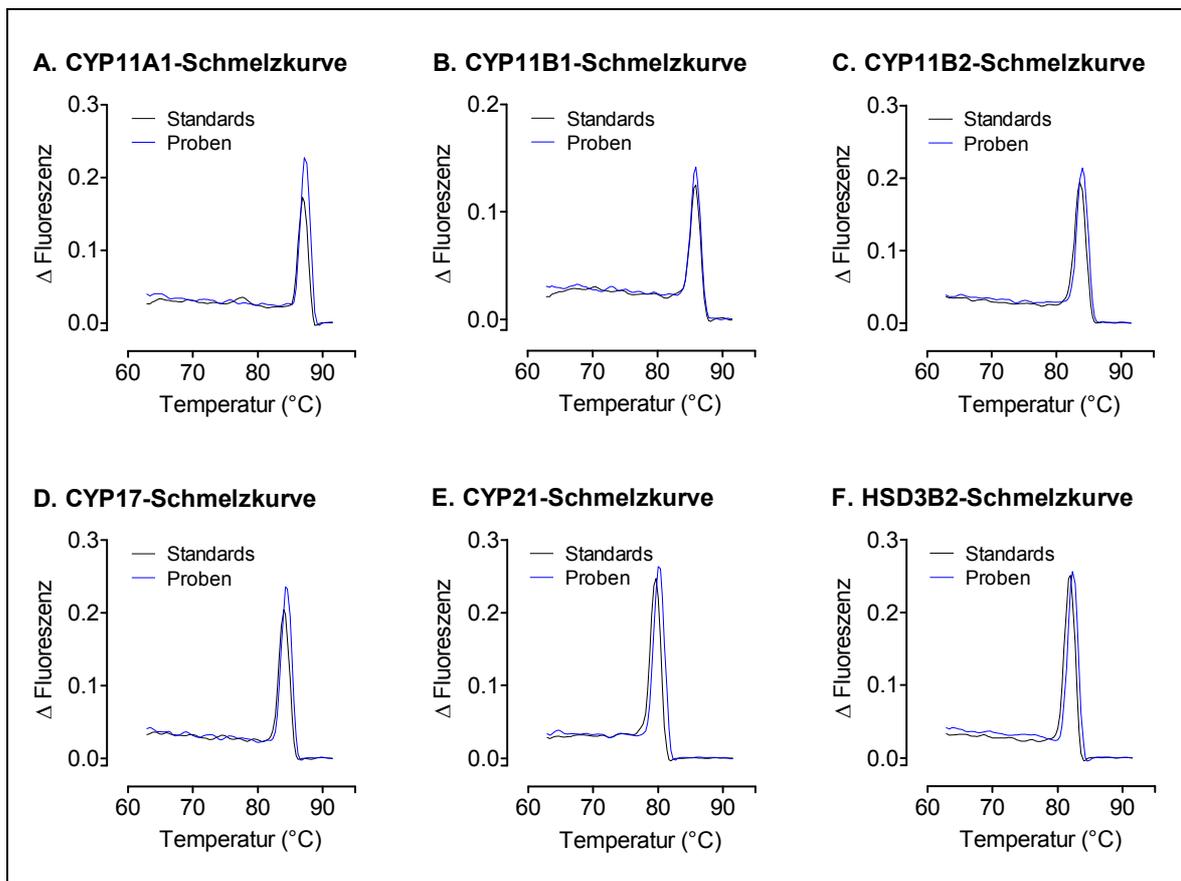


**Abbildung 3.1:** Expressionsmuster der Steroidbiosyntheseenzyme CYP11A1 (A), CYP11B1 (B), CYP11B2 (C), CYP17 (D), CYP21 (E) und HSD3B2 (F) in NCI-H295R-Zellen nach 12 Stunden Orexin A-Behandlung ( $1 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Die mRNA-Kopien jedes Enzyms wurden mittels quantitativer „real-time“ PCR bestimmt und pro 100 ng Gesamt-RNA standardisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

$36,7 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6$  Kopien pro 100 ng Gesamt-RNA), während die Anzahl der mRNA-Kopien von CYP21 im Vergleich zur Kontrollgruppe um ungefähr ein Viertel stieg ( $47,2 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^7$  vs.  $37,5 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$  Kopien pro 100 ng Gesamt-RNA). Die mRNA-Spiegel von CYP11A1 und CYP17 unterlagen hingegen keiner Regulation durch Orexin A. Dieser Versuch bestätigte frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe.

### 3.1.2 Spezifität der amplifizierten cDNA-Fragmente

Die Spezifität der in der „real-time“ PCR amplifizierten cDNA wurde routinemäßig durch DNA-Schmelzkurven-Analyse bestätigt, indem im Anschluss an die „real-time“ PCR die PCR-Produkte stetig erhitzt wurden und währenddessen kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen wurde. Da DNA-Fragmente bestimmter Länge und bestimmter Basenpaar-Zusammensetzung bei einer definierten Temperatur schmelzen, lässt die Form und Position der DNA-Schmelzkurve eine schnelle und sichere Differenzierung der entstandenen PCR-Produkte zu. Bei allen untersuchten Enzymen überlagerten sich die

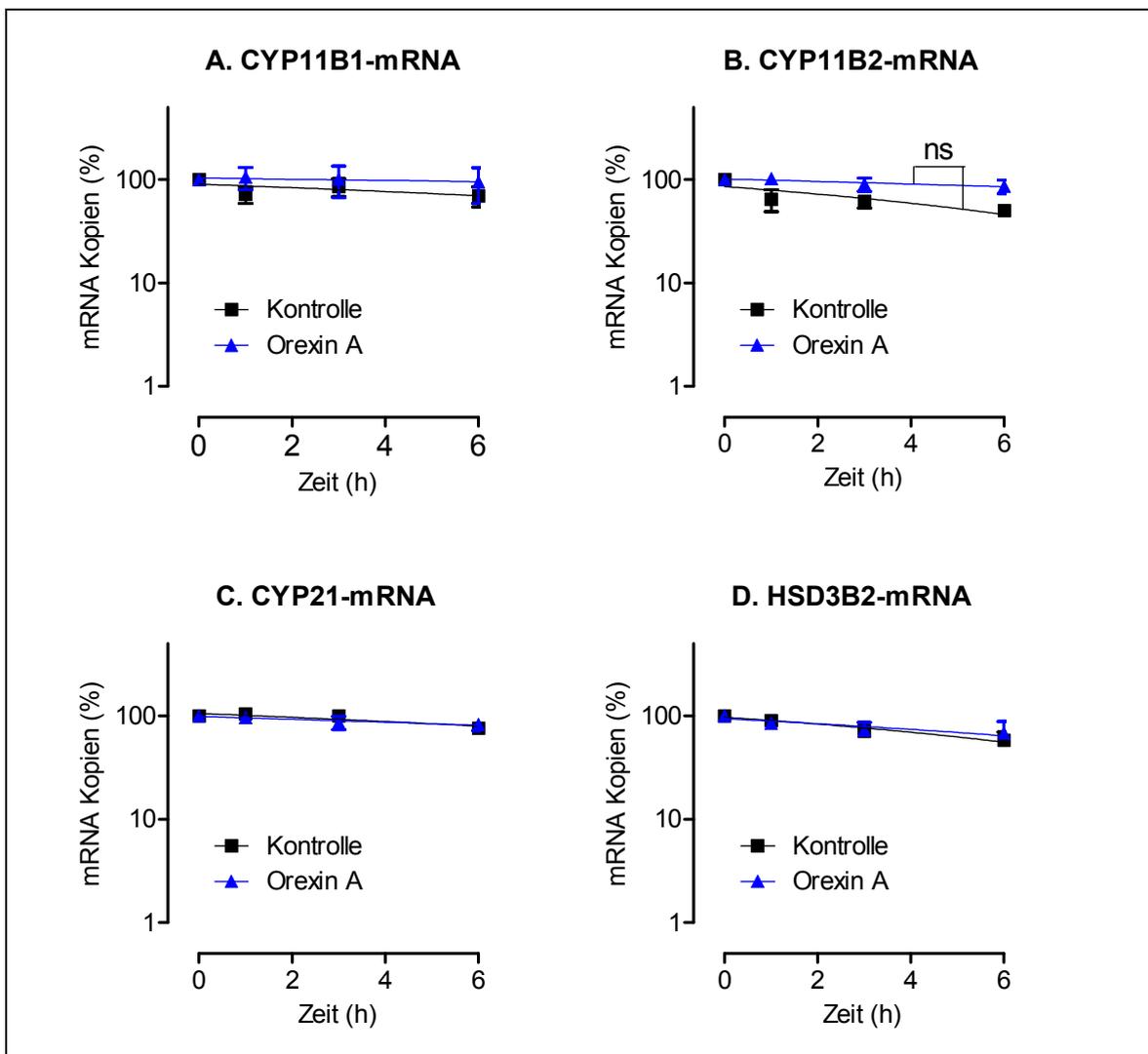


**Abbildung 3.2:** Schmelzkurven der PCR-Produkte der quantitativen „real-time“ PCR von CYP11A1 (A), CYP11B1 (B), CYP11B2 (C), CYP17 (D), CYP21 (E) und HSD3B2 (F). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der 10 Standard-cDNA-Proben und die Mittelwerte der 10 untersuchten cDNA-Proben.

gemittelten Schmelzkurven der cDNA-Standard-Proben und der zu analysierenden Proben fast vollständig, wodurch auf eine Übereinstimmung der amplifizierten DNA-Fragmente geschlossen werden konnte (s. Abb. 3.2).

### 3.1.3 Einfluss von Orexin A auf die mRNA-Stabilität der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2

Zur Feststellung der Ursache des mRNA-Spiegelanstiegs von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 unter Orexin A wurde der mRNA-Abbau dieser Enzyme nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D evaluiert. Hierzu wurden die mRNA-Kopien der Enzyme in einer über 12 Stunden mit Orexin A (1  $\mu$ M) vorbehandelten Gruppe und in



**Abbildung 3.3:** Verlauf der relativen mRNA-Spiegel der Enzyme CYP11B1 (A), CYP11B2 (B), CYP21 (C) und HSD3B2 (D) nach Transkriptionsblockade mit Actinomycin D (5  $\mu$ g/ml) über 6 Stunden in einer 12 Stunden mit Orexin A (1  $\mu$ M) vorbehandelten Gruppe im Vergleich zu einer unehandelten Kontrollgruppe. Der prozentuale Abbau der mRNA-Kopien ist als Regressionsgerade durch die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehler dargestellt. ns: nicht signifikant

einer unbehandelten Kontrollgruppe mittels quantitativer „real-time“ PCR über sechs Stunden nach Zugabe von Actinomycin D (5 µg/ml) beobachtet (s. Abb. 3.3). Die mRNA-Kopien zum Untersuchungsbeginn (0 Stunden) wurde in allen Gruppen gleich 100 % gesetzt und die Kopienanzahlen zu den späteren Zeitpunkten im Verhältnis hierzu berechnet. Mittels linearer Interpolation wurden Regressionsgeraden durch die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen gelegt, deren Steigungen somit den Abbaugeschwindigkeiten der mRNA in Prozent pro Stunde entsprechen. Die innerhalb der Regressionsanalyse durchgeführte zweiseitige Testung der Nullhypothese, die Steigungen der Geraden seien identisch, ergab für keines der Enzyme einen signifikanten Unterschied zwischen der Abbaugeschwindigkeit der jeweiligen mRNA unter Orexin A-Behandlung und unter Kontrollbedingungen. Ein geringer Unterschied in der Geschwindigkeit der mRNA-Degradierung fand sich bei CYP11B2 ( $-6,64 \pm 2,29$  vs.  $-2,73 \pm 1,75$  Prozent mRNA-Kopien pro Stunde), wobei sich auch diese Differenz als nicht signifikant erwies ( $p = 0,19$ ).

### **3.2 Promotorklonierung und Konstruktion von Reporter-genvektoren**

Um zu untersuchen, ob Orexine die mRNA-Spiegel von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 durch eine erhöhte Transkription der entsprechenden Gene steigern, wurde die Aktivität der Promotoren dieser Gene unter Orexin-Behandlung in Reporter-genstudien analysiert. Hierzu mussten die Promotorabschnitte amplifiziert, kloniert und in geeignete Expressionsvektoren eingebaut werden, die nach Überprüfung der Sequenz zur Aktivitätsmessung im  $\beta$ -Laktamase- oder Dual-Luziferase-Reporter-gen-system eingesetzt werden konnten. Zur Durchführung der  $\beta$ -Laktamase-Reporter-genstudien wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vier verschiedene Abschnitte des HSD3B2-Promotors in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Reporter-genvektor kloniert (s. Kap. 2.4.3). Für die Dual-Luziferase-Reporter-genstudien sollten die Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in den pGL4.19-Reporter-genvektor kloniert werden. Da eine direkte Klonierung in diesen Vektor jedoch diffizil und meist sehr ineffizient ist, wurden die jeweiligen Promotorabschnitte in einem Zwischenschritt zunächst in den pCR4-TOPO-TA-Vektor eingebaut und aus diesem anschließend durch Restriktion und erneute Klonierung in den Expressionsvektor pGL4.19 überführt.

### 3.2.1 Optimale Bindungstemperatur der Primerpaare und spezifische Amplifikation der DNA-Fragmente

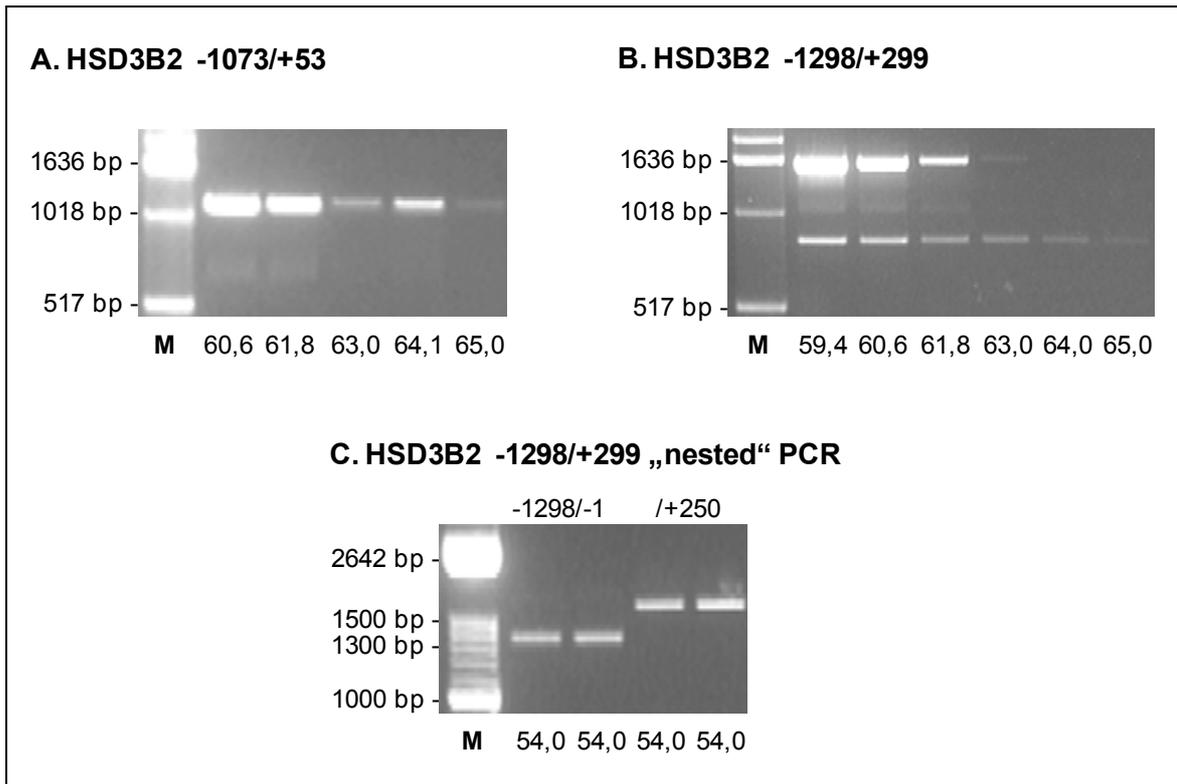
Für die Synthese der Promotorabschnitte von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 wurden die in Tabelle 2.2 angegebenen Primerpaare eingesetzt. Zur empirischen Bestimmung der optimalen Temperatur für die Bindung der Promotor-Primer an die jeweilige Matrizen-DNA wurde für jedes Primerpaar eine PCR mehrerer identischer Reaktionsansätze durchgeführt, die während der Primeranlagerung einen Temperaturgradienten aufwies. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Kriterien zur Bestimmung der optimalen Bindungstemperatur waren eine möglichst hohe PCR-Produktausbeute sowie gleichzeitig eine möglichst spezifische Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Bestand zwischen den Banden der DNA-Fragmente bei unterschiedlichen Temperaturen kein klar ersichtlicher Unterschied, wurde die höchste Temperatur als Optimum gewählt, da das Risiko unspezifischer Amplifikationen grundsätzlich mit steigender Temperatur abnimmt.

#### **Primer der Promotorfragmente für den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor**

In den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausschließlich der Promotor von HSD3B2 kloniert. Da der rekombinante Klon mit dem zunächst amplifizierten Promotorfragment von -1073 bis +53 bp in den anschließend durchgeführten  $\beta$ -Laktamase-Reporterstudien eine sehr geringe Aktivierbarkeit zeigte, wurden sukzessive drei weitere Promotorabschnitte vervielfältigt: von -1298 bis +299 bp, von -1298 bis -1 bp sowie von -1298 bis +250 bp. Das Segment von -1298 bis +299 bp diente aufgrund des darin enthaltenen Start-Codons (s. Abb. 2.2) ausschließlich als Matrize für eine „verschachtelte“ PCR mit den Primerkombinationen S -1298/-1 AS und S -1298/+250 AS und wurde nicht in Reporterstudien eingesetzt.

Die in Abbildung 3.4 A dargestellte Gelelektrophorese verdeutlicht, dass die optimale Bindungstemperatur für das HSD3B2-Promotor-Primerpaar S -1073/+53 AS nach den oben genannten Kriterien bei 60,6 °C lag. In allen Ansätzen zeigte sich eine einzelne Bande der erwarteten Länge von 1126 bp. Hingegen lag die optimale Temperatur während der Primeranlagerung für das Primerpaar S -1298/+299 AS bei 59,4 °C (s. Abb. 3.4 B). Auch bei diesem Primerpaar zeigten sich die Banden der errechneten Größe von 1597 bp, jedoch wurde hier zusätzlich ein unspezifisches DNA-Fragment mit einer Länge von etwa

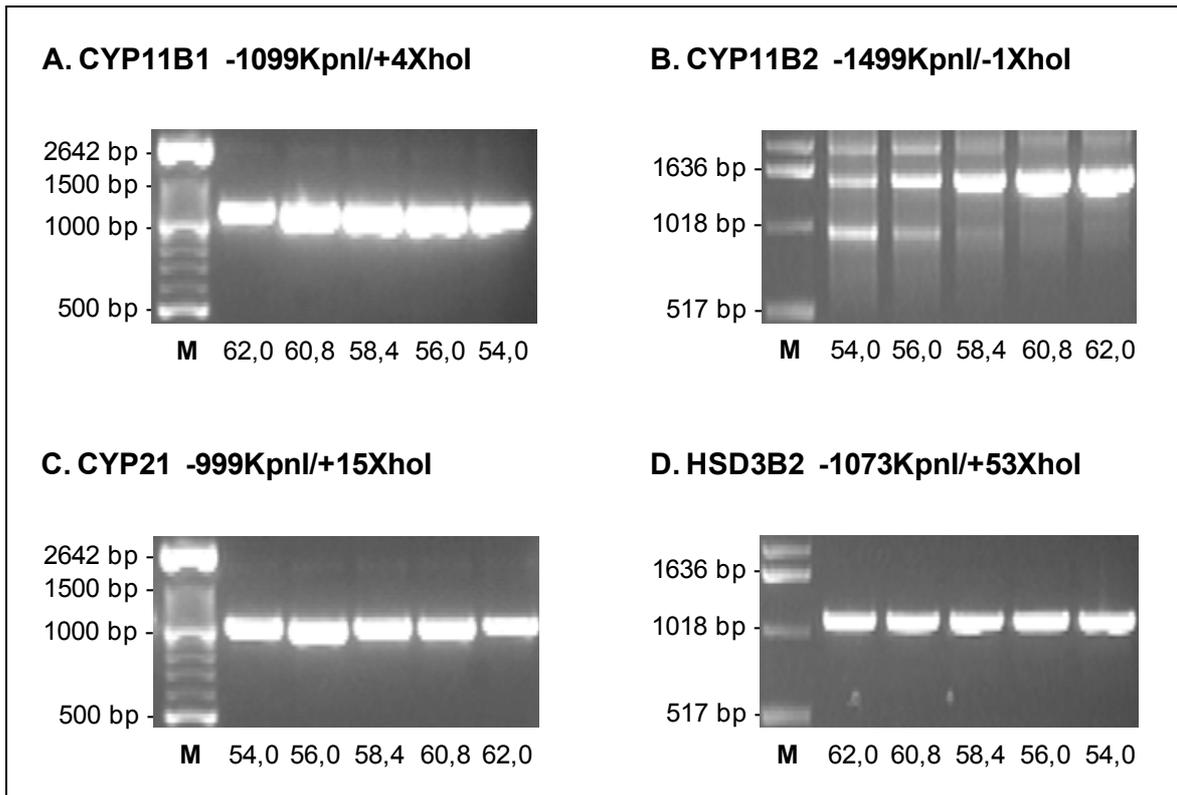


**Abbildung 3.4:** Agarosegelelektrophoresen der RT-PCR-Temperaturoptimierungen mit den HSD3B2-Promotor-Primern zur Synthese von Promotorabschnitten für die Klonierung in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor. Die Primer wurden in den Kombinationen S -1073/+53 AS (A), S -1298/+299 AS (B) sowie S -1298/-1 AS und S -1298/+250 AS (C) eingesetzt. Der DNA-Größenstandard (M) diente zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente. Am unteren Bildrand finden sich jeweils die Temperaturen in °Celsius.

800-900 bp vervielfältigt, welches im Vergleich zum gewünschten Fragment allerdings nur in einer geringfügigen Menge amplifiziert worden war. Die verschachtelte PCR des HSD3B2-Promotors mit den Primerkombinationen S -1298/-1 AS sowie S -1298/+250 AS konnte aufgrund der hohen Konzentration der Matrizenstränge im Ansatz bei dieser Methode ohne weitere Testung direkt bei 54,0 °C durchgeführt werden (s. Abb. 3.4 C). Die Gelelektrophorese bestätigte die spezifische Amplifikation singulärer DNA-Fragmente der erwarteten Größen von 1297 bp bzw. 1548 bp.

#### **Primer der Promotorabschnitte für den pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektor**

Zur Analyse im Dual-Luziferase-Reportersystem sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in den pCR4-TOPO-TA-Vektor und anschließend in den pGL4.19-Reportervektor kloniert werden. Die PCR des CYP11B1-Promotors mit dem Primerpaar S -1099KpnI/+4XhoI AS zur Synthese eines Fragments für die anschließende Ligation in den pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektor verlief nach den genannten Kriterien bei einer Bedingung von 56,0 °C optimal (s. Abb. 3.5 A). Bei allen Temperaturen zeigte sich eine einzelne, spezifische



**Abbildung 3.5:** Agarosegelelektrophoresen der RT-PCR-Temperaturoptimierungen mit den CYP11B1- (A), CYP11B2- (B), CYP21- (C) und HSD3B2-Promotor-Primern (D) zur Synthese von Promotorfragmenten für die Klonierung in den pCR4-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektor. Die Primer sind in der Reihenfolge sense Primer/antisense Primer angegeben. Der DNA-Größenstandard (M) diente zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente. Am unteren Bildrand sind jeweils die Temperaturen in °Celsius angegeben.

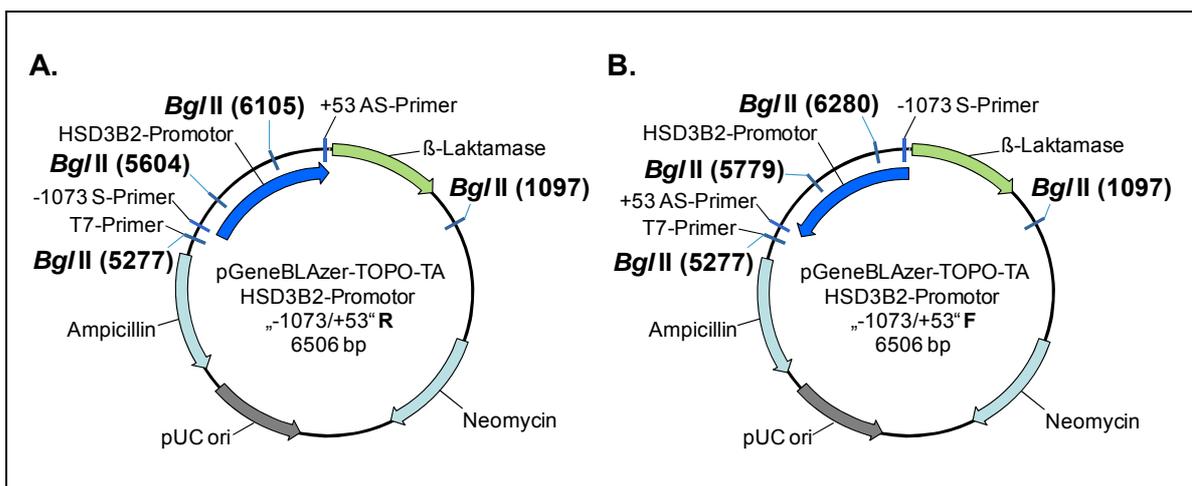
Bande der kalkulierten Größe von 1115 bp. Bei der Primerkombination S -1499KpnI/-1XhoI AS für den CYP11B2-Promotor ergaben sich die besten Resultate bei einer Bindungstemperatur von 62,0 °C (s. Abb. 3.5 B). Bei niedrigeren Temperaturen von 54,0-58,4 °C fanden sich im Agarosegel zusätzlich zum erwarteten DNA-Fragment von 1511 bp Länge unspezifische Banden in den Größen von etwa 1000 bp und 2000 bp. Für die PCR des CYP21-Promotors mit den Primern S -999KpnI/+15XhoI AS wurde eine Temperatur von 62,0 °C für die Primerbindung ausgewählt. Wie Abbildung 3.5 C veranschaulicht, fanden sich neben der spezifischen Bande von 1026 bp keine unspezifischen Banden im Agarosegel. Die optimale Bindungstemperatur für die PCR des HSD3B2-Promotors mit der Primerkombination S -1073KpnI/+53XhoI AS lag ebenfalls bei 62,0 °C. Wie aus Abbildung 3.5 D ersichtlich, ließen sich auch hier ausschließlich spezifische Banden der erwarteten Länge von 1138 bp nachweisen.

### 3.2.2 Selektion rekombinanter Vektoren mittels Restriktionsanalyse

Nach dem enzymatischen Einbau der PCR-Produkte in die drei unterschiedlichen Vektoren wurden kompetente Zellen mit diesen transformiert und angezchtet. Um für die weiteren Versuche solche Bakterienklone auswählen zu können, die rekombinante Plasmide mit korrekt eingebautem Promotorelement aufgenommen hatten, wurden die Plasmide der einzelnen Klone aufgereinigt und durch Restriktionsenzyme in Fragmente geschnitten. Durch die Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Fragmente konnte anschließend auf die Struktur der Plasmide rückgeschlossen werden.

#### Selektion rekombinanter pGeneBLAzer-TOPO-TA-Reportergenvektoren

Zur Veranschaulichung des Analyse-Prinzips ist in Abbildung 3.6 beispielhaft die schematische Vektorkarte des ersten der in diesem Kapitel besprochenen rekombinanten Reportergenvektoren mit dem HSD3B2-Promotorfragment von -1073 bis +53 bp in richtiger (3.6 A) sowie falscher (3.6 B) Orientierung dargestellt. In der Abbildung sind die Schnittstellen des hier zur Analyse eingesetzten Restriktionsenzym *Bgl* II dunkel hervorgehoben. Die Vektorkarten aller übrigen rekombinanten Vektoren mit den Schnittstellen der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme finden sich im Anhang (s. Kap. 7.2).

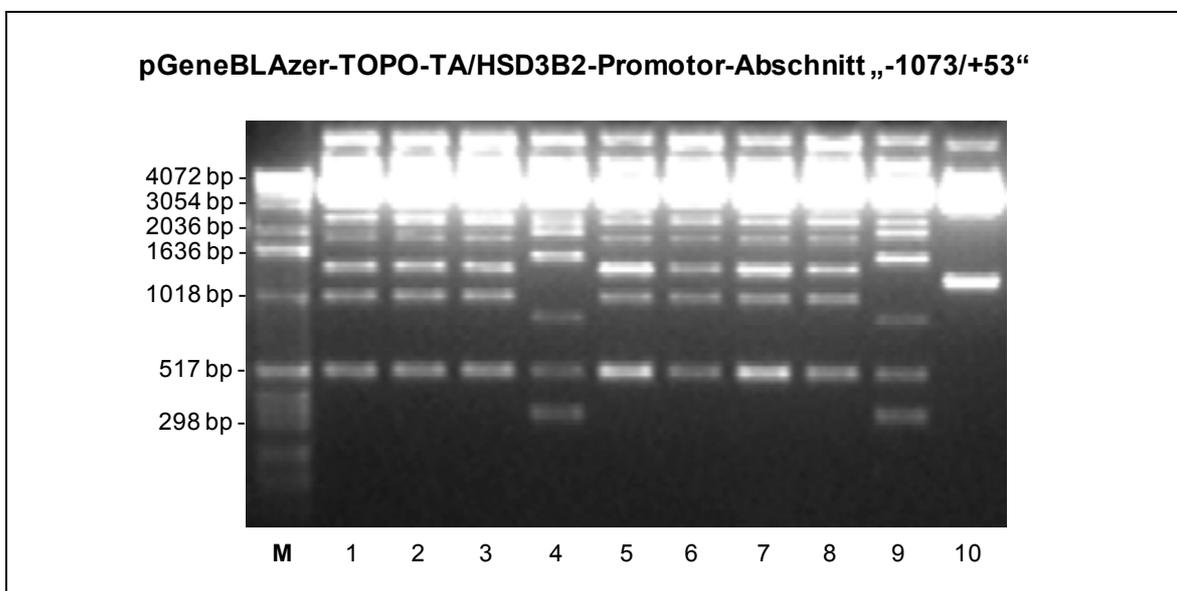


**Abbildung 3.6:** Schema der Schnittstellen des Restriktionsenzym *Bgl* II im rekombinanten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor nach Einbau des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1073 bp bis +53 bp („-1073/+53“) in richtiger (A) und falscher Orientierung (B). F: falsche Orientierung; R: richtige Orientierung

Wie die Abbildung veranschaulicht, entstehen bei der vollständigen Aufspaltung des pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektors mit korrekt eingebautem HSD3B2-Promotorsegment von -1073 bp bis +53 bp insgesamt vier Fragmente von 327, 501, 1498 und 4180 bp

Länge. Bei Aufspaltung eines Plasmids mit falsch orientiertem Promotorabschnitt entstehen hingegen vier Fragmente von 501, 502, 1323 und 4180 bp Länge. Durch unvollständige Aufspaltung können bei beiden Plasmiden zusätzliche Fragmente entstehen, deren Größen den Gesamtlängen von zwei oder mehr benachbarten Einzelfragmenten entsprechen. Im Falle eines nicht rekombinanten Vektors spaltet *Bgl* II den Leervektor von 5380 bp Gesamtlänge nur an den beiden abgebildeten Schnittstellen im Vektorrückgrat bei 1097 bp und 5277 bp auf, wodurch zwei Fragmente von 1200 und 4180 bp Größe entstehen.

Aus der in Abbildung 3.7 dargestellten Restriktionsanalyse der Plasmide aus zehn transformierten Bakterienklonen ließ sich demzufolge schließen, dass die Plasmide in den Spuren 1-3 und 5-8 das DNA-Fragment in falscher und die Plasmide in den Spuren 4 und 9 in richtiger Orientierung eingebaut hatten, während das Plasmid in Spur 10 nicht rekombinant war. Die in den Spuren 1, 2, 4 und 9 analysierten Plasmide wurden zur Überprüfung der Sequenz mittels externer Sequenzierung ausgewählt, um im Falle der Übereinstimmung mit den Originalsequenzen in den anschließend geplanten Reporterstudien eingesetzt zu werden. Die Plasmide mit falsch orientiertem Promotor aus den Spuren 1 und 2 sollten in diesen Untersuchungen als Negativkontrollen dienen.

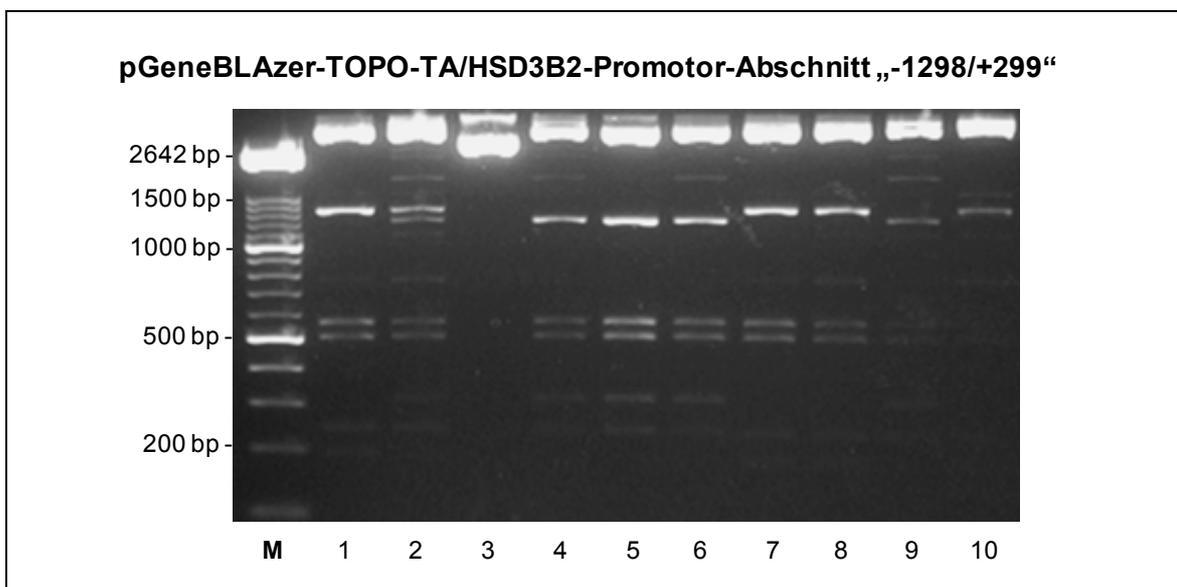


**Abbildung 3.7:** Agarosegelelektrophorese der mit dem HSD3B2-Promotorabschnitt von -1073 bp bis +53 bp ligierten und mit *Bgl* II geschnittenen pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren aus zehn transformierten Bakterienklonen. In den Spuren 1-3 und 5-8 zeigt sich das charakteristische Bandenmuster der rekombinanten Vektoren mit falsch eingebautem Promotor, in den Spuren 4 und 9 das der Vektoren mit korrekt eingebautem Promotorabschnitt und in Spur 10 das Muster eines nicht rekombinanten Vektors. M: DNA-Größenstandard

Nach Ligation des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1298 bp bis +299 bp in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor wurden die Plasmide aus zehn transformierten Bakterienklonen ebenfalls mittels einer Restriktionsanalyse mit *Bgl* II untersucht.

Bei der vollständigen Aufspaltung eines rekombinanten Plasmids mit korrekt eingebautem Promotor entstehen hier DNA-Fragmente von 243, 313, 501, 556, 1188 und 4180 bp Länge, während bei falscher Orientierung des Promotors Fragmente von 192, 243, 501, 556, 1309 und 4180 bp Länge entstehen.

