

Aus dem Institut für Normale und Pathologische Physiologie der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Karlheinz Voigt

---

# **Leptinrezeptor: Signaltransduktor und Vehikel**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Christian Peiser**  
aus Koblenz

Marburg 2000

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 07. 12. 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rudolf Arnold  
Referent: Prof. Dr. Rudolf E. Lang  
Korreferent: Prof. Dr. Johannes Hebebrand

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT GEWIDMET

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1. Adipositas und Regulation des Körpergewichts	1
1.2. Das Hormon Leptin	4
1.3. Der Leptinrezeptor	7
1.4. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	10
<b>2. Material und Methoden</b>	13
2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken	13
2.1.1. Total-RNA-Isolierung	13
2.1.2. Poly(A) <sup>+</sup> -mRNA-Isolierung	14
2.1.3. Reverse Transkription	15
2.1.4. Qualitative PCR	15
2.1.5. Semiquantitative PCR	17
2.1.6. Quantitative PCR	17
2.1.7. Einzelzell-PCR	18
2.1.8. Mikrolaser-assistiertes Zellpicken	19
2.1.9. Agarosegelelektrophorese	20
2.1.10. Formaldehydgelelektrophorese	21
2.1.11. Glasmilchreinigung	22
2.1.12. Elektroelution	23
2.1.13. Phenol/Chloroform-Extraktion	23
2.1.14. Nukleinsäurepräzipitation	24
2.1.15. Nukleinsäurequantifizierung	24
2.1.16. DNA-Restriktion	25
2.1.17. TA-Klonierung	25
2.1.18. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien	26
2.1.19. Kompetentmachung von Bakterien	27
2.1.20. Transformation	28
2.1.21. Miniplasmidpräparation	29
2.1.22. Maxiplasmidpräparation	30
2.1.23. DNA-Sequenzierung	31
2.1.24. DIG-cRNA-Sonden-Herstellung	31
2.1.25. Northern Blot	32
2.1.26. Hybridisierung	33
2.1.27. CDP-Chemilumineszenzdetektion	34
2.2. Biochemische Arbeitstechniken	36
2.2.1. SDS-Page	36
2.2.2. Proteinpräzipitation	37
2.2.3. Proteinquantifizierung	38
2.2.4. Sephadex G-75-Chromatografie	38

<b>2.3. Immunologische Arbeitstechniken</b>	40
2.3.1. <sup>125</sup> J-Tracer-Herstellung	40
2.3.2. RIA	40
2.3.3. Bindungsstudie	42
2.3.4. Internalisierungsassay	43
2.3.5. Cross-Linking	44
2.3.6. Western Blot	46
2.3.7. Antikörper-Peroxidase-Chemilumineszenzdetektion	47
2.3.8. Fluoreszenzimmunhistochemie	48
<b>2.4. Zellbiologische Arbeitstechniken</b>	50
2.4.1. Anlegen einer Primärzellkultur	50
2.4.2. Mediumwechsel	51
2.4.3. Passagieren	52
2.4.4. Einfrieren von Zellen	52
2.4.5. Auftauen von Zellen	53
2.4.6. Zellzählung	53
2.4.7. Trypanblau-Vitalitätsfärbung	54
2.4.8. MTT-Test	55
2.4.9. Mykoplasmentest	55
2.4.10. Zellmembranpräparation	56
<b>3. Ergebnisse</b>	58
3.1. Untersuchungen zum Einfluß einer Hochfettdiät auf das Leptinsystem	58
3.2. Untersuchungen zum Leptintransport durch die Blut-Liquor-Schranke	66
3.3. Untersuchungen zur möglichen Existenz eines löslichen Leptinrezeptors beim Menschen	72
3.4. Untersuchungen zur möglichen Leptin-vermittelten Signalübertragung über nervale Afferenzen	86
<b>4. Diskussion</b>	94
4.1. Untersuchungen zum Einfluß einer Hochfettdiät auf das Leptinsystem	94
4.2. Untersuchungen zum Leptintransport durch die Blut-Liquor-Schranke	97
4.3. Untersuchungen zur möglichen Existenz eines löslichen Leptinrezeptors beim Menschen	102
4.4. Untersuchungen zur möglichen Leptin-vermittelten Signalübertragung über nervale Afferenzen	108

<b>5. Zusammenfassung</b>	113
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	115
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	138
<b>Lebenslauf</b>	142
<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	145
<b>Danksagung</b>	146
<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	147

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Adipositas und Regulation des Körpergewichts

Adipositas ist als übermäßige Vermehrung oder Bildung von Fettgewebe definiert (*Pschyrembel, 1998*). Der Body mass index (BMI) dient der indirekten Abschätzung der Fettmasse; ein Wert  $< 25 \text{ kg/m}^2$  gilt als normal. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die Prävalenz der Adipositas Grad 1 ( $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ) 40 %, der Adipositas Grad 2 ( $30 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 40 \text{ kg/m}^2$ ) 16 % und der Adipositas Grad 3 ( $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ) 1 % (*Wechsler et al., 1996*). Da Adipositas Risikofaktor für eine Reihe von Erkrankungen ist, wie z. B. Diabetes mellitus Typ 2, Arterielle Hypertonie, Koronare Herzkrankheit, Apoplex, Phlebothrombose, Schlafapnoe-Syndrom, einige Krebsformen, Arthrose usw. (*Herold, 1999; Bray, 1998*), handelt es sich um ein wichtiges bevölkerungsmedizinisches Problem (*Wirth, 1998; Wechsler, 1997*).

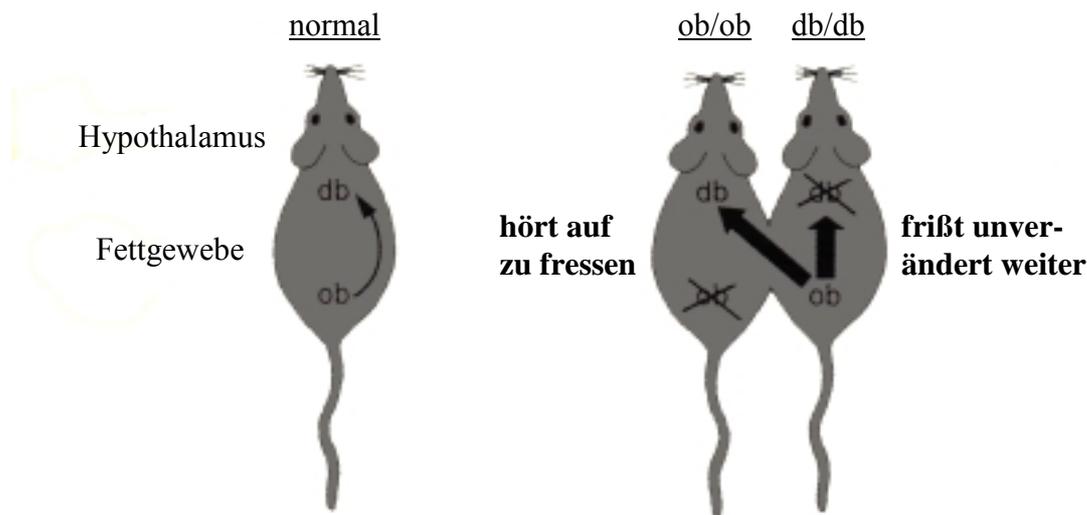
Auch wenn Adipositas zu einem großen Teil eine Erscheinung unserer Wohlstandsgesellschaft ist (fetteiche Ernährung im Überfluß kombiniert mit Bewegungsmangel) (*Blundell, 1996*), so gab es sie, wenn auch in viel geringerer Häufigkeit, in allen Epochen der Menschheitsgeschichte. Die älteste bekannte Darstellung von Adipositas ist die Venus von Willendorf, eine Kalksteinstatue aus der Steinzeit (ca. 25.000 v. Chr.) (*Bray, 1990*).

Die Ätiologie der Adipositas und der in der Pathogenese dieser Krankheit involvierten Faktoren sind multifaktoriell und komplex (*Roberts und Greenberg, 1996*). Zwar spielt das individuelle Ernährungsverhalten, das durch Kultur, Erziehung und sonstige gesellschaftliche Einflüsse geprägt wird, eine sehr wichtige Rolle (*Weck und Fischer, 1997; Wechsler et al., 1996*), doch darf die genetische Komponente der Adipositas im Sinne einer familiären Prädispositionen nicht unterschätzt werden (*Chagnon et al., 1998*), wie Zwillingsstudien eindrucksvoll gezeigt haben (*Hebebrand und Remschmidt, 1995; Meyer und Stunkard, 1994; Sorensen und Stunkard, 1994; Bouchard et al., 1990*). Der genetische Einfluß auf Ernährungsverhalten und Übergewicht wird auf 25 - 50 % geschätzt (*Weck, 1998*), und dabei spielt das Leptinsystem (das Hormon Leptin und sein Rezeptor) eine nicht unwesentliche Rolle.

Schon lange vor Entdeckung des Leptinsystems haben sich Forscher gefragt, auf welche Weise die Langzeitregulation des Körpergewichts funktioniert. Werden z. B. Ratten für einen bestimmten Zeitraum überfüttert und dadurch adipös und können sich dann wieder ad libidum ernähren, halten sie instinktiv eine hypokalorische Diät ein, bis sie wieder ihr Normalgewicht erlangt haben (*Cohn und Joseph, 1962*). Ein anderes Beispiel: Wird Ratten chirurgisch etwas Körperfett entfernt, fressen sie automatisch mehr, und zwar solange, bis sie ihre ursprüngliche Fettgewebsmasse erreicht haben (*Larson und Anderson, 1978*). Welche inneren Signale sorgen dafür, daß das Ist-Körpergewicht dem Soll-Gewicht angepaßt wird, daß unter physiologischen Bedingungen also eine Homöostase besteht?

Vor über 40 Jahren wurde durch Hervey erstmals die Existenz eines Sättigungshormons aufgezeigt (*Hervey, 1959*), indem eine aufgrund einer Läsion des ventromedialen Hypothalamus (dort liegt das Sättigungszentrum) adipöse Ratte mit einer gesunden parabiotisch (also via Kreuzzirkulation beider Blutkreisläufe) verbunden wurde. Das eigentlich gesunde Tier hörte auf zu fressen und verhungerte. Die damalige (aus heutiger Sicht völlig korrekte) Interpretation des Versuchsergebnisses lautete: Die adipöse Ratte verfügt über eine so große Menge an Sättigungsfaktor, daß sich bei der schlanken Ratte, die über den gemeinsamen Blutkreislauf mit diesem quasi „überflutet“ wird, überhaupt kein Hungergefühl mehr einstellt; das adipöse Tier spricht aufgrund des zentralen Defektes auf sein eigenes Sättigungshormon nicht an.