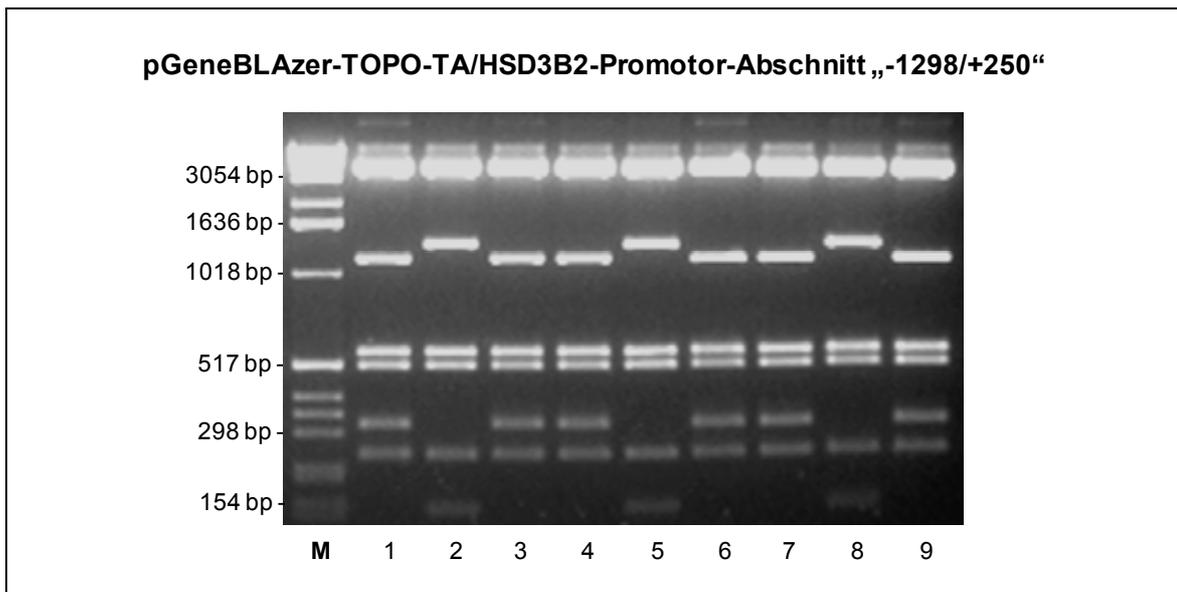
Die in Abbildung 3.8 veranschaulichten Resultate der elektrophoretischen Auftrennung der geschnittenen Plasmide ließen daher den Schluss zu, dass die Plasmide in den Spuren 2, 4, 5, 6 und 9 einen richtig orientierten und die Plasmide in den Spuren 1, 7, 8 und 10 einen falsch orientierten Promotor eingebaut hatten. In den Spuren 2 und 9 zeigten sich außerdem zahlreiche unvollständig aufgespaltene Fragmente. Der Vektor in Spur 3 war nicht rekombinant, da hier ausschließlich die für einen aufgespaltenen Leervektor charakteristischen Banden von 2801 und 4180 bp Länge zu erkennen waren. Die in den Spuren 1, 5, 6 und 7 untersuchten Plasmide wurden anschließend extern sequenziert.



**Abbildung 3.8:** Agarosegelelektrophorese der mit dem HSD3B2-Promotorabschnitt von -1298 bp bis +299 bp ligierten und mit *Bgl* II geschnittenen pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren aus zehn transformierten Bakterienklonen. Das Bandenmuster in den Spuren 1, 7, 8 und 10 ist kennzeichnend für rekombinante Vektoren mit falsch orientiertem Promotor, das Muster in den Spuren 2, 4, 5, 6 und 9 für solche mit korrekt eingebautem Promotor und das in Spur 3 für nicht rekombinante Vektoren. M: DNA-Größenstandard

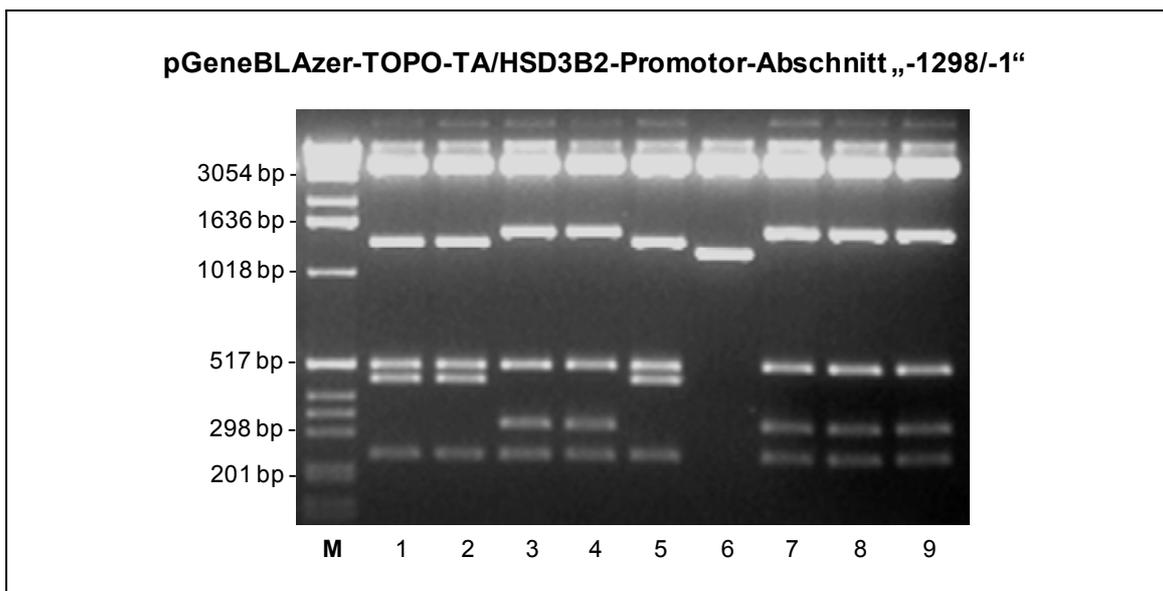
Das mittels verschachtelter PCR hergestellte HSD3B2-Promotorfragment von -1298 bp bis +250 bp wurde ebenfalls in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor kloniert. Die aufgereinigten Plasmide aus neun transformierten Bakterienklonen wurden abermals mit *Bgl* II geschnitten. Wie in Abbildung 3.9 illustriert, entstanden hierdurch aus den

Plasmiden in den Spuren 2, 5 und 8 jeweils sechs Fragmente von 143, 243, 501, 556, 1309 und 4180 bp Länge, die charakteristisch sind für den rekombinanten Vektor mit falsch orientiertem Promotor. Die Banden von 243, 313, 501, 556, 1139 und 4180 bp Größe in den übrigen Spuren entsprechen hingegen dem Bandenmuster des rekombinanten Vektors mit richtig orientiertem Promotor. Die in den Spuren 1 und 2 überprüften Plasmide wurden für die Durchführung der nachfolgenden Versuche vorgesehen.



**Abbildung 3.9:** Agarosegelelektrophorese der mit dem HSD3B2-Promotorabschnitt von -1298 bp bis +250 bp ligierten und mit *Bgl* II geschnittenen pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren aus neun transformierten Bakterienklonen. Das Bandenmuster in den Spuren 2, 5 und 8 entspricht dem typischen Muster rekombinanter Plasmiden mit falsch orientiertem Promotor, während in den übrigen Spuren das Muster rekombinanter Plasmide mit richtig eingebautem Promotor erkennbar ist. M: DNA-Größenstandard

Die mit dem HSD3B2-Promotorsegment von -1298 bp bis -1 bp ligierten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren wurden nach der Aufreinigung aus neun transformierten Bakterienklonen mit *Bgl* II geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 3.10). Die Fragmente der Längen 243, 449, 501, 1309 und 4180 bp in den Spuren 1, 2 und 5 stimmen mit dem Muster rekombinanter Vektoren mit falsch eingebautem Promotor überein, während die Fragmente der Längen 243, 313, 501, 1445 und 4180 bp in den Spuren 3, 4, 7, 8 und 9 rekombinanten Vektoren mit korrekt eingebautem Promotor zuzuordnen sind. Das Plasmid in Spur 6 war nicht rekombinant. Die in den Spuren 5 und 9 analysierten Plasmide wurden für die externe Sequenzierung ausgewählt.

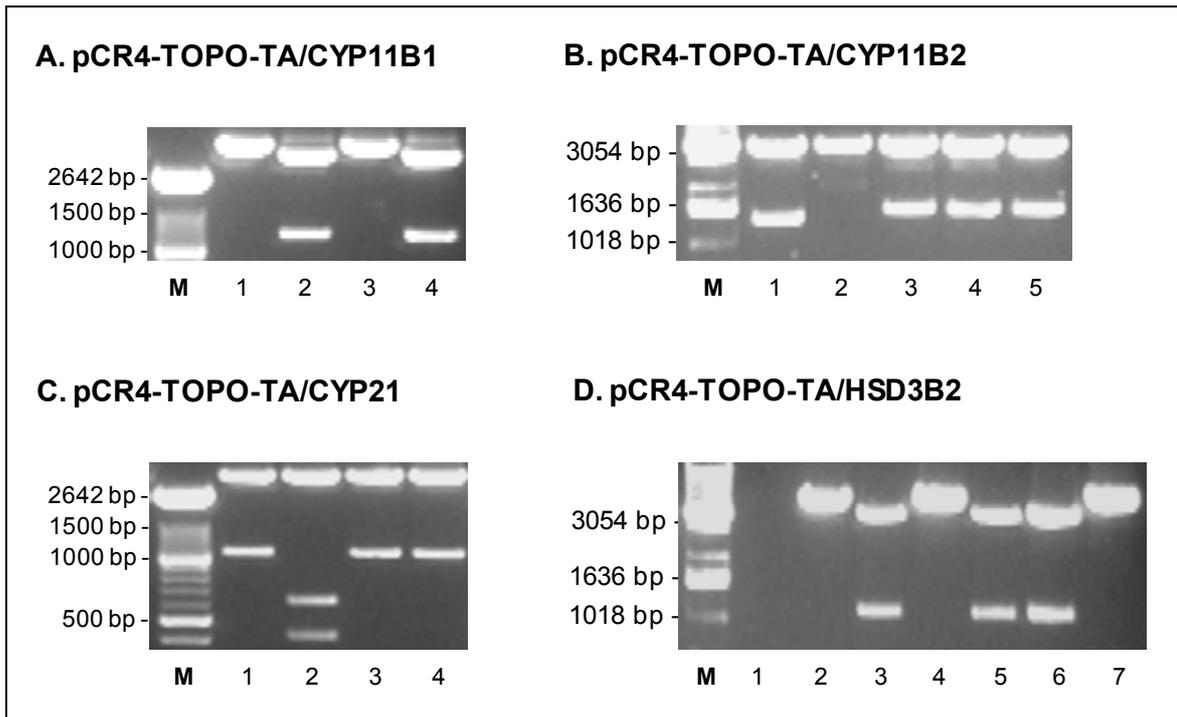


**Abbildung 3.10:** Agarosegelelektrophorese der mit dem HSD3B2-Promotorabschnitt von -1298 bp bis -1 bp ligierten und mit *Bgl* II geschnittenen pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren aus neun transformierten Bakterienklonen. In den Spuren 1, 2 und 5 lässt sich das charakteristische Bandenmuster des rekombinanten Plasmids mit falsch orientiertem Promotorabschnitt erkennen, in den Spuren 3 und 4 sowie 7-9 das Muster des Plasmids mit korrekt eingebautem Promotorabschnitt und in Spur 6 das eines nicht rekombinanten Vektors. M: DNA-Größenstandard

### Selektion rekombinanter pCR4-TOPO-TA-Vektoren

Die Fragmente der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 wurden zur Überführung in den pGL4.19-Vektor zunächst in den pCR4-TOPO-TA-Vektor ligiert. An die Enden der für die Ligation verwendeten Promotorsegmente waren hierzu die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Xho* I als Bestandteil der entsprechenden Primersequenz angefügt worden (s. Kap. 2.4.3). Im Unterschied zur Untersuchung der pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren wurde die Restriktionsanalyse der pCR4-TOPO-TA-Vektoren ausschließlich auf den Einbau des jeweiligen Promotorsegments beschränkt. Die Orientierung der Fragmente in den rekombinanten Vektoren war nicht von Relevanz, da die Plasmide nicht als eigenständige Reportergenvektoren genutzt wurden.

In Abbildung 3.11 A sind die mit dem CYP11B1-Promotorabschnitt von -1099 bp bis +4 bp ligierten pCR4-TOPO-TA-Vektoren aus vier transformierten Bakterienklonen dargestellt, nachdem sie von *Kpn* I und *Xho* I aufgespalten worden waren. In den Spuren 2 und 4 war zusätzlich zum Vektorrückgrat von 3958 bp Länge ein Fragment in der Größe von 1113 bp zu erkennen, welches dem ausgeschnittenen CYP11B1-Promotorabschnitt entspricht. Die Plasmide in den Spuren 1 und 3 waren dagegen nicht rekombinant, weswegen sich hier eine einzige Bande von 3956 bp Größe nachweisen ließ, die dem nicht linearisierten Leervektor zuzuordnen ist. Das in Spur 4 untersuchte Plasmid wurde zur anschließenden Überführung des Promotorfragments in den pGL4.19-Vektor eingesetzt.



**Abbildung 3.11:** Agarosegelelektrophoresen der mit den CYP11B1- (A), CYP11B2- (B), CYP21- (C) oder HSD3B2-Promotorfragmenten (D) ligierten und mit *Kpn* I und *Xho* I geschnittenen pCR4-TOPO-TA-Vektoren aus vier bis sechs transformierten Bakterienklonen. Die rekombinanten Plasmide aus den Spuren 4 (A), 3 (B), 1 (C) und 6 (D) wurden für die anschließende Überführung des jeweiligen Promotorfragments in den pGL4.19-Vektor ausgewählt. M: DNA-Größenstandard

Abbildung 3.11 B zeigt die mit *Kpn* I und *Xho* I geschnittenen Plasmide aus fünf transformierten Bakterienklonen nach der vorherigen Ligation des Vektors mit dem CYP11B2-Promotorabschnitt von -1499 bp bis -1 bp. In den Spuren 3-5 war hier das typische Bandenmuster der rekombinanten Plasmide mit einer Bande des Vektorrückgrats von 3958 bp Länge und einer Bande des Promotorabschnitts von 1509 bp Länge zu erkennen. Das Plasmid in Spur 2 war nicht rekombinant. In Spur 1 zeigte sich zusätzlich zur Bande des Vektorrückgrats ein kleineres Fragment, welches jedoch kürzer war als das Fragment von 1509 bp Länge in den Spuren 3-5. Es handelte sich bei diesem Fragment somit nicht um den vollständigen Promotorabschnitt. Für die anschließende Klonierung des Promotorabschnitts in den pGL4.19-Vektor wurde das in Spur 3 analysierte Plasmid verwendet.

Die mit dem CYP21-Promotorsegment von -999 bp bis +15 bp ligierten pCR4-TOPO-TA-Vektoren aus vier transformierten Bakterienklonen wurden ebenso mit *Kpn* I und *Xho* I geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt (s. Abb. 3.11 C). Da der CYP21-Promotorabschnitt im Bereich von +6 bis +11 bp für die *Kpn* I-Erkennungssequenz kodiert, kann das durch die Restriktionsenzyme aus dem pCR4-TOPO-TA-Vektor ausgeschnittene Promotorsegment eine Länge von 1018 oder 1024 bp aufweisen. In den Spuren 1, 3 und 4 war das Muster des rekombinanten Plasmids mit einer Bande des eingebauten Promotors

der erwarteten Länge von 1018 bzw. 1024 bp sowie einer Bande des aufgespaltenen Vektors von 3958 bp Länge zu erkennen. Die zwei kleineren Banden des Plasmids in Spur 2 entsprachen hingegen nicht dem intakten Promotorabschnitt. Das Plasmid aus Spur 1 wurde für die Klonierung des Promotorsegments in den pGL4.19-Vektor ausgewählt.

In Abbildung 3.11 D ist das Bandenmuster der mit *Kpn* I und *Xho* I enzymatisch aufgetrennten Plasmide aus sechs transformierten Bakterienklonen nach der vorangegangenen Ligation der Plasmide mit dem HSD3B2-Promotorsegment von -1073 bp bis +53 bp zu sehen. Die Plasmide in den Spuren 2, 4 und 7 konnten von den Restriktionsenzymen nicht in Fragmente aufgespalten werden, was die Schlussfolgerung zuließ, dass es sich hierbei um nicht rekombinante Plasmide handelte. Im Gegensatz hierzu fand sich bei den in den Spuren 3, 5 und 6 untersuchten Plasmiden zusätzlich zur Bande des Vektorrückgrats von 3958 bp Länge die charakteristische Bande von 1136 bp Länge des ausgeschnittenen Promotorabschnitts. Das Plasmid aus Spur 6 wurde für die darauf folgende Klonierung des Promotorsegments in den pGL4.19-Vektor verwendet.

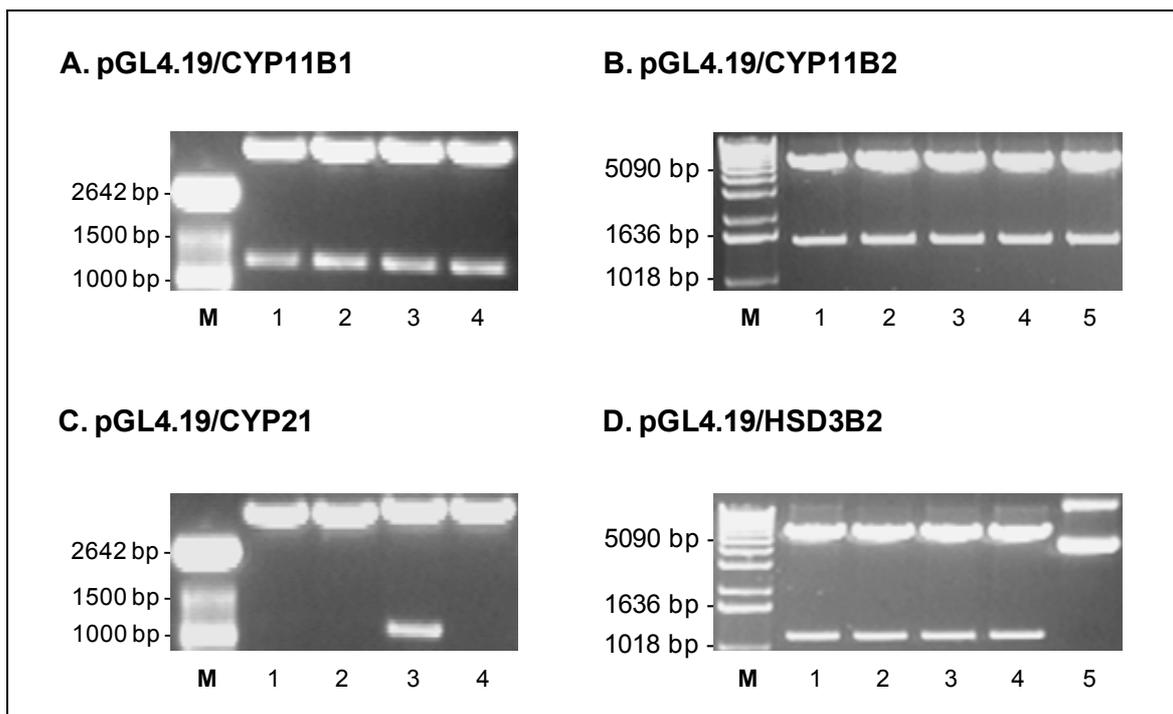
### **Selektion rekombinanter pGL4.19-Reportergenvektoren**

Nach der Aufreinigung der Promotorfragmente von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 aus den ausgewählten pCR4-TOPO-TA-Vektoren wurden diese in pGL4.19-Reportergenvektoren kloniert, die anschließend in kompetente Zellen eingeschleust wurden. Da die Promotorfragmente und die linearisierten pGL4.19-Vektoren an den Enden ihrer Basenpaarstränge komplementäre Schnittstellen aufwiesen, konnten die Promotorfragmente in diese Vektoren ausschließlich in korrekter Orientierung eingebaut werden. In Abbildung 3.12 ist die elektrophoretische Auftrennung der mit *Kpn* I und *Xho* I geschnittenen Plasmide aus je vier oder fünf transformierten Bakterienklonen dargestellt.

Die vier untersuchten Plasmide, die zuvor mit dem CYP11B1-Promotorfragment ligiert worden waren, erwiesen sich sämtlich mit einer für das Promotorsegment charakteristischen Bande von 1113 bp Länge und einer Bande des Vektorrückgrats von 5763 bp Länge als rekombinant (s. Abb. 3.12 A). Das in Spur 4 analysierte Plasmid wurde für die Durchführung der weiteren Versuche ausgewählt und hierzu extern sequenziert.

Die mit dem CYP11B2-Promotorfragment ligierten Plasmide aus fünf Bakterienklonen ließen mit einer Bande des Promotorabschnitts von 1509 bp Länge ebenfalls allesamt das typische Muster des rekombinanten Vektors erkennen (s. Abb. 3.12 B). Das in Spur 1 analysierte Plasmid wurde anschließend extern sequenziert.

Unter den mit dem CYP21-Promotorabschnitt ligierten Plasmiden aus vier transformierten



**Abbildung 3.12:** Agarosegelelektrophoresen der mit den CYP11B1- (A), CYP11B2- (B), CYP21- (C) oder HSD3B2-Promotorfragmenten (D) ligierten und mit *Kpn* I und *Xho* I geschnittenen pGL4.19-Vektoren aus jeweils vier oder fünf transformierten Bakterienklonen. Als rekombinant erwiesen sich die untersuchten Plasmide in den Spuren 1-4 (A), 1-5 (B), 3 (C) und 1-4 (D). M: DNA-Größenstandard

Bakterienklonen fand sich hingegen nur ein rekombinantes Plasmid mit der Bande des Promotorsegments von 1024 bp Länge (s. Abb. 3.12 C). Dieses Plasmid wurde für die nachfolgenden Versuche ausgewählt.

Die Restriktionsanalyse der Plasmide aus sechs transformierten Bakterienklonen nach der vorherigen Ligation der Plasmide mit dem HSD3B2-Promotorfragment ergab das in Abbildung 3.12 D gezeigte Bandenmuster. Während die Plasmide in den Spuren 1-4 das Promotorfragment von 1136 bp Länge aufgenommen hatten, erwies sich das in Spur 5 untersuchte Plasmid als nicht rekombinant. Das in Spur 4 analysierte Plasmid wurde zur Durchführung der anschließenden Experimente ausgewählt.

### 3.2.3 Bestätigung der Sequenzen der ausgewählten Plasmide durch externe Sequenzierung

Zur Bestätigung der durch Restriktionsanalyse ermittelten Ergebnisse wurden die für die Durchführung der anschließenden Versuchsreihen ausgewählten rekombinanten pGeneBLAzer-TOPO-TA- und pGL4.19-Vektoren von den Sequence Laboratories Göttingen an den Übergangsstellen von Vektorrückgrat und eingebautem Promotorabschnitt über eine Länge von etwa 350 bp sequenziert. Es ergab sich in allen

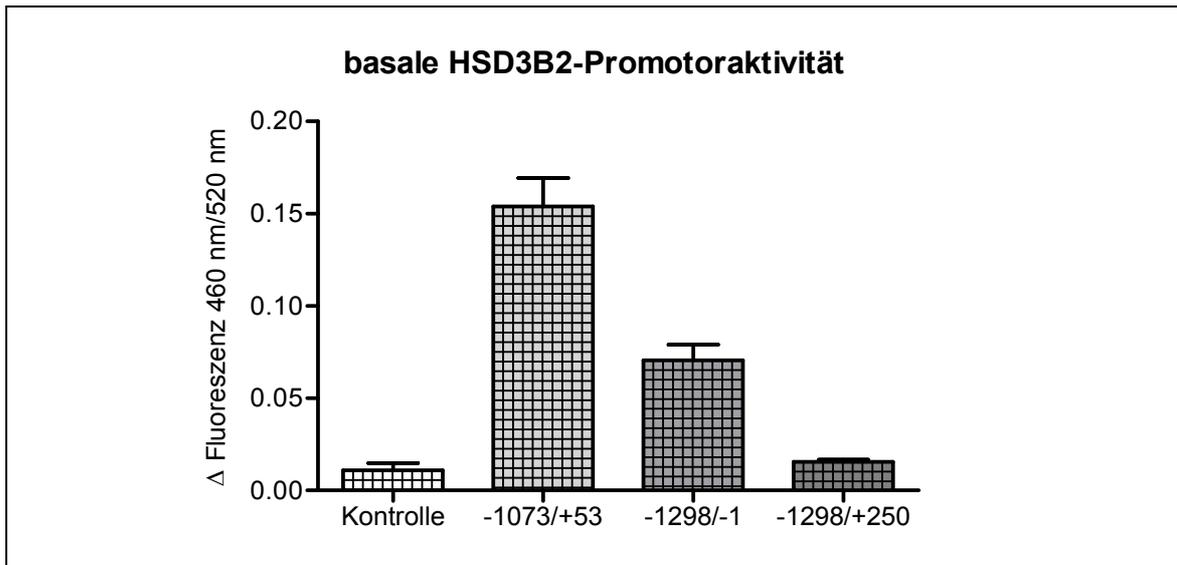
Fällen eine annähernd 100 %ige Übereinstimmung der Sequenzen der eingesandten Plasmide mit den in der GenBank veröffentlichten und durch die Vector NTI Software kombinierten Originalsequenzen des jeweiligen Promotorabschnitts und Vektors. Die von SeqLab ermittelten Teilsequenzen der für die Versuche ausgewählten pGL4.19-Plasmide finden sich in Gegenüberstellung mit den jeweiligen Originalsequenzen im Anhang (s. Kap. 7.3).

### **3.3 Wirkung der Orexine auf die Aktivitäten der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen**

#### **3.3.1 Etablierung des $\beta$ -Laktamase-Reportergensystems zur Untersuchung der Wirkung von Orexinen auf die Aktivität des HSD3B2-Promotors**

Zur Analyse eines potenziellen Effekts der Orexine auf die Aktivität des HSD3B2-Promotors war das  $\beta$ -Laktamase-Reportergensystem zunächst durch einige Voruntersuchungen auf seine Eignung für die geplanten Versuchsreihen zu testen und gegebenenfalls zu optimieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte außerdem der geeignetste der rekombinanten Klone für die anschließenden Versuchsreihen ausgewählt werden. Die Promotoraktivität wurde in diesem System über die Transkription des  $\beta$ -Laktamase-Reportergens bestimmt, die durch die Änderung des Fluoreszenzverhältnisses der Proben von 460 nm zu 520 nm während der 45 Minuten dauernden Messung indirekt quantifiziert werden konnte.

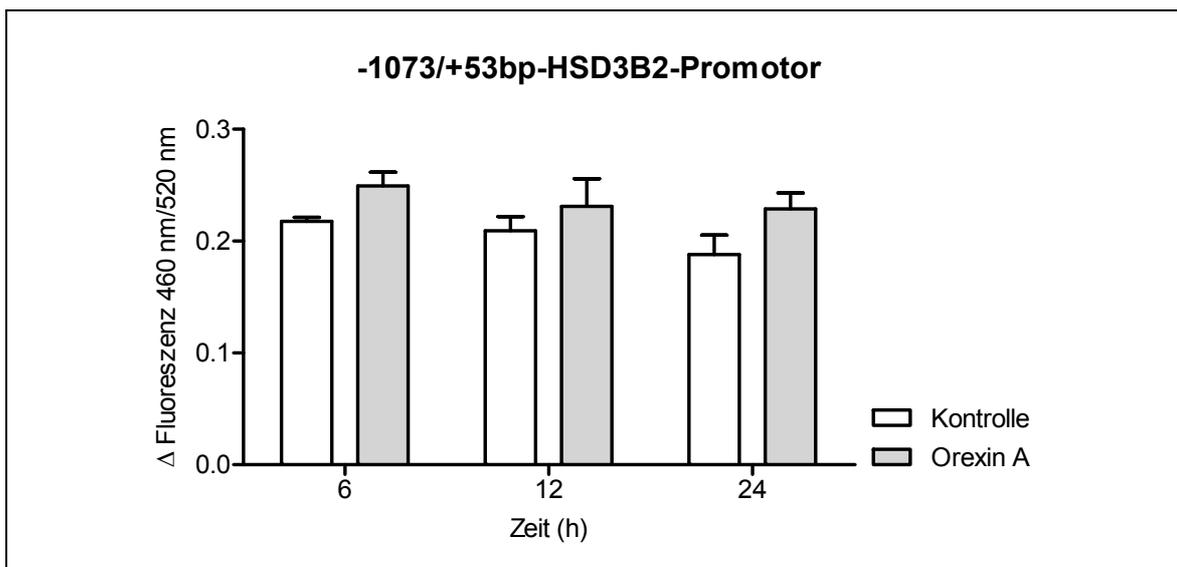
Nach der transienten Transfektion der NCI-H295R-Zielzellen wurde zunächst die Basalaktivität der HSD3B2-Promotorabschnitte in den rekombinanten Vektoren mit derjenigen eines Kontrollvektors mit umgekehrt eingebautem Promotorabschnitt in unbehandelten Zellen verglichen (s. Abb. 3.13). Von allen untersuchten HSD3B2-Promotorabschnitten wies das Promotorsegment von -1073 bp bis +53 bp im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor in unbehandelten Zellen die höchste Grundaktivität auf. Im Vergleich zur Kontrollgruppe fand sich beim Vektor mit diesem Promotorabschnitt eine etwa 14fach höhere basale Expression des nachgeschalteten  $\beta$ -Laktamase-Reportergens ( $0,1538 \pm 0,0154$  vs.  $0,0109 \pm 0,0039$ ). Der HSD3B2-Promotorabschnitt von -1298 bp bis -1 bp besaß im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor gegenüber der Transkription des Reportergens im Kontrollvektor eine ungefähr sechsfach höhere Grundaktivität ( $0,0706 \pm 0,0084$  vs.  $0,0109 \pm 0,0039$ ), während die Aktivität des Fragments von -1298 bp



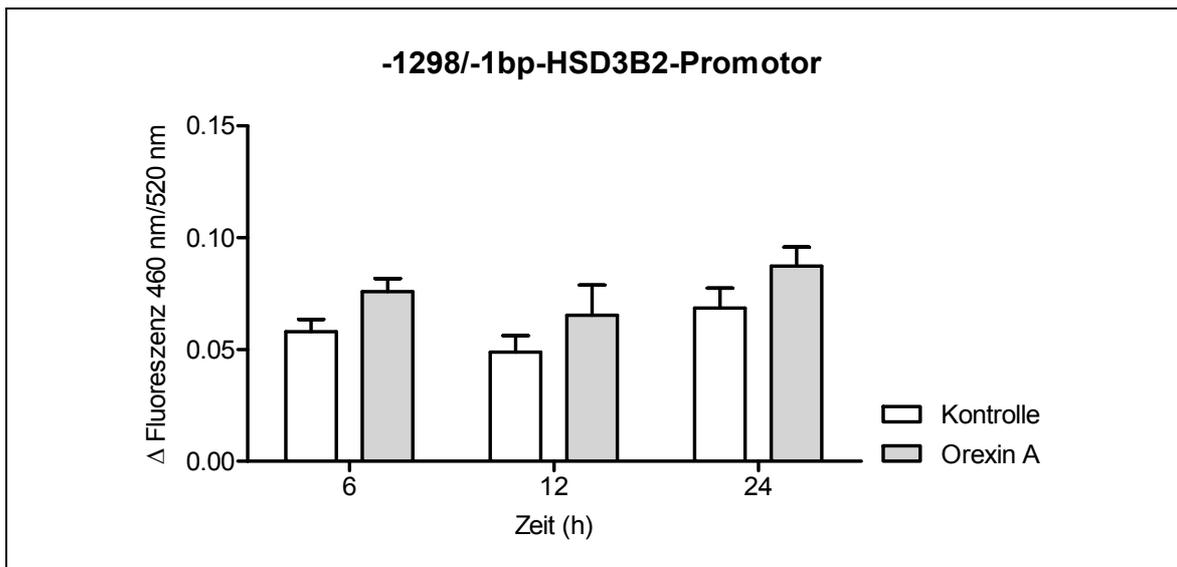
**Abbildung 3.13:** Basale Aktivität der HSD3B2-Promotorabschnitte von -1073 bp bis +53 bp sowie von -1298 bp bis -1 bp und von -1298 bp bis +250 bp im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor im Vergleich zum pGeneBLAzer-TOPO-TA-Kontrollvektor. Dargestellt sind die Zunahmen des Fluoreszenzverhältnisses von 460 nm zu 520 nm während der Messung über 45 Minuten aus einer Doppel- bis Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

bis +250 bp nur etwa 42 % über der des Kontrollvektors lag ( $0,0155 \pm 0,0012$  vs.  $0,0109 \pm 0,0039$ ).

Die Induzierbarkeit der Aktivität des HSD3B2-Promotorfragments von -1073 bp bis +53 bp im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor durch Orexin A ( $1 \mu\text{M}$ ) wurde in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubationszeit im Vergleich zur Aktivität in unbehandelten Kontrollzellen untersucht (s. Abb. 3.14). Zu allen



**Abbildung 3.14:** Zeitkinetik der Aktivität des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1073 bp bis +53 bp im rekombinanten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Reportergenvektor nach 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A ( $1 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Aktivität unter Kontrollbedingungen. Die Promotoraktivität ist angegeben als Änderung des Emissionsverhältnisses von 460 nm zu 520 nm während der Detektion über 45 Minuten aus einer Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

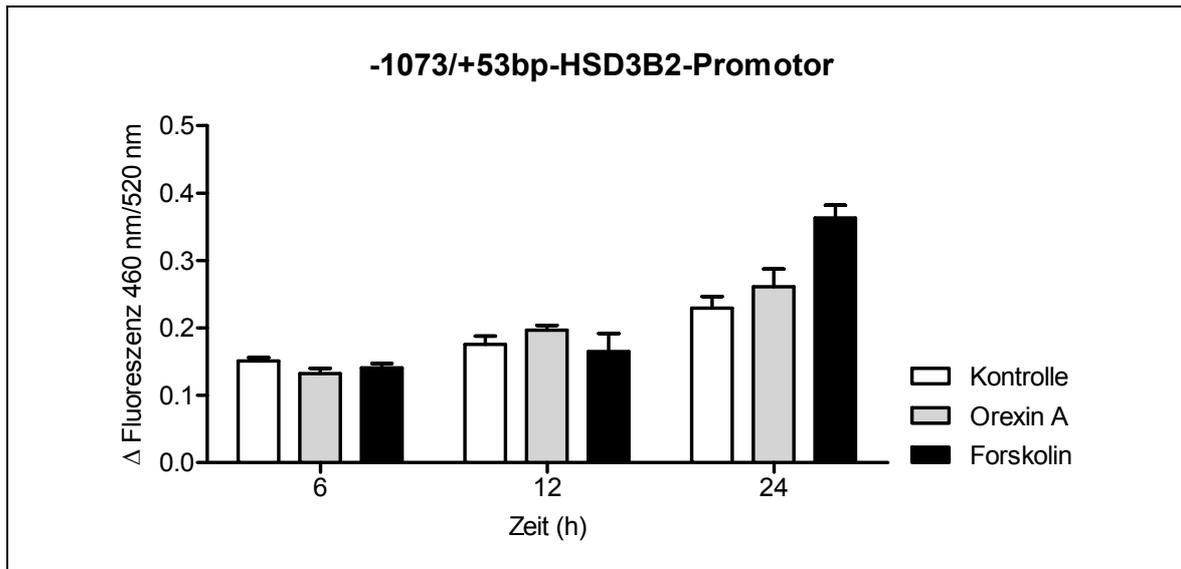


**Abbildung 3.15:** Aktivität des HSD3B2-Promotorfragments von -1298 bp bis -1 bp nach Ligation in den pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor nach 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität des Promotors in unbehandelten Zellen. Dargestellt sind die Zunahmen des Fluoreszenzverhältnisses von 460 nm zu 520 nm während der Messung über 45 Minuten aus einer Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

Zeitpunkten wiesen die Promotoren in den mit Orexin A behandelten Zellen eine höhere Aktivität auf als in den unbehandelten Kontrollzellen. Die größte Steigerung der Aktivität fand sich nach 24 Stunden Orexin A-Behandlung, wobei die Zunahme gegenüber der Kontrollgruppe bei ungefähr 22 % lag ( $0,2286 \pm 0,0144$  vs.  $0,1878 \pm 0,0175$ ).

Die Aktivität des HSD3B2-Promotorfragments von -1298 bp bis -1 bp wurde gleichermaßen analysiert (s. Abb. 3.15). Auch bei diesem Promotorabschnitt lag die Aktivität unter Orexin A-Behandlung konstant über derjenigen in den Kontrollzellen, wobei die maximale Steigerung, die etwa ein Drittel des Kontrollwertes betrug ( $0,0653 \pm 0,0135$  vs.  $0,0488 \pm 0,0074$ ), nach 12 Stunden festzustellen war. Insgesamt lagen die Werte auf einem niedrigeren Grundniveau als beim Promotorsegment von -1073 bp bis +53 bp.

Die Aktivität des HSD3B2-Promotorsegments von -1298 bp bis +250 bp wurde nach 24 Stunden Orexin A-Behandlung (1  $\mu$ M) untersucht (ohne Abb.). Die hierbei gemessenen Veränderungen der Fluoreszenzrelation (Orexin A:  $0,0212 \pm 0,0020$  vs. Kontrolle:  $0,0066 \pm 0,0016$ ) fielen jedoch um mehr als eine Zehnerpotenz geringer aus als die des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1073 bp bis +53 bp und unterschieden sich im Einstichproben t-Test nicht mehr signifikant von Null (Behandlungsgruppe:  $p = 0,06$ ; Kontrollgruppe:  $p = 0,15$ ). Da sich die bei diesem Promotor messbaren Fluoreszenzrelationen demnach nicht signifikant von der Hintergrundstrahlung unterschieden, wurde der zugehörige rekombinante Vektor nicht für weitere Untersuchungen verwendet.



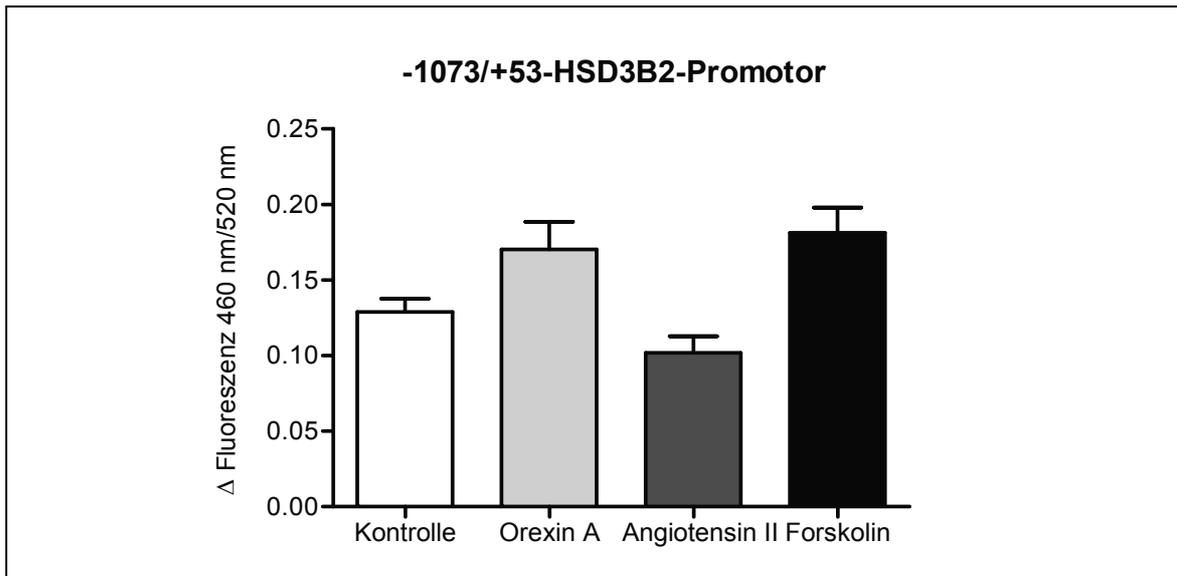
**Abbildung 3.16:** Aktivität des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1073 bp bis +53 bp im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor nach 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) und Forskolin (25  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität des Promotors in unbehandelten Kontrollzellen. Gezeigt sind die Änderungen des Emissionsverhältnisses der Proben von 460 nm zu 520 nm während der 45 Minuten dauernden Messung aus einer Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

In den weiterführenden Versuchen wurde zur zusätzlichen Überprüfung der Induzierbarkeit der Promotoraktivitäten der AC-Aktivator Forskolin als Positivkontrolle eingesetzt, der in dieser Zelllinie als Alternative zu ACTH genutzt wird.

Eine erneute Aktivitätsstudie des HSD3B2-Promotorsegments von -1073 bp bis +53 bp über die Behandlungszeiträume von 6, 12 und 24 Stunden bestätigte sowohl nach 12 Stunden ( $0,1966 \pm 0,0074$  vs.  $0,1755 \pm 0,0121$ ) als auch nach 24 Stunden ( $0,2609 \pm 0,0265$  vs.  $0,2292 \pm 0,0177$ ) eine leichte Steigerung der Promotoraktivität durch Orexin A (1  $\mu$ M) im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Abb. 3.16). Die Positivkontrolle Forskolin (25  $\mu$ M) bewirkte lediglich nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden einen Anstieg der Promotoraktivität, welcher etwa 58 % gegenüber der Kontrollgruppe betrug ( $0,3628 \pm 0,0194$  vs.  $0,2292 \pm 0,0177$ ).

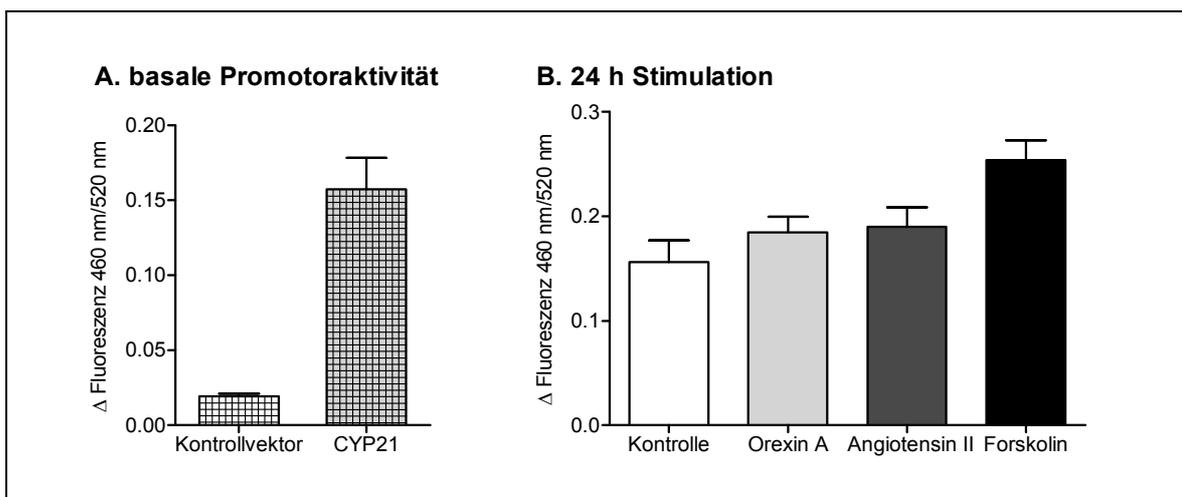
In Abbildung 3.17 sind die Ergebnisse einer wiederholten Analyse der Aktivität des Promotorsegments von -1073 bp bis +53 bp nach 24 Stunden Inkubation mit Orexin A und Forskolin illustriert, wobei hier als weitere Positivkontrolle Angiotensin II (0,1  $\mu$ M) eingesetzt wurde. In diesem Versuch zeigte sich unter Orexin A ( $0,1703 \pm 0,0183$ ) und Forskolin ( $0,1814 \pm 0,0166$ ) eine Zunahme der Promotoraktivität um jeweils etwa ein Drittel im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,1290 \pm 0,0086$ ), während Angiotensin II einen hemmenden Einfluss auf die Promotoraktivität hatte ( $0,1019 \pm 0,0110$ ).

Am Institut lag zusätzlich ein rekombinanter pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektor mit dem Promotorabschnitt des Enzyms CYP21 von -999 bp bis +15 bp vor, der für



**Abbildung 3.17:** Aktivität des HSD3B2-Promotorfragments von -1073 bp bis +53 bp im pGeneBLAzer-TOPO-TA-Reportergenvektor nach 24 Stunden Inkubation mit Orexin A (1  $\mu$ M), Angiotensin II (0,1  $\mu$ M) und Forskolin (25  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Änderungen des Emissionsverhältnisses von 460 nm zu 520 nm während der Detektion über 45 Minuten aus einer Fünffachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

Untersuchungen im  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem zu Verfügung gestellt wurde. In Abbildung 3.18 A ist die basale Promotoraktivität des rekombinanten Vektors im Vergleich zum Kontrollvektor dargestellt (0,1571  $\pm$  0,0210 vs. 0,0193  $\pm$  0,0019), die in etwa der basalen Aktivität des HSD3B2-Promotorfragments von -1073 bp bis +53 bp entspricht. In einer vergleichenden Studie der Promotoraktivität unter 24 Stunden Orexin A- (1  $\mu$ M), Angiotensin II- (0,1  $\mu$ M) oder Forskolin-Behandlung (25  $\mu$ M) führten sowohl



**Abbildung 3.18:** Aktivität des CYP21-Promotors im rekombinanten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Reportergenvektor. A: Basalaktivität des unbehandelten CYP21-pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektors gegenüber einem unbehandelten Kontrollvektor; B: Aktivität des CYP21-Promotors nach 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Angiotensin II (0,1  $\mu$ M) und Forskolin (25  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität unter Kontrollbedingungen. Dargestellt sind die Änderungen des Emissionsverhältnisses von 460 nm zu 520 nm während der Messung über 45 Minuten aus einer Vierfachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

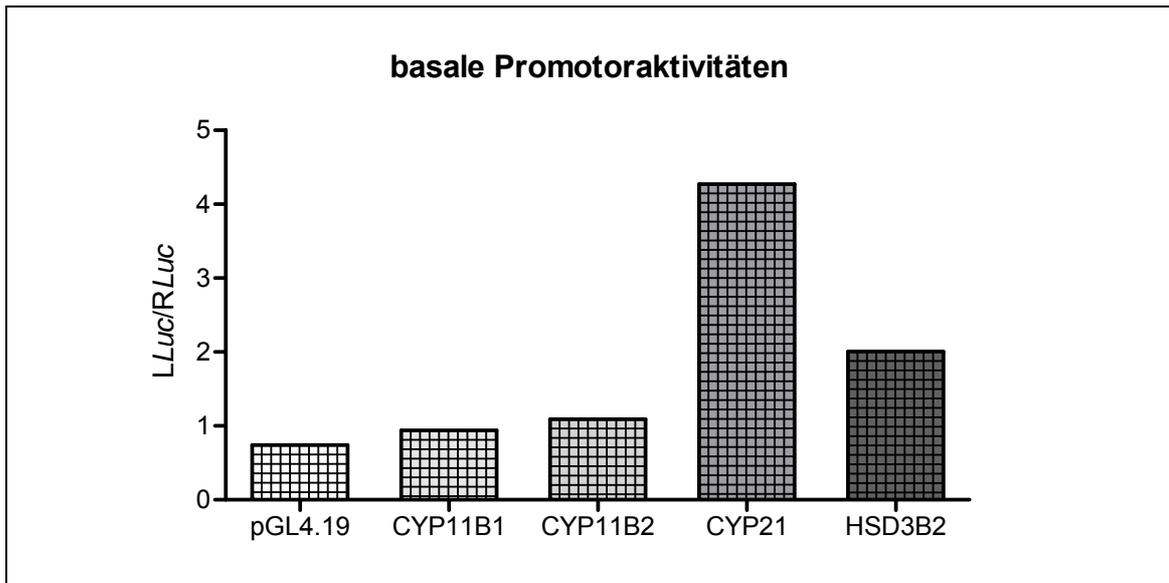
Orexin A ( $0,1848 \pm 0,0151$ ) als auch Angiotensin II ( $0,1902 \pm 0,0185$ ) zu einer Steigerung der Promotoraktivität um etwa ein Fünftel gegenüber der Kontrollgruppe ( $0,1563 \pm 0,0210$ ). Die Stimulation mit Forskolin über 24 Stunden bewirkte bei diesem Promotor eine Aktivitätssteigerung um näherungsweise zwei Drittel ( $0,2540 \pm 0,0191$  vs.  $0,1563 \pm 0,0210$ ).

Weitere in der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche mit den in pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren klonierten Promotoren von CYP11B1, CYP11B2 und CYP21 im  $\beta$ -Laktamase-Reportergensystem lieferten den hier vorgestellten Ergebnissen vergleichbare Resultate (unveröffentlicht, ohne Abb.).

Auch weitere Modifikationen des Versuchsaufbaus, wie die Änderung der verwendeten Konzentrationen, der Zell-Lyse-Methode sowie der Detektionsdauer, führten nicht zu einer verbesserten Aktivierbarkeit der Reportgenvektoren durch die verschiedenen Behandlungen. Die unter den Positivkontrollen Angiotensin II und Forskolin beobachteten Aktivitäten blieben somit deutlich hinter den aus der Literatur bekannten Effekten zurück. Zusammenfassend erwies sich das  $\beta$ -Laktamase-Reportergensystem im Rahmen der Voruntersuchungen weder in Bezug auf seine Reliabilität noch auf seine Sensitivität als geeignete Untersuchungsmethode für die geplanten Versuchsreihen.

### **3.3.2 Optimierung des Luziferase-Reportergensystems zur Untersuchung der Aktivitäten der CYP11B1-, CYP11B2-, CYP21- und HSD3B2-Promotoren in rekombinanten pGL4.19-Vektoren**

Als weiteres Untersuchungssystem wurde das Dual-Luziferase-Reportergensystem ausgewählt, welches zu diesem Zeitpunkt bereits in der Arbeitsgruppe etabliert war und daher lediglich in einigen Vorversuchen für die Untersuchung der Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 optimiert werden sollte. Da sich bereits früh zeigte, dass die Untersuchungsergebnisse mit diesem Reportergensystem eine geringe Streuung aufwiesen und gut reproduzierbar waren, wurden die Vorversuche zwecks größeren Probendurchsatzes bald in Einfachbestimmung durchgeführt. Die Promotoraktivität wurde in diesem System anhand der Expression des Reportergens Leuchtkäfer-Luziferase bestimmt, welche indirekt über die Lumineszenz der Proben quantifiziert wurde. Zur Normalisierung von Ungleichheiten zwischen den einzelnen Proben wurden die Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) auf die

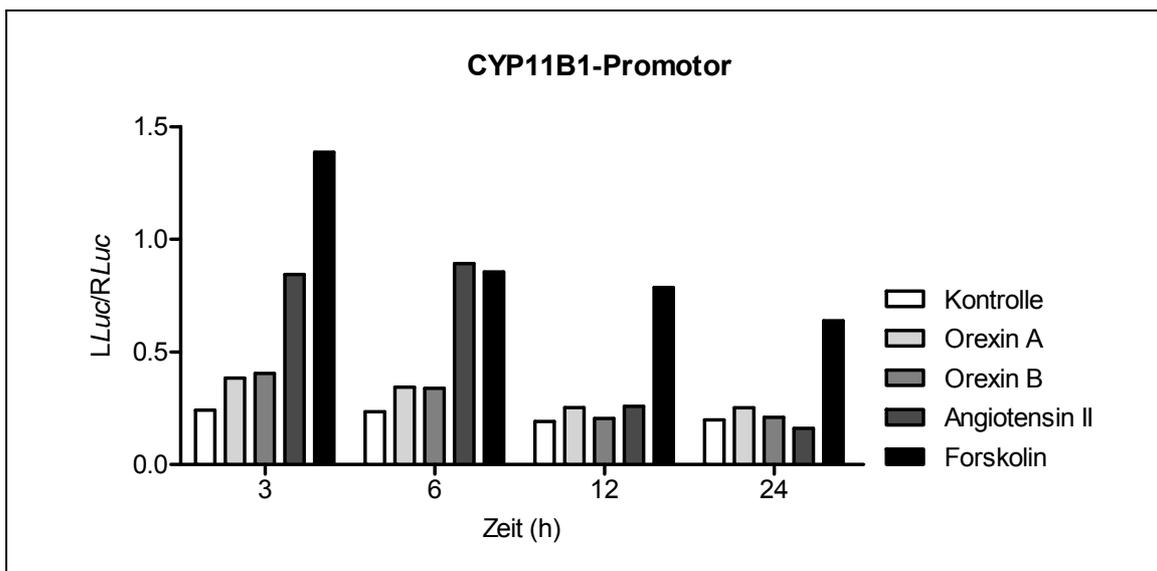


**Abbildung 3.19:** Basalaktivitäten der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 im jeweiligen rekombinanten pGL4.19-Reportergenvektor im Vergleich zum pGL4.19-Leervektor in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) zu denjenigen der Renilla-Luziferase-Reaktion (*RLuc*) aus einer Einfachbestimmung.

Lumineszenzwerte der Kontrollreaktion der koexprimierten Renilla-Luziferase (*RLuc*) bezogen.

In Abbildung 3.19 sind die Basalaktivitäten der Promotoren der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in den entsprechenden rekombinanten pGL4.19-Vektoren im Vergleich zum pGL4.19-Leervektor in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen unter Kontrollbedingungen dargestellt. Während die Aktivität des CYP11B1-Promotors in unbehandelten Zellen nur etwa 27 % über der Hintergrundaktivität des Leervektors lag (0,94 vs. 0,74), verursachte der CYP11B2-Promotor eine Zunahme um annähernd 47 % (1,09 vs. 0,74). Die Promotoren der Enzyme CYP21 und HSD3B2 zeigten mit einer knappen Versechsfach- bzw. Verdreifachung (4,27 bzw. 2,00 vs. 0,74) indessen deutlich höhere Grundaktivitäten im Vergleich zum Leervektor in NCI-H295R-Zellen.

Zur Auswahl geeigneter Untersuchungszeitpunkte für die anschließenden Versuchsreihen wurde mit jedem der rekombinanten Vektoren eine Zeitkinetik über 3, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) und Orexin B (1  $\mu$ M) durchgeführt. Zur Überprüfung der Induzierbarkeit der Promotoraktivitäten wurden die beiden Positivkontrollen Angiotensin II (1  $\mu$ M) und Forskolin (10  $\mu$ M) eingesetzt. Im Gegensatz zu den rekombinanten pGeneBLAzer-TOPO-TA-Vektoren ließ sich bei den im Dual-Luziferase-Reportersystem verwendeten rekombinanten pGL4.19-Reportergenvektoren konstant eine deutliche Aktivierbarkeit der untersuchten Promotoren durch Forskolin und Angiotensin II feststellen. Zur Berücksichtigung der Hintergrundaktivität des Leervektors

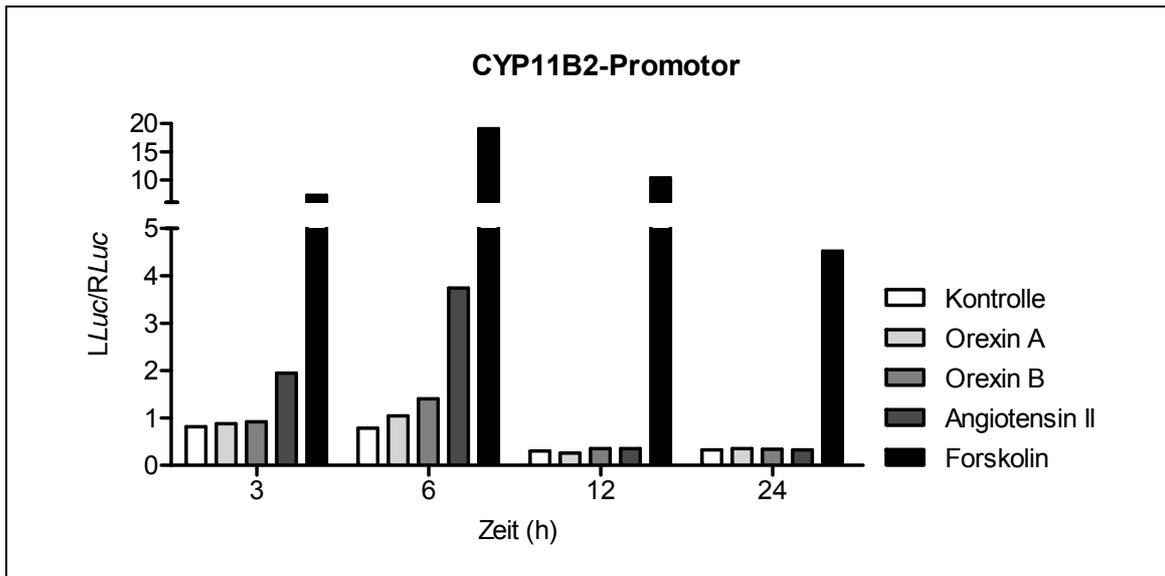


**Abbildung 3.20:** Zeitkinetik der Aktivität des rekombinanten pGL4.19-CYP11B1-Reportergenvektors nach 3, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Orexin B (1  $\mu$ M), Angiotensin II (1  $\mu$ M) oder Forskolin (10  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität des Promotors in unbehandelten Zellen. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) zu denjenigen der Renilla-Luziferase-Reaktion (*RLuc*) aus einer Einfachbestimmung.

wurde nach der oben beschriebenen Normalisierung in jeder Behandlungsgruppe die Aktivität des pGL4.19-Leervektors von derjenigen des rekombinanten Vektors abgezogen. Abbildung 3.20 veranschaulicht die Aktivität des CYP11B1-Promotors im rekombinanten pGL4.19-Reportergenkonstrukt in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen nach 3, 6, 12 und 24 Stunden Inkubationszeit mit Orexin A, Orexin B, Angiotensin II und Forskolin im Verhältnis zur Promotoraktivität in unbehandelten Zellen. Orexin A und B zeigten nach 3 Stunden Inkubationszeit das größte Aktivierungspotential (0,38 bzw. 0,40 vs. 0,24), welches mit Verlängerung der Inkubationszeit kontinuierlich abnahm. Auch Angiotensin II und Forskolin vermochten die Promotoraktivität nach kürzerer Behandlungsdauer stärker zu aktivieren als zu späteren Zeitpunkten.

Der in den pGL4.19-Reportergenvektor klonierte Promotor von CYP11B2 sprach in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen nach 6 Stunden Inkubation auf eine Stimulation mit Orexin A (1,04 vs. 0,79) oder Orexin B (1,40 vs. 0,79) an (s. Abb. 3.21). Die Positivkontrolle Forskolin bestätigte die Aktivierbarkeit des Promotors zu allen Zeitpunkten, während Angiotensin II nur nach 3 und 6 Stunden einen Effekt zeigte.

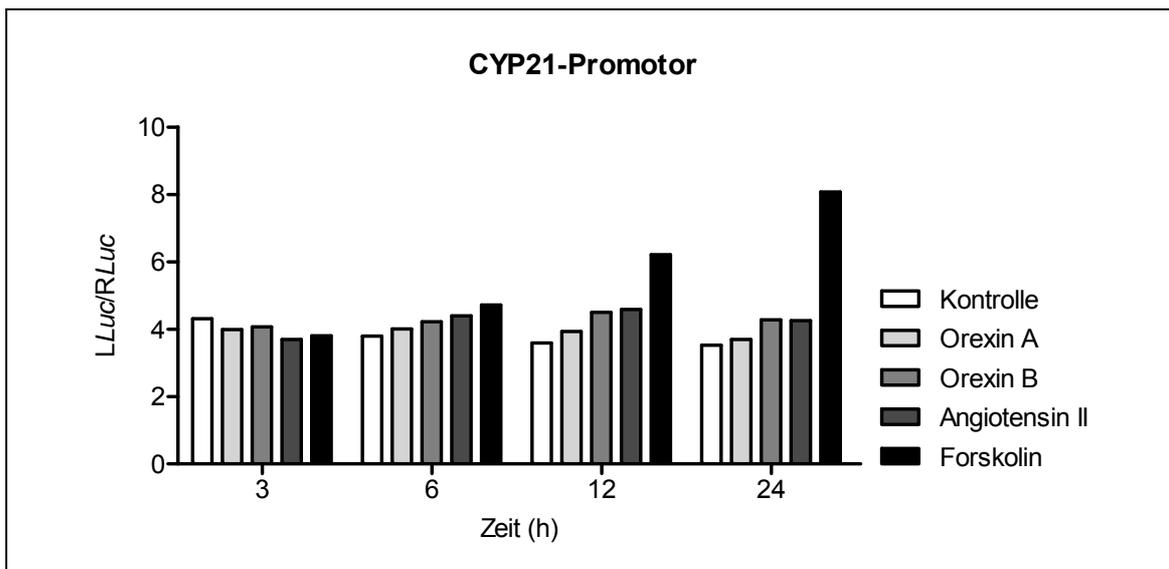
Wie Abbildung 3.22 veranschaulicht, ließ sich der Promotor des Enzyms CYP21 im Vergleich zur Kontrollgruppe am deutlichsten nach 12 Stunden Inkubationszeit durch Orexin A und Orexin B (3,93 bzw. 4,50 vs. 3,60) aktivieren. Gleichermäßen zeigte sich das Maximum der Aktivierbarkeit durch Angiotensin II nach 12 Stunden. Eine Steigerung der



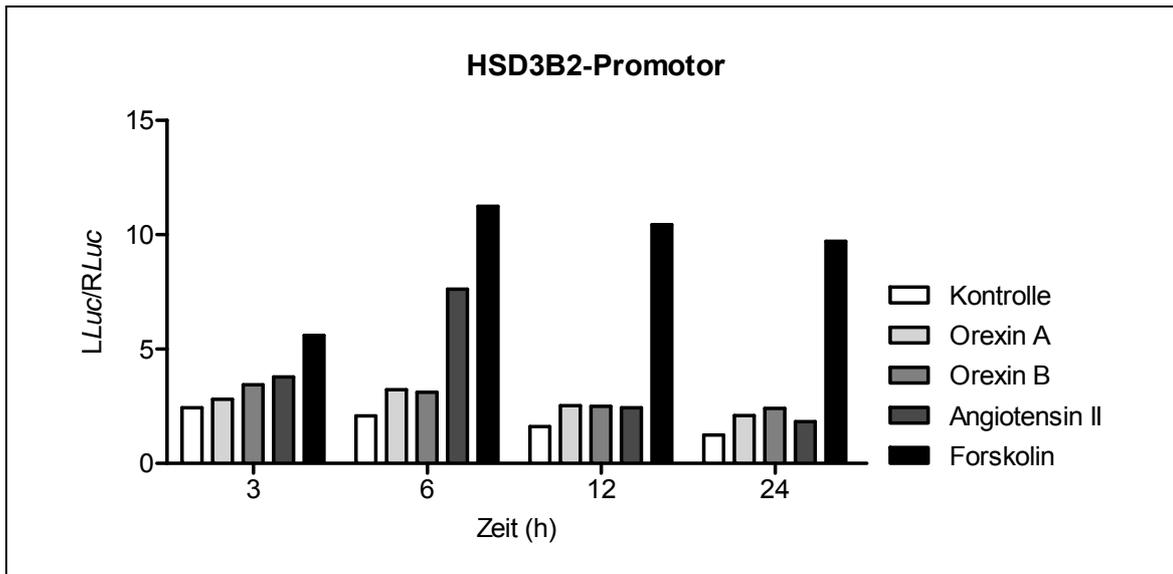
**Abbildung 3.21:** Aktivität des CYP11B2-Promotors im rekombinanten pGL4.19-Reportergenvektor nach 3, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Orexin B (1  $\mu$ M), Angiotensin II (1  $\mu$ M) oder Forskolin (10  $\mu$ M) im Vergleich zur Promotoraktivität unter Kontrollbedingungen. Abgebildet ist das Verhältnis der Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) zu denjenigen der Renilla-Luziferase-Reaktion (*RLuc*) aus einer Einfachbestimmung.

Promotoraktivität durch Forskolin war in ansteigendem Maß nach 6, 12 und 24 Stunden zu verzeichnen.

Der rekombinante HSD3B2-Reportergenvektor zeigte zu allen Zeitpunkten eine Aktivierbarkeit durch Orexin A und Orexin B. Nach 6 Stunden Inkubation wies der Promotor eine hohe Stimulierbarkeit durch alle Substanzen auf (Orexin A: 3,22 bzw. Orexin B: 3,11 vs. Kontrolle: 2,08). Während die Positivkontrolle Angiotensin II



**Abbildung 3.22:** Zeitkinetik der Aktivität des CYP21-Promotors im pGL4.19-Vektor nach 3, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Orexin B (1  $\mu$ M), Angiotensin II (1  $\mu$ M) oder Forskolin (10  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität des Promotors in unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) zu denjenigen der Renilla-Luziferase-Reaktion (*RLuc*) aus einer Einfachbestimmung.

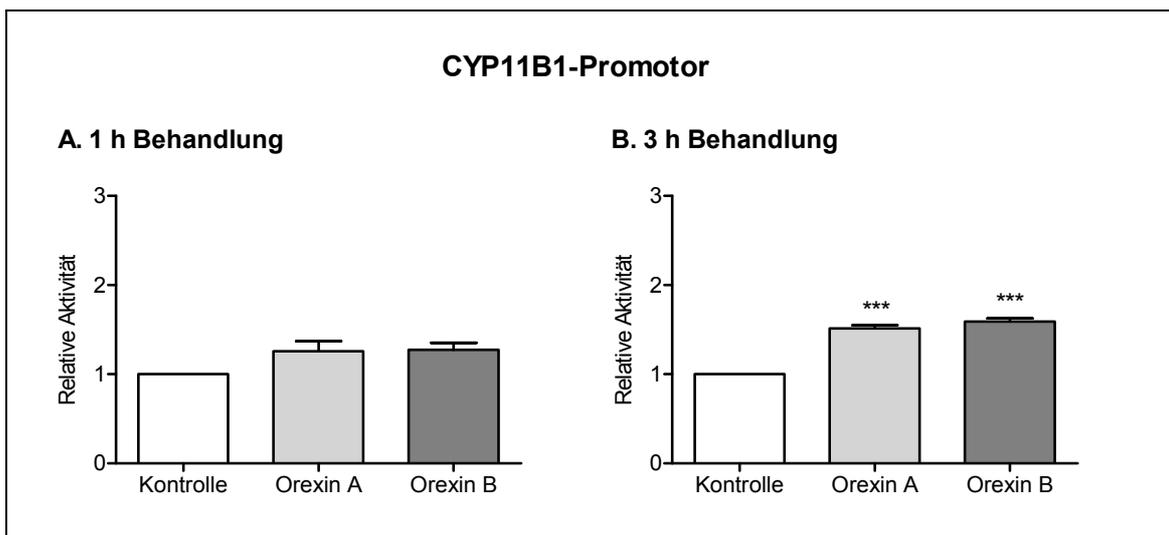


**Abbildung 3.23:** Aktivität des HSD3B2-Promotors im rekombinanten pGL4.19-Reportergenvektor nach 3, 6, 12 und 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Orexin B (1  $\mu$ M), Angiotensin II (1  $\mu$ M) oder Forskolin (10  $\mu$ M) im Vergleich zur Promotoraktivität unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist das Verhältnis der Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion (*LLuc*) zu denjenigen der Renilla-Luziferase-Reaktion (*RLuc*) aus einer Einfachbestimmung.

ausschließlich nach 3 und 6 Stunden ein Aktivierungspotenzial besaß, induzierte Forskolin die Promotoraktivität zu allen Zeitpunkten (s. Abb. 3.23).

### 3.3.3 Effekt der Orexine auf die Aktivitäten der Promotoren der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 im pGL4.19-Reportergenvektor

Die Wirkung von Orexin A (1  $\mu$ M) und Orexin B (1  $\mu$ M) auf die in den pGL4.19-Vektor klonierten Promotoren der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 wurde in transient transfizierten NCI-H295R-Zellen untersucht. Die Behandlungszeiträume wurden für jeden Promotor entsprechend den Ergebnissen der Vorversuche gewählt. Zu allen Zeitpunkten wurden die Positivkontrollen Angiotensin II und Forskolin zur Überprüfung der Promotorinduzierbarkeit mitgeführt, wodurch die Reliabilität des Untersuchungssystems fortlaufend kontrolliert werden konnte. Die Lumineszenzwerte der Leuchtkäfer-Luziferase-Reaktion wurden abermals mit den Werten der Kontrollreaktion der koexprimierten Renilla-Luziferase normalisiert (*LLuc/RLuc*). Sodann wurde in jeder Behandlungsgruppe die Aktivität des Leervektors von derjenigen des rekombinanten Vektors abgezogen. Um die relative Expressionsänderung in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu analysieren, wurden die so ermittelten Lumineszenzwerte der Behandlungsgruppen anschließend ins Verhältnis zu den Werten der jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt. Daher sind die auf diese Weise ermittelten Aktivitätsverhältnisse

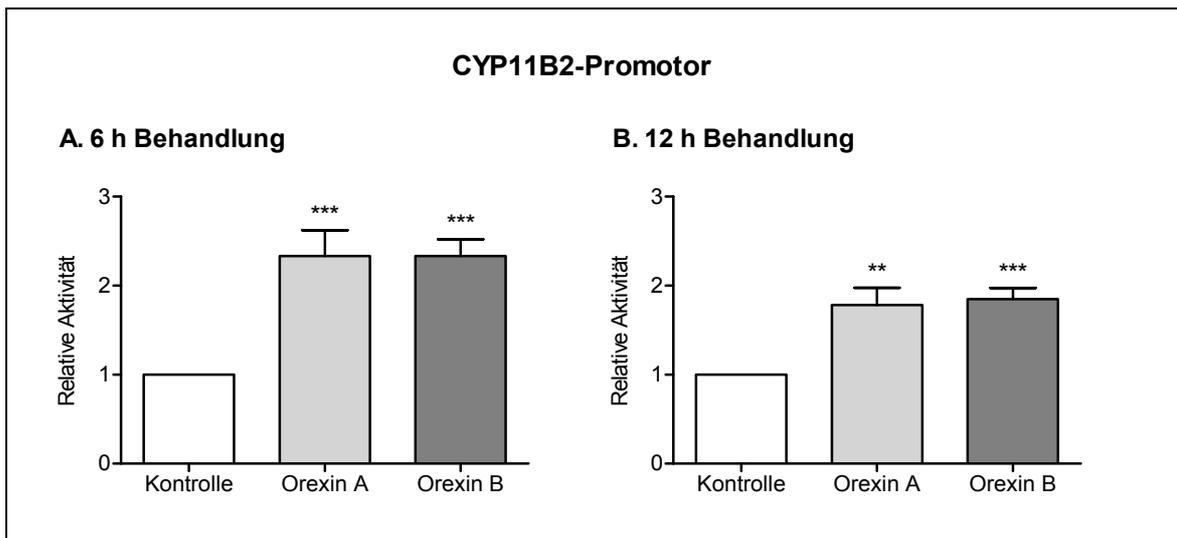


**Abbildung 3.24:** Aktivität des CYP11B1-Promotors im pGL4.19-Reportergenvektor nach 1 und 3 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) und Orexin B (1  $\mu$ M) im Vergleich zur Aktivität des Promotors in unbehandelten Kontrollzellen. Dargestellt ist die Aktivität des Promotors in den Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Aktivität in den Kontrollgruppen aus fünf unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehler. \*\*\*  $p < 0,001$

aus jeweils fünf bis sieben unabhängigen Versuchen im Folgenden als „relative Aktivitäten“ dargestellt.