In den 70iger Jahren führte Coleman ähnliche Experimente durch (*Coleman, 1978*). In einem davon wurden die Blutkreisläufe einer ob/ob-Maus („ob“ steht für „obese“ bzw. „obesity“) (*Ingalls et al., 1950*) und einer db/db-Maus („db“ steht für „diabetic“) (*Hummel et al., 1966*) miteinander verbunden. Beide Mäusestämme sind homozygote Träger von Gendefekten, die zu einem annähernd identischen Phänotyp führen: Sie zeichnen sich durch massive Adipositas mit einem Körpergewicht, das dem dreifachen der Norm entspricht, durch Hyperphagie, Hyperglykämie, Hyperinsulinämie mit Insulinresistenz, Adynamie, erniedrigte Körpertemperatur, verminderte Immunantwort und Infertilität aus. Was geschieht unter der Kreuzzirkulation? Nur die ob/ob-Maus ändert ihr Freßverhalten und nimmt ab, die db/db-Maus ändert ihr Verhalten nicht. Offenbar verfügt die db/db-Maus über eine große Menge an Sättigungshormon, welches allerdings bei ihr selbst nicht wirken kann; der ob/ob-Maus hingegen fehlt der Sättigungsfaktor, so daß bei ihr erst durch dessen Zufuhr über den Parabionten ein Sättigungsgefühl eintritt.



*Schematische Darstellung des Parabiosexperimentes von Coleman  
[modifiziert nach Campfield et al., 1996]*

Mittlerweile ist bekannt, daß es sich bei diesem Sättigungshormon um Leptin (auch ob-Protein genannt) handelt. Bei den ob/ob-Mäusen wurden je nach Inzuchtstamm zwei verschiedene Mutationen des ob-Gens aufgezeigt: eine Mutation im Codon 105, welche zur Expression einer abnormen m-RNA führt, so daß post translationem ein funktionsuntüchtiges Protein resultiert, sowie eine Mutation in der Promotorregion, so daß überhaupt keine m-RNA und somit kein Protein gebildet wird (Zhang et al., 1994). Substituiert man einer ob/ob-Maus Leptin, verschwinden sämtliche vorhin genannten Symptome (Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Rentsch et al., 1995). Die db/db-Maus hat zwar sehr viel Leptin, aber einen Leptinrezeptordefekt, so daß das Leptin nicht wirken kann (Chen et al., 1996; Lee et al. 1996).

Daß adipöse Menschen kein ausreichendes Sättigungsgefühl haben, warf unmittelbar nach der Entdeckung der Genmutationen bei den ob/ob-Mäusen die Frage auf, ob die Ergebnisse von der Maus auf den Menschen übertragbar sind, d. h. ob es bei einem Teil der adipösen Menschen ebenfalls Gendefekte gibt, so daß kein oder ein funktionsuntüchtiges Leptin gebildet wird. Zwar wurden weltweit einige wenige Familien mit unterschiedlichen Mutationen des bei Menschen auf Chromosom 7 lokalisierten (Isse et al., 1995) ob-Gens gefunden (Clément et al., 1998; O'Rahilly, 1998; Strobel et al., 1998; Montague et al., 1997a), aber hierbei handelt es sich um extrem seltene Einzelfälle, so daß dieser Befund beim Menschen eine ausgesprochene Rarität darstellt.

## 1.2. Das Hormon Leptin

Zunächst eine kurze Anmerkung zur Namensgebung. Das Wort „Leptin“ leitet sich aus dem Griechischen ab: „λέπειν“ heißt „abschälen“, und das dazugehörige Adjektiv „λεπτός“ „abgeschält, enthülst, ausgedroschen“ und (davon abgeleitet) „dünn“ im negativen Sinne von „kraftlos und „schwach“ (Gemoll, 1954). Insofern erscheint die Namensgebung etwas unglücklich, da wir „dünn“ im Sinne von „schlank“ als positives Attribut verstehen. Betrachtet man den Namen des Hormons jedoch im Kontext der Evolution, könnte man ihn folgendermaßen interpretieren: Leptin ist, evolutionshistorisch betrachtet, nicht das Schlankheitshormon, das vor Adipositas schützen soll, sondern der Mangel an Leptin in Hungerperioden, in denen die Menschen geschwächt sind, ist wahrscheinlich als das eigentliche Signal zu verstehen.

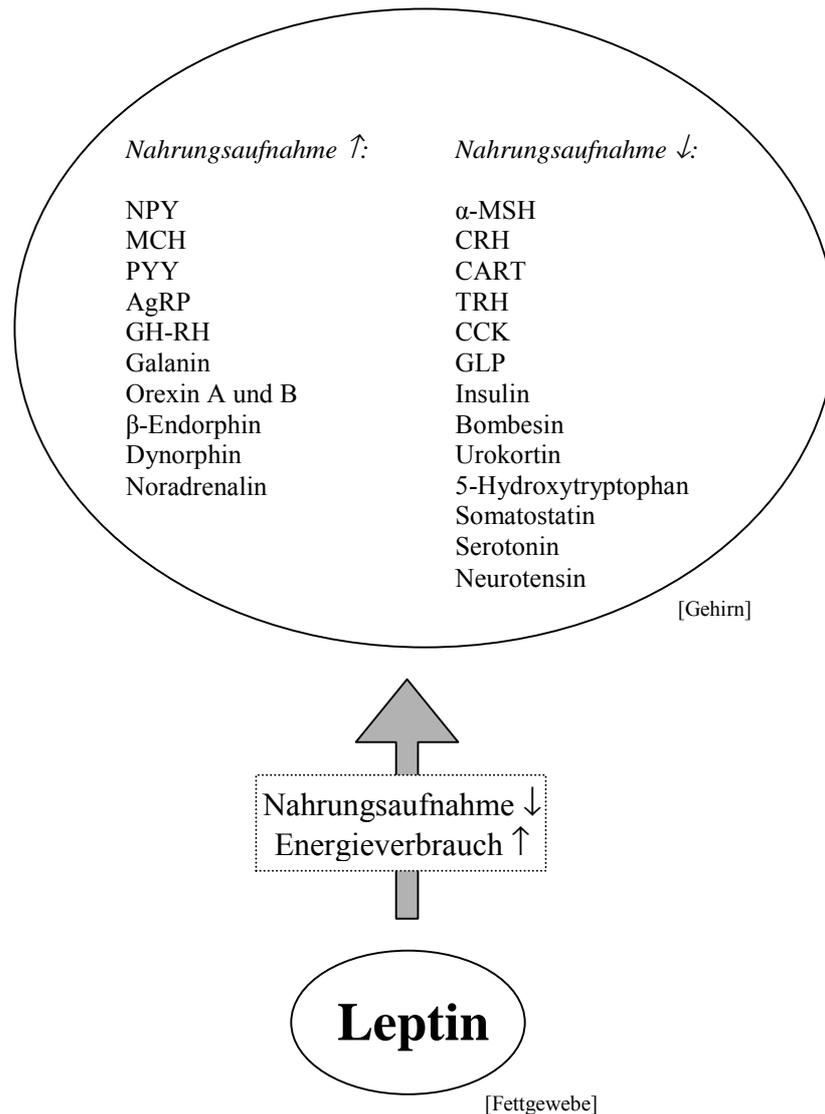
Leptin ist ein Proteohormon, für welches das 1994 durch positionelles Klonieren und Sequenzieren bei der ob/ob-Maus auf Chromosom 6 identifizierte ob-Gen kodiert (Zhang *et al.*, 1994). Das 167 AS lange Peptid (inklusive einer 21 AS langen Signalsequenz) (Zhang *et al.*, 1994) weist eine C-terminale Disulfidbrücke auf, welche zu einem großen Loop am hinteren Drittel des Proteins führt (Zhang *et al.*, 1997). Die Tertiärstruktur ist die eines globulären Proteins mit vier  $\alpha$ -Helices und zwei  $\beta$ -Sheets (Zhang *et al.*, 1997). Zwischen Codon 106 und 167 ist, wie Studien mit Peptidfragmenten gezeigt haben, die Leptinaktivität lokalisiert (Frühbeck *et al.*, 1998a; Grasso *et al.*, 1997). Leptin weist eine Homologie zur Klasse I-Zytokin-Familie auf (Campfield und Smith, 1998). Die Homologie zwischen Mensch und Maus beträgt 84 % (Considine *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994), die zwischen Mensch und Ratte 83 % (Ogawa *et al.*, 1995).

Die Hauptproduktionsstätte für Leptin ist das Fettgewebe (Maffei *et al.*, 1995a; Masazuki *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1994). Außer von Adipozyten wird Leptin, wenngleich auch in wesentlich geringerer Menge, von den Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Hassink *et al.*, 1997; Hoggard *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 1997) sowie von den Epithelzellen der weiblichen Brustdrüse (O'Brien *et al.*, 1999; Smith-Kirwin *et al.*, 1998) und der Magenfundusmukosa (Mix *et al.*, 1999; Bado *et al.*, 1998) synthetisiert. Außerdem wurde bei der Ratte Leptin auch in einigen Hirnarealen gefunden (Morash *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999). Die Leptinausschüttung weist einen pulsatilen Verlauf mit

einer Pulsdauer von ca. 30 min (*Licinio et al., 1997; Sinah et al., 1996b*) sowie eine zirkadiane Rhythmik mit nächtlichem Anstieg (*Matkovic et al., 1997; Sinha et al., 1996a*) auf.