Zur Untersuchung der Aktivität des CYP11B1-Promotors im rekombinanten pGL4.19-Vektor wurden gemäß den Ergebnissen der Vorversuche Behandlungszeiträume von 1 und 3 Stunden ausgewählt. In den Orexin-Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe wurden nach einstündiger Behandlungsdauer unterschiedliche Aktivitäten gemessen (Orexin A:  $1,26 \pm 0,11$  bzw. Orexin B:  $1,28 \pm 0,08$  vs. Kontrolle:  $1,00 \pm 0,00$ ), die sich im Dunnett's Post-Test jedoch statistisch als nicht signifikant erwiesen (s. Abb. 3.24). Der nach 3 Stunden Behandlungsdauer beobachtete Anstieg der Promotoraktivität unter Orexin A um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrollgruppe ( $1,51 \pm 0,04$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) wies hingegen eine statistische Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 0,1 % auf. Auch die Stimulation mit Orexin B über 3 Stunden führte zu einer signifikanten Steigerung der Luziferase-Expression, die etwa 60 % über dem Wert der Kontrollgruppe lag ( $1,59 \pm 0,04$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ;  $p < 0,001$ ).

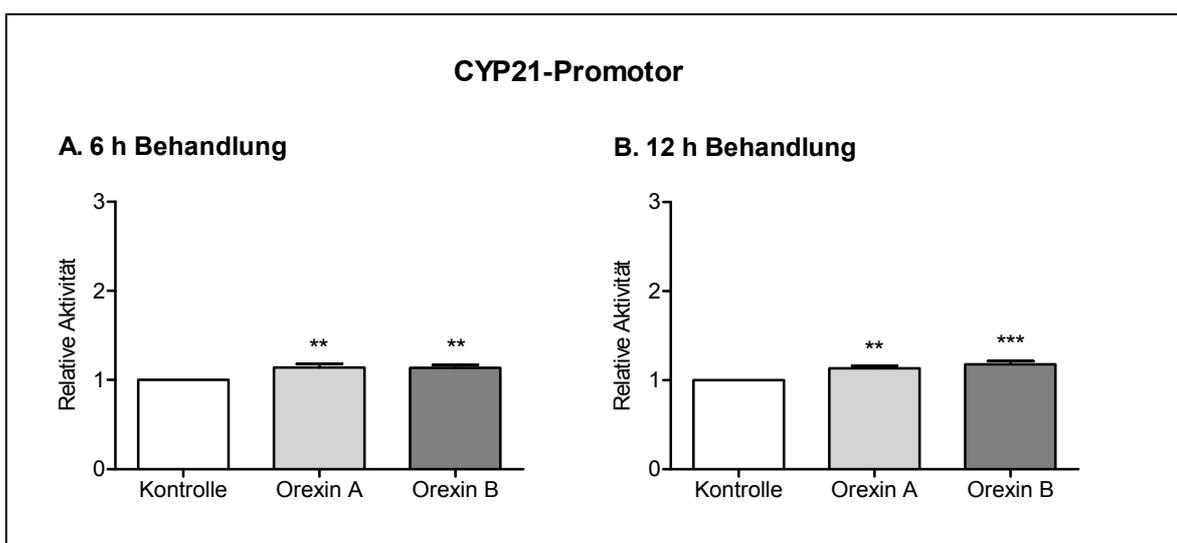
Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, wurden zur Untersuchung einer potenziellen Beeinflussung der Aktivität des in den pGL4.19-Reportergenvektor klonierten CYP11B2-Promotors durch Orexin A und Orexin B aufgrund der Resultate der Vorversuche Inkubationszeiten von 6 und 12 Stunden gewählt. Sowohl Orexin A ( $2,33 \pm 0,29$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) als auch Orexin B ( $2,33 \pm 0,19$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) führten nach 6 Stunden Behandlungsdauer zu einer signifikanten Aktivitätszunahme um 133 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Nach 12 Stunden Stimulation bewirkten Orexin A ( $1,78 \pm 0,20$



**Abbildung 3.25:** Aktivität des CYP11B2-Promotors im pGL4.19-Reportergenvektor nach 6 und 12 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) und Orexin B (1  $\mu$ M) im Vergleich zur Transkription des Reportergens unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist die Aktivität des CYP11B2-Promotors in den Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Aktivität in den Kontrollgruppen aus sechs (A) oder sieben (B) unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehler. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) und Orexin B ( $1,85 \pm 0,13$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) eine Erhöhung der Promotoraktivität um etwa vier Fünftel. Bei letztgenannten Effekten betrug die Wahrscheinlichkeit, dass sie auf einem Zufall beruhen, im Post-Test der einfaktoriellen Varianzanalyse weniger als 1 % bzw. 0,1 %.

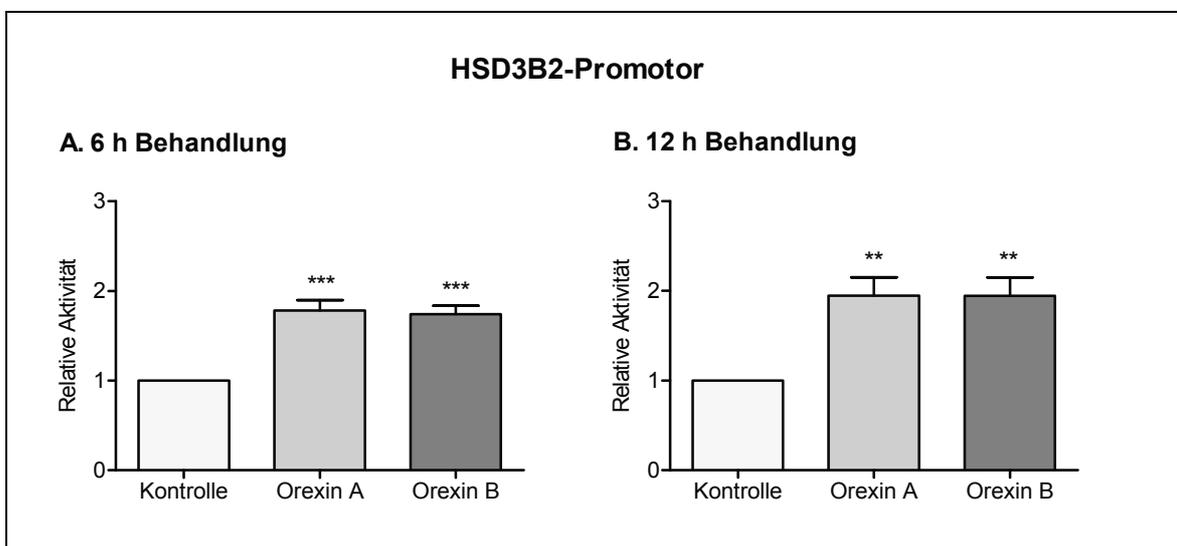
Nach den Voruntersuchungen wurden für die Analyse der Aktivität des CYP21- Promotors unter Orexin-Behandlung Stimulationszeiträume von 6 und 12 Stunden ausgewählt (s. Abb. 3.26). Unter Orexin A zeigte der CYP21-Promotor im Vergleich zur Kontrollgruppe



**Abbildung 3.26:** Aktivität des CYP21-Promotors im pGL4.19-Reportergenvektor nach 6 und 12 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) und Orexin B (1  $\mu$ M) im Vergleich zur Promotoraktivität in unbehandelten Zellen. Gezeigt ist die Aktivität des CYP21-Promotors in den Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Aktivität in den Kontrollgruppen aus sechs unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehler. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

sowohl nach 6 Stunden ( $1,14 \pm 0,04$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) als auch nach 12 Stunden ( $1,13 \pm 0,03$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) eine geringe, aber signifikante Steigerung der Luziferase-Expression ( $p < 0,01$ ). Auch die Zugabe von Orexin B zum Nährmedium bewirkte nach 6 Stunden eine signifikante Steigerung der Transkription des Luziferase-Reportergens um 14 % ( $1,14 \pm 0,03$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ;  $p < 0,01$ ). Nach 12 Stunden Stimulation mit Orexin B ( $1,18 \pm 0,04$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ) betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit der beobachteten Steigerung weniger als 0,1 % ( $p < 0,001$ ).

Wie Abbildung 3.27 veranschaulicht, wurden entsprechend den Vorversuchen auch beim HSD3B2-Promotor die Behandlungszeiträume von 6 und 12 Stunden als Untersuchungszeitpunkte gewählt. Nach einer Stimulation mit Orexin A oder Orexin B über 6 Stunden war in beiden Gruppen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 0,1 % ein Anstieg der Promotoraktivität um etwa drei Viertel festzustellen ( $1,78 \pm 0,12$  vs.  $1,00 \pm 0,00$  bzw.  $1,74 \pm 0,09$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ;  $p < 0,001$ ). Nach einer doppelt so langen Behandlungsdauer zeigte sich in beiden Gruppen eine Zunahme der Promotoraktivität um 95 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1,95 \pm 0,21$  vs.  $1,00 \pm 0,00$  bzw.  $1,95 \pm 0,20$  vs.  $1,00 \pm 0,00$ ), wobei sich diese Resultate im Dunnett's Post-Test ebenfalls als signifikant erwiesen ( $p < 0,01$ ).



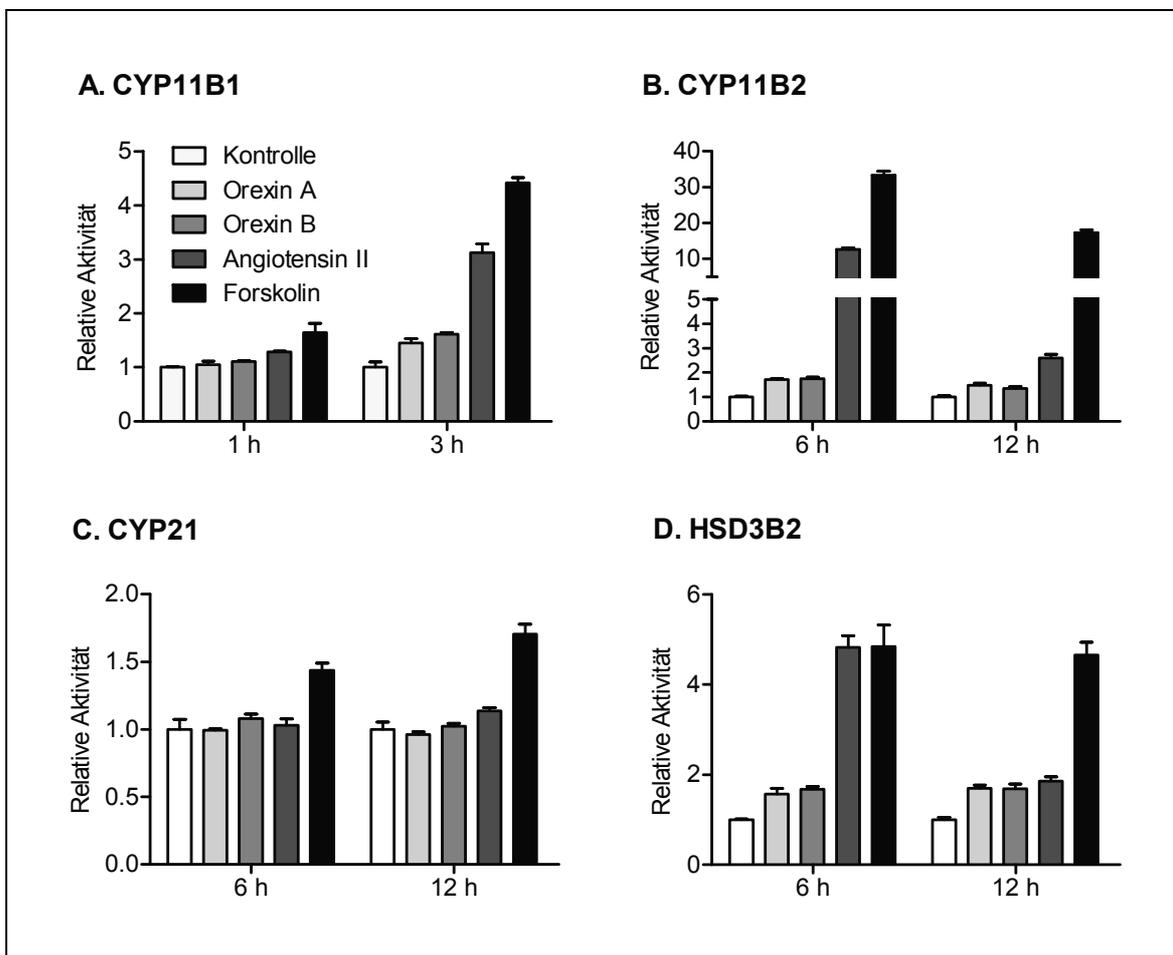
**Abbildung 3.27:** Aktivität des HSD3B2-Promotors im pGL4.19-Reportergenvektor nach 6 und 12 Stunden Behandlung mit Orexin A ( $1 \mu\text{M}$ ) und Orexin B ( $1 \mu\text{M}$ ) im Vergleich zur Aktivität des Vektors unter Kontrollbedingungen. Dargestellt ist die Aktivität des Promotors in den Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Aktivität in den Kontrollgruppen aus sieben unabhängigen Versuchen  $\pm$  Standardfehler. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

### 3.3.4 Quantitativer Vergleich der Promotoraktivierungen von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 durch Orexin A, Orexin B, Angiotensin II und Forskolin

Um Aufschluss über die relative Stärke des Effekts von Orexin A und B auf die Aktivität der Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 zu erlangen, wurden die Orexin-Effekte (je 1  $\mu\text{M}$ ) in Relation zu den Effekten der bereits bekannten Stimulatoren Angiotensin II (1  $\mu\text{M}$ ) und Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) analysiert. Hiervon abgesehen entsprachen Versuchsablauf und Auswertungsmethode den Dual-Luziferase-Reporterstudien wie unter 3.3.3 dargelegt.

Abbildung 3.28 illustriert, dass die Behandlung mit Forskolin und Angiotensin II bei den analysierten Promotoren zu fast allen Untersuchungszeitpunkten eine größere Aktivierung hervorrief als die Inkubation mit Orexin A und B. Die deutlichsten Unterschiede zwischen den Effekten der Orexine und von Forskolin oder Angiotensin II ließen sich beim CYP11B2-Promotor nach 6 Stunden Behandlung ausmachen. Während die Orexine hier wie in den vorangegangenen Untersuchungen abermals annähernd eine Verdoppelung der Promotoraktivität bewirkten, führte Angiotensin II etwa zu einer Verdreizehnfachung und Forskolin zu einer Verdreiunddreißigfachung ( $12,61 \pm 0,44$  bzw.  $33,30 \pm 1,14$  vs.  $1,00 \pm 0,04$ ) der Promotoraktivität (s. Abb. 3.28 B). Eine deutliche Differenz zwischen den Effekten ließ sich weiterhin beim Promotor von CYP11B1 nach 3 Stunden Inkubation nachweisen (s. Abb. 3.28 A). Wie in den vorherigen Untersuchungen riefen die Orexine bei diesem Promotor eine Aktivitätszunahme um etwa die Hälfte hervor, Angiotensin II und Forskolin bewirkten hingegen Zunahmen um etwa 210-340 % ( $3,12 \pm 0,16$  bzw.  $4,41 \pm 0,10$  vs.  $1,00 \pm 0,10$ ). Die Aktivität des HSD3B2-Promotors fiel nach sechsständiger Inkubation mit Angiotensin II und Forskolin ( $4,83 \pm 0,26$  bzw.  $4,85 \pm 0,49$  vs.  $1,00 \pm 0,02$ ) fast dreimal so hoch aus wie unter Orexinen (s. Abb. 3.28 D). Nach 12 Stunden Inkubation fand sich beim Promotor von HSD3B2 indessen eine vergleichbare Steigerung der Promotoraktivität durch Orexine und durch Angiotensin II ( $1,83 \pm 0,10$  vs.  $1,00 \pm 0,06$ ). Auch beim Promotor von CYP11B2 lagen die Effekte der Orexine und von Angiotensin II nach zwölfständiger Behandlung ( $2,60 \pm 0,15$  vs.  $1,00 \pm 0,05$ ) deutlich näher beieinander als nach 6 Stunden. Die Inkubation mit Forskolin war in beiden Fällen jedoch abermals um ein Vielfaches effektiver als die Behandlung mit Orexinen (CYP11B2:  $17,40 \pm 0,72$  vs.  $1,00 \pm 0,05$ ; HSD3B2:  $4,66 \pm 0,28$  vs.  $1,00 \pm 0,06$ ). Auffällig war überdies, dass die insgesamt schwächste Aktivierung durch Angiotensin II und Forskolin, wie bereits in den

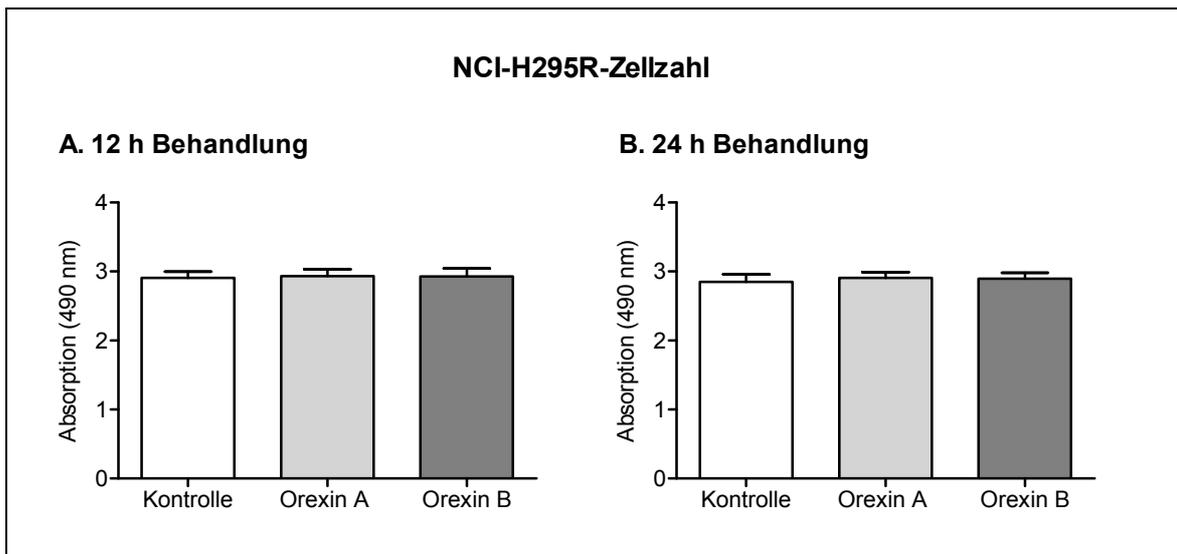
vorangegangenen Untersuchungen unter Orexin-Behandlung, beim CYP21-Promotor lag, der in diesem Versuch überhaupt nicht durch Orexine reguliert wurde (s. Abb. 3.28 C).



**Abbildung 3.28:** Aktivitäten der rekombinanten pGL4.19-Reportergenvektoren unter Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M), Orexin B (1  $\mu$ M), Angiotensin II (1  $\mu$ M) oder Forskolin (10  $\mu$ M) im Vergleich zu den Aktivitäten der Vektoren unter Kontrollbedingungen. A: CYP11B1-Promotor nach 1 und 3 Stunden Behandlung; B: CYP11B2-Promotor nach 6 und 12 Stunden Behandlung; C: CYP21-Promotor nach 6 und 12 Stunden Behandlung; D: HSD3B2-Promotor nach 6 und 12 Stunden Behandlung. Dargestellt sind die Aktivitäten der Promotoren in den Behandlungsgruppen im Verhältnis zur Aktivität in den Kontrollgruppen aus einer Drei- bis Vierfachbestimmung  $\pm$  Standardfehler.

### 3.4 Proliferation der NCI-H295R-Zellen unter Orexin-Behandlung

Die Proliferation der NCI-H295R-Zellen unter Orexin-Behandlung wurde mit einem MTS-basierten kolorimetrischen Nachweisverfahren ermittelt. Bei dieser Methode wird von stoffwechselaktiven Zellen ein wasserlösliches Formazan gebildet, dessen Absorption bei 490 nm der Zellzahl direkt proportional ist. Wie aus Abbildung 3.29 hervorgeht, konnte weder nach 12 Stunden noch nach 24 Stunden Behandlung mit Orexin A (1  $\mu$ M) oder Orexin B (1  $\mu$ M) eine Differenz der Zellzahlen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.29:** Kolorimetrische Bestimmung des Effekts einer 12 (A) oder 24 (B) Stunden dauernden Orexin A- oder Orexin B-Behandlung ( $1 \mu\text{M}$ ) auf die relative Zellzahl von NCI-H295R-Zellen jeweils im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardfehler.

## 4 Diskussion

Zahlreiche Studien deuten darauf hin, dass das Orexin-System auf unterschiedlichen Ebenen an der Regulation der HHN-Achse beteiligt ist (32, 107, 110, 115, 152, 186, 229, 248, 288). In diesem Zusammenhang konnten diverse Arbeitsgruppen einen direkten stimulierenden Effekt der Orexine auf die Glukokortikoid- sowie teilweise auch auf die Mineralokortikoid-Ausschüttung aus NNR-Zellen von Mensch, Ratte und Schwein nachweisen, welche Orexin-Rezeptoren exprimieren (112, 150, 152, 153, 162, 177, 186, 249, 275, 288). Derartige ACTH-unabhängige Effekte der Orexine auf die Kortikoidfreisetzung aus NNR-Zellen wurden bislang ausschließlich nach Stimulationszeiträumen von mindestens 1 Stunde beobachtet. Nach kürzeren Zeitintervallen konnten die Neuropeptide bei peripherer Applikation keinen signifikanten Anstieg der Steroide bewirken (107). Die Latenz bis zum Eintritt der Orexin-Wirkung lässt daher als zugrunde liegenden Mechanismus eine Langzeit-Regulation der Steroidbiosynthese vermuten, welche in NNR-Zellen maßgeblich über eine erhöhte Transkription der Steroidbiosyntheseenzyme erfolgt (195, 237, 243). Hiermit übereinstimmend konnte kürzlich in der humanen NNR-Zelllinie NCI-H295R durch die Behandlung mit Orexin A und B eine Erhöhung der mRNA-Kopien selektiver Steroidbiosyntheseenzyme und des StAR-Proteins nachgewiesen werden (211, 275). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den molekularbiologischen Regulationsmechanismus zu identifizieren, der in NCI-H295R-Zellen zu dem beobachteten mRNA-Spiegelanstieg der Steroidbiosyntheseenzyme führt.

Die hierzu durchgeführten Untersuchungen zeigten erstmalig, dass Orexine die Promotoraktivitäten der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen signifikant steigern, was auf eine erhöhte Transkription dieser Enzyme schließen lässt. Darüber hinaus wurde an NCI-H295R-Zellen erstmals demonstriert, dass Orexine weder die mRNA-Stabilität dieser Enzyme beeinflussen noch die Zellproliferation erhöhen.

#### **4.1 Orexine verändern das Expressionsmuster der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen auf mRNA-Ebene**

Bereits in früheren Untersuchungen an NCI-H295R-Zellen konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass Orexin A neben einer Steigerung der Kortisolausschüttung eine simultane Erhöhung der mRNA-Kopien von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 bewirkt (275). In einer Zeitkinetik über 3, 6, 12 und 24 Stunden zeigten CYP11B1, CYP21 und HSD3B2 nach 12 Stunden Inkubation ein deutliches Expressionsmaximum, während die Expression von CYP11B2 zu allen Zeitpunkten annähernd gleich stark erhöht wurde. Die mRNA-Kopien der Enzyme CYP11A1 und CYP17 blieben von der Inkubation mit Orexin A unbeeinflusst.

Da Zellen in Kultur durch unterschiedliche Mechanismen, wie Selektion, Adaptation oder Mutation, substantielle Veränderungen erfahren können, wäre eine Entstehung orexinunempfindlicher Klone während der Subkultivierung denkbar (97, 194, 209, 235). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die oben beschriebene Änderung des Expressionsmusters der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen nach 12 Stunden Orexin A-Inkubation mittels quantitativer „real-time“ PCR verifiziert. So wurde in diesem Versuch abermals die Expression der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 durch die Behandlung mit Orexin A gesteigert, während die Enzyme CYP11A1 und CYP17 erneut keiner Regulation durch Orexin A unterlagen. Ein direkter quantitativer Vergleich der Ergebnisse der hier durchgeführten „real-time“ PCR mit denjenigen der vorherigen Untersuchungen ist nicht zulässig, da diese nicht im selben PCR-Ansatz durchgeführt wurden. Außerdem können aufgrund des zeitlichen Abstands der Untersuchungen Änderungen schwer kontrollierbarer äußerer Bedingungen, die in der Auswertung keine Berücksichtigung finden, nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der beiden Untersuchungen hinsichtlich der Verhältnisse der mRNA-Expressionsänderungen der einzelnen Enzyme untereinander bleibt von diesen Einschränkungen jedoch unberührt. Hierbei lassen sich geringfügige Abweichungen zwischen den Ergebnissen feststellen. So fand sich im ursprünglichen Experiment die größte Steigerung der mRNA-Expression mit einer annähernden Verdreifachung beim Enzym HSD3B2, gefolgt von den Orexin-Effekten auf die mRNA-Kopien von CYP11B1, CYP11B2 und CYP21, die mit einer ungefähren Verdoppelung in etwa auf demselben Niveau lagen. Im Bestätigungsexperiment ließ sich hingegen der stärkste Effekt mit einer Verdoppelung der mRNA-Kopien bei den Enzymen CYP11B1 und CYP11B2 feststellen,

während die Wirkung der Orexine auf die mRNA-Expression von CYP21 und HSD3B2 mit einer Zunahme um etwa ein Viertel bzw. zwei Drittel in Relation dazu abgenommen hatte. Als mögliche Erklärung für diese Unterschiede lässt sich anführen, dass die Grundexpressionen von HSD3B2 und CYP21 in den Kontrollgruppen des Bestätigungsexperiments um ein bis zwei Zehnerpotenzen über dem Niveau der Kontrollgruppen der ursprünglichen Untersuchung lagen. Die Expressionssteigerung durch die Zugabe von Orexin hätte durch diese bereits sehr hohe Grundexpression beeinträchtigt werden können, da der Expressionssteigerung jedes Gens aufgrund der Dauer der hierzu jeweils aktivierten zellulären Prozesse sowie der Verfügbarkeit der erforderlichen Kofaktoren biologisch eine Grenze gesetzt ist. Die eingangs beschriebenen potenziellen Änderungen der Zelleigenschaften während der Subkultivierung können ebenfalls als eine mögliche Erklärung für ein solches Abweichen der Basalexpression angeführt werden. Die Grundexpressionen von CYP11B1 und CYP11B2 lagen im Unterschied hierzu in beiden Versuchen annähernd auf dem gleichen Niveau.

Da durch den orexininduzierten Anstieg der mRNA-Expression der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 im hier durchgeführten Bestätigungsexperiment die grundsätzliche Änderung des Expressionsmusters des vorherigen Versuchs validiert werden konnte, wurden die experimentellen Voraussetzungen für die weiterführenden Untersuchungen als gegeben angesehen.

## **4.2 Orexine regulieren die Expression der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen auf Transkriptionsebene**

Als Regulationsmechanismus, durch den Orexine zum Anstieg der mRNA-Spiegel von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen führen, wurde eine Erhöhung der mRNA-Stabilität dieser Enzyme in Betracht gezogen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Abbaugeschwindigkeit der mRNA dieser Enzyme unter Actinomycin D in Orexin A-behandelten Zellen und in unbehandelten Zellen bestimmt. Dieser Versuch zeigte jedoch, dass zwischen den mRNA-Abbaugeschwindigkeiten aller untersuchten Enzyme in der Behandlungs- und in der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bestand. Die Stabilität der mRNA von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 wird folglich in NCI-H295R-Zellen durch Orexin A nicht beeinflusst und der nachgewiesene Anstieg der mRNA-Kopien unter Orexin A kann nicht auf eine Erhöhung der mRNA-Stabilität zurückgeführt werden.

Alternativ kommt als ursächlicher Mechanismus für den beschriebenen Anstieg der mRNA-Spiegel eine verstärkte Ablesung der entsprechenden Gene durch eine erhöhte Promotoraktivität in Frage. Diese Annahme sollte in einer Reporterstudie überprüft werden. Hierzu wurde zunächst der Promotor von HSD3B2 in den pGene-BLAzer-TOPO-TA-Reportervektor kloniert. Insgesamt wurden drei verschiedene Abschnitte des Promotors, von -1073 bis +53 bp, von -1298 bis -1 bp sowie von -1298 bis +250 bp, zur Aktivitätsanalyse erfolgreich in den pGene-BLAzer-TOPO-TA-Vektor eingebaut. In den anschließenden  $\beta$ -Laktamase-Reporterstudien blieben die Effekte der Positivkontrollen Angiotensin II und Forskolin, zwei bekannten Stimulatoren der HSD3B2-Transkription in NCI-H295R-Zellen, deutlich hinter den in der Literatur beschriebenen Werten zurück und die Messwerte besaßen gleichzeitig eine relativ hohe Streuung (19, 20, 22, 195, 209, 237, 242, 243). Daher wurde sowohl die ausreichende Sensitivität als auch die ausreichende Reliabilität des Untersuchungssystems angezweifelt. Unter Orexin A zeigte sich nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation zwar konstant eine Steigerung der Aktivität des HSD3B2-Promotors, allerdings blieb auch diese mit einer durchschnittlichen maximalen Zunahme um etwa 20-30 % gegenüber der Kontrollgruppe hinter den aufgrund der Vorversuche zu erwartenden Effekten zurück und besaß ebenfalls eine vergleichsweise hohe Streuung. Auch ein zusätzlicher Versuch mit dem klonierten Promotor von CYP21 sowie weitere in der Arbeitsgruppe durchgeführte  $\beta$ -Laktamase-Reporterstudien mit den Promotoren von CYP11B1, CYP11B2 und CYP21 führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Da diverse Änderungen am Versuchsaufbau diese grundlegenden Mängel des Systems nicht zu beheben vermochten, wurde das  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem schlussendlich weder als ausreichend sensitiv noch als ausreichend reliabel für die geplanten Versuchsreihen erachtet.

Zur weiteren Überprüfung, ob Orexine den mRNA-Spiegelanstieg von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 über eine erhöhte Promotoraktivität bedingen, wurden die Promotoren dieser Enzyme nunmehr im Dual-Luziferase-Reportersystem untersucht. Dieses System wurde ausgewählt, da es sich im Unterschied zum  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem besonders durch eine hohe Messdynamik auszeichnet, wodurch Änderungen der Expressionsrate exakter erfasst werden können. Für diese Untersuchungen wurden die Promotoren erfolgreich über den pCR4-TOPO-TA-Vektor in den pGL4.19-Reportervektor kloniert. Im Gegensatz zum  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem zeigte sich bereits in den Vorversuchen, dass mit dieser Methode nicht nur die Ergebnisse sehr gut reproduzierbar waren und eine sehr geringe Streuung aufwiesen, sondern auch, dass

sich die Promotoraktivitäten durch die Positivkontrollen Forskolin und Angiotensin II stark induzieren ließen. Mit diesem Untersuchungssystem konnte in der vorliegenden Arbeit in jeweils fünf bis sieben unabhängigen Untersuchungen erstmals nachgewiesen werden, dass Orexine die Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen signifikant steigern. Die insgesamt größte Zunahme ließ sich beim Promotor von CYP11B2 mit einer mehr als verdoppelten Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 6 Stunden Orexin A- oder Orexin B-Behandlung beobachten. Die zweithöchste Steigerung der Promotoraktivität ergab sich beim Promotor von HSD3B2 mit einer knappen Verdoppelung nach 12 Stunden Inkubation mit Orexin A oder B. Die Aktivität des CYP11B1-Promotors wurde durch die Neuropeptide nach 3 Stunden Behandlung um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert. Einen sehr geringen Effekt zeigten Orexin A und B auf die Aktivität des Promotors von CYP21, dessen Aktivität durch eine Stimulation über 6 oder 12 Stunden um weniger als ein Fünftel anstieg.

Die mit dem Dual-Luziferase-Reportersystem gemessenen Steigerungen der Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 lassen sich nicht nur qualitativ, sondern auch im Verhältnis zueinander sehr gut mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Befunden zum Anstieg der mRNA-Spiegel dieser Enzyme unter Orexin A in Einklang bringen. So fand sich auch auf mRNA-Ebene die maximale Steigerung durch Orexine beim Enzym CYP11B2 und nur eine sehr geringe beim Enzym CYP21, während die Effekte auf die Expressionen von CYP11B1 und HSD3B2 in beiden Untersuchungen zwischen diesen Extremen lagen. Dass das Enzym CYP11B1 auf mRNA-Ebene nach CYP11B2 die zweitstärkste Induzierbarkeit zeigte, aber auf Promotorebene nach CYP11B2 und HSD3B2 lediglich die drittstärkste Aktivierbarkeit aufwies, kann einerseits darauf zurückzuführen sein, dass in der Dual-Luziferase-Reportergenstudie aufgrund der Zeitkinetik-Vorversuche ein wesentlich kürzerer Inkubationszeitraum gewählt wurde als in der „real-time“ PCR. Alternativ kommt in Betracht, dass die Orexine neben der Steigerung der Promotoraktivität noch in einen weiteren Schritt der mRNA-Synthese, wie beispielsweise in die mRNA-Prozessierung, eingreifen und dadurch einen zusätzlichen steigernden Einfluss auf die mRNA-Spiegel besitzen (14). Allerdings kann auch hier aufgrund des zeitlichen Abstandes zwischen der „real-time“ PCR- und den Dual-Luziferase-Reportergen-Untersuchungen eine Veränderung der Stimulierbarkeit der Zellen durch Orexine während der Subkultivierung nicht ausgeschlossen werden.

Als Ursache für die nicht zufriedenstellende Sensitivität des zunächst eingesetzten  $\beta$ -Laktamase-Reportergensystems lässt sich anführen, dass in diesem System im Unterschied zum Dual-Luziferase-Reportergensystem das Reporterprotein aufgrund seiner Stabilität intrazellulär akkumuliert (251, 290). Da die Promotoren der untersuchten Enzyme im Vergleich zum Leervektor bereits sehr hohe Basalaktivitäten aufwiesen, wurden daher besonders bei längeren Inkubationszeiträumen große Mengen des  $\beta$ -Laktamase-Moleküls angehäuft, welche eine hohe basale Emission des Detektionsfarbstoffs bei 447 nm bewirkten. Diese hohe basale Emission korreliert jedoch invers mit der Nachweissensitivität, da Veränderungen der Expressionsrate durch die Zugabe von Stimulanzien nur noch vergleichsweise geringfügige Emissionsänderungen bedingen. Hierdurch verschiebt sich die Nachweisgrenze für Veränderungen der Expressionsrate nach oben, wodurch die Sensitivität absinkt. Diese geringe Dynamik des  $\beta$ -Laktamase-Reportergensystems ist in der Literatur bereits beschrieben worden (204). Trotz der methodischen Vorteile, die das System durch seine spezielle Verhältnis-Quantifizierung bietet, wie die Normalisierung von Unterschieden in der Substratkonzentration oder Signalintensität zwischen den einzelnen Proben, erwies sich seine geringe Dynamik schlussendlich als limitierend für die geplante Versuchsreihe.