Bezüglich seiner Wirkung als Sättigungshormon läßt sich über Leptin folgendes sagen: Es gibt eine Vielzahl von Peptiden und Transmittern im Gehirn, welche teils appetitsteigernd (wie z. B. NPY [Neuropeptid Y] (*Stanley und Leibowitz, 1984*), MCH [Melanin-konzentrierendes Hormon] (*Qu et al., 1996*), PYY [Peptid YY] (*Morley et al., 1985*), AgRP [Agouti-verwandtes Protein] (*Rossi et al., 1998*), GH-RH [Wachstumshormon-Releasinghormon] (*Vaccarino et al., 1985*), Galanin (*Kyrkouli et al., 1990*), Orexin A und B (*Sakurai et al., 1998*),  $\beta$ -Endorphin (*Grandison und Guidotti, 1977*), Dynorphin (*Morley et al., 1982*) und Noradrenalin (*Coons und Quartermain, 1970*)), teils appetithemmend (wie z. B.  $\alpha$ -MSH [ $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon] (*Fan et al., 1997*), CRH [Kortikotropin-Releasinghormon] (*Rohner-Jeanrenaud et al., 1989*), CART [Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript] (*Kristensen et al., 1998*), TRH [Thyreotropin-Releasinghormon] (*Konturek et al., 1981*), CCK [Cholezystokinin] (*Gibbs et al., 1973*), GLP [Glukagon-ähnliches Peptid] (*Turton et al., 1996*), Insulin (*Woods et al., 1996*), Bombesin (*Ohi-Hamazaki et al., 1997*), Urokortin (*Spina et al., 1996*), 5-Hydroxytryptophan (*Blundell und Latham, 1979*), Somatostatin (*Levine und Morley, 1982*), Serotonin (*Rezek und Novin, 1975*) und Neurotensin (*Luttinger et al., 1982*)) wirken. Zur Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen diesen Modulatoren, welches für die Konstanz des Körpergewichts notwendig ist, sind Signale aus der Peripherie erforderlich, die via feed back auf die zentralen Faktoren regulatorisch Einfluß nehmen.

Leptin hat eine solche Signalfunktion. Es gelangt von seiner Hauptproduktionsstätte, dem Fettgewebe, auf dem Blutweg über einen noch nicht vollständig bekannten sättigbaren Transportmechanismus ins Gehirn (*Banks et al., 1996*), wo als Sättigungssignal fungiert, indem es eine Verminderung der Nahrungsaufnahme (*Barinaga, 1995; Weigle et al., 1995*) und durch Sympathikusaktivierung einen Anstieg des Energieverbrauchs bewirkt (*Campfield et al., 1995; Halaas et al., 1995; Pelleymounter et al., 1995; Rentsch et al., 1995*). Somit kann Leptin als Lipostat bezeichnet werden. Bei einer ausgeglichenen Energiebilanz spiegelt der Leptinplasmaspiegel die Menge an Körperfett wieder und korreliert hochsignifikant mit dem BMI (*Sinha et al., 1997; Considine et al., 1996; McGregor et al., 1996; Rosenbaum et al., 1996; Maffai et al., 1995b*).



***Schematische Darstellung der Leptinwirkung: Das im Fettgewebe produzierte Hormon Leptin repräsentiert den Energiestatus des Organismus und wirkt als Sättigungssignal, wobei es einige der aufgelisteten zentralen Faktoren direkt oder indirekt beeinflusst.***

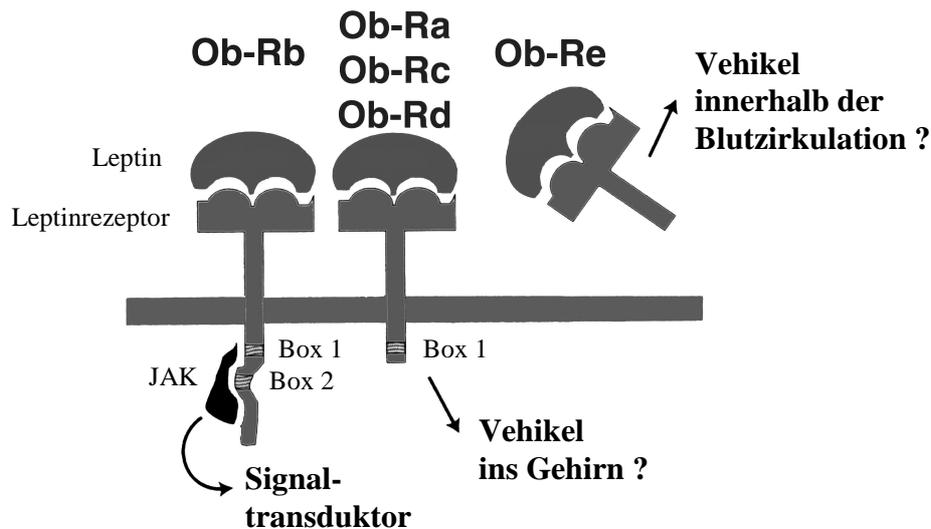
Bei sehr schnellen Verschiebungen der Energiebilanz kommt es vorübergehend zu überschießenden Veränderungen des Leptinplasmaspiegels, so z. B. bei eintägiger massiver Hyperalimentation ohne Gewichtszunahme zu einer Erhöhung um 40 % (Kolaczynski *et al.*, 1996b). Leptin kommt somit eine bivalente Aufgabe zu, nämlich einerseits die der Langzeitregulation des Körpergewichts, andererseits aber auch die eines kurzfristigen Regulators.

### 1.3. Der Leptinrezeptor

Ende 1995 wurde durch Expressionsklonieren und Sequenzieren der Leptinrezeptor (OB-R) entdeckt (*Tartaglia et al., 1995*). Durch Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem oder mit alkalischer Phosphatase fusioniertem Leptin wurden im murinen Plexus chorioideus hochaffine spezifische ob-Bindungsstellen ermittelt, welche durch Screening einer aus den Plexuszellen hergestellten cDNA-Bibliothek identifiziert werden konnten. Das gefundene Leptinrezeptorgen befindet sich bei der Maus auf Chromosom 4 im den db-Locus beinhaltenden Intervall (*Tartaglia et al., 1995*) und kodiert für ein Protein, welches Homologien zur Familie der Klasse I-Zytokinrezeptoren, insbesondere zur Signaltransduktionsuntereinheit gp 130 des IL-6-Rezeptors (*Taga et al., 1989*), des G-CSF (Granulocytenkolonie-stimulierender Faktor)-Rezeptors (*Fukunaga et al., 1990*) und des LIF (Leukämie-inhibitorischer Faktor)-Rezeptors (*Gearing et al., 1991*) zeigt (*Tartaglia et al., 1995*).

Der Leptinrezeptor setzt sich aus einem Leptin-bindenden extrazellulären Anteil, einer Transmembranregion und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen (*Tartaglia, 1997*) und wird posttransmembranös alternativ gespleißt, so daß der intrazelluläre Bereich unterschiedlich lang ist; bei der Maus existieren fünf Spleißvarianten (OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd und OB-Re), welche im C-terminal kodierenden Exon variabel sind (*Chen et al., 1996; Lee et al., 1996*). OB-Rb ist mit 1162 AS die längste Rezeptorform und enthält die Proteinmotive Box 1 und Box 2 (*Lee et al., 1996*), welche zur Aktivierung der JAK-STAT-Signaltransduktion notwendig sind (*Stahl et al., 1995; Baumann et al., 1994; Narazaki et al., 1994; Murakami et al., 1991*). OB-Ra (894 AS), OB-Rc (892 AS) und OB-Rd (900 AS) sind verkürzte Rezeptoren; ihnen fehlt die Box 2-Sequenz (*Lee et al., 1996*). OB-Re (805 AS) endet sogar bereits vor der transmembranösen Domäne; es handelt sich somit um einen löslichen Rezeptor (*Lee et al., 1996*).

Mit Hilfe einer murinen Leptinrezeptor-cDNA-Sonde gelang es, den humanen Leptinrezeptor aus einer humanen cDNA-Bibliothek des gesamten Gehirns zu identifizieren (*Tartaglia et al., 1995*). Beim Menschen ist das für den Leptinrezeptor kodierende Gen auf Chromosom 1 angesiedelt (*Chung et al., 1996*). Die Leptinrezeptorhomologie zwischen Mensch und Maus liegt auf Aminosäureebene für die extrazelluläre Domäne bei 78 %, für die intrazelluläre bei 71 % (*Chen et al., 1996; Tartaglia et al., 1995*).



**Schematische Darstellung der Leptinrezeptorspleißvarianten und ihrer möglichen Funktionen [modifiziert nach Misra und Garg, 1996]**

Der lange Rezeptor (OB-Rb) beinhaltet bei der db/db-Maus aufgrund eines abnormen Spleißens ein Insert mit einem prämaturnen Stop-Codon, während die anderen Rezeptorformen von der Mutation nicht beeinträchtigt sind (Chen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996). Daraus läßt sich ableiten, daß der lange Rezeptor für die Leptinwirkung essentiell ist. Ein besonders hoher Expressionsspiegel für OB-Rb befindet sich in hypothalamischen Neuronen (Ncl. arcuatus, Ncl. dorsomedialis, Ncl. lateralis, Ncl. paraventricularis, Ncl. ventromedialis), Kerngebieten, die in die Regulation des Körpergewichts involviert sind (Elmqvist *et al.*, 1998; Mercer *et al.*, 1996). Der Stellenwert dieser ZNS-Areale als Target der Leptinwirkung wird u. a. durch die Tatsache gestützt, daß icv.-Infusionen von Leptin bereits in äußerst geringen Konzentrationen (3 ng/h) zu einer deutlichen Wirkung führen, während bei peripherer Applikation wesentlich höhere Dosen (500 ng/h) erforderlich sind (Halaas *et al.*, 1997). Die Signaltransduktion läuft, ganz kurz dargestellt, folgendermaßen ab: Durch die Ligand-Rezeptor-Bindung mit anschließender Aggregation der Rezeptorhomodimere (Nakashima *et al.*, 1997; White *et al.*, 1997) kommt es zu einer Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinase JAK (Januskinase) (Firmbach-Kraft *et al.*, 1990), durch welche der Rezeptor selbst sowie zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren, die sog. STAT's (Signaltransduktoren und -aktivatoren der Transkription) (Fu, 1992), phosphoryliert werden (Darnell, 1996). Die STAT's (und zwar vor allem STAT-3 (Vaisse *et al.*, 1996)) dimerisieren daraufhin und wandern zum

Zellkern, um dort die Transkription spezifischer Gene zu initiieren (*Darnell, 1996*). Es sei angemerkt, daß die Signaltransduktion bei den Mitgliedern der Klasse I-Zytokinrezeptor-Familie, zu denen der Leptinrezeptor gehört, neben dem JAK-STAT-System auch durch MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und PI-3 (Phosphatidylinositol-3) vermittelt werden kann (*Heldin, 1995; Kishimoto et al., 1994*). Die Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion SOCS (Suppressor der Zytokinsignalweiterleitung) (*Nicholson und Hilton, 1998*) und PIAS (Proteininhibitor von aktiviertem STAT) (*Chung et al., 1997*) sind als negative Regulatoren in die Signaltransduktionskaskade involviert; von SOCS-3 ist bekannt, daß seine Expression im Hypothalamus durch Leptin induziert wird (*Emilsson et al., 1999*).