Das Dual-Luziferase-System zeichnet sich im Unterschied hierzu besonders durch seine hohe Dynamik aus, da das Leuchtkäfer-Luziferase-Reportergen im pGL4.19-Reporter-genvektor durch die beiden synthetisch angehängten Sequenzen CL1 und PEST destabilisiert wird (74, 215). Auf diese Weise wird eine intrazelluläre Akkumulation des Reporterproteins verhindert und eine hohe Messdynamik erzielt, durch welche die aktuellen Expressionsraten des Reporterproteins sehr präzise erfasst werden können. Zur Messgenauigkeit des Dual-Luziferase-Reportergensystems trägt überdies seine Funktionsweise auf der Basis von Chemilumineszenz bei, da diese im Unterschied zum ubiquitären Phänomen der Fluoreszenz in kultivierten Säugetier-Zellen endogen nicht vorkommt. Eine artifizielle Verfälschung der Messwerte wird hierdurch minimiert und die Streuung der Messwerte reduziert. Darüber hinaus ist die Kotransfektion der Zielzellen mit der Renilla-Luziferase als wichtiger methodischer Vorteil anzusehen, da hierdurch nicht nur Unterschiede zwischen den Proben in Zellzahl und Zellgröße, sondern auch in Transfektionseffizienz, Zellfunktionstüchtigkeit, Zell-Lyse-Effizienz und eingesetzten Probenvolumina normalisiert werden (64, 84, 279).

Im Einklang mit diesen Ausführungen zeigte sich beim Vergleich der Basalaktivitäten der Promotoren eine vielfach niedrigere Grundaktivität der Promotoren von CYP21 und

HSD3B2 im Dual-Luziferase-Reportersystem als im  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem. Während die Basalaktivitäten des CYP21-Promotors und des HSD3B2-Promotorabschnitts von -1073 bis +53 bp im  $\beta$ -Laktamase-Reportersystem im Verhältnis zum Leervektor beide das etwa Vierzehnfache betragen, waren sie im Dual-Luziferase-Reportersystem bei einem ebenso langen Inkubationsintervall zwischen Transfektion und Messung auf das knapp Drei- bis Sechsfache abgesunken. Die zusätzlich klonierten Promotoren von CYP11B1 und CYP11B2 wiesen in diesem System sogar noch deutlich kleinere Basalaktivitäten auf.

Zusammenfassend ist unter Berücksichtigung der hier ermittelten Befunde anzunehmen, dass Orexine die mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen erhöhen, indem sie die Transkription der entsprechenden Gene durch eine Induktion der Promotoraktivität steigern.

### **4.3 Bedeutung der Transkriptionssteigerung selektiver Steroidbiosyntheseenzyme durch Orexine in der NNR auf zellulärer Ebene**

In Anbetracht der zahlreichen Befunde zur Stimulation der Gluko- und teilweise auch Mineralokortikoid-Ausschüttung aus NNR-Zellen durch Orexine ist davon auszugehen, dass diese Zunahme aus der hier nachgewiesenen Transkriptionssteigerung selektiver Steroidbiosyntheseenzyme resultiert.

Diese Hypothese lässt sich sehr gut mit den speziellen Funktionen der einzelnen untersuchten Enzyme in der Steroidbiosynthese in Einklang bringen. So kommen die in ihrer Transkription erhöhten Enzyme CYP11B1, CYP11B2 und CYP21 ausschließlich in den Synthesewegen von Gluko- und Mineralokortikoiden vor und lenken die Steroidbiosynthese bei erhöhter Expression unweigerlich in Richtung der Produktion dieser Steroidklassen (s. Abb. 1.3) (195). Das Enzym HSD3B2 ist zwar für die Synthese aller NNR-Steroide erforderlich, da es aber mit dem androgenspezifischen Enzym CYP17 um Steroidvorstufen konkurriert, führt eine erhöhte Transkription der HSD3B2 ebenfalls zu einer Ausrichtung der NNR-Steroidbiosynthese auf die Produktion von Gluko- und Mineralokortikoiden (71, 195, 208). Die nicht durch Orexine regulierten Enzyme CYP17 und CYP11A1 würden aufgrund ihrer Funktionen in der Steroidbiosynthese bei erhöhter Transkription hingegen keine Verschiebung der NNR-Steroidproduktion zugunsten von Mineralo- oder Glukokortikoiden bedingen. Da von den hier untersuchten Enzymen die Expression der Aldosteronsynthase, CYP11B2, am stärksten durch Orexine reguliert

wurde, wäre eine Untersuchung des Einflusses der Orexine auf die Aldosteronausschüttung aus NCI-H295R-Zellen eine interessante Anknüpfung an die hier vorgestellten Ergebnisse. Dies gilt insbesondere deshalb, weil bisher insgesamt weniger Studien zur Wirkung der Orexine auf die Mineralokortikoid- als auf die Glukokortikoid-Freisetzung aus NNR-Zellen vorliegen. Möglicherweise liegt die Funktion der Orexine vor allem in der beschriebenen Verschiebung des Expressionsmusters der Steroidbiosyntheseenzyme. Diese könnte eine nachfolgende ACTH-Wirkung bahnen, welche akut zu einer Phosphorylierung des StAR-Proteins führt. Auf diese Weise könnten Orexine eine Verschiebung der unter ACTH verstärkt freigesetzten Steroide zugunsten von Gluko- und Mineralokortikoiden bedingen. Um dies zu klären, wäre es interessant, das Kortikoidfreisetzungsprofil von NNR-Zellen unter ACTH in orexinvorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen zu vergleichen.

Dass die Expression des Enzyms CYP21 sowohl auf mRNA- als auch auf Promotorebene im Vergleich zu CYP11B1, CYP11B2 und HSD3B2 am geringsten auf die Orexin-Behandlung ansprach, lässt sich möglicherweise mit der auch im Dual-Luziferase-Reportergensystem noch mit Abstand höchsten Basalaktivität des zugehörigen Promotors begründen. Eine solch hohe basale Expression von CYP21 in menschlichen NNR-Zellen ist auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet worden (21, 44, 195). Möglicherweise dient sie der Aufrechterhaltung der basalen Produktion von Mineralo- und Glukokortikoiden in der Zona glomerulosa und fasciculata. Allerdings bedingt eine hohe basale Genexpression grundsätzlich eine geringere maximale Aktivierbarkeit der Transkription durch die Zugabe von Stimulanzien, da die Ableserate jedes Gens durch die Dauer von Initiation, Transkription und Termination sowie durch die intrazelluläre Verfügbarkeit der nötigen Kofaktoren biologisch limitiert ist. Im Einklang damit wies der CYP21-Promotor im vergleichenden Übersichtsversuch ebenfalls die geringste Aktivierbarkeit durch die Behandlung mit den bekannten Stimulatoren Angiotensin II und Forskolin auf.

Die hier erhobenen Befunde auf mRNA- und Promotorebene werden durch die kürzlich beschriebene orexininduzierte Expressionszunahme des StAR-Proteins in NCI-H295R-Zellen schlüssig ergänzt (211). Da das StAR-Protein für die Bereitstellung von Cholesterin, dem Substrat aller Steroide, in den Mitochondrien der NNR-Zellen verantwortlich ist, könnte die erhöhte Expression unter Orexinen dem insgesamt gesteigerten Substratbedarf durch die erhöhte Steroidproduktion Rechnung tragen. Ramanjaneya et al. beobachteten auf mRNA-Ebene eine maximale Expressionszunahme

des StAR-Proteins nach 2 Stunden Inkubation, gefolgt von einer sukzessiven Abnahme über 4, 6 und 12 Stunden sowie einem erneuten Anstieg der mRNA-Kopien nach 24 Stunden. Dies lässt vermuten, dass der Orexin-Effekt auf die StAR-Expression zur Kompensation des erhöhten Substratbedarfs bei gesteigerter Steroidproduktion zeitlich versetzt von der Expressionszunahme der Steroidbiosyntheseenzyme einsetzt. Hierbei ist sowohl ein zeitlich vorausgehendes als auch ein nachfolgendes Einsetzen der StAR-Expressionssteigerung vorstellbar. Eventuell liegt in dem von Ramanjaneya et al. beschriebenen zweigipfligen Effekt der Orexine auf die StAR-mRNA-Expression gleichzeitig die Erklärung dafür, weswegen einige Arbeitsgruppen einen Anstieg der Kortikoidfreisetzung aus NNR-Zellen unter Orexin-Behandlung nach 1 bis 2 Stunden beobachten konnten, während andere Gruppen einen solchen Anstieg nach Behandlungsintervallen von 6 bis 24 Stunden fanden. Da die meisten Arbeitsgruppen die Kortikoidausschüttung entweder nur zu einem oder zu zwei eng beieinander liegenden Zeitpunkten bestimmten, konnten sie anhand ihrer eigenen Daten bisher keinen derartigen zweigipfligen Effekt auf die Steroidausschüttung beschreiben, er wird jedoch beim Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Arbeitsgruppen augenscheinlich. Möglicherweise resultiert der frühe Orexin-Effekt auf die Steroidausschüttung ausschließlich aus einer gesteigerten StAR-Expression, während der späte Effekt durch eine gesteigerte Synthese von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2, gefolgt von einer kompensatorisch erhöhten StAR-Produktion, verursacht wird. Auch ACTH, Angiotensin II und Kalium verursachen ihren akuten und chronischen Effekt über die zeitlich versetzte Beeinflussung des StAR-Proteins und der Steroidbiosyntheseenzyme. Denkbar wäre indessen auch, dass der frühe und der späte Effekt der Orexine jeweils nur in Abhängigkeit vom untersuchten NNR-Zelltypus beobachtet werden kann.

Die Hypothese, dass Orexine die NNR-Steroidproduktion durch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Transkriptionssteigerung selektiver Steroidbiosyntheseenzyme regulieren, deckt sich darüber hinaus in Bezug auf den Wirkmechanismus und die Inkubationszeiten mit dem seit langem bekannten Langzeit-Regulations-Mechanismus der NNR-Steroidbiosynthese durch ACTH, Angiotensin II und Kalium. Der chronische Effekt dieser Hauptaktivatoren der Gluko- und Mineralokortikoid-Produktion, welcher mit einer Verzögerung von mehreren Stunden einsetzt, wird gleichermaßen über eine gesteigerte Genexpression selektiver Steroidbiosyntheseenzyme vermittelt. Im Gegensatz hierzu wird ihr akuter Effekt, welcher innerhalb von Sekunden bis Minuten eintritt, über die Phosphorylierung des StAR-Proteins verursacht (237, 243). Die in der Literatur

beschriebene Zeitverzögerung bis zum Einsetzen des Langzeit-Effekts von ACTH, Angiotensin II und Kalium entspricht weitgehend den hier ermittelten Inkubationszeiträumen bis zum Beginn der Orexin-Wirkung auf Promotorebene. So erreichen die mRNA-Spiegel von CYP11B1, CYP21 und HSD3B2 unter ACTH oder dem AC-Aktivator Forskolin ebenfalls nach Behandlungsintervallen von etwa 8 bis 24 Stunden ihr Maximum (11, 173, 244, 252). Die stärksten Zunahmen der mRNA-Kopien von CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 unter Angiotensin II oder Kalium werden nach Inkubationszeiträumen von 12 bis 24 Stunden beschrieben (18, 20, 21, 252). Auch in den Vorversuchen der hier durchgeführten Dual-Luziferase-Reporterstudien zeigte sich eine weitgehende Übereinstimmung der Inkubationszeiträume bis zur maximalen Aktivierung der untersuchten Promotoren durch Orexine sowie durch Angiotensin II und Forskolin.

Insgesamt kann demnach festgehalten werden, dass es sich bei den hier erstmalig beobachteten Transkriptionssteigerungen selektiver Steroidbiosyntheseenzyme durch Orexine aller Wahrscheinlichkeit nach um den molekularen Regulationsmechanismus handelt, der zu den vielfach beschriebenen Steigerungen der adrenokortikalen Steroidfreisetzung durch Orexine führt. Die hier präsentierten Ergebnisse stellen nicht nur eine schlüssige Ergänzung zu den bisher bekannten Wirkungen der Orexine an der NNR dar, sondern stehen darüber hinaus auch im Einklang mit dem bereits bekannten Regulationsmechanismus der NNR-Kortikoidproduktion durch ihre Hauptaktivatoren ACTH, Angiotensin II und Kalium.

#### **4.4 Orexininduzierte Signaltransduktion und Promotoraktivierung in NCI-H295R-Zellen**

Auf welche Weise die intrazelluläre Weiterleitung des Orexin-Effekts von der Bindung der Orexine an ihre Rezeptoren auf der Zelloberfläche bis zu den Promotoraktivierungen im Zellkern erfolgt, ist mit den voranstehenden Ausführungen allerdings noch nicht geklärt.

Aufgrund der relativ langen Verzögerung bis zum Einsetzen des Orexin-Effekts auf die Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 von bis zu 12 Stunden wurde die Hypothese aufgestellt, dass Orexine die Expression dieser Enzyme durch eine gesteigerte Zellproliferation und dadurch frühere Ausbildung von Zell-Zellkontakten induzieren (194, 209). Für diesen Vermittlungsweg spricht außerdem, dass die Ausbildung der funktionellen Untergliederung der NNR während der Embryonal-

Entwicklung mutmaßlich über die zonenspezifische Regulation der Expression der Steroidbiosyntheseenzyme bedingt wird (207). Da dieser Prozess mit einer erhöhten Proliferationsrate der NNR-Zellen einhergeht und in fetalem NNR-Gewebe bereits sowohl die Expression von Präpro-Orexin als auch des OX<sub>2</sub>R detektiert wurde, erscheint eine Assoziation der Orexine mit der Vermehrung der NNR-Zellen denkbar (119). Ferner konnten Spinazzi et al. in kortisolproduzierenden NNR-Adenomen, welche ebenfalls mit einer gesteigerten Zellproliferation vergesellschaftet sind, nicht aber in gesundem NNR-Gewebe, die mRNA von Präpro-Orexin sowie eine gesteigerte Orexin-Rezeptor-Expression nachweisen (249). Außerdem beobachteten mehrere Arbeitsgruppen, dass die ERK1/2- und p38-MAPK-Wege, welche maßgeblich in die Regulation der Zellproliferation und -differenzierung involviert sind, in NNR-Zellen unter Orexin-Behandlung aktiviert wurden (210, 211, 250, 275). Direkte Untersuchungen der Zellproliferation unter Orexin-Behandlung an NNR-Gewebe von Menschen und Ratten haben indessen bisher zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt (151, 249, 250). In der vorliegenden Arbeit ließ sich kein Einfluss der Orexine auf die Proliferation der NCI-H295R-Zellen feststellen. Zusammenfassend kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt somit kein endgültiger Schluss hinsichtlich der Wirkung von Orexinen auf die Teilungsrate von NNR-Zellen gezogen werden. In Bezug auf die NCI-H295R-Zelllinie erscheint es jedoch unter Berücksichtigung der hier durchgeführten Untersuchungen zumindest unwahrscheinlich, dass Orexine die beschriebenen Transkriptionseffekte über eine gesteigerte Proliferation und frühere Differenzierung der Zellen hervorrufen.

Alternativ zur Zelldifferenzierung ist eine direkte Vermittlung des Orexin-Effekts von den aktivierten Orexin-Rezeptoren über sekundäre Botenstoffe auf die DNA-Transkription in Betracht zu ziehen. Welcher Orexin-Rezeptor-Subtyp und welche intrazelluläre Signalkaskade an der Transduktion des Orexin-Effekts in NNR-Zellen maßgeblich beteiligt sein könnten, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht abschließend geklärt. So konnte in den NCI-H295R-Zellen, wie in zahlreichen vorherigen Studien an NNR-Material von Ratten und Menschen, die simultane Expression beider Orexin-Rezeptorsubtypen nachgewiesen werden. Zwei unabhängige Studien demonstrierten mittels „real-time“ PCR jedoch eine vielfach höhere Expression des OX<sub>2</sub>R als des OX<sub>1</sub>R in dieser Zelllinie (211, 275). In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigte sich außerdem, dass der Effekt von Orexin A auf die mRNA-Kopien von HSD3B2 durch die gleichzeitige Behandlung mit einem OX<sub>2</sub>R-Antagonisten nahezu vollständig aufgehoben wurde, während die Blockade des OX<sub>1</sub>R nur zu einer leichten Abschwächung der Orexin

A-Wirkung führte (77). Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass die Expression des OX<sub>2</sub>R in NCI-H295R-Zellen nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation mit Orexin A herunterreguliert wurde (275). Diese verminderte Expression erhärtet nicht nur die Vermutung, dass dieser Rezeptorsubtyp wesentlich in die Vermittlung der beobachteten Orexin-Wirkung involviert ist, sondern gibt gleichzeitig auch Aufschluss darüber, weshalb der maximale Effekt meist nach 6-12 Stunden und nicht zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten war. Als letzter Hinweis auf eine maßgebliche Beteiligung des OX<sub>2</sub>R lässt sich anführen, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen Orexin A und B konstant einen fast identischen Effekt auf die Promotoraktivitäten besaßen. Da Orexin A und B nur am OX<sub>2</sub>R mit gleich großer Affinität binden, während der OX<sub>1</sub>R nahezu selektiv Orexin A bindet, bestätigt dies indirekt die Rolle des OX<sub>2</sub>R in der Signaltransduktion in NCI-H295R-Zellen (226). Experimentell ließe sich die Rolle der einzelnen Rezeptorsubtypen in der Weiterleitung des Orexin-Effekts an der NNR durch den Einsatz selektiver OX<sub>1</sub>R- oder OX<sub>2</sub>R-Antagonisten in den Reporterstudien verifizieren (163, 246).

Beide Orexin-Rezeptorsubtypen können grundsätzlich an verschiedene G-Proteine gekoppelt sein, wobei sich bisher Abhängigkeiten von der Ligandenkonzentration, dem analysierten Zell- und Gewebetypus sowie von der metabolischen Situation der untersuchten Organismen ergeben haben. Eine weitere Regulation der Kopplung durch bisher noch unbekannte Faktoren, wie beispielsweise den Differenzierungsgrad der NNR-Zellen oder das Alter der Herkunftsorganismen, kann daher nicht ausgeschlossen werden. Diese Beeinflussungsmöglichkeiten der Kopplung bergen potenzielle Erklärungen für die Divergenz der bisher erhobenen Befunde.

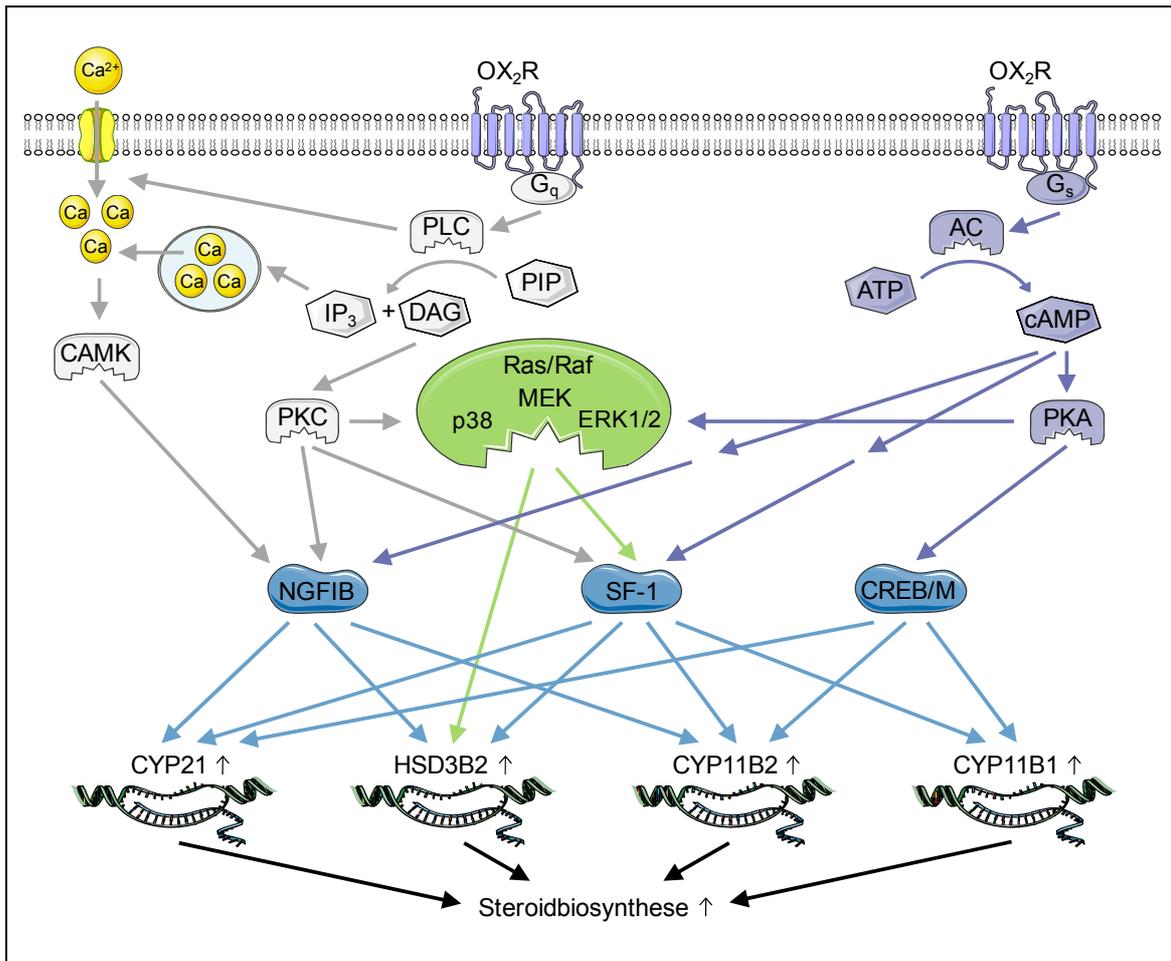
In Studien an NNR-Zellen von Schweinen, Ratten und Menschen ließen sich bereits sowohl eine Kopplung der lokal exprimierten Orexin-Rezeptoren an G<sub>s</sub> als auch eine orexininduzierte Aktivierung der AC und der PKA als auch ein intrazellulärer Anstieg von cAMP nachweisen (31, 118, 153, 162, 177, 288). Einige Arbeitsgruppen konnten darüber hinaus demonstrieren, dass der stimulierende Effekt der Orexine auf die Glukokortikoid-Ausschüttung aus den NNR-Zellen durch Blockade der AC oder der PKA aufgehoben wurde (153, 162, 288). Parallel hierzu fanden sich in Untersuchungen an NN-Zellen von Ratten und Menschen eine Kopplung der lokal exprimierten Orexin-Rezeptoren an G<sub>q</sub> und ein intrazellulärer Anstieg von IP<sub>3</sub> unter der Behandlung mit Orexinen (118, 119, 212). Ramanjaneya et al. wiesen in NCI-H295R-Zellen nach, dass der von ihnen beobachtete Orexin-Effekt auf die StAR-Expression durch Ausschaltung der G-Proteine G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>

sowie durch Blockade der PKA, der PKC, aber auch der p38- sowie ERK1/2-MAPK vermindert bis aufgehoben wurde (211). In Zusammenarbeit mit Ramanjaneya et al. konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die orexininduzierte Aktivierung der p38- und ERK1/2-MAPK in NCI-H295R-Zellen über den OX<sub>2</sub>R und die G-Proteine G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> vermittelt werden kann (210). Die von unserer Arbeitsgruppe beschriebene Erhöhung des HSD3B2-mRNA-Spiegels wurde in NCI-H295R-Zellen durch Blockade der PKC, nicht aber der PKA, gehemmt (77, 275). Im Einklang hiermit fand sich ausschließlich ein orexinbedingter Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-, nicht aber der cAMP-Konzentration. Des Weiteren ließ sich eine Minderung des Orexin-Effekts nach Inhibition der ERK1/2-Signalkaskade feststellen, während die Blockade der p38-MAPK keinen Einfluss auf den Orexin-Effekt besaß. Im Unterschied zu den Kopplungen an G-Proteine vom Subtyp G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> ist eine Kopplung der Orexin-Rezeptoren in NNR-Zellen an G<sub>i</sub> oder G<sub>0</sub> bisher weniger gut gesichert (118, 211, 212).

Zusammenfassend kann daher angenommen werden, dass der in der vorliegenden Arbeit beschriebene Effekt von Orexin A und B auf die Transkription der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen vornehmlich über die lokal exprimierten OX<sub>2</sub>R vermittelt wird. Diese sind allem Anschein nach in der Lage, in NNR-Zellen an G-Proteine vom Subtyp G<sub>q</sub> sowie G<sub>s</sub> zu koppeln und dadurch sowohl die intrazelluläre PLC/IP<sub>3</sub>/PKC- als auch die AC/cAMP/PKA-Signalkaskade zu aktivieren. Die wichtige Rolle dieser beiden Signalkaskaden in der Regulation der Expression der adrenalen Steroidbiosyntheseenzyme ist seit langem bekannt, da sie auch als Hauptsignalwege von ACTH (AC/cAMP/PKA) und Angiotensin II (PLC/IP<sub>3</sub>/PKC) in der Zona glomerulosa und fasciculata gelten (66). In die Vermittlung des Orexin-Effekts auf die Expression der Steroidbiosyntheseenzyme in NNR-Zellen scheinen zusätzlich noch die MAPK-Wege über p38 und ERK1/2 involviert zu sein.

#### **4.5 Modell zur intrazellulären Signalkaskade in NCI-H295R-Zellen**

Im Folgenden wird ein Modell zur intrazellulären Transduktion des Orexin-Effekts in NCI-H295R-Zellen vorgestellt, welches potenzielle Verknüpfungswege der beschriebenen Signalkaskaden mit den hier nachgewiesenen Promotoraktivierungen erläutert. Als Bindeglieder zwischen den Signalkaskaden und den Promotoraktivierungen dienen in diesem Schema einige der wichtigsten Transkriptionsfaktoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2, deren Bedeutung für die Ablesung der entsprechenden Gene in der



**Abbildung 4.1:** Modell zur Signaltransduktion des Effekts der Orexine auf die Promotoren von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 über den OX<sub>2</sub>R in NCI-H295R-Zellen. Der OX<sub>2</sub>R koppelt an G-Proteine vom Subtyp G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>, die die PLC/IP<sub>3</sub>/PKC- und die AC/cAMP/PKA-Signalkaskade aktivieren. Dies führt über die Transkriptionsfaktoren SF-1, CREB/M und NGFIB zur Aktivierung der Promotoren und in der Folge zur Steigerung der Steroidbiosynthese.

Literatur bereits beschrieben wurde (s. Abb. 4.1).

Der Transkriptionsfaktor „steroidogenic factor 1“ (SF-1) spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung steroidogenen Gewebes und kontrolliert die Genexpression aller an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme (266). Die SF-1-abhängige Induktion der Genexpression der Steroidbiosyntheseenzyme scheint in steroidogenen Zellen sowohl über den PKC- als auch über den MAPK- und den cAMP-Signalweg vermittelt werden zu können (80, 141, 195, 266). Da diese drei Signalkaskaden, wie im vorangehenden Abschnitt ausgeführt, ihrerseits über die lokal exprimierten Orexin-Rezeptoren aktiviert werden können, stellt SF-1 den ersten potenziellen Verknüpfungspunkt zwischen den orexinaktivierten Signalkaskaden und der beobachteten Stimulation der Genexpression dar. Eine weitere bedeutende Rolle in der Promotoraktivierung der Steroidbiosyntheseenzyme wird den Transkriptionsfaktoren „cAMP response element binding protein“ (CREB) und „cAMP response element modulator“ (CREM) zugesprochen, die von der PKA

phosphoryliert werden. Die Transkriptionsfaktoren CREB und CREM interagieren mit den individuellen „cAMP response sequences“, die alle Cytochrom-P450-Steroidhydroxylasen in ihren Promotorregionen aufweisen (195, 207, 237). Zwischen der cAMP/CREB/CREM- und der SF-1-vermittelten Kaskade bestehen darüber hinaus komplexe Wechselwirkungen, die bisher allerdings noch nicht vollständig entschlüsselt wurden. So überlappen die „cAMP response sequences“ und die SF-1-Bindungssequenzen in den Promotorbereichen der Steroidbiosyntheseenzyme häufig. Außerdem scheint SF-1 für die Weiterleitung der cAMP-Antwort erforderlich, gleichwohl aber nicht ausreichend zu sein (266). Die Promotoren von CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 gelten ferner als Zielgene des Transkriptionsfaktors „nerve growth factor-induced clone B“ (NGFIB), dessen Aktivität in NNR-Zellen über die PKC, die „calcium/calmodulin-dependent“ Kinasen (CAMK) und die cAMP-Signalkaskade gesteuert werden kann (12, 38, 157, 183). Auch eine Beteiligung der MAPK p38 an der Regulation der HSD3B2-Genexpression, wie sie unsere Arbeitsgruppe für die Transduktion des Orexin-Effekts beobachtet hatte, wurde zuvor bereits in NNR-Zellen beschrieben. So inhibierte die Blockade der MAPK p38 oder auch der ERK1/2 die Angiotensin II-induzierte Expression von HSD3B2 und StAR in Ratten-Glomerulosa-Zellen (190). Auf der Ebene der Ras/Raf-Proteinkaskade, die zunächst zur Phosphorylierung der MAPK Kinase „MEK“ und in der Folge zur Aktivierung der MAPK p38 und ERK1/2 führt, befindet sich eine weitere Schnittstelle zwischen der G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-gekoppelten Signaltransduktion, da in steroidogenen Zellen sowohl die PKC als auch die PKA zur Aktivierung dieser Kaskade führen können (66, 98, 263). In nachfolgenden Promotorstudien könnte durch den Einsatz selektiver Inhibitoren der einzelnen Signalkaskaden ihre hier beschriebene Rolle in der Transduktion des Orexin-Effekts überprüft werden. Auch die Beteiligung weiterer Transkriptionsfaktoren an der Signaltransduktion, wie beispielsweise GATA-4/-6, STAT5 oder DAX-1, deren Bedeutung für die Genexpression der Steroidbiosyntheseenzyme bereits beschrieben wurde, kann nicht ausgeschlossen und sollte in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden (10, 156, 206, 242).

Gleichwohl verdeutlicht das in diesem Abschnitt illustrierte Modell bereits, dass sich die Hypothese, Orexine erhöhten die Promotoraktivitäten selektiver Steroidbiosyntheseenzyme über eine Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und infolgedessen spezifischer Transkriptionsfaktoren, schlüssig in das bisher bekannte Gesamtbild der Regulation der Genexpression dieser Enzyme in steroidogenen Zellen einfügen lässt.

Die beschriebene Beteiligung diverser Signalkaskaden an der Transduktion des Orexin-Effekts in NCI-H295R-Zellen, die auf verschiedenen Ebenen untereinander in Wechselbeziehungen stehen, zeigt, wie fein regulierbar die intrazelluläre Antwort auf einen Orexin-Stimulus möglicherweise sein könnte. Die einzelnen Kaskaden könnten eventuell jeweils nur in bestimmten Situationen, beispielsweise in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der Ligandenkonzentration oder der metabolischen Situation des Organismus, zum Tragen kommen.

#### **4.6 Physiologische Rolle der Orexine im Regelkreis der adrenalen Steroidbiosynthese *in vivo***

Unabhängig von der exakten intrazellulären Transduktion des Orexin-Effekts in NNR-Zellen bleibt die physiologische Bedeutung dieses Effekts noch zu klären.

So zeigte sich beim quantitativen Vergleich der Orexin-Effekte auf die Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 mit den Effekten der Hauptaktivatoren der Steroidbiosynthese in der NNR, Angiotensin II und dem ACTH-Ersatz Forskolin, dass Angiotensin II und Forskolin nach den meisten Behandlungsintervallen zu einer deutlich größeren Steigerung der Promotoraktivitäten führten als Orexine. Hierbei erreichten die Promotoraktivitäten unter Angiotensin II insgesamt eine maximale Steigerung um etwa das Zwölffache im Vergleich zur Kontrollgruppe und unter Forskolin um circa das Dreiunddreißigfache, während die maximale Aktivierung unter Orexinen auch in diesem Versuch bei einer ungefähren Verdoppelung lag. Ausschließlich bei den Enzymen CYP11B1 und HSD3B2 zeigte sich nach 12 Stunden Inkubation ein vergleichbarer Effekt der Orexine und von Angiotensin II. In beiden Fällen wies Angiotensin II jedoch nach dem kürzeren Behandlungsintervall von 6 Stunden eine stärkere Wirkung auf als die Orexine, sodass der nach 12 Stunden gemessene Effekt lediglich als eine Abschwächung der hier früher einsetzenden Angiotensin II-Wirkung zu deuten ist. Auch auf mRNA-Ebene wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits entsprechend hohe Steigerungen der Expression dieser Enzyme durch Angiotensin II und Forskolin im Vergleich zum Effekt von Orexin A und B nachgewiesen (275). In Bezug auf Forskolin, welches hier das insgesamt stärkste Promotoraktivierungspotenzial besaß, sollte beim quantitativen Vergleich der Effekte allerdings berücksichtigt werden, dass es sich hierbei nicht um einen physiologischen Stimulator der NNR-Steroidbiosynthese handelt, sondern um einen synthetischen Ersatz für ACTH in dieser ACTH-unsensiblen Zelllinie. In der neueren, ACTH-sensiblen

humanen NNR-Zelllinie HAC15 („human adrenocortical carcinoma clone 15“) ergab ein Vergleich der ACTH- und Forskolin-Wirkung eine meist vielfach höhere Steigerung der mRNA-Spiegel aller sechs NNR-Steroidbiosyntheseenzyme durch Forskolin als durch ACTH, dessen Effekte sich eher auf oder unterhalb des Niveaus von Angiotensin II befanden (193).

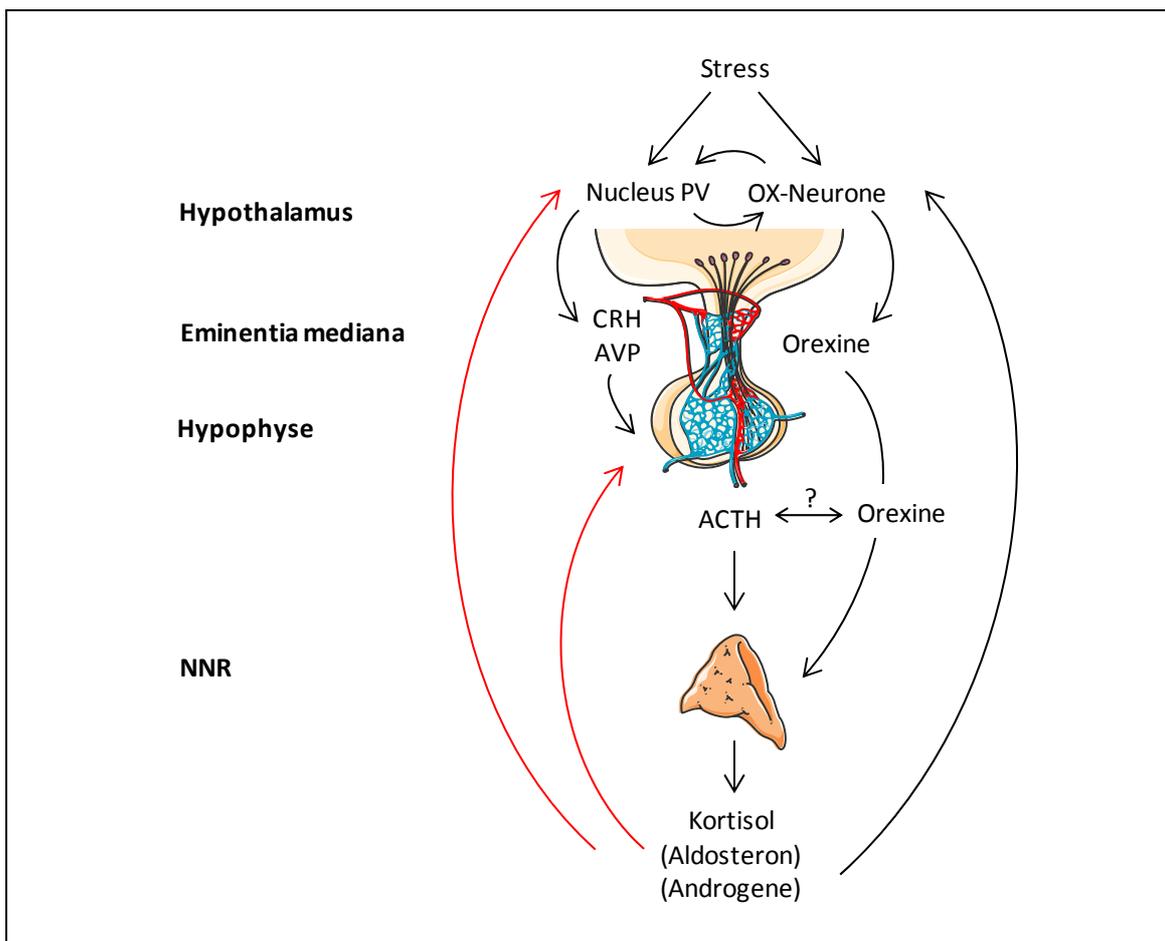
Zusammenfassend muss aufgrund der insgesamt jedoch erheblich stärkeren Effekte von Angiotensin II, Forskolin und mutmaßlich auch ACTH angenommen werden, dass den Orexinen in der Regulation der NNR-Funktion eine eher modulierende Rolle zukommt. In diesem Zusammenhang wäre eine weiterführende Untersuchung eines möglichen additiven Effekts der Orexine und der Hauptaktivatoren der Steroidbiosynthese, ACTH/Forskolin, Angiotensin II und Kalium, aufschlussreich. Derzeit liegen hierzu lediglich zwei Studien an NNR-Zellen von Ratten und Menschen vor, die zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Einerseits zeigten sie übereinstimmend, dass die Neuropeptide den Effekt von hochdosiertem ACTH ( $10^{-10}$ - $10^{-8}$  M) auf die Glukokortikoid-Ausschüttung nicht zu steigern vermochten (153, 162). Andererseits ließ sich bei geringeren ACTH-Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Kortisolausschüttung durch Orexin A aus humanen NNR-Zellen nachweisen (162). Mazzocchi et al. stellten außerdem fest, dass sich die Kortisolfreisetzung humaner NNR-Zellen unter hochdosiertem Angiotensin II ( $10^{-8}$  M) durch die gleichzeitige Inkubation mit Orexin A annähernd verdoppeln ließ (162). Unsere Arbeitsgruppe fand Hinweise darauf, dass Orexin A und ACTH ( $10^{-9}$  M) in NCI-H295R-Zellen einen additiven Effekt auf die mRNA-Expression der Enzyme CYP21 und HSD3B2 besitzen könnten (274). Die Klärung, ob die hier nachgewiesenen Promotoraktivierungen von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 unter Orexin-Behandlung in NCI-H295R-Zellen durch die simultane Stimulation mit ACTH bzw. Forskolin, Angiotensin II oder Kalium beeinflusst werden, muss allerdings einer nachfolgenden Studie vorbehalten bleiben.

Solche additiven Wirkungen könnten nicht nur durch eine simultane Aktivierung der gleichen intrazellulären Signalkaskaden, sondern auch durch eine Interaktion der Wirkstoffe auf einer anderen Ebene zustande kommen. Da für den  $OX_1R$  bereits bekannt ist, dass seine Orexin A-Sensibilität durch die spontane Dimerisierung mit dem Cannabinoid-Rezeptor „CB1“ gesteigert werden kann und dadurch das Potenzial von Orexin A zur Aktivierung der intrazellulären MAPK-Signalkaskade erhöht wird, wäre beispielsweise auch eine Interaktion mit ACTH oder Angiotensin II auf Rezeptorebene denkbar (61, 96). Diese Hypothese könnte durch die Analyse des Einflusses selektiver

Orexin-Rezeptor-Antagonisten, wie ACT-078573 (OX<sub>1</sub>R und OX<sub>2</sub>R) oder SB-334867-A (OX<sub>1</sub>R), auf die Steroidbiosynthese in NNR-Zellen unter ACTH, Forskolin oder Angiotensin II überprüft werden (27, 246).

### Orexine und die stressinduzierte Aktivierung der HHN-Achse

Im physiologischen Gesamtzusammenhang könnte der peripheren Modulation der NNR-Steroidproduktion durch Orexine eine vermittelnde Funktion im Regelkreis der HHN-Achse zukommen (s. Abb. 4.2). Dessen wichtigste Aufgabe besteht in der Steuerung der Bereitstellung von Kortisol aus der NNR unter Basalbedingungen sowie insbesondere auch in Stresssituationen. Seit langem ist bekannt, dass der hypothalamische Nucleus paraventricularis im Rahmen einer Stressreaktion vermehrt CRH und AVP exprimiert, welche anschließend in den hypophysären Pfortaderkreislauf eingeschleust werden. Hierdurch steigt im Hypophysenvorderlappen die Sekretion von ACTH, welches durch die Stimulation der NNR-Steroidbiosynthese die peripheren Glukokortikoid-Plasmaspiegel



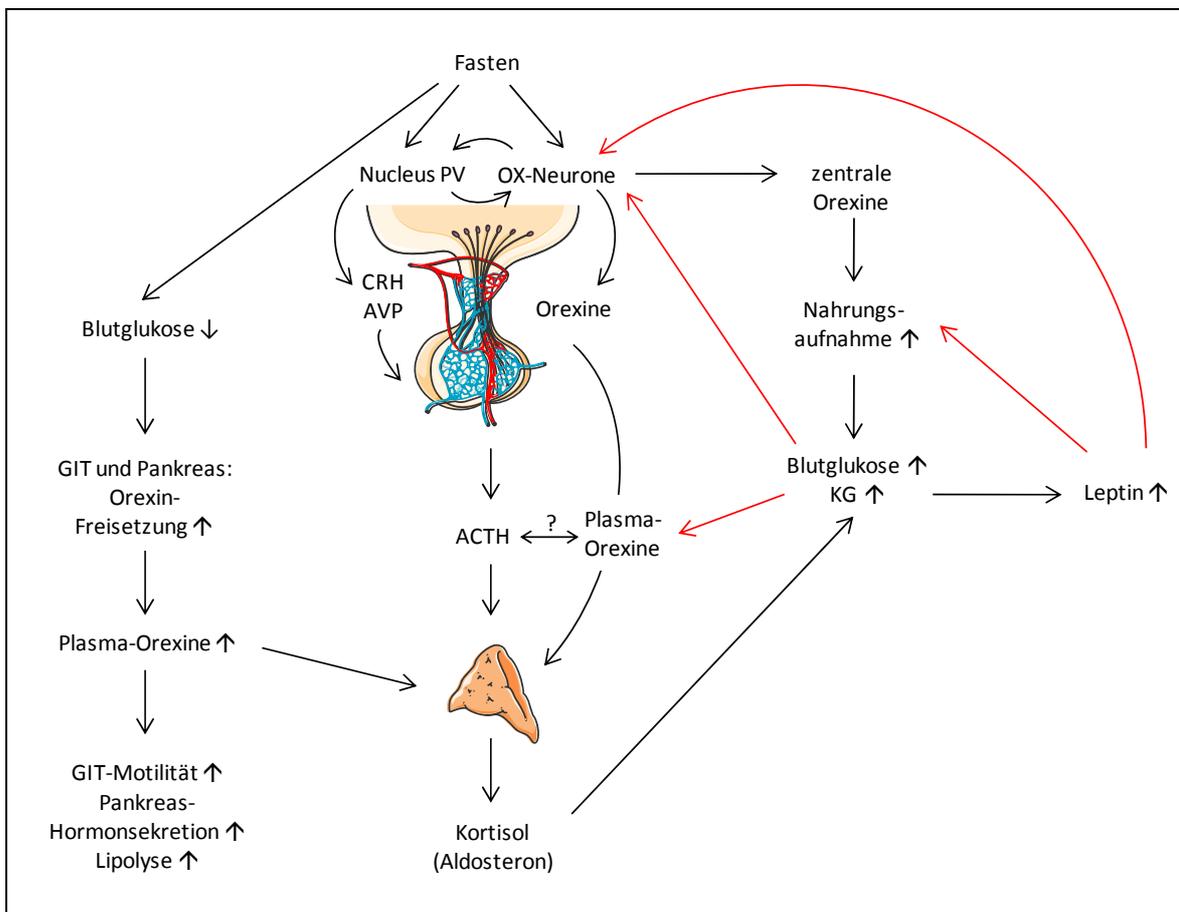
**Abbildung 4.2:** Schema zur hypothetischen Einbindung der Orexine in die stressinduzierte Aktivierung der HHN-Achse über eine Interaktion mit deren zentralen und peripheren Schaltstellen. Rote Pfeile zeigen eine hemmende, schwarze eine fördernde Wirkung an. OX: Orexin; PV: paraventricularis

ansteigen lässt (62, 143). Wie in der Einleitung dargestellt, deuten zahlreiche Studien darauf hin, dass die Orexine neben der peripheren Interaktion mit der NNR zusätzlich auch die zentralen Schaltstellen der HHN-Achse beeinflussen. So scheinen die zentral im lateralen Hypothalamus gebildeten Orexine die CRH- und AVP-vermittelte Freisetzung von ACTH aus dem Hypophysenvorderlappen steigern zu können, wodurch sekundär ebenfalls die Glukokortikoid-Plasmaspiegel erhöht werden (3, 32, 50, 107, 138, 160, 219). Weitere Untersuchungen ergaben überdies, dass bei Ratten in Stresssituationen durch Kälte oder Immobilisierung auch die Expression der Orexine und des Zellaktivierungsmarkers *c-fos* in den Orexin-Neuronen im lateralen Hypothalamus anstieg (104, 223). Zusätzlich zu den Projektionen der hypothalamischen Orexin-Neurone zu den CRH-produzierenden Zellen im Nucleus paraventricularis scheinen von diesen auch Projektionen zu den Orexin-Neuronen im lateralen Hypothalamus zurück zu führen, die ihrerseits CRH-Rezeptoren an der Oberfläche exprimieren (50, 278). Ferner erhöhte die Inkubation mit CRH die Aktionspotentialfrequenz der hypothalamischen Orexin-Neurone von Mäusen *in vitro* und bei CRH-Rezeptor-defizienten Mäusen erwies sich die stressinduzierte Aktivierung der Neurone *in vivo* als abgeschwächt (277, 278). Diese Daten weisen darauf hin, dass Orexine und CRH ihre Ausschüttung in Stresssituationen in einem reziproken Verhältnis gegenseitig verstärken können, wodurch die neuroendokrine Reaktion des Organismus auf einen Stressreiz potenziert werden könnte. Die Hypothese einer verstärkenden Rolle der Orexine im Gefüge der stressinduzierten Aktivierung der HHN-Achse wird ferner dadurch erhärtet, dass die mRNA-Expression von Präpro-Orexin im lateralen Hypothalamus von Ratten nach Adrenalektomie um 50 % absank und durch die periphere Substitution mit Dexamethason wieder auf ihr Ausgangsniveau zurückkehrte (256). Über diese positive Rückkopplung der Plasma-Glukokortikoide auf die zentrale Orexin-Produktion könnte die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierte periphere Orexin-Wirkung auf die NNR-Steroidbiosynthese in die Potenzierung der HHN-Achsen-Aktivierung eingebunden sein. Hierdurch würde ein geschlossener HHN-Orexin-Regelkreislauf entstehen. Die in Stresssituationen zentral vermehrt produzierten Orexine könnten neben der Förderung der ACTH-Freisetzung über die Projektionen der Orexin-Neurone an der Eminentia mediana möglicherweise direkt in die Zirkulation gelangen und über die Blutbahn die Produktion der Glukokortikoide in der NNR erhöhen. Durch deren positive Rückkopplung auf das zentrale Orexin-System würde der beschriebene Kreis geschlossen. Wie im vorangehenden Abschnitt erläutert, liegen zusätzlich auch Hinweise für eine synergistische Wirkung der Orexine und der HHN-Achsen-Hormone an der NNR selbst vor. Aufgrund der zum Teil

mehrständigen Inkubationszeiten bis zur maximalen Wirkung der Orexine auf die Steroidbiosynthese in NCI-H295R-Zellen wäre es denkbar, dass die Orexine *in vivo* als Vermittler beim Übergang einer akuten in eine chronische Stressreaktion fungieren. In Bezug auf das hier dargelegte Modell sollte künftig geklärt werden, ob die Expression des Orexin-Systems in der NNR oder die bisher gemessenen Orexin-Plasmaspiegel durch äußere Stressreize beeinflusst werden.

**Orexine und die Energiehomöostase**

Neben einer potenziellen Einbindung in die HHN-Achse und die Stressreaktion könnte die Bedeutung der orexininduzierten Steroidbiosynthese auch in einer vermittelnden Rolle in der Regulation des Glukosehaushalts und der Energiehomöostase liegen (s. Abb. 4.3). Seit einigen Jahren werden nicht nur die zentralen Anteile der HHN-Achse, sondern insbesondere auch die NNR als wichtige Schaltstellen in der Steuerung des Energie- und Glukosehaushalts sowie deren pathologischen Veränderungen erachtet (158, 214). So scheint durch Fasten die Aktivität der HHN-Achse gesteigert zu werden, gefolgt von



**Abb. 4.3:** Modell zur Interaktion des Orexin-Systems mit der Energiehomöostase unter Einbeziehung der HHN-Achse. GIT: Gastrointestinaltrakt, KG: Körpergewicht, OX: Orexin, PV: paraventricularis

erhöhten ACTH- und Glukokortikoid-Blutspiegeln (1, 2, 47). Eine Dysfunktion der NNR-Steroidproduktion ließ sich bisher mit Adipositas, dem metabolischen Syndrom, dem polyzystischen ovariellen Syndrom und der Insulinresistenz in Zusammenhang bringen (134, 155, 214). Hierbei werden pathologische Erhöhungen der Aldosteronsynthese mit einer verminderten Insulinsensitivität in Verbindung gebracht (214). Seit der Entdeckung spezieller Aldosteron-Releasing-Faktoren aus dem Fettgewebe gilt eine vermehrte Mineralokortikoid-Produktion darüber hinaus als mögliche Ursache für die mit der Adipositas häufig assoziierte Hypertonie (57). Erhöhte Kortisolspiegel führen wiederum über eine Steigerung der Glukoneogenese, eine Hemmung der Glukoseutilisation und eine Förderung der Nahrungsaufnahme zu Adipositas und Insulinresistenz (124, 214). Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass die Wechselbeziehung der Orexine mit der Energiehomöostase und dem Glukosehaushalt, ähnlich den Interaktionen mit der HHN-Achse, sowohl über zentrale als auch periphere Schaltstellen erfolgen könnte. So zeigte sich vielfach, dass zentral applizierte Orexine eine kurzfristige Erhöhung der Nahrungsaufnahme bewirken und so der Vermeidung hypoglykämischer Zustände dienen könnten (54, 56, 89, 159, 226, 258). Umgekehrt wurde die Nahrungsaufnahme bei Ratten durch eine Präpro-Orexin-Defizienz sowie durch die i.z.v. Infusion von Orexin-Antikörpern oder eines selektiven OX<sub>1</sub>R-Antagonisten gemindert (86, 88, 281). Die Aktivität der Orexin-Neurone im lateralen Hypothalamus von Mäusen korrelierte *in vitro* und *in situ* dementsprechend negativ mit den Konzentrationen von Glukose und Leptin (33, 159, 171, 282). Auch hinsichtlich der Expression von Präpro-Orexin im lateralen Hypothalamus von Ratten und Mäusen ergab sich ein antiproportionaler Zusammenhang mit den Glukose- und Leptin-Plasmaspiegeln (79, 146, 159, 282). Damit übereinstimmend stiegen die Orexin-Plasmaspiegel von Ratten und Menschen durch Fasten an und korrelierten in Studien an Menschen negativ mit dem Körpergewicht der Probanden (1, 8, 29, 128, 191). Zusätzlich zur Steigerung der Kortisol- und eventuell auch Aldosteronfreisetzung aus der NNR zeigte sich, dass auch die Expression des adrenokortikalen Orexin-Systems bei Ratten durch Fasten sowie metabolische Entgleisungen modifiziert wird (111, 118). Abgesehen von der NNR interagieren die Orexine darüber hinaus noch mit einer Reihe weiterer peripherer Organe, die in die Regulation des Glukose- und Energiehaushalts involviert sind. So führten niedrige Glukosespiegel auch am Darm und am Pankreas zur Aktivierung der lokalen Orexin-Neurone und zur vermehrten Freisetzung von Orexin A (125, 191). Des Weiteren beeinflussen Orexine die spezifischen Funktionen zahlreicher am Metabolismus beteiligter,

peripherer Organe. So modifizieren sie beispielsweise die Motilität und Sekretion im Magen-Darmtrakt, die Hormonsekretion des endokrinen Pankreas und die Lipolyse in Adipozyten (53, 91, 125, 191).

Eine solche duale Beteiligung an der Regulation der HHN-Achse und an der Energiehomöostase, wie sie hier spekulativ für Orexine beschrieben wurde, ist bereits für die hypothalamischen Peptide Leptin und Neuropeptid Y bekannt (75, 187, 216). Diesen wird eine Gegenspielerfunktion in der Regulation der Energiehomöostase zugesprochen. Während Leptin sowohl die Nahrungsaufnahme als auch die adrenokortikale Steroidbiosynthese hemmt, hat Neuropeptid Y entgegengesetzte Effekte (75, 158, 187, 216). Orexinen würde demnach am ehesten eine synergistische Rolle mit Neuropeptid Y als zusätzlichem Gegenspieler zu Leptin zukommen. Für diese These spricht auch, dass der zentrale Effekt von Orexinen sowohl auf die CRH-Ausschüttung als auch auf die Stimulation der Nahrungsaufnahme zumindest teilweise an NPY gekoppelt zu sein scheint (102, 108, 219, 283). Einige Studien legen außerdem nahe, dass Orexine die NPY-produzierenden Neurone im Nucleus arcuatus über ihre dorthin führenden Projektionen aktivieren können (50, 142, 199, 269, 283). Umgekehrt reduzierte nicht nur Leptin, wie beschrieben, die Expression des Orexin-Systems im Hypothalamus, sondern Orexine erniedrigten umgekehrt auch die Plasma-Leptinspiegel (58, 128).

Möglicherweise kommt die hier erläuterte Interaktion von Orexinen mit der Energiehaushalt- und Stressregulation des Organismus besonders in bestimmten Situationen zum Tragen. Da in der Aktivierung und Funktion der HHN-Achse, der Steuerung der Energiehomöostase und auch im Orexin-System auf der Ebene von Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere Geschlechtsunterschiede bestehen, könnten die hier beschriebenen Interaktionen der Orexine in Abhängigkeit vom Sexualhormonstatus auftreten (52, 68, 83, 109, 112, 280). Denkbar wäre demgemäß auch, dass die Orexin-HHN-Interaktion der Steuerung der Reaktion des Organismus auf Stressreize oder auf Veränderungen der Energiehomöostase in Abhängigkeit von den gonadalen Steroiden dient, wodurch eine Anpassung der Reaktion an die jeweils erforderlichen Bedürfnisse des Organismus möglich wäre.

### **Übertragbarkeit der Modelle auf *in vivo* Konditionen**

Vor der Übertragung der hier vorgestellten Modelle auf *in vivo* Bedingungen müssen abschließend jedoch noch zwei kritische Punkte erörtert werden. So handelt es sich bei den NCI-H295R-Zellen um die kultivierten Karzinom-Zellen einer einzigen Patientin. Die

Übertragung der Resultate der durchgeführten Versuche auf die gesunde Allgemeinheit ist somit nur bedingt zulässig. Auch bei Betrachtung der gesamten Datenlage muss konstatiert werden, dass zwar zahlreiche Studien zur Orexin-NNR-Interaktion an gesundem NNR-Gewebe von Ratten durchgeführt wurden, aber bei allen bisherigen Studien an menschlichem NNR-Gewebe eine pathologische Veränderung desselben zumindest nicht auszuschließen ist. Hinsichtlich der Untersuchungen an NCI-H295R-Zellen muss weiterhin festgehalten werden, dass die Wahrscheinlichkeit der Veränderung der ursprünglichen Zelleigenschaften, wie grundsätzlich bei allen kultivierten Zelllinien, mit der Anzahl der Subkultivierungen zunimmt. Zur Absicherung der hier vorgestellten Ergebnisse sowie der unter Bezug auf die Fachliteratur daraus abgeleiteten Modelle sollte daher eine Validierung dieser Befunde an einer Primärkultur von NNR-Zellen aus pathologisch unverändertem, humanem NNR-Gewebe angestrebt werden. Außerdem wird durch die Transfektion der rekombinanten Expressionsvektoren in die NCI-H295R-Zellen ein artifizielles System geschaffen, welches den anschließenden Messungen zugrunde liegt. Die Regulation der endogenen Transkription der Steroidbiosyntheseenzyme in NCI-H295R-Zellen ließe sich in Zukunft beispielsweise in einer „nuclear run on“-Untersuchung bestimmen.

Darüber hinaus muss der Blick vor der theoretischen Übertragung der Modelle auf *in vivo* Konditionen noch einmal auf die Orexin-Plasmaspiegel gerichtet werden. Da aufgrund der widersprüchlichen Befunde zur Expression von Präpro-Orexin und Orexin A in der NNR bisher nicht sicher von einer auto- oder parakrinen Wirkung der Orexine in der NNR ausgegangen werden kann, müssten die Orexine zur Aktivierung ihrer Rezeptoren in der NNR diese über die Zirkulation erreichen (112, 119, 145, 175, 212, 249). Mittlerweile wurde zwar in mehr als einem Dutzend Studien Orexin A im menschlichen Plasma nachgewiesen, aber dessen Ursprung ist nach wie vor ungeklärt. Orexin A könnte vom Hypothalamus über die orexinführenden Projektionen zur Eminentia mediana in den hypophysären Pfortaderkreislauf und von dort in die periphere Zirkulation gelangen, jedoch scheinen die Plasmakonzentrationen von Orexin A zumindest teilweise von der zentralen Produktion unabhängig zu sein (40, 46, 49, 91). Aufgrund der Detektion von Präpro-Orexin oder Orexin A in diversen peripheren Organen, wie der Adenohypophyse, dem Magen-Darmtrakt, dem Pankreas, der Niere oder den Gonaden, wäre auch eine lokale Produktion in diesen Organen mit anschließender Abgabe in die Zirkulation denkbar (24, 49, 58, 125, 175, 191). Bislang wurde die Sekretion von Orexin A an die Umgebung einzig an isolierten Langerhansinseln von Ratten verifiziert, welche durch niedrige Glukosekonzentrationen induziert wurde (191). Unabhängig von der Quelle des Plasma-

Orexins, ist es jedoch fraglich, ob die bisher gemessenen Konzentrationen zur Aktivierung der Orexin-Rezeptoren in der NNR ausreichen. In Studien an gesunden Erwachsenen fanden sich Plasma-Orexinspiegel im Bereich von ungefähr  $2-12 \times 10^{-12}$  M, was demnach bis zu sechs Zehnerpotenzen unter den hier und in der Literatur in Studien an NNR-Material üblicherweise eingesetzten Orexin-Konzentrationen von  $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M liegt (1, 7, 91, 128, 224). Denkbar wäre jedoch, dass die Orexin-Plasmaspiegel erst in bestimmten Situationen, wie beispielsweise unter Stress, Nahrungsentzug oder auch in Abhängigkeit von den gonadalen Steroiden, physiologisch relevante Konzentrationen erreichen und das periphere Orexin-System ausschließlich in diesen Situationen aktivieren. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann allerdings auch eine Aktivierung der Orexin-Rezeptoren in der NNR durch Heterodimerbildung mit einem anderen Rezeptor oder die Existenz weiterer, bisher noch unbekannter endogener Liganden an den Orexin-Rezeptoren nicht völlig ausgeschlossen werden. Schließlich könnte sich die Bedeutung des Orexin-Systems im Falle biologisch unwirksamer Orexin-Plasmaspiegel auch aus einer hohen konstitutiven Aktivität der lokal exprimierten Rezeptoren ergeben, welche grundlegend für die regelrechte Funktionsweise der NNR sein könnte. Um hierüber Aufschluss zu erlangen, sollte die Funktion der NNR an adrenokortikalen Zellen von Orexin-Rezeptor-defizienten Versuchstieren untersucht werden.

#### **4.7 Fazit und Ausblick**

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Erhöhungen der Promotoraktivitäten von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen lassen sich schlüssig in den Kontext der bisher bekannten Funktionen der Orexine in der NNR und in anderen Teilen der HHN-Achse einreihen. Dass die Orexine keinen Einfluss auf die mRNA-Stabilität der genannten Enzyme oder auf die Proliferation der NCI-H295R-Zellen hatten, lässt sich ebenfalls hiermit und mit der Fachliteratur gut in Einklang bringen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe sowie der veröffentlichten Daten anderer Arbeitsgruppen kann daher zusammenfassend angenommen werden, dass es sich bei den hier erstmals beschriebenen Transkriptionssteigerungen selektiver Steroidbiosyntheseenzyme um den bislang noch unbekanntem molekulargenetischen Mechanismus handelt, der unter Orexin-Behandlung zu den vielfach beobachteten Anstiegen der Gluko- und teilweise auch Mineralokortikoid-Ausschüttung aus NNR-Zellen von Ratten, Schweinen und Menschen führt. Intrazellulär scheinen die Orexin-Rezeptoren

hierbei sowohl die PLC/IP<sub>3</sub>/PKC- als auch die AC/cAMP/PKA-Signalkaskade aktivieren zu können, die bereits als Hauptsignalwege von ACTH und Angiotensin II in der Zona glomerulosa und fasciculata bekannt sind. In den weiteren Verlauf der Signaltransduktion sind vermutlich auch die MAPK-Wege involviert.

Über die Funktion der Aktivierung der Steroidbiosynthese in der NNR durch Orexine kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. So könnte den Orexinen eine vermittelnde Rolle in der stressinduzierten HHN-Achsen-Aktivierung zukommen sowie auch in der Regulation der Energiehomöostase unter Einbeziehung der NNR. Wie die Orexin-NNR-Interaktion im Hinblick auf die diversen anderen Funktionen des Orexin-Systems, wie beispielsweise dessen Einfluss auf das Schlaf-Wach-Verhalten, auf die Suchtentstehung oder auf vegetative Funktionen, einzuordnen ist, bleibt ebenfalls noch zu klären. In Betracht kommt, dass das Orexin-System bei Nahrungsentzug eine Reihe unterschiedlichster peripherer und zentralnervöser Programme einleitet, die sämtlich der Vermeidung hypoglykämischer Zustände dienen. Da Nahrungsentzug immer auch eine Stressreaktion bedingt, könnten Orexine unter der hier dargelegten Einbeziehung der NNR körpereigene Energiereserven aktivieren. Wie sich aus der gesteigerten Aufmerksamkeit, Bewegungsaktivität und Schlafunterdrückung bei Ratten ableiten lässt, könnten die Neuropeptide gleichzeitig im ZNS motorische Programme zur Nahrungsbeschaffung generieren. Die Validierung dieser Thesen und die Einordnung der Rolle des gesamten Orexin-Systems in die Physiologie des Organismus bleiben jedoch zukünftigen Forschungsprojekten vorbehalten. Die Aufklärung dieses Gesamtkontexts könnte auch das Verständnis der hier beschriebenen Interaktion der Orexine mit der NNR fördern. Die Tatsache, dass ein stimulierender Effekt der Orexine auf die Kortikoidausschüttung nicht nur an NNR-Zellen von Menschen, sondern auch von Ratten und Schweinen beobachtet werden konnte, demonstriert bereits, wie hoch diese Funktion phylogenetisch konserviert ist und welche hohe physiologische Bedeutung ihr daher zukommen könnte.

Besonders im Hinblick auf die gegenwärtige Entwicklung selektiver Orexin-Rezeptor-Antagonisten, wie beispielsweise Almorexant, die bereits als Hypnotika in klinischen Studien getestet wurden, wird deutlich, welche hohe klinische Relevanz und Aktualität der Erforschung des Orexin-Systems bezüglich seiner Rolle im Organismus, seiner einzelnen Teilfunktionen und hinsichtlich der beteiligten molekularen Wirkmechanismen zukommt (99, 181).

## 5 Zusammenfassung

Die erstmals im Jahr 1998 beschriebenen hypothalamischen Neuropeptide Orexin A und Orexin B werden aus dem gemeinsamen Vorläuferpeptid Präpro-Orexin gebildet und entfalten ihre Wirkungen über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren OX<sub>1</sub>R und OX<sub>2</sub>R. Nach heutigen Erkenntnissen ist das Orexin-System nicht nur in zentrale Regulationsprozesse involviert, sondern beeinflusst in einem eigenständigen System auch die Funktionen diverser peripherer Organe. So haben sich in den letzten Jahren zahlreiche Hinweise auf eine Interaktion des Orexin-Systems mit den zentralen und insbesondere auch mit den peripheren Anteilen der HHN-Achse ergeben. Die Expression der Orexin-Rezeptoren wurde in NNR-Zellen von Ratten, Schafen, Schweinen und Menschen nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten die Orexine in einer Vielzahl von Studien einen stimulierenden Effekt auf die Gluko- und teilweise auch auf die Mineralokortikoid-Ausschüttung aus NNR-Zellen von Ratten, Schweinen und Menschen.

Eine kürzlich von unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung an der humanen adrenokortikalen Zelllinie NCI-H295R ergab, dass die Steigerung der Kortikoidausschüttung unter Orexin-Behandlung vermutlich von einer zeitlich parallel auftretenden Erhöhung der mRNA-Spiegel der Steroidbiosyntheseenzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 verursacht wird. Hieran anknüpfend war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den bisher noch unbekanntem molekulargenetischen Mechanismus zu identifizieren, der den beobachteten Anstieg der mRNA-Kopien selektiver Steroidbiosyntheseenzyme durch Orexine in NCI-H295R-Zellen verursacht.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die beschriebene Änderung des Expressionsmusters der Steroidbiosyntheseenzyme unter zwölfstündiger Orexin A-Behandlung in NCI-H295R-Zellen mittels quantitativer „real-time“ RT-PCR bestätigt. Hiernach wurde in einer mRNA-Stabilitäts-Untersuchung mit dem DNA-Interkalator Actinomycin D erstmals gezeigt, dass die zwölfstündige Inkubation mit Orexin A den Abbau der mRNA der Enzyme CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 in NCI-H295R-Zellen nicht beeinflusst. Eine veränderte mRNA-Stabilität dieser Enzyme ist daher nicht als ursächlich für die beobachteten Erhöhungen der mRNA-Kopien anzusehen. Um zu überprüfen, ob die Orexine alternativ durch eine verstärkte Transkription der Gene von CYP11B1, CYP11B2, CYP21 und HSD3B2 einen Anstieg der jeweiligen mRNA bewirken, wurden die Aktivitäten der zugehörigen Promotoren unter Orexin-Behandlung analysiert. Nach der

Klonierung der Promotoren in pGL4.19-Expressionsvektoren ließ sich mit Hilfe des Dual-Luziferase-Reportersystems erstmals nachweisen, dass Orexin A und Orexin B nach Inkubationszeiträumen von 3, 6 oder 12 Stunden zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Aktivitäten der untersuchten Promotoren führten. Es ist daher anzunehmen, dass es sich hierbei um den zu identifizierenden Mechanismus handelt, der die beschriebenen mRNA-Spiegelanstiege verursacht. In einem vergleichenden Übersichtsversuch mit Angiotensin II und dem ACTH-Ersatz Forskolin ließ sich jedoch feststellen, dass die relativen Zunahmen der Promotoraktivitäten unter Orexinen im Vergleich zu den Steigerungen unter diesen beiden Positivkontrollen deutlich geringer ausfallen. Da eine erhöhte Proliferationsrate zur Veränderung des zellulären Genexpressionsmusters führen kann, wurde anschließend der Einfluss der Orexine auf die Proliferation der NCI-H295R-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Orexin A und Orexin B keinen Einfluss auf die Zellzahl der NCI-H295R-Zelllinie besitzen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Orexine durch eine Erhöhung der Transkription selektiver Steroidbiosyntheseenzyme den häufig beobachteten Anstieg der Gluko- und teilweise auch Mineralokortikoid-Ausschüttung aus NNR-Zellen von Ratten, Schweinen und Menschen verursachen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die Orexine hierbei einen modulierenden Einfluss auf die adrenokortikale Steroidproduktion nehmen können. Die physiologische Funktion einer solchen Feinregulation *in vivo* bedarf besonders auch im Hinblick auf die zahlreichen bereits bekannten Wirkungen des Orexin-Systems noch weiterer Klärung. Möglicherweise sind die Orexine in die stressinduzierte Aktivierung der HHN-Achse oder auch in die Regulation der Energiehomöostase unter Beteiligung der NNR involviert. Die aktuelle Entwicklung selektiver Orexin-Rezeptor-Antagonisten als Hypnotika unterstreicht die klinische Bedeutung der weiteren Erforschung des Orexin-Systems.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Adam JA, Menheere PP, van Dielen FM, Soeters PB, Buurman WA, Greve JW: Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 274-276 (2002)
2. Akana SF, Strack AM, Hanson ES, Dallman MF: Regulation of activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis is integral to a larger hypothalamic system that determines caloric flow. *Endocrinology* 135, 1125-1134 (1994)
3. Al Barazanji KA, Wilson S, Baker J, Jessop DS, Harbuz MS: 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 (2001)
4. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410 (1990)
5. Ammoun S, Johansson L, Ekholm ME, Holmqvist T, Danis AS, Korhonen L, Sergeeva OA, Haas HL, Akerman KE, Kukkonen JP: OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca<sup>2+</sup> influx in OX1 receptor signaling. *Mol Endocrinol* 20, 80-99 (2006)
6. Arafah BM: Hypothalamic pituitary adrenal function during critical illness: limitations of current assessment methods. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3725-3745 (2006)
7. Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Mouri T: Immunoreactive orexin-A in human plasma. *Peptides* 22, 139-142 (2001)
8. Baranowska B, Wolinska-Witort E, Martynska L, Chmielowska M, Baranowska-Bik A: Plasma orexin A, orexin B, leptin, neuropeptide Y (NPY) and insulin in obese women. *Neuro Endocrinol Lett* 26, 293-296 (2005)
9. Barreiro ML, Pineda R, Navarro VM, Lopez M, Suominen JS, Pinilla L, Senaris R, Toppari J, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M: Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid expression and stimulation of testosterone secretion by orexin-A in rat testis. *Endocrinology* 145, 2297-2306 (2004)
10. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I, Rainey WE: Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5446-5455 (2005)
11. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE: The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation. *J Biol Chem* 279, 37622-37630 (2004)

12. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE: The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 18, 279-290 (2004)
13. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL: GenBank. *Nucleic Acids Res* 36, D25-D30 (2008)
14. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry*. 6. Aufl., 892-920, W H Freeman Company, New York, 2007
15. Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M: Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene* 148, 71-74 (1994)
16. Bernardis LL, Bellinger LL: The lateral hypothalamic area revisited: ingestive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 20, 189-287 (1996)
17. Beuckmann CT, Yanagisawa M: Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation. *J Mol Med* 80, 329-342 (2002)
18. Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE: Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology* 133, 1555-1561 (1993)
19. Bird IM, Imaishi K, Pasquarette MM, Rainey WE, Mason JI: Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells. *J Endocrinol* 150 Suppl, S165-S173 (1996)
20. Bird IM, Mason JI, Rainey WE: Battle of the kinases: integration of adrenal responses to cAMP, DG and Ca<sup>2+</sup> at the level of steroidogenic cytochromes P450 and 3betaHSD expression in H295R cells. *Endocr Res* 24, 345-354 (1998)
21. Bird IM, Mason JI, Rainey WE: Protein kinase A, protein kinase C, and Ca<sup>2+</sup>-regulated expression of 21-hydroxylase cytochrome P450 in H295R human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1592-1597 (1998)
22. Bird IM, Pasquarette MM, Rainey WE, Mason JI: Differential control of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 2171-2178 (1996)
23. Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523 (1979)
24. Blanco M, Gallego R, Garcia-Caballero T, Dieguez C, Beiras A: Cellular localization of orexins in human anterior pituitary. *Histochem Cell Biol* 120, 259-264 (2003)
25. Blanco M, Garcia-Caballero T, Fraga M, Gallego R, Cuevas J, Forteza J, Beiras A, Dieguez C: Cellular localization of orexin receptors in human adrenal gland, adrenocortical adenomas and pheochromocytomas. *Regul Pept* 104, 161-165 (2002)
26. Boutrel B, Kenny PJ, Specio SE, Martin-Fardon R, Markou A, Koob GF, de Lecea L: Role for hypocretin in mediating stress-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19168-19173 (2005)