Die kurzen Rezeptoren (OB-Ra, c und d) sind nur unwesentlich zur Signaltransduktion befähigt (*Bjorbaek et al., 1997*). Sie haben mit großer Wahrscheinlichkeit eine Transportfunktion beim Übergang zwischen Blut und Gehirn (*Friedman und Halaas, 1998*), eine Hypothese, die durch die Tatsache, daß ein sättigbarer Transport von Leptin ins Gehirn besteht (*Banks et al., 1996*), und insbesondere durch das Vorhandensein großer Mengen an OB-Ra im Plexus chorioideus (*Tartaglia et al., 1995*) gestützt wird. Neben einer Transportfunktion von Leptin aus dem Blut in den Liquor, von wo das Hirngewebe per diffusionem erreicht werden könnte, könnte der kurze Leptinrezeptor auch eine Clearance-Aufgabe haben (*Tartaglia et al., 1995*).

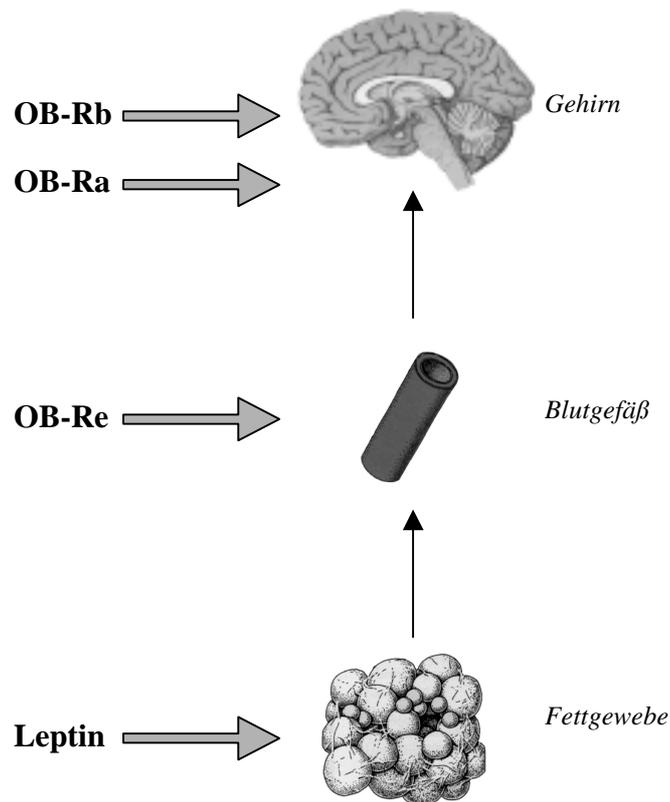
Die Spleißvariante für den löslichen Rezeptor (OB-Re) ist bisher nur beim Nagetier nachgewiesen worden (*Fei et al., 1997; Takaya et al., 1996a*); eine entsprechende Isoform scheint es beim Menschen nicht zu geben (*Chua et al., 1997*). Es ist denkbar, daß beim Menschen post translationem aus einer der kurzen Rezeptorformen der extrazelluläre Bereich durch proteolytische Spaltung (Rezeptor-Shedding) freigesetzt wird und so ein lösliche Leptinrezeptor gebildet wird.

## 1.4. Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Wenn die Langzeitregulation des Körpergewichts durch das Leptinsystem im Sinne eines negativen feed back korrekt funktioniert, sollte es eigentlich keine Adipositas geben, da der bei beginnender Zunahme der Fettgewebssmasse steigende Leptinplasmaspiegel sofort eine Verringerung der Nahrungsaufnahme durch Appetithemmung sowie eine Steigerung des Energieverbrauchs durch Sympathikusaktivierung bewirken müßte. Die Tatsache, daß es im Tierreich unter natürlichen Lebensumständen praktisch keine Adipositas gibt und daß auch beim Menschen in Zeiten knapper Nahrungsmittelressourcen (wie z. B. im und unmittelbar nach dem Zweiten Weltkrieg) Adipositas eine ausgesprochene Seltenheit war, weist auf den großen Einfluß der bezüglich des Eß- und Bewegungsverhaltens unphysiologisch veränderten Lebensumstände unserer sog. Wohlstandsgesellschaft als ätiologisch wichtigen Faktor der hohen Adipositas-Inzidenz und -Prävalenz hin.

Doch neben diesen exogenen, verhaltensbedingten Ursachen gibt es auch endogene, genetische Einflüsse auf das Ernährungsverhalten und den Körperfettgehalt, wobei (neben etlichen anderen Regulationssystemen) dem Leptin und seinem Rezeptor eine bedeutende Rolle zukommt. Betrachtet man ausschließlich das Leptinsystem, so gibt es für die Entstehung der Adipositas u. a. folgende Möglichkeiten: Entweder wird zu wenig Leptin produziert, oder es liegt eine Leptinresistenz vor. Im letzteren Fall könnte:

- Leptin aufgrund einer fehlerhaften Leptinrezeptorexpression oder -regulation unwirksam sein,
- Leptin nach Bindung an den langen Leptinrezeptor aufgrund einer gestörten Signaltransduktion nicht wirken,
- Leptin durch ein defektes Carriersystem wie dem kurzen Leptinrezeptor in nicht ausreichendem Maße zu seiner Wirkstätte im Gehirn gelangen,
- Leptin im Blutgefäßsystem durch ein Bindungsprotein wie eventuell dem löslichen Leptinrezeptor abgefangen und so vielleicht inaktiviert werden.



*Schematische Darstellung von möglichen Defekten des Leptinsystems: Es könnte zu wenig Leptin produziert werden, Leptin könnte aufgrund eines defekten OB-Rb nicht ausreichend wirken, Leptin könnte aufgrund eines defekten OB-Ra nicht ausreichend ins Gehirn gelangen, oder Leptin könnte durch OB-Re inaktiviert werden. [Abbildungen von Fettgewebe, Blutgefäß und Gehirn von Schäffler und Schmidt, 1995]*

Diese Möglichkeiten experimentell zu beleuchten, war Ziel dieser Arbeit:

Fragestellung 1:

Wie wirkt sich eine langfristige Hochfettdiät auf den Expressionsspiegel des Leptinrezeptors aus, und hat sie einen Einfluß auf die Expression von Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion?

Fragestellung 2:

Kann die Blut-Liquor-Barriere für Leptin durch einen Leptinrezeptor-vermittelten Transport überwunden werden?

Fragestellung 3:

Gibt es beim Menschen eine lösliche Form des Leptinrezeptors?

Fragestellung 4:

Gibt es neben dem humoralen Weg auch nervale Afferenzen, die die Signalübertragung von Leptin aus der Peripherie zum ZNS vermitteln?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Molekularbiologische Arbeitstechniken

#### 2.1.1. Total-RNA-Isolierung

##### Reagenzien:

- Solution D
  - 100 g Guanidinthiozyanat [Roth]
  - 117,20 ml DEPC-Wasser (s. u.)
  - 7,04 ml Natriumzitat (750 mM, pH 7,0) [Merck]
  - 10,43 ml N-Lauroylsarkosin (20 %) [Roth]
  - 2,41 ml 2-Merkaptoethanol [Fluka]
- Natriumazetat (2 M, pH 4,0) [Merck]
- Phenol (wassergesättigt)
  - Kristallines Phenol [Merck] wird bei 65 °C geschmolzen, mit 1 Vol. DEPC-Wasser versetzt und 300 mg 8-Hydroxichinolin [Merck] hinzugegeben. Dann wird für mindestens 30 min gemischt. Danach findet bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min die Phasentrennung statt.
- Chloroform [Roth]
- Isoamylalkohol [Roth]
- Isopropanol [Roth]
- Ethanol [Roth]
- DEPC-Wasser
  - Aq. dest. wird mit DEPC [Roth] in einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt, 3 h gerührt und 3 x autoklaviert.

##### Durchführung:

Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff weggefroren; Zellen wurden direkt in Solution D aufgenommen. Pro 100 mg Gewebe bzw. pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde 1 ml Solution D verwendet. Gewebe wurde mit einem Dispergiergerät [Polytron, Kinematica] homogenisiert, Zellen wurden durch mehrfaches Aufziehen durch eine englumige Kanüle Scherkräften ausgesetzt. Nachdem das Lysat 15 min auf Eis stehengelassen worden war, wurden 0,1 Vol. 2 M Natriumazetat (pH 4,0) hinzugegeben und 10 s geschüttelt, dann 1 Vol. wassergesättigtes Phenol und wieder 10 s geschüttelt und schließlich 0,2 Vol. Chloroform / Isoamylalkohol (49 + 1) und 2 min kräftig gevortext. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze zentrifugiert (10.000 x g, 15 min, 4 °C) [Mikroliter 1394, Hettich]. Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und in ein neues Tube überführt; die Interphase und die untere

(phenolische) Phase wurden verworfen. Wenn die Interphase sehr dick war, was insbesondere bei proteinreichen Geweben der Fall war, wurden die Arbeitsschritte ab der Natriumazetat-Zugabe wiederholt. Die obere Phase wurde mit 1 Vol. eiskaltem Isopropanol vermischt und die RNA für mindestens 1 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach Zentrifugation ( $10.000 \times g$ , 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [Mikroliter 1394, Hettich] wurde das Pellet in 0,2 Vol. der anfangs eingesetzten Solution D-Menge aufgenommen und nochmals 1 Vol. eiskaltem Isopropanol für mindestens 1 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt, zentrifugiert ( $10.000 \times g$ , 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [Mikroliter 1394, Hettich], das Pellet 3 x mit eiskaltem 75 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser gelöst, wobei für 5 -10 min auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt wurde. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der extrahierten Total-RNA erfolgten fotometrisch (s. 2.1.15.) sowie gelelektrophoretisch (s. 2.1.9.): Für die Mengenermittlung gilt näherungsweise:  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA}$ . Um die Reinheit der isolierten RNA zu beurteilen (Kontaminationsgefahr mit aus der Interphase stammendem Protein), wurde der Quotient  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  berechnet; dieser lag stets zwischen 1,7 und 2,1. Die gelelektrophoretische Darstellung der RNA auf einem 1 %igen Agarosegel (s. 2.1.9.) zeigte, daß keine Degradation stattgefunden hatte. Schließlich wurde die RNA aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.1.2. Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA-Isolierung