27. Brisbare-Roch C, Dingemans J, Koberstein R, Hoever P, Aissaoui H, Flores S, Mueller C, Nayler O, van Gerven J, de Haas SL, Hess P, Qiu C, Buchmann S, Scherz M, Weller T, Fischli W, Clozel M, Jenck F: Promotion of sleep by targeting the orexin system in rats, dogs and humans. *Nat Med* 13, 150-155 (2007)
28. Brivanlou AH, Darnell JE Jr: Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295, 813-818 (2002)
29. Bronsky J, Nedvidkova J, Zamrazilova H, Pechova M, Chada M, Kotaska K, Nevoral J, Prusa R: Dynamic changes of orexin A and leptin in obese children during body weight reduction. *Physiol Res* 56, 89-96 (2007)
30. Brooks EM, Sheflin LG, Spaulding SW: Secondary structure in the 3' UTR of EGF and the choice of reverse transcriptases affect the detection of message diversity by RT-PCR. *Biotechniques* 19, 806-5 (1995)
31. Brüggemann N: Regulation der Expression von Orexinrezeptoren durch gonadale Steroide. *Med. Diss. Lübeck* (2004)
32. Brunton PJ, Russell JA: Hypothalamic-pituitary-adrenal responses to centrally administered orexin-A are suppressed in pregnant rats. *J Neuroendocrinol* 15, 633-637 (2003)
33. Burdakov D, Gerasimenko O, Verkhatsky A: Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25, 2429-2433 (2005)
34. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193 (2000)
35. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29, 23-39 (2002)
36. Cai XJ, Widdowson PS, Harrold J, Wilson S, Buckingham RE, Arch JR, Tadayyon M, Clapham JC, Wilding J, Williams G: Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding. *Diabetes* 48, 2132-2137 (1999)
37. Carlander B, Eliaou JF, Billiard M: Autoimmune hypothesis in narcolepsy. *Neurophysiol Clin* 23, 15-22 (1993)
38. Chang SF, Chung BC: Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol Endocrinol* 9, 1330-1336 (1995)
39. Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, Elmquist JK, Scammell T, Lee C, Richardson JA, Williams SC, Xiong Y, Kisanuki Y, Fitch TE, Nakazato M, Hammer RE, Saper CB, Yanagisawa M: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-451 (1999)
40. Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK: Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neurosci Lett* 260, 161-164 (1999)

41. Chen CT, Hwang LL, Chang JK, Dun NJ: Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R692-R697 (2000)
42. Chen J, Randeva HS: Genomic organization of mouse orexin receptors: characterization of two novel tissue-specific splice variants. *Mol Endocrinol* 18, 2790-2804 (2004)
43. Cluderay JE, Harrison DC, Hervieu GJ: Protein distribution of the orexin-2 receptor in the rat central nervous system. *Regul Pept* 104, 131-144 (2002)
44. Coulter CL, Jaffe RB: Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 139, 5144-5150 (1998)
45. Cutler DJ, Morris R, Sheridhar V, Wattam TA, Holmes S, Patel S, Arch JR, Wilson S, Buckingham RE, Evans ML, Leslie RA, Williams G: Differential distribution of orexin-A and orexin-B immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Peptides* 20, 1455-1470 (1999)
46. Dalal MA, Schuld A, Haack M, Uhr M, Geisler P, Eisensehr I, Noachtar S, Pollmacher T: Normal plasma levels of orexin A (hypocretin-1) in narcoleptic patients. *Neurology* 56, 1749-1751 (2001)
47. Dallman MF, Akana SF, Bhatnagar S, Bell ME, Choi S, Chu A, Horsley C, Levin N, Meijer O, Soriano LR, Strack AM, Viau V: Starvation: early signals, sensors, and sequelae. *Endocrinology* 140, 4015-4023 (1999)
48. Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Nakazato M: Distribution of orexin-A and orexin-B (hypocretins) in the rat spinal cord. *Neurosci Lett* 288, 87-90 (2000)
49. Date Y, Mondal MS, Matsukura S, Ueta Y, Yamashita H, Kaiya H, Kangawa K, Nakazato M: Distribution of orexin/hypocretin in the rat median eminence and pituitary. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 1-6 (2000)
50. Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakazato M: Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 748-753 (1999)
51. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM, Sutcliffe JG: The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 322-327 (1998)
52. Diamond MP, Jones T, Caprio S, Hallarman L, Diamond MC, Addabbo M, Tamborlane WV, Sherwin RS: Gender influences counterregulatory hormone responses to hypoglycemia. *Metabolism* 42, 1568-1572 (1993)
53. Digby JE, Chen J, Tang JY, Lehnert H, Matthews RN, Randeva HS: Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol* 191, 129-136 (2006)

54. Dube MG, Kalra SP, Kalra PS: Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. *Brain Res* 842, 473-477 (1999)
55. Dyer CJ, Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matteri RL: Cloning of porcine prepro-orexin cDNA and effects of an intramuscular injection of synthetic porcine orexin-B on feed intake in young pigs. *Domest Anim Endocrinol* 16, 145-148 (1999)
56. Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Murphy KG, Ghatei MA, Bloom SR: The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. *J Endocrinol* 160, R7-12 (1999)
57. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, Bornstein SR: Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14211-14216 (2003)
58. Ehrstrom M, Gustafsson T, Finn A, Kirchgessner A, Gryback P, Jacobsson H, Hellstrom PM, Naslund E: Inhibitory effect of exogenous orexin a on gastric emptying, plasma leptin, and the distribution of orexin and orexin receptors in the gut and pancreas in man. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 2370-2377 (2005)
59. Ehrstrom M, Levin F, Kirchgessner AL, Schmidt PT, Hilsted LM, Gryback P, Jacobsson H, Hellstrom PM, Naslund E: Stimulatory effect of endogenous orexin A on gastric emptying and acid secretion independent of gastrin. *Regul Pept* 132, 9-16 (2005)
60. Ekholm ME, Johansson L, Kukkonen JP: IP3-independent signalling of OX1 orexin/hypocretin receptors to Ca<sup>2+</sup> influx and ERK. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 475-480 (2007)
61. Ellis J, Pediani JD, Canals M, Milasta S, Milligan G: Orexin-1 receptor-cannabinoid CB1 receptor heterodimerization results in both ligand-dependent and -independent coordinated alterations of receptor localization and function. *J Biol Chem* 281, 38812-38824 (2006)
62. Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT: The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 25, 132-149 (2004)
63. Erlich HA: Principles and applications of the polymerase chain reaction. *Rev Immunogenet* 1, 127-134 (1999)
64. Faridi J, Wang L, Endemann G, Roth RA: Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsivity of these cells in vivo. *Clin Cancer Res* 9, 2933-2939 (2003)
65. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M: Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417 (1987)

66. Foster RH: Reciprocal influences between the signalling pathways regulating proliferation and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Mol Endocrinol* 32, 893-902 (2004)
67. Freeman WM, Vrana SL, Vrana KE: Use of elevated reverse transcription reaction temperatures in RT-PCR. *Biotechniques* 20, 782-783 (1996)
68. Galassetti P, Neill AR, Tate D, Ertl AC, Wasserman DH, Davis SN: Sexual dimorphism in counterregulatory responses to hypoglycemia after antecedent exercise. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3516-3524 (2001)
69. Gautvik KM, de Lecea L, Gautvik VT, Danielson PE, Tranque P, Dopazo A, Bloom FE, Sutcliffe JG: Overview of the most prevalent hypothalamus-specific mRNAs, as identified by directional tag PCR subtraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8733-8738 (1996)
70. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV: Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50, 5488-5496 (1990)
71. Gell JS, Carr BR, Sasano H, Atkins B, Margraf L, Mason JI, Rainey WE: Adrenarche results from development of a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-deficient adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 3695-3701 (1998)
72. Georgescu D, Zachariou V, Barrot M, Mieda M, Willie JT, Eisch AJ, Yanagisawa M, Nestler EJ, DiLeone RJ: Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *J Neurosci* 23, 3106-3111 (2003)
73. Gibson UE, Heid CA, Williams PM: A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6, 995-1001 (1996)
74. Gilon T, Chomsky O, Kulka RG: Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17, 2759-2766 (1998)
75. Glasow A, Bornstein SR: Leptin and the adrenal gland. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3, 39-45 (2000)
76. Goncz E, Strowski MZ, Grotzinger C, Nowak KW, Kaczmarek P, Sassek M, Mergler S, El Zayat BF, Theodoropoulou M, Stalla GK, Wiedenmann B, Plockinger U: Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway. *Endocrinology* 149, 1618-1626 (2008)
77. Grabinski N: Effekte von Orexinen auf die Expression von Steroidbiosynthese Enzymen und Beteiligung verschiedener Signaltransduktionswege in humanen Nebennierenrindenzellen. Masterarbeit Lübeck (2006)
78. Green MR: Eukaryotic transcription activation: right on target. *Mol Cell* 18, 399-402 (2005)
79. Griffond B, Risold PY, Jacquemard C, Colard C, Fellmann D: Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262, 77-80 (1999)

80. Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM: ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem* 276, 34888-34895 (2001)
81. Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N: Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10911-10916 (1999)
82. Hampsey M: Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 465-503 (1998)
83. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA: Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav* 28, 464-476 (1994)
84. Hannah RR, Jennens-Clough ML, Wood KV: Rapid Luciferase Reporter Assay Systems for High Throughput Studies. *Promega Notes* 65, 9-14 (1998)
85. Hanson BJ: Multiplexing Fluo-4 NW and a GeneBLazer transcriptional assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* 11, 644-651 (2006)
86. Hara J, Beuckmann CT, Nambu T, Willie JT, Chemelli RM, Sinton CM, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. *Neuron* 30, 345-354 (2001)
87. Harris GC, Wimmer M, Aston-Jones G: A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking. *Nature* 437, 556-559 (2005)
88. Haynes AC, Jackson B, Chapman H, Tadayyon M, Johns A, Porter RA, Arch JR: A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96, 45-51 (2000)
89. Haynes AC, Jackson B, Overend P, Buckingham RE, Wilson S, Tadayyon M, Arch JR: Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20, 1099-1105 (1999)
90. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994 (1996)
91. Heinonen MV, Purhonen AK, Makela KA, Herzig KH: Functions of orexins in peripheral tissues. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 471-485 (2008)
92. Hervieu GJ, Cluderay JE, Harrison DC, Roberts JC, Leslie RA: Gene expression and protein distribution of the orexin-1 receptor in the rat brain and spinal cord. *Neuroscience* 103, 777-797 (2001)
93. Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y: Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2841-2845 (1986)

94. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10, 413-417 (1992)
95. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030 (1993)
96. Hilairret S, Bouaboula M, Carriere D, Le Fur G, Casellas P: Hypersensitization of the Orexin 1 receptor by the CB1 receptor: evidence for cross-talk blocked by the specific CB1 antagonist, SR141716. *J Biol Chem* 278, 23731-23737 (2003)
97. Hiorns LR, Bradshaw TD, Skelton LA, Yu Q, Kelland LR, Leyland-Jones B: Variation in RNA expression and genomic DNA content acquired during cell culture. *Br J Cancer* 90, 476-482 (2004)
98. Hirakawa T, Ascoli M: The lutropin/choriogonadotropin receptor-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases in leydig cells is mediated by a protein kinase a-dependent activation of ras. *Mol Endocrinol* 17, 2189-2200 (2003)
99. Hoever P, de Haas S, Winkler J, Schoemaker RC, Chiossi E, van Gerven J, Dingemans J: Orexin receptor antagonism, a new sleep-promoting paradigm: an ascending single-dose study with almorexant. *Clin Pharmacol Ther* 87, 593-600 (2010)
100. Hollander JA, Lu Q, Cameron MD, Kamenecka TM, Kenny PJ: Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19480-19485 (2008)
101. Holmqvist T, Johansson L, Ostman M, Ammoun S, Akerman KE, Kukkonen JP: OX1 orexin receptors couple to adenylyl cyclase regulation via multiple mechanisms. *J Biol Chem* 280, 6570-6579 (2005)
102. Horvath TL, Diano S, van den Pol AN: Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19, 1072-1087 (1999)
103. Ida T, Nakahara K, Katayama T, Murakami N, Nakazato M: 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 (1999)
104. Ida T, Nakahara K, Murakami T, Hanada R, Nakazato M, Murakami N: Possible involvement of orexin in the stress reaction in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 318-323 (2000)
105. International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945 (2004)
106. Irahara M, Tamura T, Matuzaki T, Saito S, Yasui T, Yamano S, Kamada M, Aono T: Orexin-A suppresses the pulsatile secretion of luteinizing hormone via beta-endorphin. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 232-236 (2001)

107. Jaszberenyi M, Bujdoso E, Pataki I, Telegdy G: Effects of orexins on the hypothalamic-pituitary-adrenal system. *J Neuroendocrinol* 12, 1174-1178 (2000)
108. Jaszberenyi M, Bujdoso E, Telegdy G: The role of neuropeptide Y in orexin-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activation. *J Neuroendocrinol* 13, 438-441 (2001)
109. Jöhren O, Brüggemann N, Dendorfer A, Dominiak P: 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 (2003)
110. Jöhren O, Brüggemann N, Dominiak P: Orexins (hypocretins) and adrenal function. *Horm Metab Res* 36, 370-375 (2004)
111. Jöhren O, Gremmels JA, Qadri F, Dendorfer A, Dominiak P: Adrenal expression of orexin receptor subtypes is differentially regulated in experimental streptozotocin induced type-1 diabetes. *Peptides* 27, 2764-2769 (2006)
112. Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A, Dominiak P: Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142, 3324-3331 (2001)
113. Jones DN, Gartlon J, Parker F, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Hatcher JP, Johns A, Porter RA, Hagan JJ, Hunter AJ, Upton N: Effects of centrally administered orexin-B and orexin-A: a role for orexin-1 receptors in orexin-B-induced hyperactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 153, 210-218 (2001)
114. Jones LJ, Yue ST, Cheung CY, Singer VL: RNA quantitation by fluorescence-based solution assay: RiboGreen reagent characterization. *Anal Biochem* 265, 368-374 (1998)
115. Kagerer SM, Jöhren O: Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiol (Oxf)* 198, 361-371 (2010)
116. Karin M: Signal transduction and gene control. *Curr Opin Cell Biol* 3, 467-473 (1991)
117. Karteris E, Chen J, Randeva HS: Expression of human prepro-orexin and signaling characteristics of orexin receptors in the male reproductive system. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1957-1962 (2004)
118. Karteris E, Machado RJ, Chen J, Zervou S, Hillhouse EW, Randeva HS: Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E1089-E1100 (2005)
119. Karteris E, Randeva HS, Grammatopoulos DK, Jaffe RB, Hillhouse EW: Expression and coupling characteristics of the CRH and orexin type 2 receptors in human fetal adrenals. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4512-4519 (2001)
120. Kastin AJ, Akerstrom V: Orexin A but not orexin B rapidly enters brain from blood by simple diffusion. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 219-223 (1999)

121. Kawainoto T, Mitsuuchi Y, Ohnishi T, Ichikawa Y, Yokoyama Y, Sumimoto H, Toda K, Miyahara K, Kuribayashi I, Nakao K: Cloning and expression of a cDNA for human cytochrome P-450 $\alpha$  as related to primary aldosteronism. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 309-316 (1990)
122. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Miyahara K, Yokoyama Y, Nakao K, Hosoda K, Yamamoto Y, Imura H, Shizuta Y: Cloning of cDNA and genomic DNA for human cytochrome P-450 $\beta$ . *FEBS Lett* 269, 345-349 (1990)
123. Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Yokoyama Y, Miyahara K, Miura S, Ohnishi T, Ichikawa Y, Nakao K, Imura H: Role of steroid 11 beta-hydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1458-1462 (1992)
124. King BM: Glucocorticoids and hypothalamic obesity. *Neurosci Biobehav Rev* 12, 29-37 (1988)
125. Kirchgessner AL, Liu M: Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24, 941-951 (1999)
126. Knapp T, Hare E, Feng L, Zlokarnik G, Negulescu P: Detection of beta-lactamase reporter gene expression by flow cytometry. *Cytometry A* 51, 68-78 (2003)
127. Kok SW, Roelfsema F, Overeem S, Lammers GJ, Strijers RL, Frolich M, Meinders AE, Pijl H: Dynamics of the pituitary-adrenal ensemble in hypocretin-deficient narcoleptic humans: blunted basal adrenocorticotropin release and evidence for normal time-keeping by the master pacemaker. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 5085-5091 (2002)
128. Komaki G, Matsumoto Y, Nishikata H, Kawai K, Nozaki T, Takii M, Sogawa H, Kubo C: Orexin-A and leptin change inversely in fasting non-obese subjects. *Eur J Endocrinol* 144, 645-651 (2001)
129. Koob GF: The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 877, 445-460 (1999)
130. Koob GF: A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* 59, 11-34 (2008)
131. Korczynski W, Ceregrzyn M, Kato I, Wolinski J, Zabielski R: The effect of orexins on intestinal motility in vitro in fed and fasted rats. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 6, 43-54 (2006)
132. Korczynski W, Ceregrzyn M, Matyjek R, Kato I, Kuwahara A, Wolinski J, Zabielski R: Central and local (enteric) action of orexins. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 6, 17-42 (2006)
133. Kosaki K, Ando J, Korenaga R, Kurokawa T, Kamiya A: Fluid shear stress increases the production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by endothelial cells via mRNA stabilization. *Circ Res* 82, 794-802 (1998)
134. Krug AW, Ehrhart-Bornstein M: Adrenocortical dysfunction in obesity and the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 40, 515-517 (2008)

135. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE: Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am J Physiol Cell Physiol* 283, C1567-C1591 (2002)
136. Kummer M, Neidert SJ, Jöhren O, Dominiak P: Orexin (hypocretin) gene expression in rat ependymal cells. *Neuroreport* 12, 2117-2120 (2001)
137. Kunii K, Yamanaka A, Nambu T, Matsuzaki I, Goto K, Sakurai T: Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842, 256-261 (1999)
138. Kuru M, Ueta Y, Serino R, Nakazato M, Yamamoto Y, Shibuya I, Yamashita H: Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11, 1977-1980 (2000)
139. Larsson KP, Peltonen HM, Bart G, Louhivuori LM, Penttonen A, Antikainen M, Kukkonen JP, Akerman KE: Orexin-A-induced Ca<sup>2+</sup> entry: evidence for involvement of trpc channels and protein kinase C regulation. *J Biol Chem* 280, 1771-1781 (2005)
140. Latchman DS: Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1305-1312 (1997)
141. Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JJ, Melner MH: Synergistic activation of the human type II 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/delta<sup>5</sup>-delta<sup>4</sup> isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 272, 7960-7967 (1997)
142. Li Y, van den Pol AN: Differential target-dependent actions of coexpressed inhibitory dynorphin and excitatory hypocretin/orexin neuropeptides. *J Neurosci* 26, 13037-13047 (2006)
143. Lightman SL, Young WS: Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol* 403, 511-523 (1988)
144. Lin L, Faraco J, Li R, Kadotani H, Rogers W, Lin X, Qiu X, de Jong PJ, Nishino S, Mignot E: The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365-376 (1999)
145. Lopez M, Senaris R, Gallego R, Garcia-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F, Dieguez C: Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology* 140, 5991-5994 (1999)
146. Lopez M, Seoane L, Garcia MC, Lago F, Casanueva FF, Senaris R, Dieguez C: Leptin regulation of prepro-orexin and orexin receptor mRNA levels in the hypothalamus. *Biochem Biophys Res Commun* 269, 41-45 (2000)
147. Lubkin M, Stricker-Krongrad A: Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 241-245 (1998)
148. Lund PE, Shariatmadari R, Uustare A, Detheux M, Parmentier M, Kukkonen JP, Akerman KE: The orexin OX1 receptor activates a novel Ca<sup>2+</sup> influx pathway necessary for coupling to phospholipase C. *J Biol Chem* 275, 30806-30812 (2000)

149. Magga J, Bart G, Oker-Blom C, Kukkonen JP, Akerman KE, Nasman J: Agonist potency differentiates G protein activation and Ca<sup>2+</sup> signalling by the orexin receptor type 1. *Biochem Pharmacol* 71, 827-836 (2006)
150. Malendowicz LK, Hochol A, Ziolkowska A, Nowak M, Gottardo L, Nussdorfer GG: Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med* 7, 401-404 (2001)
151. Malendowicz LK, Jedrzejczak N, Belloni AS, Trejter M, Hochol A, Nussdorfer GG: Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands. *Histol Histopathol* 16, 713-717 (2001)
152. Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG: Acute effects of orexins A and B on the rat pituitary-adrenocortical axis. *Biomed Res* 20, 301-304 (1999)
153. Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG: 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 (1999)
154. Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK: Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435, 6-25 (2001)
155. Marouliss GB, Triantafillidis IK: Polycystic ovarian disease: the adrenal connection. *Pediatr Endocrinol Rev* 3 Suppl 1, 205-207 (2006)
156. Martin LJ, Taniguchi H, Robert NM, Simard J, Tremblay JJ, Viger RS: GATA factors and the nuclear receptors, steroidogenic factor 1/liver receptor homolog 1, are key mutual partners in the regulation of the human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter. *Mol Endocrinol* 19, 2358-2370 (2005)
157. Martin LJ, Tremblay JJ: The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells. *Endocrinology* 146, 861-869 (2005)
158. Mastorakos G, Zapanti E: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neuroendocrine regulation of food intake and obesity: the role of corticotropin releasing hormone. *Nutr Neurosci* 7, 271-280 (2004)
159. Matsuki T, Sakurai T: Orexins and orexin receptors: from molecules to integrative physiology. *Results Probl Cell Differ* 46, 27-55 (2008)
160. Matsumura K, Tsuchihashi T, Abe I: Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37, 1382-1387 (2001)
161. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Aragona F, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG: 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 (2001)
162. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F, Nussdorfer GG: 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 (2001)
163. McAtee LC, Sutton SW, Rudolph DA, Li X, Aluisio LE, Phuong VK, Dvorak CA, Lovenberg TW, Carruthers NI, Jones TK: Novel substituted 4-phenyl-[1,3]dioxanes: potent and selective orexin receptor 2 (OX(2)R) antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 4225-4229 (2004)
  164. McCann SM, Antunes-Rodrigues J, Franci CR, Anselmo-Franci JA, Karanth S, Rettori V: Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res* 33, 1121-1131 (2000)
  165. Mignot E: Sleep, sleep disorders and hypocretin (orexin). *Sleep Med* 5 Suppl 1, S2-S8 (2004)
  166. Miller WL: StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* 21, 589-601 (2007)
  167. Mitsuma T, Hirooka Y, Kayama M, Mori Y, Yokoi Y, Rhue N, Ping J, Izumi M, Ikai R, Adachi K, Nogimori T: Radioimmunoassay for orexin A. *Life Sci* 66, 897-904 (2000)
  168. Mitsuma T, Hirooka Y, Kayama M, Mori Y, Yokoi Y, Izumi M, Rhue N, Ping J, Adachi K, Ikai R, Kawai N, Nakayashiki A, Nogimori T: Radioimmunoassay for hypocretin-2. *Endocr Regul* 34, 23-27 (2000)
  169. Mitsuma T, Hirooka Y, Mori Y, Kayama M, Adachi K, Rhue N, Ping J, Nogimori T: Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 31, 606-609 (1999)
  170. Moore CC, Miller WL: The role of transcriptional regulation in steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40, 517-525 (1991)
  171. Moriguchi T, Sakurai T, Nambu T, Yanagisawa M, Goto K: 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 (1999)
  172. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24, 954-8, 960, 962 (1998)
  173. Mukai K, Mitani F, Agake R, Ishimura Y: Adrenocorticotrophic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors. *Eur J Biochem* 256, 190-200 (1998)
  174. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24, 17-27 (1992)
  175. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H: Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 205, 43-50 (2003)

176. Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K: Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 243-260 (1999)
177. Nanmoku T, Isobe K, Sakurai T, Yamanaka A, Takekoshi K, Kawakami Y, Goto K, Nakai T: Effects of orexin on cultured porcine adrenal medullary and cortex cells. *Regul Pept* 104, 125-130 (2002)
178. Naqvi NH, Rudrauf D, Damasio H, Bechara A: Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* 315, 531-534 (2007)
179. Narita M, Nagumo Y, Hashimoto S, Narita M, Khotib J, Miyatake M, Sakurai T, Yanagisawa M, Nakamachi T, Shioda S, Suzuki T: Direct involvement of orexinergic systems in the activation of the mesolimbic dopamine pathway and related behaviors induced by morphine. *J Neurosci* 26, 398-405 (2006)
180. Naslund E, Ehrstrom M, Ma J, Hellstrom PM, Kirchgessner AL: Localization and effects of orexin on fasting motility in the rat duodenum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G470-G479 (2002)
181. Neubauer DN: Almorexant, a dual orexin receptor antagonist for the treatment of insomnia. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 101-110 (2010)
182. Nishino S, Ripley B, Overeem S, Lammers GJ, Mignot E: Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355, 39-40 (2000)
183. Nogueira EF, Xing Y, Morris CA, Rainey WE: Role of angiotensin II-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. *J Mol Endocrinol* 42, 319-330 (2009)
184. Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M, Malendowicz LK: Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci* 66, 449-454 (2000)
185. Nowak KW, Strowski MZ, Switonska MM, Kaczmarek P, Singh V, Fabis M, Mackowiak P, Nowak M, Malendowicz LK: Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int J Mol Med* 15, 969-972 (2005)
186. Nowak M, Hochol A, Tortorella C, Jedrzejczak N, Ziolkowska A, Nussdorfer GG, Malendowicz LK: Modulatory effects of orexins on the function of rat pituitary-adrenocortical axis under basal and stressful conditions. *Biomed Res* 21, 89-93 (2000)
187. Nussdorfer GG, Gottardo G: Neuropeptide-Y family of peptides in the autocrine-paracrine regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30, 368-373 (1998)
188. Ohkubo T, Tsukada A, Shamoto K: cDNA cloning of chicken orexin receptor and tissue distribution: sexually dimorphic expression in chicken gonads. *J Mol Endocrinol* 31, 499-508 (2003)
189. Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M: Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* 36, 255-269 (1998)

190. Otis M, Gallo-Payet N: Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 265-266, 126-130 (2007)
191. Ouedraogo R, Naslund E, Kirchgessner AL: Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52, 111-117 (2003)
192. Parker KL, Schimmer BP: The role of nuclear receptors in steroid hormone production. *Semin Cancer Biol* 5, 317-325 (1994)
193. Parmar J, Key RE, Rainey WE: Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 4542-4546 (2008)
194. Paul J: Zell- und Gewebekulturen. 5. Aufl., 9-121, de Gruyter, Berlin, 1980
195. Payne AH, Hales DB: Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25, 947-970 (2004)
196. Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F: Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. *J Endocrinol* 171, 373-383 (2001)
197. Peter M, Dubuis JM: Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3, 14-20 (2000)
198. Peyron C, Faraco J, Rogers W, Ripley B, Overeem S, Charnay Y, Nevsimalova S, Aldrich M, Reynolds D, Albin R, Li R, Hungs M, Pedrazzoli M, Padigaru M, Kucherlapati M, Fan J, Maki R, Lammers GJ, Bouras C, Kucherlapati R, Nishino S, Mignot E: 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 (2000)
199. Peyron C, Tighe DK, van den Pol AN, de Lecea L, Heller HC, Sutcliffe JG, Kilduff TS: Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18, 9996-10015 (1998)
200. Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ: Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650 (2002)
201. Piper DC, Upton N, Smith MI, Hunter AJ: The novel brain neuropeptide, orexin-A, modulates the sleep-wake cycle of rats. *Eur J Neurosci* 12, 726-730 (2000)
202. Powley TL, Keesey RE: Relationship of body weight to the lateral hypothalamic feeding syndrome. *J Comp Physiol Psychol* 70, 25-36 (1970)
203. Pu S, Jain MR, Kalra PS, Kalra SP: Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept* 78, 133-136 (1998)
204. Qureshi SA: Beta-lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells. *Biotechniques* 42, 91-96 (2007)

205. Raeymaekers L: A commentary on the practical applications of competitive PCR. *Genome Res* 5, 91-94 (1995)
206. Ragazzon B, Lefrancois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, Chambon C, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veysiére G, Martinez A: Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147, 1805-1818 (2006)
207. Rainey WE: Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. *Mol Cell Endocrinol* 151, 151-160 (1999)
208. Rainey WE, Nakamura Y: Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108, 281-286 (2008)
209. Rainey WE, Saner K, Schimmer BP: Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 228, 23-38 (2004)
210. Ramanjaneya M, Conner AC, Chen J, Kumar P, Brown JE, Jöhren O, Lehnert H, Stanfield PR, Randeve HS: Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B. *J Endocrinol* 202, 249-261 (2009)
211. Ramanjaneya M, Conner AC, Chen J, Stanfield PR, Randeve HS: Orexins stimulate steroidogenic acute regulatory protein expression through multiple signaling pathways in human adrenal H295R cells. *Endocrinology* 149, 4106-4115 (2008)
212. Randeve HS, Karteris E, Grammatopoulos D, Hillhouse EW: 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 (2001)
213. Rheume E, Lachance Y, Zhao HF, Breton N, Dumont M, de Launoit Y, Trudel C, Luu-The V, Simard J, Labrie F: Structure and expression of a new complementary DNA encoding the almost exclusive 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4-isomerase in human adrenals and gonads. *Mol Endocrinol* 5, 1147-1157 (1991)
214. Roberge C, Carpentier AC, Langlois MF, Baillargeon JP, Ardilouze JL, Maheux P, Gallo-Payet N: Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance and onset of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1465-E1478 (2007)
215. Rogers S, Wells R, Rechsteiner M: Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368 (1986)
216. Rohner-Jeanrenaud F, Cusin I, Sainsbury A, Zakrzewska KE, Jeanrenaud B: The loop system between neuropeptide Y and leptin in normal and obese rodents. *Horm Metab Res* 28, 642-648 (1996)
217. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC: Adrenal gland: structure, function, and mechanisms of toxicity. *Toxicol Pathol* 29, 41-48 (2001)

218. Russell SH, Kim MS, Small CJ, Abbott CR, Morgan DG, Taheri S, Murphy KG, Todd JF, Ghatei MA, Bloom SR: Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* 12, 1213-1218 (2000)
219. Russell SH, Small CJ, Dakin CL, Abbott CR, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR: 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 (2001)
220. Russell SH, Small CJ, Kennedy AR, Stanley SA, Seth A, Murphy KG, Taheri S, Ghatei MA, Bloom SR: Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology* 142, 5294-5302 (2001)
221. Russell SH, Small CJ, Sunter D, Morgan I, Dakin CL, Cohen MA, Bloom SR: 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 (2002)
222. Rutledge RG, Cote C: Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res* 31, e93 (2003)
223. Sakamoto F, Yamada S, Ueta Y: Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons. *Regul Pept* 118, 183-191 (2004)
224. Sakurai S, Nishijima T, Takahashi S, Yamauchi K, Arihara Z, Takahashi K: Clinical significance of daytime plasma orexin-A-like immunoreactivity concentrations in patients with obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Respiration* 71, 380-384 (2004)
225. Sakurai T: Roles of orexins in regulation of feeding and wakefulness. *Neuroreport* 13, 987-995 (2002)
226. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M: Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585 (1998)
227. Sakurai T, Moriguchi T, Furuya K, Kajiwara N, Nakamura T, Yanagisawa M, Goto K: Structure and function of human prepro-orexin gene. *J Biol Chem* 274, 17771-17776 (1999)
228. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In: Nolan C: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2. Aufl., E.1-E.39, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989
229. Samson WK, Bagley SL, Ferguson AV, White MM: Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R382-R387 (2007)

230. Samson WK, Bagley SL, Ferguson AV, White MM: Orexin receptor subtype activation and locomotor behaviour in the rat. *Acta Physiol (Oxf)* 198, 313-324 (2010)
231. Samson WK, Gosnell B, Chang JK, Resch ZT, Murphy TC: Cardiovascular regulatory actions of the hypocretins in brain. *Brain Res* 831, 248-253 (1999)
232. Samson WK, Taylor MM: Hypocretin/orexin suppresses corticotroph responsiveness in vitro. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R1140-R1145 (2001)
233. Samson WK, Taylor MM, Follwell M, Ferguson AV: Orexin actions in hypothalamic paraventricular nucleus: physiological consequences and cellular correlates. *Regul Pept* 104, 97-103 (2002)
234. Sanders RD, Brian D, Maze M: G-protein-coupled receptors. *Handb Exp Pharmacol* 93-117 (2008)
235. Schmitz S: *Der Experimentator: Zellkultur*. 2. Aufl., 9-38, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009
236. Schorpp M, Jager R, Schellander K, Schenkel J, Wagner EF, Weiher H, Angel P: The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res* 24, 1787-1788 (1996)
237. Sewer MB, Waterman MR: ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61, 300-307 (2003)
238. Shirasaka T, Nakazato M, Matsukura S, Takasaki M, Kannan H: Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277, R1780-R1785 (1999)
239. Shuman S: Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678-32684 (1994)
240. Silveyra P, Catalano PN, Lux-Lantos V, Libertun C: Impact of proestrous milieu on expression of orexin receptors and prepro-orexin in rat hypothalamus and hypophysis: actions of Cetrorelix and Nembupal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E820-E828 (2007)
241. Silveyra P, Lux-Lantos V, Libertun C: Both orexin receptors are expressed in rat ovaries and fluctuate with the estrous cycle: effects of orexin receptor antagonists on gonadotropins and ovulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E977-E985 (2007)
242. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH: Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26, 525-582 (2005)
243. Simpson ER, Waterman MR: Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol* 50, 427-440 (1988)

244. Sirianni R, Rehman KS, Carr BR, Parker CR Jr, Rainey WE: Corticotropin-releasing hormone directly stimulates cortisol and the cortisol biosynthetic pathway in human fetal adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 279-285 (2005)
245. Smart D, Jerman JC, Brough SJ, Rushton SL, Murdock PR, Jewitt F, Elshourbagy NA, Ellis CE, Middlemiss DN, Brown F: Characterization of recombinant human orexin receptor pharmacology in a Chinese hamster ovary cell-line using FLIPR. *Br J Pharmacol* 128, 1-3 (1999)
246. Smart D, Sabido-David C, Brough SJ, Jewitt F, Johns A, Porter RA, Jerman JC: SB-334867-A: the first selective orexin-1 receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 132, 1179-1182 (2001)
247. Soccio RE, Breslow JL: StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. *J Biol Chem* 278, 22183-22186 (2003)
248. Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP, Nussdorfer GG: Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev* 58, 46-57 (2006)
249. Spinazzi R, Rucinski M, Neri G, Malendowicz LK, Nussdorfer GG: Preproorexin and orexin receptors are expressed in cortisol-secreting adrenocortical adenomas, and orexins stimulate in vitro cortisol secretion and growth of tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 3544-3549 (2005)
250. Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, Nowak M, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Andreis PG, Malendowicz LK: Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med* 15, 847-852 (2005)
251. Stack JH, Whitney M, Rodems SM, Pollok BA: A ubiquitin-based tagging system for controlled modulation of protein stability. *Nat Biotechnol* 18, 1298-1302 (2000)
252. Staels B, Hum DW, Miller WL: Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 7, 423-433 (1993)
253. Stellar E: The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61, 5-22 (1954)
254. Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, Derge JG, Klausner RD, Collins FS, Wagner L, Shenmen CM, Schuler GD, Altschul SF, Zeeberg B, Buetow KH, Schaefer CF, Bhat NK, Hopkins RF, Jordan H, Moore T, Max SI, Wang J, Hsieh F, Diatchenko L, Marusina K, Farmer AA, Rubin GM, Hong L, Stapleton M, Soares MB, Bonaldo MF, Casavant TL, Scheetz TE, Brownstein MJ, Usdin TB, Toshiyuki S, Carninci P, Prange C, Raha SS, Loquellano NA, Peters GJ, Abramson RD, Mullahy SJ, Bosak SA, McEwan PJ, McKernan KJ, Malek JA, Gunaratne PH, Richards S, Worley KC, Hale S, Garcia AM, Gay LJ, Hulyk SW, Villalón DK, Muzny DM, Sodergren EJ, Lu X, Gibbs RA, Fahey J, Helton E, Kettelman M, Madan A, Rodrigues S, Sanchez A, Whiting M, Madan A, Young AC, Shevchenko Y, Bouffard GG, Blakesley RW, Touchman JW, Green ED, Dickson MC, Rodriguez AC, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Butterfield YS, Krzywinski MI, Skalska U, Smailus DE, Schnerch A, Schein JE, Jones SJ, Marra MA: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903 (2002)

255. Strauss WM: Transfection of mammalian cells via lipofection. *Methods Mol Biol* 54, 307-327 (1996)
256. Stricker-Krongrad A, Beck B: Modulation of hypothalamic hypocretin/orexin mRNA expression by glucocorticoids. *Biochem Biophys Res Commun* 296, 129-133 (2002)
257. Sutcliffe JG: Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 3737-3741 (1978)
258. Sweet DC, Levine AS, Billington CJ, Kotz CM: Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821, 535-538 (1999)
259. Taheri S, Zeitzer JM, Mignot E: The role of hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. *Annu Rev Neurosci* 25, 283-313 (2002)
260. Takahashi N, Okumura T, Yamada H, Kohgo Y: Stimulation of gastric acid secretion by centrally administered orexin-A in conscious rats. *Biochem Biophys Res Commun* 254, 623-627 (1999)
261. Tamura T, Irahara M, Tezuka M, Kiyokawa M, Aono T: Orexins, orexigenic hypothalamic neuropeptides, suppress the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 759-762 (1999)
262. Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R, Ramanathan L, Gulyani S, Aldrich M, Cornford M, Siegel JM: Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27, 469-474 (2000)
263. Tian Y, Smith RD, Balla T, Catt KJ: Angiotensin II activates mitogen-activated protein kinase via protein kinase C and Ras/Raf-1 kinase in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 139, 1801-1809 (1998)
264. Trivedi P, Yu H, MacNeil DJ, Van der Ploeg LH, Guan XM: Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438, 71-75 (1998)
265. Uramura K, Funahashi H, Muroya S, Shioda S, Takigawa M, Yada T: Orexin-a activates phospholipase C- and protein kinase C-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in dopamine neurons of the ventral tegmental area. *Neuroreport* 12, 1885-1889 (2001)
266. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A: SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1, 8 (2003)
267. van den Pol AN: Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19, 3171-3182 (1999)
268. van den Pol AN, Gao XB, Obrietan K, Kilduff TS, Belousov AB: Presynaptic and postsynaptic actions and modulation of neuroendocrine neurons by a new hypothalamic peptide, hypocretin/orexin. *J Neurosci* 18, 7962-7971 (1998)
269. van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D: Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* 7, 493-494 (2004)

270. von Heijne G: Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* 189, 239-242 (1986)
271. Waleh NS, Apte-Deshpande A, Terao A, Ding J, Kilduff TS: Modulation of the promoter region of prepro-hypocretin by alpha-interferon. *Gene* 262, 123-128 (2001)
272. Wang J, Osaka T, Inoue S: Energy expenditure by intracerebroventricular administration of orexin to anesthetized rats. *Neurosci Lett* 315, 49-52 (2001)
273. Wang J, Osaka T, Inoue S: Orexin-A-sensitive site for energy expenditure localized in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *Brain Res* 971, 128-134 (2003)
274. Wenzel J: Die Wirkung von Orexin A auf die Steroidbiosynthese in humanen Nebennierenrinden-Zellen (NCI H295). Bachelorarbeit Lübeck (2005)
275. Wenzel J, Grabinski N, Knopp CA, Dendorfer A, Ramanjaneya M, Randeve HS, Ehrhart-Bornstein M, Dominiak P, Jöhren O: Hypocretin/orexin increases the expression of steroidogenic enzymes in human adrenocortical NCI H295R cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297, R1601-R1609 (2009)
276. White PC, New MI, Dupont B: Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5111-5115 (1986)
277. Winsky-Sommerer R, Boutrel B, de Lecea L: Stress and arousal: the corticotrophin-releasing factor/hypocretin circuitry. *Mol Neurobiol* 32, 285-294 (2005)
278. Winsky-Sommerer R, Yamanaka A, Diano S, Borok E, Roberts AJ, Sakurai T, Kilduff TS, Horvath TL, de Lecea L: Interaction between the corticotropin-releasing factor system and hypocretins (orexins): a novel circuit mediating stress response. *J Neurosci* 24, 11439-11448 (2004)
279. Wood KV: The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays. *Promega Notes* 65, 14-20 (1998)
280. Woods SC, Gotoh K, Clegg DJ: Gender differences in the control of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 1175-1180 (2003)
281. Yamada H, Okumura T, Motomura W, Kobayashi Y, Kohgo Y: Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 527-531 (2000)
282. Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T: Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38, 701-713 (2003)
283. Yamanaka A, Kunii K, Nambu T, Tsujino N, Sakai A, Matsuzaki I, Miwa Y, Goto K, Sakurai T: Orexin-induced food intake involves neuropeptide Y pathway. *Brain Res* 859, 404-409 (2000)
284. Yamanaka A, Sakurai T, Katsumoto T, Yanagisawa M, Goto K: 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 (1999)

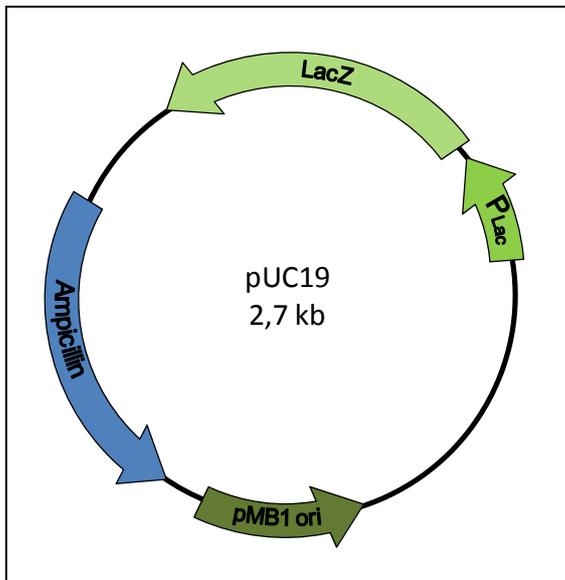
285. Zar J: Biostatistical analysis. 2. Aufl., 360-377, Prentice Hall, Upper Saddle River, 1984
286. Zhang S, Blache D, Vercoe PE, Adam CL, Blackberry MA, Findlay PA, Eidne KA, Martin GB: Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regul Pept* 124, 81-87 (2005)
287. Zhu Y, Miwa Y, Yamanaka A, Yada T, Shibahara M, Abe Y, Sakurai T, Goto K: Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci* 92, 259-266 (2003)
288. Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz LK, Tortorella C, Nussdorfer GG: Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96, 423-429 (2005)
289. Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burren N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY: Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 279, 84-88 (1998)
290. Zuck P, Murray EM, Stec E, Grobler JA, Simon AJ, Strulovici B, Inglese J, Flores OA, Ferrer M: A cell-based beta-lactamase reporter gene assay for the identification of inhibitors of hepatitis C virus replication. *Anal Biochem* 334, 344-355 (2004)

## 7 Anhang

### 7.1 Vektorkarten der Kontrollvektoren pUC19 und pRL-SV40

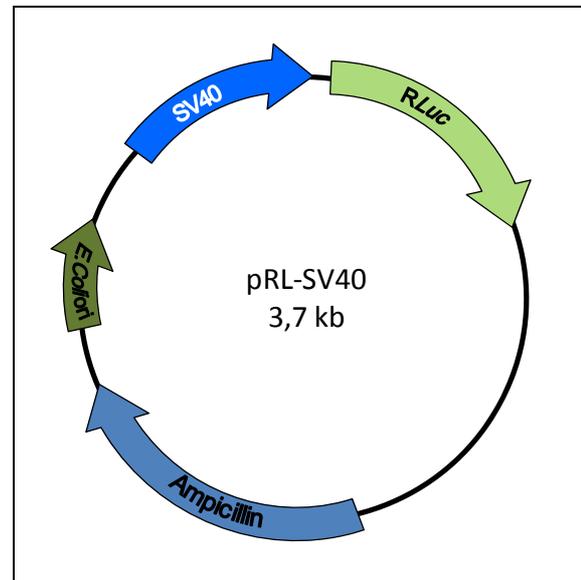
Ergänzend zu den Schilderungen in den Kapiteln 2.4.9: „Transformation“ und 2.6.2: „Dual-Luziferase-Reportersystem“ sind hier die Vektorkarten der bei diesen Methoden zusätzlich eingesetzten Kontrollvektoren pUC19 (Invitrogen) und pRL-SV40 (Promega) abgebildet.

#### pUC19-Vektor



**Abb. 7.1:** pUC19-Vektor als Positivkontrolle der Transformationseffizienz. LacZ:  $\beta$ -Galaktosidase unter Kontrolle des Lac-Promotors (P<sub>Lac</sub>); pMB1 ori: Replikationsursprung

#### pRL-SV40-Vektor

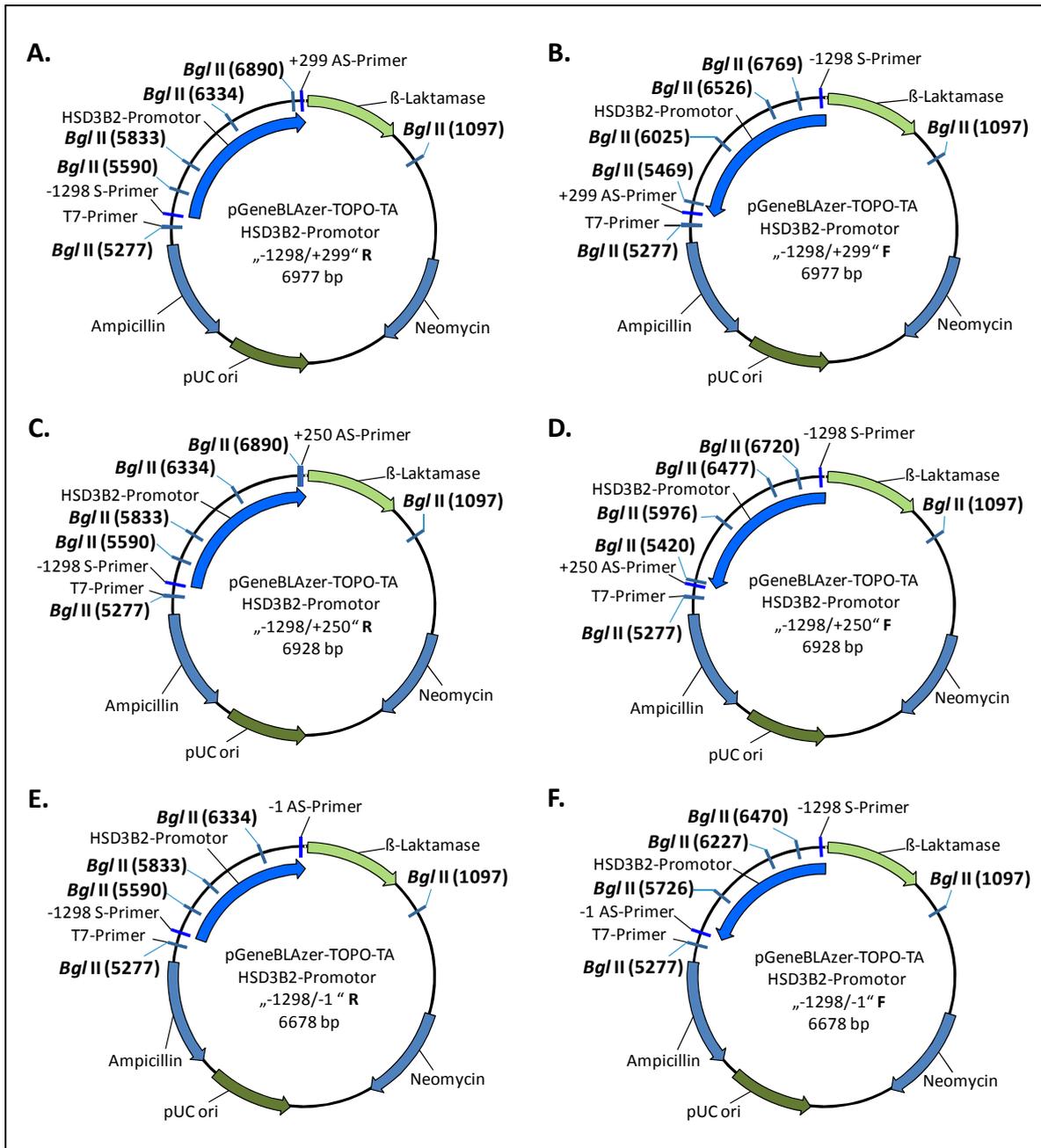


**Abb. 7.2:** pRL-SV40-Vektor als Kontrollvektor im Dual-Luziferase-Reportersystem. *E. coli* ori: *E. coli*-Replikationsursprung; RLuc: Renilla-Luziferase; SV40: SV40-Early-Enhancer/Promotor

### 7.2 Vektorkarten der rekombinanten Plasmide

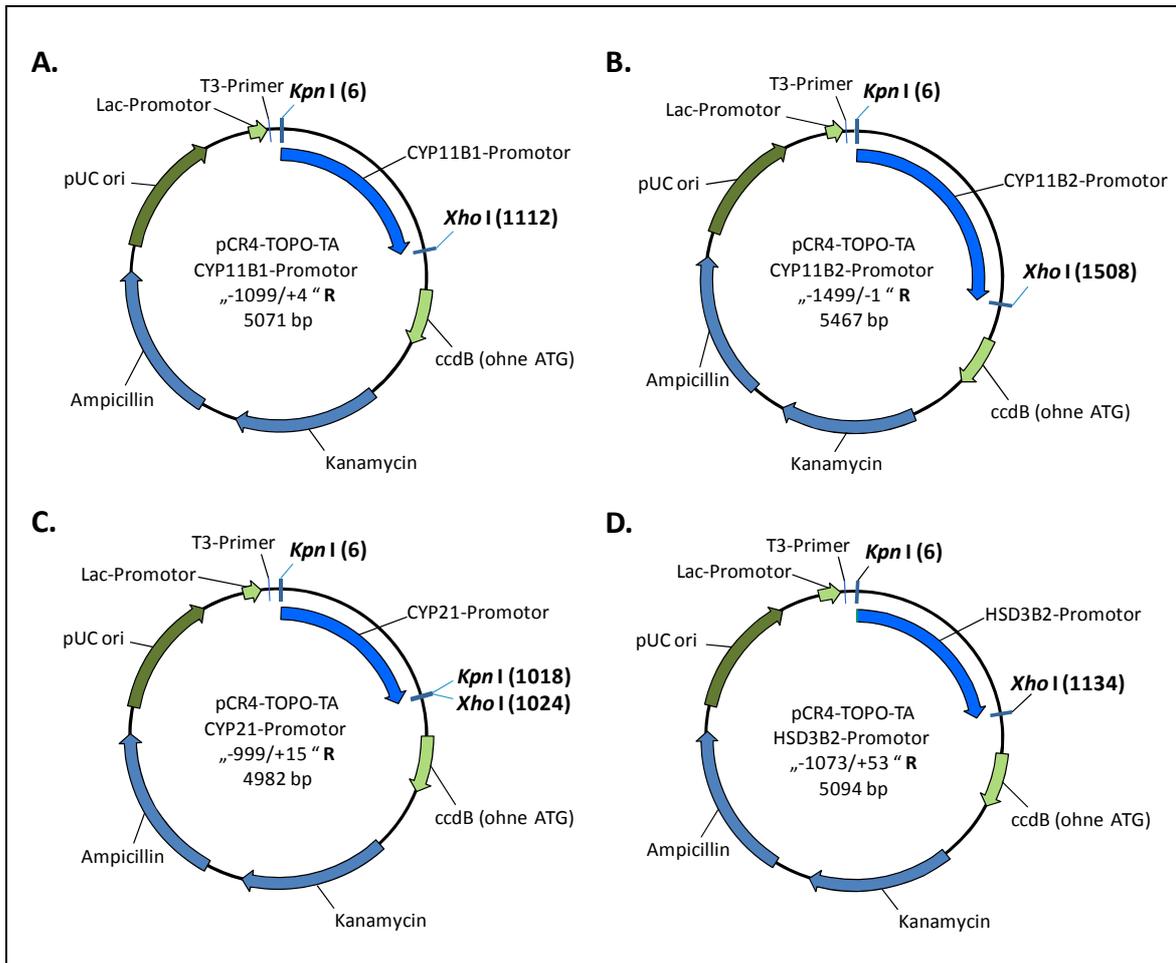
Ergänzend zu den Ausführungen in Kapitel 3.2.2 „Selektion rekombinanter Vektoren mittels Restriktionsanalyse“ sind im Folgenden die Vektorkarten aller zusätzlichen rekombinanten Plasmide mit den Schnittstellen der jeweils verwendeten Restriktionsenzyme dargestellt.

## pGene-BLAzer-TOPO-TA-Vektor/HSD3B2



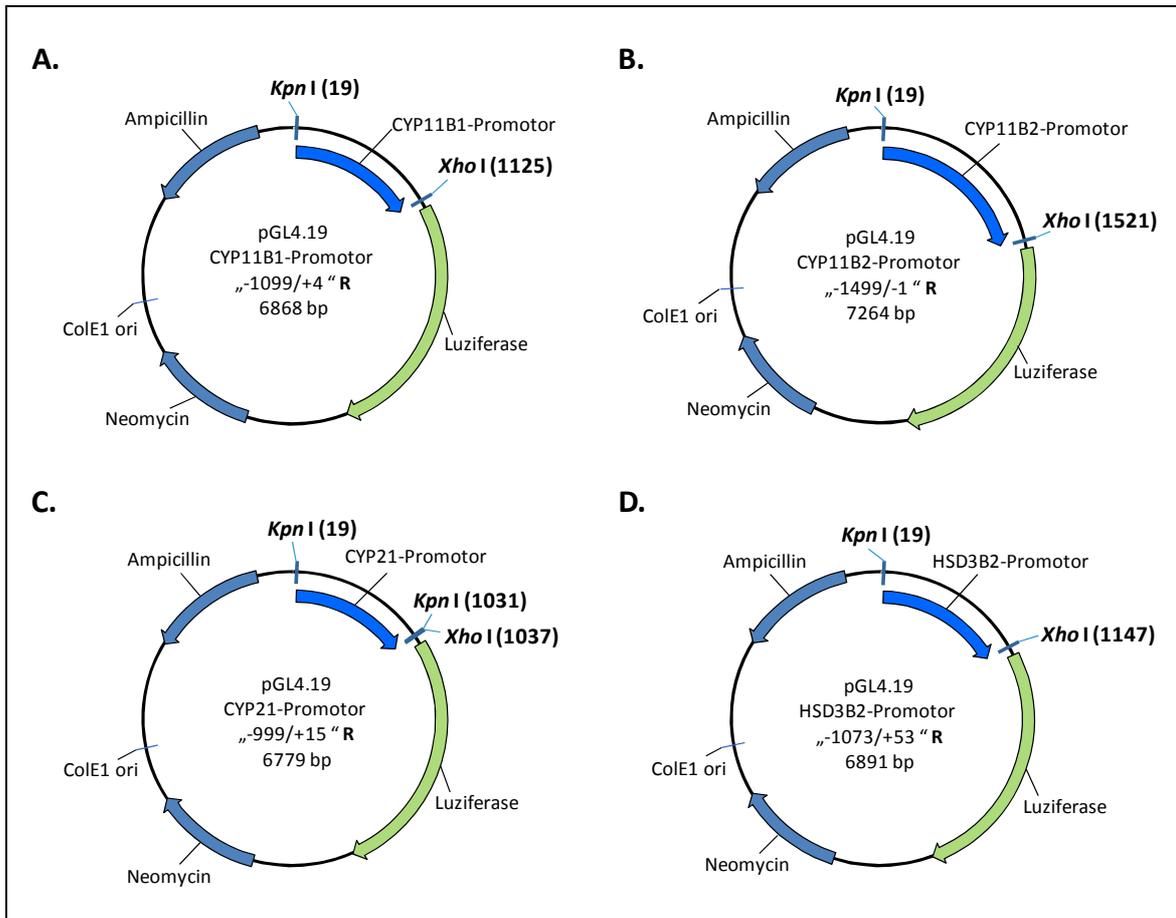
**Abbildung 7.3:** Schema der rekombinanten pGene-BLAzer-TOPO-TA-Vektoren mit unterschiedlichen Abschnitten des HSD3B2-Promotors und den Schnittstellen des Restriktionsenzym *Bgl* II. Promotorabschnitte: A: von -1298 bis +299 bp in richtiger Orientierung (R) und B: in falscher Orientierung (F); C: von -1298 bis +250 bp in richtiger und D: in falscher Orientierung; E: von -1298 bis -1 bp in richtiger und D: in falscher Orientierung.

## pCR4-TOPO-TA-Vektor



**Abbildung 7.4:** Schema der rekombinanten pCR4-TOPO-TA-Vektoren mit den jeweils eingebauten Promotorabschnitten und den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Xho* I. Promotorabschnitte: A: CYP11B1 von -1099 bis +4 bp in richtiger Orientierung (R); B: CYP11B2 von -1499 bis -1 bp in richtiger Orientierung; C: CYP21 von -999 bis +15 bp in richtiger Orientierung; D: HSD3B2 von -1073 bis +53 bp in richtiger Orientierung. Das LacZ $\alpha$ -*ccdB* Fusionsprotein wird durch den Einbau des Promotors im Bereich der LacZ $\alpha$ -Sequenz aufgespalten, weshalb nur noch der intakte *ccdB*-Anteil des Fusionsproteins in der Vektorkarte dargestellt ist.

## pGL4.19-Vektor



**Abbildung 7.5:** Schema der rekombinanten pGL4.19-Vektoren mit den jeweils eingebauten Promotorabschnitten und den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Kpn* I und *Xho* I. Promotorabschnitte: A: CYP11B1 von -1099 bis +4 bp in richtiger Orientierung (R); B: CYP11B2 von -1499 bis -1 bp in richtiger Orientierung; C: CYP21 von -999 bis +15 bp in richtiger Orientierung; D: HSD3B2 von -1073 bis +53 bp in richtiger Orientierung.

### 7.3 Sequenzen der extern sequenzierten Plasmide

Ergänzend zu den Ausführungen in Kapitel 3.2.3 „Bestätigung der Sequenzen der ausgewählten Plasmide durch externe Sequenzierung“ sind im Folgenden die von den Sequence Laboratories Göttingen ermittelten Sequenzen der kodierenden Stränge der eingesandten rekombinanten CYP11B1-, CYP11B2-, CYP21- und HSD3B2-pGL4.19-Plasmide aufgeführt. Die Sequenzen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten Plasmide sind in Gegenüberstellung mit den in der GenBank veröffentlichten und durch die Vector NTI Software kombinierten Originalsequenzen des jeweiligen Promotorabschnitts und des pGL4.19-Vektorrückgrats dargestellt. In der oberen Zeile finden sich bei jedem Promotor die von SeqLab ermittelten Sequenzen und in der unteren Zeile die homologen Originalsequenzen. In allen Fällen fand sich eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen der eingebauten Promotoren mit den zugehörigen Originalsequenzen. Im Folgenden sind alle Sequenzen vom 5'- zum 3'-Ende angegeben, wobei die übereinstimmenden Nukleotide innerhalb der Promotorabschnitte gelb unterlegt sind. Die Sequenz des eingefügten Promotors befindet sich stromaufwärts der mit „XhoI“ markierten Schnittstelle des gleichnamigen Restriktionsenzym, während stromabwärts davon jeweils der Anfang der Vektorrückgratsequenz mit dem Reporter gen Luziferase liegt. Zu Beginn der Sequenzierungsreaktion am 3'-Ende kommt es methodenbedingt zu Fehlern und Ungenauigkeiten in der Basenabfolge, welche in der Sequenz des untersuchten Stranges mit „N“ (entspricht A, T, C oder G) oder „-“ (keine Base erkannt) gekennzeichnet sind.

#### CYP11B1-Promotor

Sequenzierung 19.06.09	(1)	819	868
Originalsequenz	(819)	AATTCATGCCAACTCATTCCCTCGTTTTTTTGCATATAAACCTTGCAAGGAG	
Sequenzierung 19.06.09	(51)	869	918
Originalsequenz	(869)	ATGAATAATCCAAGGCTCTTGGATAAGATAAGGGCCCCATCCATCTTGCT	
Sequenzierung 19.06.09	(101)	919	968
Originalsequenz	(919)	CCTCTCAGCCCTGGAGGAGGAGGGAGAGTCCCTTTTCCCCTGTCTACGCTC	
Sequenzierung 19.06.09	(151)	969	1018
Originalsequenz	(969)	ATGCACCCCAATGAGTCCCTGCCTCCAGCCCTGACCTCTGCCCTCGGTC	
Sequenzierung 19.06.09	(201)	1019	1068
Originalsequenz	(1019)	TCTCAGGCAGATCCAGGGCCAGTTCTCCCATGACGTGATCCCTCTCGAAG	

		1069		1118
Sequenzierung 19.06.09	(251)	GCAAGGCACCAGGCAAGATAAAAAGGATTGCAGCTGAACAGGGTGGAGGGA		
Originalsequenz	(1069)	GCAAGGCACCAGGCAAGATAAAAAGGATTGCAGCTGAACAGGGTGGAGGGA		
		1119	XhoI	1168
Sequenzierung 19.06.09	(301)	GCATTCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCAATC		
Originalsequenz	(1119)	GCATTCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCAATC		
		1169	Luziferase	
Sequenzierung 19.06.09	(351)	CGGTACTGTGG--AAAGCCACCT--GAAGA---CAAAG--		
Originalsequenz	(1169)	CGGTACTGTTGGTAAAGCCACC <u>ATGGAAGATGCCAAAAACA</u>		

### CYP11B2-Promotor

		1212		1261
Sequenzierung 12.11.09	(1)	TCCATTTTACTCCTCTCAGCCCTGGAGAAAGGAGAGGCCAGGTCCCACCA		
Originalsequenz	(1212)	TCCATTTTACTCCTCTCAGCCCTGGAGAAAGGAGAGGCCAGGTCCCACCA		
		1262		1311
Sequenzierung 12.11.09	(51)	CCTTCCACCAGCATGGACCCCCAGTCCAGACCCACGCCTTTTCTCAGCA		
Originalsequenz	(1262)	CCTTCCACCAGCATGGACCCCCAGTCCAGACCCACGCCTTTTCTCAGCA		
		1312		1361
Sequenzierung 12.11.09	(101)	TCCTCAGACCAGCAGGACTTGCAGCAATGGGGAATTAGGCACCTGACTTC		
Originalsequenz	(1312)	TCCTCAGACCAGCAGGACTTGCAGCAATGGGGAATTAGGCACCTGACTTC		
		1362		1411
Sequenzierung 12.11.09	(151)	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGGCCTCCAGCCTTGACCTTCGCTCTGA		
Originalsequenz	(1362)	TCCTTCATCTACCTTTGGCTGGGGCCTCCAGCCTTGACCTTCGCTCTGA		
		1412		1461
Sequenzierung 12.11.09	(201)	GAGTCTCAGGCAGGTCCAGAGCCAGTTCTCCCATGACGTGATATGTTTCC		
Originalsequenz	(1412)	GAGTCTCAGGCAGGTCCAGAGCCAGTTCTCCCATGACGTGATATGTTTCC		
		1462		1511
Sequenzierung 12.11.09	(251)	AGAGCAGGTTCTGGGTGAGATAAAAAGGATTTGGGCTGAACAGGGTGGAG		
Originalsequenz	(1462)	AGAGCAGGTTCTGGGTGAGATAAAAAGGATTTGGGCTGAACAGGGTGGAG		
		1512	XhoI	1561
Sequenzierung 12.11.09	(301)	GGAGCATTTCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCA		
Originalsequenz	(1512)	GGAGCATTTCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCA		
		1562	Luziferase	
Sequenzierung 12.11.09	(351)	ATCCGGTACTGTTGG-AAAGCCACCATG-AAGNN--CNAAGNNGN--		
Originalsequenz	(1562)	ATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC <u>ATGGAAGATGCCAAAAACATTA</u>		

### CYP21-Promotor

		737		786
Sequenzierung 19.06.09	(1)	CCTATTAGGCAGGGACTGCCATTTTCTCTCTGAGACAAACATCATGCCAG		
Originalsequenz	(737)	CCTATTAGGCAGGGACTGCCATTTTCTCTCTGAGACAAACATCATGCCAG		
		787		836
Sequenzierung 19.06.09	(51)	TAAACTGGCCACGGTGGGGTGGCAGAGGGAGAGGGCCAGGTGGGGGCG		
Originalsequenz	(787)	TAAACTGGCCACGGTGGGGTGGCAGAGGGAGAGGGCCAGGTGGGGGCG		
		837		886
Sequenzierung 19.06.09	(101)	GACACTATTGCCTGCACAGTTGATGTGGAACCAGAAAGCTGACTCTGGAT		
Originalsequenz	(837)	GACACTATTGCCTGCACAGTTGATGTGGAACCAGAAAGCTGACTCTGGAT		
		887		936
Sequenzierung 19.06.09	(151)	GCAGGAAAAAGGTGAGGGTTGCATTTCCCTTCCTTGCTTCTTGATGGGTG		
Originalsequenz	(887)	GCAGGAAAAAGGTGAGGGTTGCATTTCCCTTCCTTGCTTCTTGATGGGTG		

		937		986
Sequenzierung 19.06.09	(201)	ATCAATTTTTTTGAAATACGGACGTCCCAAGGCCAATGAGACTGGTGTCA		
Originalsequenz	(937)	ATCAATTTTTTTGAAATACGGACGTCCCAAGGCCAATGAGACTGGTGTCA		
		987		1036
Sequenzierung 19.06.09	(251)	TTCCAGAAAAGGGCCACTCTGTGGGCGGGTCCGGTGGGAGGGTACCTGAAC		
Originalsequenz	(987)	TTCCAGAAAAGGGCCACTCTGTGGGCGGGTCCGGTGGGAGGGTACCTGAAC		
		XhoI		1086
Sequenzierung 19.06.09	(301)	TCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCAATCCGGTAC		
Originalsequenz	(1037)	TCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTTGGCAATCCGGTAC		
		1087	Luziferase	
Sequenzierung 19.06.09	(351)	TGT-GGTAAAGCCACCT--GAAGATGCCAAAATGG--		
Originalsequenz	(1087)	TGTTGGTAAAGCCACC <u>ATGGAAGATGCCAAAACATT</u>		

### HSD3B2-Promotor

		834		883
Sequenzierung 12.11.09	(1)	AGATCCCAGACAGCTGGTATCAACTGACCAGTGTCTGTTAAGGCTAAAG		
Originalsequenz	(834)	AGATCCCAGACAGCTGGTATCAACTGACCAGTGTCTGTTAAGGCTAAAG		
		884		933
Sequenzierung 12.11.09	(51)	CCAAGACTCTTTATCACACTGTGGCCTTAAGATTGGATTTCTCTTCCTGT		
Originalsequenz	(884)	CCAAGACTCTTTATCACACTGTGGCCTTAAGATTGGATTTCTCTTCCTGT		
		934		983
Sequenzierung 12.11.09	(101)	TCCTGGGAAGAATTAGAGATATAACCTAAAGGTCACTATTATCTGAGAA		
Originalsequenz	(934)	TCCTGGGAAGAATTAGAGATATAACCTAAAGGTCACTATTATCTGAGAA		
		984		1033
Sequenzierung 12.11.09	(151)	AAGGGATTCTGGAGGAGGAGGGAGCAATGAGTATGTGGCAGGAGTTCAAG		
Originalsequenz	(984)	AAGGGATTCTGGAGGAGGAGGGAGCAATGAGTATGTGGCAGGAGTTCAAG		
		1034		1083
Sequenzierung 12.11.09	(201)	GTAATAAGGGCTGAGACACAAGCCACAGAGCATAAAGCTCCAGTCCTTCC		
Originalsequenz	(1034)	GTAATAAGGGCTGAGACACAAGCCACAGAGCATAAAGCTCCAGTCCTTCC		
		1084		1133
Sequenzierung 12.11.09	(251)	TCCAGGGATGAGGCAGTAAGGACTTGGACTCCTCTGTCCAGCTTTAACA		
Originalsequenz	(1084)	TCCAGGGATGAGGCAGTAAGGACTTGGACTCCTCTGTCCAGCTTTAACA		
		1134	XhoI	1183
Sequenzierung 12.11.09	(301)	ATCTAAGTTACGCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTT		
Originalsequenz	(1134)	ATCTAAGTTACGCTCGAGGATATCAAGATCTGGCCTCGGCGGCCAAGCTT		
		1184	Luziferase	1233
Sequenzierung 12.11.09	(351)	GGCAATCCGGTACTGTTGG-AAAGCCACCT--GAANN---CAAANGN--		
Originalsequenz	(1184)	GGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACC <u>ATGGAAGATGCCAAAACATT</u>		
		1234		
Sequenzierung 12.11.09	(393)	---		
Originalsequenz	(1234)	AAG		

## 8 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Peter Dominiak für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. rer. nat. Olaf Jöhren für die Überlassung des interessanten Themas und für die exzellente Betreuung während der Erstellung dieser Arbeit. Sein fortdauerndes Engagement, seine unerschöpfliche Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen, seine Zuverlässigkeit und sein Vertrauen haben mich immer wieder motiviert und ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Christine Eichholz und Frau Gudrun Vierke für die kompetente Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken, ihre engagierte und ausdauernde Hilfe während der experimentellen Phase sowie die ausgesprochen freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, die die Arbeit im Labor sehr bereichert hat.

Ich danke der Kommission zur Förderung des wissenschaftlichen und des künstlerischen Nachwuchses der Universität zu Lübeck für die Bewilligung meines Promotionsstipendiums.

Ich danke meinen Eltern von Herzen, sie haben mir alles ermöglicht.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Sonja Maria Kagerer  
Geburtsdatum 21.02.1981  
Geburtsort Frankfurt am Main  
Familienstand ledig  
Staatsangehörigkeit deutsch



### Schulische Ausbildung

08/87 - 07/91 Grundschule Burgholzhausen, Friedrichsdorf  
08/91 - 06/00 Kaiserin-Friedrich-Gymnasium, Bad Homburg  
05/00 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/01 - 11/08 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck  
09/03 Ärztliche Vorprüfung  
11/08 Ärztliche Prüfung

### Promotion

02/06 - 03/10 Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation  
05/09 - 07/10 Promotionsstipendium nach der Landesverordnung des Landes Schleswig-Holstein über die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses

### Ärztliche Tätigkeit

Seit 08/10 Assistenzärztin, Klinik für Neurologie, UKSH, Campus Lübeck

### Auslandsaufenthalte

08/97 - 07/98 Brooks School, North Andover, Massachusetts, USA  
08/00 - 01/01 Soziale Arbeit als Freiwillige in einem SOS-Kinderdorf in David, Panamá  
09/04 - 07/05 ERASMUS-Stipendiatin an der Universität de Barcelona, Spanien

## 10 Veröffentlichungen und Vorträge

1. Kagerer SM, Jöhren O: Interactions of orexins/hypocretins with adrenocortical functions. *Acta Physiol (Oxf)* 198, 361-371 (2010)
2. Kagerer SM, Eichholz C, Jöhren O: Orexins/hypocretins increase the promoter activity of selective steroidogenic enzymes. *Peptides* 32, 839-843 (2011)
3. Vortrag auf dem 15. Treffen der Ostsee-Physiologen in Lübeck: Der Einfluss von Orexinen auf die Expression der Steroidbiosyntheseenzyme der Nebennierenrinde.  
*09./10.07.2010*