#### Reagenzien:

- Lysepuffer
  - 100 mM Tris-HCl (pH 8,0) [Gerbu]
  - 500 mM Lithiumchlorid [Merck]
  - 10 mM EDTA [Roth]
  - 1 % SDS [Serva]
  - 5 mM DTT [Gerbu]
- Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> [DynaL MPC]
- Waschpuffer
  - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) [Gerbu]
  - 150 mM Lithiumchlorid [Merck]
  - 1 mM EDTA [Sigma]
- SDS [Serva]
- Tris-HCl (10 mM, pH 7,5) [Gerbu]

#### Durchführung:

Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff weggefroren; Zellen wurden direkt in Lysepuffer aufgenommen. Pro 10 mg Gewebe bzw. pro  $1 \times 10^6$  Zellen

wurde 1 ml Lysepuffer verwendet. Gewebe wurde mit einem Dispergiergerät [*Polytron, Kinematica*] homogenisiert, Zellen wurden durch mehrfaches Aufziehen durch eine englumige Kanüle Scherkräften ausgesetzt. Nachdem das Lysat 15 min auf Eis stehengelassen worden war, wurden 20 µl Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub>, welche zuvor in Lysepuffer gewaschen worden waren, hinzugegeben und unter leichtem Schwenken für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann für 2 min bei Raumtemperatur auf einem Magnetpartikelkonzentrator [*Dynal MPC*] weiterinkubiert, bis sich die Dynabeads am Magneten gesammelt hatten. Der Überstand wurde verworfen und die Dynabeads 2 x Waschpuffer plus 0,1 % SDS und 1 x mit Waschpuffer ohne SDS gewaschen. Anschließend wurde für 2 min bei 65 °C mit Tris-HCl eluiert. Aufgrund der geringen Mengen waren Quantifizierung und Qualitätskontrolle nicht möglich. Die m-RNA wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 2.1.3. Reverse Transkription

#### Reagenzien:

- Random Hexamer (50 M) [*Roche*]
- dNTP-Mix (2 mM) [*MPI Fermentas*]
- 5 x Erststrangpuffer [*Life Technologies*]
- DTT (100 mM) [*Life Technologies*]
- Superscript-II-Reverse Transkriptase (200 U/µl) [*Life Technologies*]

#### Durchführung:

2 (1 – 5) µg RNA wurden mit 2 µl Random Hexamer versetzt und durch Inkubation für 10 min bei 70 °C und anschließendes Abschrecken für 1 min auf Eis denaturiert. Dann wurden pro Ansatz 4 (1 – 5) µl aq. dest., 5 µl dNTP-Mix, 4 µl Erststrangpuffer, 2 µl DTT und 1 µl Superscript-II-Reverse Transkriptase zugegeben.. Der 20 µl-Ansatz wurde dann für 10 min bei RT, für 60 min bei 42 °C und für 10 min bei 70 °C inkubiert.

### 2.1.4. Qualitative PCR

#### Reagenzien:

- dNTP-Mix (2 mM) [*MPI Fermentas*]
- 10 x REDTaq-PCR-Reaktionspuffer [*Sigma*]

- 5'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]
- 3'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]
- REDTaq-DNA-Polymerase (1 U/µl) [Sigma]

#### Durchführung:

2 (1 – 5) µl RT-Produkt wurden mit 29 (26 – 30) µl aq. dest., 7,5 µl dNTP-Mix, 5 µl 10 x REDTaq-PCR-Reaktionspuffer, 2 µl 5'-Primer, 2 µl 3'-Primer und 2,5 µl REDTaq-DNA-Polymerase versetzt. Bei speziellen Anwendungen, wie z. B. der Amplifikation besonders langer oder besonders GC-reicher Sequenzen wurden teilweise andere Polymerasen verwendet; in den Fällen, in denen möglichst keine Mismatches auftreten sollten., wurde ein Gemisch aus Taq- und Pwo-Polymerase (z. B. Expand High Fidelity PCR System [Roche]) verwendet. Als Negativkontrollen dienten PCR-Ansätze ohne RT-Produkt zum Ausschluß einer Kontamination mit Template sowie PCR-Ansätze mit RNA ohne Reverse Transkriptase-Reaktion zur Erkennung einer Kontamination mit genomischer DNA. Außerdem wurden die Primer, wann immer möglich, so gewählt, daß sie Intron-überspannend waren. Das Amplifikationsstandardprogramm war: 1 Zyklus: 1 min 94 °C; 35 Zyklen: 30 s 94 °C, 45 s 55 – 65 °C (je nach Primer), 1 min 72 °C; 1 Zyklus: 10 min 72 °C. Als Thermocycler wurde der GeneAmp 9600 [Perkin Elmer] verwendet. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch (s. 2.1.9.) dargestellt. Die Spezifität des jeweiligen Amplifikates wurde durch Sequenzierung verifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Primer verwendet:

GAPDH (Mensch, Ratte)	+	5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'
	-	5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG-3'
GAPDH (Ratte, für TaqMan)	+	5'-ACGGGAAACCCATCACCAT-3'
	-	5'-CCAGCATCACCCATTTGA-3'
OB-R (Mensch)	+	5'-CACCTCTAATGTCAGTTCAGCC-3'
	-	5'-ATTCAGCATAGCGATGATGG-3'
OB-Rb (Mensch)	+	5'-ATAGTTCAGTCACCAAGTGC-3'
	-	5'-GTCCTGGAGAACTCTGATGTC-3'
OB-R (Ratte)	+	5'-GTGAATGTCTTGTGCCTGTGCC-3'
	-	5'-ATTCAGCATAGCGATGATGG-3'
OB-Ra (Ratte)	+	5'-ACCAGCAAATGATGCAGGG-3'
	-	5'-TCAAAGAGTGTCGGCTCT-3'
OB-Rb (Ratte)	+	5'-AACAGCAAATGATGCAGGG-3'
	-	5'-GATGCTCAAATGTTTCAGGC-3'
OB-Rb (Ratte, für TaqMan)	+	5'-GGGAACCTGTGAGGATGAGTG-3'
	-	5'-TAGCCCCTTGCTCTTCATCAG-3'
Leptin (Ratte)	+	5'-TCCAAGAAGAAGAAGACCCCA-3'
	-	5'-AGCCAAGGTTTCTTCCCTCAA-3'
SOCS-3 (Mensch)	+	5'-CTTCAGCTCCAAGAGCGAGT-3'
	-	5'-ACGGTCTTCCGACAGAGATG-3'

SOCS-3 (Ratte)	+	5'-CCTTTGAGGTTTCAGGAGCAG-3'
	-	5'-GGCTGGATTTTTGTGCTTGT-3'
PIAS-3 (Ratte)	+	5'-CTGGGCGAATTAAGCACA-3'
	-	5'-GGGAGCCTACAGGAGAGGTG-3'

### 2.1.5. Semiquantitative PCR

#### Reagenzien:

- dNTP-Mix (2 mM) [MPI Fermentas]
- 10 x REDTaq-PCR-Reaktionspuffer [Sigma]
- 5'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]
- 3'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]
- REDTaq-DNA-Polymerase (1 U/µl) [Sigma]

#### Durchführung:

Der PCR-Ansatz sowie das Cyclex-Programm entsprachen den Angaben bei der qualitativen PCR (s. 2.1.4.). Für die Semiquantifizierung wurden innerhalb des exponentiellen Amplifikationsbereiches, der je nach Expressionsspiegel und Primer vorab zu bestimmen war, von dem 50 µl-PCR-Ansatz nach z. B. 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36 Zyklen jeweils 5 µl entnommen und nach der PCR-Reaktion sämtliche Proben auf einem Agarosegel (s. 2.1.9.) visualisiert. Die Ethidiumbromidbanden wurden über eine Videoeinheit [MWG Biotech] auf einen Datenträger gespeichert und mit der „ONE-Dscan“-Software [Scanalytics] die integrierte optische Dichte bestimmt. Als Bezugsgröße wurde von sämtlichen Proben die GAPDH-Message bestimmt. Mittels einer Verdünnungskurve wurde die Linearität der Meßdaten gezeigt.

### 2.1.6. Quantitative PCR

#### Reagenzien:

- dNTP-Mix (2 mM) [MPI Fermentas]
- 10 x PCR-Reaktionspuffer A [Perkin Elmer]
- Magnesiumchlorid (25 µM) [Perkin Elmer]
- 5'-Primer (3 µM) [MWG Biotech]
- 3'-Primer (3 µM) [MWG Biotech]
- TaqMan-Sonde (2 µM) [Perkin Elmer]
- AmpErase Urazil-N-Glykosilase (1 U/µl) [Perkin Elmer]
- AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase (5 U/µl) [Perkin Elmer]

### Durchführung:

2,5 µl RT-Produkt wurden mit 6,625 µl aq. dest., 2 µl dNTP-Mix, 2,5 µl 10 x PCR-Reaktionspuffer A, 3,5 µl Magnesiumchlorid, 2,5 µl 5'-Primer, 2,5 µl 3'-Primer, 2,5 µl TaqMan-Sonde, 0,25 µl AmpErase Urazil-N-Glykosilase und 0,125 µl AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase versetzt. Die TaqMan-Sonden waren am 5'-Ende mit der fluoreszenten Reporterfarbe FAM (6-Karboxifluoreszein), einem Fluoreszeinderivat, und am 3'-Ende mit der Quencherfarbe TAMRA (6-Karboxitetramethylrhodamin), einem Rhodaminderivat, markiert und waren mit einem OH-blockierenden Phosphat ausgestattet. Die Sondenauswahl wurde mit Hilfe der „Primer Express“-Software [Perkin Elmer] bewerkstelligt. Die Sequenz der GAPDH (Ratte)-Sonde war: 5'-TTCCAGGAGCGAGATCCCGTCAAG-3'; die der OB-Rb (Ratte)-Sonde: 5'-AGAGTCAACCCTCAGTTAAATATGCAACGCTG-3'. Als Reaktionsgefäße wurden spezielle MicroAmp Optical Tubes mit entsprechenden MicroAmp Optical Caps [Perkin Elmer] verwendet. Als Negativkontrollen dienten PCR-Ansätze ohne RT-Produkt zum Ausschluß einer Kontamination mit Template sowie PCR-Ansätze mit RNA ohne Reverse Transkriptase-Reaktion zur Erkennung einer Kontamination mit genomischer DNA. Außerdem wurden die Primer, wann immer möglich, so gewählt, daß sie Intron-überspannend waren. 1:2-Verdünnungsreihen mit cDNA aus den zu vermessenden Geweben dienten der Anfertigung von Standardkurven, welche das gesamte Meßspektrum abdeckten und eine geringe Streuung hatten ( $r > 0,98$ ). Das Amplifikationsstandardprogramm war: 1 Zyklus: 2 min 50 °C; 10 min 95 °C; 40 Zyklen: 15 s 95 °C, 1 min 60 °C. Als Thermocycler wurde der ABI PRISM 7700 Sequence Detector [Perkin Elmer] verwendet, welcher eine Echtzeitanalyse des Amplifikationsverlaufs ermöglicht. Die Auswertung dieser Echtzeitanalyse erfolgte durch die „Sequence Detections Systems“-Software [Perkin Elmer]. Sämtliche Meßdaten wurden auf GAPDH bezogen.

### **2.1.7. Einzelzell-PCR**

#### Reagenzien:

- dNTP-Mix (2 mM) [MPI Fermentas]
- 10 x PCR-Reaktionspuffer II [Perkin Elmer]
- Magnesiumchlorid (25 µM) [Perkin Elmer]
- 5'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]
- 3'-Primer (20 µM) [MWG Biotech]

- AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) [*Perkin Elmer*]

#### Durchführung:

8  $\mu$ l RT-Produkt wurden mit 20  $\mu$ l aq. dest., 7,5  $\mu$ l dNTP-Mix, 5  $\mu$ l 10 x PCR-Reaktionspuffer A, 5  $\mu$ l Magnesiumchlorid, 2  $\mu$ l 5'-Primer, 2  $\mu$ l 3'-Primer und 0,5  $\mu$ l AmpliTaq Gold-DNA-Polymerase versetzt. Als Negativkontrollen dienten PCR-Ansätze ohne RT-Produkt zum Ausschluß einer Kontamination mit Template sowie PCR-Ansätze mit RNA ohne Reverse Transkriptase-Reaktion zur Erkennung einer Kontamination mit genomischer DNA. Außerdem wurden die Primer, wann immer möglich, so gewählt, daß sie Intron-überspannend waren. Das Amplifikationsstandardprogramm war: 1 Zyklus: 2 min 94 °C; 60 Zyklen: 30 s 94 °C, 45 s 55 – 65 °C (je nach Primer), 1 min 72 °C; 1 Zyklus: 10 min 72 °C. Als Thermocycler wurde der GeneAmp 9600 [*Perkin Elmer*] verwendet. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch (s. 2.1.9.) dargestellt. Die Spezifität des jeweiligen Amplifikates wurde durch Sequenzierung verifiziert.

### 2.1.8. Mikrolaser-assistiertes Zellpicken

#### Reagenzien:

- Tissue-Tek [*Sakura*]
- Azeton [*Roth*]
- Ethanol [*Roth*]
- Hämalaun
  - 1 g Hämatoxin [*Fluka*]
  - 200 mg Natriumjodat [*Fluka*]
  - 50 g Kaliumaluminiumsulfat [*Fluka*]
  - 50 g Chloralhydrat [*Merck*]
  - 1 g Zitronensäure [*Fluka*]
 → Zunächst wird Hämatoxin in 1 l aq. dest. gelöst, dann werden Natriumjodat und Kaliumaluminiumsulfat zugegeben und zuletzt Chloralhydrat und Zitronensäure hinzugefügt. Die Lösung wird sterilfiltriert.
- 2 x Erststrangpuffer
  - 52 mM Tris-HCl (pH 8,3) [*Gerbu*]
  - 78 mM Kaliumchlorid [*Roth*]
  - 3,1 mM Magnesiumchlorid [*Roth*]
  - 1 % Igepal CA-630 [*Sigma*]
  - 4 % RNase-Inhibitor [*Perkin Elmer*]

### Durchführung:

Mit der Methode des Mikrolaser-assistierten Zellpickens ist es möglich, aus einem Gewebsschnitt einzelne Zellquerschnitte freizulegen und für Untersuchungen auf Einzelzellebene, wie der Einzelzell-PCR (s. 2.1.7.), zu gewinnen. Das Gewebe, aus welchem die lasergestützte Einzelzellpräparation durchgeführt werden sollte, wurde, wie folgt, vorbehandelt: Das zu untersuchende Gewebepreparat wurde auf Filterpapier in Tissue Tek [*O.C.T.-Compound, Sakura*] eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Die weitere Aufarbeitung der Gewebestückchen bestand in der Kryosektion [*Kryostat CM 1900, Leica*]. Die  $6\text{ }\mu\text{m}$  dicken Schnitte wurden auf vorbehandelte (Einlegen für mind. 1 h in Azeton, anschließend für ca. 10 min in 100 %igem Ethanol; Trocknung an der Luft) Deckgläschen aufgebracht, für 2 min mit Hämalaun gefärbt, kurz in aq. dest. getaucht und mit 100 %-igem Ethanol fixiert. Die Begutachtung der Schnitte erfolgte mit einem Inversmikroskop [*Axiocvert 135, Zeiss*]. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden mit einem UV-Laser-Mikrostrahl mit einer Wellenlänge von 337 nm [*Laser-MicroBeam System, PALM*] die zu untersuchenden Zellen vom Umgebungsgewebe separiert, das zwischen diesen Zellen befindliche Stroma fotolytisch eliminiert und sogar in den Zellen angeschnittene Nuklei weggebrannt. Die freipräparierten Zellquerschnitte wurden mit einer Mikromanipulator-gesteuerten Nadel aufgenommen und in ein Reaktionsstube überführt, in welches bereits  $10\text{ }\mu\text{l}$  2 x Erststrangpuffer vorgelegt waren. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Tubes in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.1.9. Agarosegelelektrophorese**

#### Reagenzien:

- Agarose [*Life Technologies*]
- 50 x TAE
  - 242 g Tris-Base [*Roth*]
  - 57,1 ml Eisessig [*Roth*]
  - 100 ml EDTA (500 mM, pH 8,0) [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest.
- Ethidiumbromid (0,5 %) [*Serva*]
- 10 x DNA-Probenpuffer
  - 200 mM EDTA (pH 8,2) [*Roth*]
  - 50 Vol.-% Glycerin (87 %) [*Roth*]
  - 0,25 % Bromphenolblau [*Sigma*]
  - 0,25 % Xylenzyanol [*Sigma*]

→ sterilfiltrieren

- 100 bp-Leiter [*Life Technologies*]

#### Durchführung:

Die Agarose wurde in einer Konzentration zwischen 0,5 % und 2 % in 1 x TAE durch Kochen gelöst, mit Ethidiumbromid (5 µl von o. g. Stammlösung pro 100 ml) versetzt. und in einen mit Klebeband an Ober- und Unterseite abgedichteten Gelschlitten gegossen, in welchem ein Gelkamm eingesetzt war. Nach dem Abkühlen und Erhärten wurde der Kamm gezogen, das Klebeband entfernt und das Gel mitsamt dem Schlitten in eine Gelkammer gesetzt, in welcher als Laufpuffer soviel 1 x TAE gegeben wurde, daß das Gel vollständig bedeckt war. Die mit DNA-Probenpuffer versetzten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Als Marker wurde meist eine 100 bp-Leiter verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V [*Electrophoresis Power Supply Model 493, ISCO*] bis zur gewünschten Laufstrecke. Das sich in die Tertiärstruktur der Nukleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht die Visualisierung der DNA bei 312 nm mit einem UV-Transilluminator [*Fluo-Link, Vilber Lourmat*]. Zur Dokumentation wurde eine Sofortbildkamera verwendet [*MP-4, Polaroid*].

### 2.1.10. Formaldehydelektrophorese

#### Reagenzien:

- Agarose [*Life Technologies*]
- 10 x MOPS
  - 200 mM MOPS [*Roth*]
  - 50 mM Natriumazetat [*Roth*]
  - 10 mM EDTA [*Roth*]
 → ad 1 l aq. dest.; auf pH 7,0 einstellen; sterilfiltrieren
- Formaldehyd (37 %) [*Roth*]
- Ethidiumbromid (0,5 %) [*Serva*]
- Denaturierungspuffer
  - 10 ml Formamid [*Roth*]
  - 3,5 ml Formaldehyd (37 %) [*Roth*]
  - 1 ml 10 x MOPS (s. o.)
  - 1 ml aq. dest.
- 10 x RNA-Probenpuffer
  - 200 mM EDTA (pH 8,2) [*Roth*]
  - 50 Vol.-% Glycerin (87 %) [*Roth*]
  - 0,25 % Bromphenolblau [*Sigma*]
  - 0,25 % Xylenzyanol [*Sigma*]
 → sterilfiltrieren

### Durchführung:

Für ein 1,2 %-iges Gel wurde die entsprechende Menge Agarose zunächst in aq. dest., dessen Menge so gewählt war, daß nach Zugabe aller Reagenzien die Endkonzentration erreicht wurde, durch Kochen gelöst. Dann wurden (bezogen auf das Endvolumen) 10 Vol.-% 10 x MOPS hinzugefügt. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden (bezogen auf das Endvolumen) 18 Vol.-% Formaldehyd und Ethidiumbromid (5 µl von o. g. Stammlösung pro 100 ml) zugegeben. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in welchem ein Gelkamm eingesetzt war. Nach dem Abkühlen und Erhärten wurde der Kamm gezogen und das Gel mitsamt dem Schlitten in eine Gelkammer überführt, in welcher als Laufpuffer soviel 1 x MOPS gegeben wurde, daß das Gel vollständig bedeckt war. Ein Gelvorlauf für 10 min bei 30 V wurde durchgeführt. Die RNA-Proben wurden in 3 Vol. Denaturierungspuffer aufgenommen, für 15 min auf 65 °C erhitzt, für 1 min auf Eis abgeschreckt und schließlich in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 30 V [*Electrophoresis Power Supply Model 493, ISCO*] bis zur gewünschten Laufstrecke. Das sich in die Tertiärstruktur der Nucleinsäuren interkalierende Ethidiumbromid ermöglicht die Visualisierung der RNA bei 312 nm mit einem UV-Transilluminator [*Fluo-Link, Vilber Lourmat*]. Zur Dokumentation wurde eine Sofortbildkamera verwendet [*MP-4, Polaroid*].

### **2.1.11. Glasmilchreinigung**

#### Reagenzien:

- Natriumjodid (6 M) [*BIO 101*]
- Glasmilchsuspension [*BIO 101*]
- New Wash-Puffer [*BIO 101*]

#### Durchführung:

Die zu isolierende DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem TAE-Agarosegel herausgeschnitten und das Gelstückchen in 3 Vol. Natriumjodid bei 55 °C geschmolzen. Dann wurde gründlich suspendierte Glasmilchsuspension (ca. 1 µl/500 ng DNA) hinzugegeben und für mindestens 15 min langsam geschüttelt, so daß sich die DNA an die Silikapartikel binden konnte. Dann wurde zentrifugiert (10.000 x g, 10 s) [*Mikroliter 1394, Hettich*] und das Pellet 3 x mit New Wash-Puffer gewaschen. Aus dem getrockneten Pellet wurde die DNA durch Inkubation für 5 min

bei 55 °C mit aq. dest. eluiert. Weil eine Glasmilchverunreinigung nachfolgende enzymatische Reaktionen inhibieren kann, wurde das Eluat nochmals zentrifugiert (10.000 x g, 1 min) [*Mikroliter 1394, Hettich*] und bis auf einen winzigen Rest am Boden des Reaktionsgefäßes in ein neues Tube überführt.

### 2.1.12. Elektroelution

#### Reagenzien:

- 50 x TAE
  - 242 g Tris-Base [*Roth*]
  - 57,1 ml Eisessig [*Roth*]
  - 100 ml EDTA (500 mM, pH 8,0) [*Roth*]→ ad 1 l aq. dest.
- TE-Puffer (pH 8,0)
  - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) [*Gerbu*]
  - 1 mM EDTA [*Roth*]

#### Durchführung:

Bei besonders großen TAE-Agarosegelstücken wurde die DNA per Elektroporation aufgereinigt. Dazu wurde das unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnittene Gelstück mit einem möglichst geringen Volumen 1 x TAE in einen Dialyseschlauch [*Zellutrans, Roth*] gegeben und dieser in eine 2,5 l 1 x TAE beinhaltende Elektrophoresekammer gehängt. Für 30 min – 2 h (je nach Größe des Gelstücks) wurde eine Spannung von 45 V angelegt [*Electrophoresis Power Supply Model 493, ISCO*], damit die DNA aus der Agarosematrix auswanderte. Nachdem der Inhalt des Dialyseschlauches in ein Reaktionsgefäß überführt worden war, wurde die im 1 x TAE-Puffer befindliche DNA präzipitiert (s. 2.1.14). und in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst

### 2.1.13. Phenol/Chloroform-Extraktion

#### Reagenzien:

- Phenol (wassergesättigt)
  - Kristallines Phenol [*Merck*] wird bei 65 °C geschmolzen, mit 1 Vol. DEPC-Wasser versetzt und 300 mg 8-Hydroxichinolin [*Merck*] hinzugegeben. Dann wird für mindestens 30 min gemischt. Danach findet bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min die Phasentrennung statt.
- Chloroform [*Roth*]
- Isoamylalkohol [*Roth*]

Durchführung:

Die Extraktion von Nukleinsäuren aus einer Lösung erfolgte durch Zugabe von 1 Vol. eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1). Nach kräftigem Schütteln wurde zentrifugiert (10.000 x g, 15 min) [*Mikroliter 1394, Hettich*], um eine Phasentrennung zu erhalten. Die obere (wässrige) Phase wurde abgenommen und zur Entfernung von Phenolresten erneut mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (49:1), wie oben beschrieben, extrahiert.

**2.1.14. Nukleinsäurepräzipitation**Reagenzien:

- Ethanol [*Roth*]
- Natriumazetat (3 M, pH 5,2) [*Roth*]

Durchführung:

Nukleinsäuren wurden aus einer Lösung durch Zugabe von 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol plus 0,1 Vol. Natriumazetat gefällt. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung für mindestens 1 h (bei geringen Nukleinsäuremengen auch über Nacht) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das sich während dieser Zeit gebildete Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 x g, 15 min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [*Mikroliter 1394, Hettich*] pelletiert und 3 x mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und konnte dann im gewünschten Puffer oder in aq. dest. aufgenommen werden.

**2.1.15. Nukleinsäurequantifizierung**Reagenzien:

- TE-Puffer (pH 8,0)
  - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) [*Gerbu*]
  - 1 mM EDTA [*Roth*]

Durchführung:

Die DNA- oder RNA-Quantifizierung erfolgte fotometrisch [*Spektralfotometer U-2000, Hitachi*]. Die zu quantifizierende Nukleinsäure wurde mit Lösungsmittel (meist TE-Puffer (pH 8,0) oder aq. dest.) verdünnt (meist 10  $\mu\text{l/ml}$ ) und in einer Quarzglasküvette

[Hellma] gegen das als Nullwert eingestellte Lösungsmittel vermessen. Die Absorptionsmessung bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, diente der eigentlichen Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren. Als Richtwert gilt:  $1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml DNA (doppelsträngig)} = 37 \text{ } \mu\text{g/ml DNA (einzelssträngig)} = 20 \text{ } \mu\text{g/ml Oligonukleotide (einzelssträngig)} = 40 \text{ } \mu\text{g/ml RNA}$ . Indem ein Spektrum von 300 - 220 nm abgefahren wurde, konnte auch die Reinheit der Nukleinsäurelösung ermittelt werden. Durch Vergleich mit der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, ließ sich eine diesbezügliche Verunreinigung erkennen; der Quotient  $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$  sollte mindestens 1,8 betragen. Eine übermäßig starke Verunreinigung mit Salzen konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß das Absorptionsspektrum im Bereich niedrigerer Wellenlängen ( $\leq 230 \text{ nm}$ ) nicht drastisch anstieg.

#### 2.1.16. DNA-Restriktion

##### Reagenzien:

- 10 x Restriktionspuffer [Amersham]
- Restriktionsenzym (10 – 12 U/ $\mu\text{l}$ ) [Amersham]

##### Durchführung:

Der Restriktionsansatz bestand aus der zu schneidenden DNA (maximal 200 ng/ $\mu\text{l}$ ), aq. dest., dem zum Enzym gehörenden Restriktionspuffer und dem jeweiligen Restriktionsenzym (je Schnittstelle 3 – 5 U/ $\mu\text{g}$  DNA; maximal 10 Vol.-%/ $\mu\text{l}$ ). Der Ansatz wurde für 2 – 3 h bei 37 °C (bei einigen Restriktionsenzymen existieren andere Temperatur-optima) inkubiert. Anschließend wurde der Verdau agarosegelelektrophoretisch (s. 2.1.9.) überprüft und ggf. für weitere Experimente mit Glasmilch (s. 2.1.11.) oder per Elektroelution (s. 2.1.12.) aufgereinigt.

#### 2.1.17. TA-Klonierung

##### Reagenzien:

- pCR 2.1-Vektor (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) [Invitrogen] oder pGEM-T-Vektor (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) [Promega]
- 10 x Ligationspuffer [Roche]
- T4-DNA-Ligase (3 Weiss-U/ $\mu\text{l}$ ) [Roche]

Durchführung:

Bei den zu klonierenden Inserts handelte es sich um PCR-Produkte (s. 2.1.4.), wobei für die Amplifikation ein Gemisch aus Pwo- und Taq-Polymerase verwendet wurde, um sowohl den Vorteil der geringen Fehlerrate als auch den A-Überhang zu haben. Der Ligationsansatz bestand aus dem PCR-Produkt, 2 µl pCR 2.1- oder 1 µl pGEM-T-Vektor, 1 µl 10 x Ligationspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase und aq. dest. auf ein Gesamtvolumen von 10 µl. Die Menge an eingesetztem PCR-Produkt berechnete sich nach folgender Formel:  $x \text{ ng PCR-Produkt} = (y \text{ bp PCR-Produkt}) \times (50 \text{ ng Vektor}) / (z \text{ bp Vektor})$  wurden für ein 1:1-Verhältnis von Insert und Vektor gewählt. Es wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde direkt oder nach Zwischenlagerung bei -20 °C zur Transformation (s. 2.1.20.) eingesetzt.

**2.1.18. Anzucht und Stammhaltung von Bakterien**Reagenzien:

- E. coli JM 109 [*Stratagene*]
- LB-Medium
  - 10 g Bacto-Trypton [*Difco*]
  - 5 g Bacto-Hefeextrakt [*Difco*]
  - 10 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest.
- LB-Agar
  - 1 l LB-Medium (s. o.)
  - 15 g BiTek-Agar [*Difco*]
  - Der BiTek-Agar wird durch Autoklavieren im LB-Medium gelöst. Wenn dem LB-Agar Ampizillin zugesetzt wird, muß darauf geachtet werden, daß dieses erst nach Abkühlung des LB-Agars auf ca. 40 °C geschieht, um eine Inaktivierung des Antibiotikums zu vermeiden.
- Ampizillin (100 µg/ml) [*Merck*]
- Glyzerin (87 %) [*Roth*]

Durchführung:

Bakterien (z. B. E. coli JM 109) wurden in LB-Medium hochgezüchtet. Bei Vorhandensein einer Ampizillinresistenz (z. B. nach Transformation mit einem entsprechenden Plasmid (s. 2.1.20.)) wurde das LB-Medium mit 0,5 µl/ml Ampizillin versetzt. Zunächst wurden die Bakterien (entweder eine gepickte Kolonie von einer Kulturplatte oder ca. 10 µl von einem Glyzerinstamm (s. u.)) in 5 ml LB-Medium in einem Schüttelinkubator für mindestens 6 h bei einer Temperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 350/min inkubiert, dann wurden die Bakterien in ein größeres Volumen (300 - 500 ml)

überführt und bis zur gewünschten Dichte bei 37 °C mit einer Schüttelfrequenz von 150/min vermehrt. Ein Glycerinstamm wurde bevorzugt aus sehr dichten Bakterien-suspensionen angelegt. Dazu wurden in Einfrierröhrchen [*Nunc*] 700 µl Glycerin vorgelegt, 1 ml der auf 4 °C gekühlten Bakterien-suspension hinzugegeben, gemischt, in Trockeneis/Ethanol eingefroren und bei –80 °C gelagert. Alle 6 Monate wurden vom Glycerinstamm Bakterien auf eine LB-Agarplatte (in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer Ampizillinresistenz ggf. mit Ampizillin) überimpft, eine einzelne Kolonie gepickt und von diesem Klon, wie eben beschrieben, nach Vermehrung ein neuer Glycerinstamm angelegt.

### 2.1.19. Kompetentmachung von Bakterien

#### Reagenzien:

- E. coli JM 109 [*Stratagene*]
- SOB-Medium
  - 20 g Bacto-Trypton [*Difco*]
  - 5 g Bacto-Hefeextrakt [*Difco*]
  - 10 ml Natriumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 2,5 ml Kaliumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 10 ml Magnesiumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 10 ml Magnesiumsulfat (1 M) [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest.; Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben
- TFB
  - 100 mM Kaliumchlorid [*Roth*]
  - 45 mM Magnesiumchlorid [*Roth*]
  - 3 mM Hexaminkobalt-3-chlorid [*Merck*]
  - 45 mM Magnesiumchlorid [*Roth*]
  - 10 ml MOPS (pH 6,3; mit Kalilauge einzustellen) [*Sigma*]
  - ad 1 l aq. dest.; sterilfiltrieren
- DMSO [*Roth*]
- DTT (2,25 M) [*Roth*]
  - 3,47 g DTT und 400 µl Kaliumazetat (1 M, pH 6,0) [*Roth*] wird mit aq. dest. auf 10 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.

#### Durchführung:

Die kompetent zu machenden Bakterien (z. B. E. coli JM 109) wurden in 50 ml SOB-Medium hochgezüchtet (37 °C, 250/min), bis eine OD von 0,45 – 0,55 [*Spektralfotometer U-2000, Hitachi*] erreicht war. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*] und das Pellet in 17 ml TFB resuspendiert. Nach erneuter Inkubation für 15 min auf Eis wurde wieder zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*]; das Pellet wurde nun in 2 ml

TFB aufgenommen. Es folgten die Zugabe von 70 µl DMSO, 5 min Inkubation auf Eis, die Zugabe von 70 µl DTT und 10 min Inkubation auf Eis. Die auf diese Weise kompetent gemachten Zellen wurden frisch für die Transformation verwendet.

### 2.1.20. Transformation

#### Reagenzien:

- SOC-Medium
  - 20 g Bacto-Trypton [*Difco*]
  - 5 g Bacto-Hefeextrakt [*Difco*]
  - 10 ml Natriumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 2,5 ml Kaliumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 10 ml Magnesiumchlorid (1 M) [*Roth*]
  - 10 ml Magnesiumsulfat (1 M) [*Roth*]
  - 10 ml Glukose (2 M) [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest.; Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat und Glukose erst unmittelbar vor Gebrauch zugeben
- LB-Agar
  - 1 l LB-Medium (s. 2.1.18.)
  - 15 g BiTek-Agar [*Difco*]
  - Der BiTek-Agar wird durch Autoklavieren im LB-Medium gelöst. Wenn dem LB-Agar Ampizillin zugesetzt wird, muß darauf geachtet werden, daß dieses erst nach Abkühlung des LB-Agars auf ca. 40 °C geschieht, um eine Inaktivierung des Antibiotikums zu vermeiden.
- Ampizillin (100 mg/ml) [*Merck*]
- IPTG (100 mM) [*Roth*]
- X-Gal [*Roth*]
  - 20 mg werden in 1 ml DMF [*Roth*] gelöst; Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

#### Durchführung:

Zu 200 µl kompetenten Bakterien (s. 2.1.19.) wurde das zu transformierende Plasmid gegeben, wie beispielsweise 1 - 10 µl Ligationsprodukt (s. 2.1.17.), vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 1,5 min auf 42 °C erhitzt und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurden die Bakterien im Schüttelinkubator für 1 h bei einer Temperatur von 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 150/min inkubiert und anschließend zentrifugiert (500 x g, 10 min) [*Rotanta 128, Hettich*]. Das Pellet wurde in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Je 100 µl wurden auf eine LB-Agarplatte ausplattiert. Damit möglichst nur transformierte Bakterien Kolonien bilden, wurde in Abhängigkeit von den Eigenschaften des Plasmids eine Selektion über die Ampizillinresistenz sowie über das Blau-Weiß-Screening durchgeführt. Der pCR 2.1-Vektor, in welchen die meisten PCR-Produkte kloniert worden waren (s. 2.1.17.), verfügt über beide Selektionsmöglichkeiten.

Für die Selektion über die Ampizillinresistenz wurde dem LB-Agar 1 µl/ml Ampizillin, für die Selektion über das Blau-Weiß-Screening 5 µl/ml IPTG sowie 4 µl/ml X-Gal beigefügt. Positivkontrolle (Kontrollplasmid mit o. g. Selektionsmöglichkeiten zur Überprüfung der Transformationseffizienz) und Negativkontrolle (linearisierter Vektor, welcher ohne Insertzugabe einer Ligationsreaktion unterzogen worden war, zur Ermittlung des Backgrounds) wurden mitgeführt. Die angeimpften LB-Agarplatten wurden über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C inkubiert. Weiße, abgrenzbare Klone wurden gepickt und zur Durchführung von Mini-Plasmidpräparationen (s. 2.1.21.) und zum Anlegen von Glyzerinstämmen (s. 2.1.18.) in 6 ml Ampizillin-haltigem LB-Medium hochgezüchtet (s. 2.1.18.).

### 2.1.21. Miniplasmidpräparation

#### Reagenzien:

- Resuspensionspuffer
  - Tris-HCl (50 mM pH 8,0) [Gerbü]
- Lysepuffer I
  - 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) [Gerbü]
  - 10 mM CDTA [Sigma]
  - 50 mM Glukose [Roth]
  - 4 mg/ml Lysozym [Merck]
- Lysepuffer II
  - 200 mM Natronlauge [Roth]
  - 1 % SDS [Serva]
- Neutralisationspuffer
  - 3 M Kaliumazetat (pH 4,8) [Roth]
- TE-Puffer (pH 8,0)
  - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) [Gerbü]
  - 1 mM EDTA [Roth]

#### Durchführung:

Die Miniplasmidpräparation wurde aus 5 ml dichter Bakteriensuspension durchgeführt. Das Bakterienpellet (Zentrifugationsbedingungen: 2.000 x g, 10 min, 4 °C [Rotanta 128, Hettich]) wurde 1 ml Resuspensionspuffer aufgenommen, erneut zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich]), das Pellet in 100 µl Lysepuffer I resuspendiert, 5 min stehengelassen, 200 µl Lysepuffer II zugegeben, vorsichtig geschwenkt und wieder 5 min stehengelassen. Schließlich wurden 150 µl Neutralisationspuffer hinzugefügt, gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Lysat hochohrtig zentrifugiert (10.000 x g, 15 min) [Mikroliter 1394, Hettich] und der Über-

stand in ein neues Tube überführt. Das Plasmid wurde Phenol/Chloroform-extrahiert (s. 2.1.13.), Ethanol-präzipitiert (s. 2.1.14), quantifiziert (s. 2.1.15.) und in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

### 2.1.22. Maxiplasmidpräparation

#### Reagenzien:

- Resuspensionspuffer [*Quiagen*]
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
  - 10 mM EDTA
  - 100 µg/ml Rnase A
- Lysepuffer [*Quiagen*]
  - 200 mM Natronlauge
  - 1 % SDS
- Neutralisationspuffer [*Quiagen*]
  - 3 M Kaliumazetat (pH 5,5)
- Äquilibrationspuffer [*Quiagen*]
  - 750 mM Natriumchlorid
  - 50 mM MOPS (pH 7,0)
  - 15 % Isopropanol
  - 0,15 % Triton X-100
- Waschpuffer [*Quiagen*]
  - 1 M Natriumchlorid
  - 50 mM MOPS (pH 7,0)
  - 15 % Isopropanol
- Elutionspuffer [*Quiagen*]
  - 1,25 M Natriumchlorid
  - 50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
  - 15 % Isopropanol
- Isopropanol [*Roth*]
- Ethanol [*Roth*]
- TE-Puffer (pH 8,0)
  - 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) [*Gerbü*]
  - 1 mM EDTA [*Roth*]

#### Durchführung:

Die Maxiplasmidpräparation wurde aus 300 ml dichter Bakteriensuspension durchgeführt. Das Bakterienpellet (Zentrifugationsbedingungen: 2.000 x g, 10 min, 4 °C [*Rotanta 128, Hettich*]) wurde 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. 10 ml Lysepuffer wurden zugegeben und 6 x geschwenkt. Dann wurden 10 ml Neutralisationspuffer hinzugefügt und wieder 6 x geschwenkt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde das Lysat hochtourig zentrifugiert (20.000 x g, 45 min, 4 °C) [*J-218, Beckman*]. Währenddessen wurde eine Anionenaustauschsäule [*Ouiagen-Tip 500, Quiagen*] durch

Auftragen von 10 ml Äquilibriumspuffer äquilibriert. Dann wurde die Säule mit dem Zentrifugationsüberstand beladen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit jeweils 30 ml Waschpuffer erfolgte die Elution mit 15 ml Elutionspuffer. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde das Plasmid gefällt, mit 70 %igem Erhanol gewaschen und in TE-Puffer (pH 8,8) gelöst

### 2.1.23. DNA-Sequenzierung

#### Reagenzien:

- AmpliTaq-FS-Big-Dye-Terminator-Premix [*Perkin Elmer*]
- Primer (5  $\mu$ M) [*MWG Biotech*]
- EDTA (50  $\mu$ M, pH 8,0) [*Roth*]

#### Durchführung:

Der Sequenzierreaktionsansatz setzte sich aus 4  $\mu$ l AmpliTaq-FS-Big-Dye-Terminator-Premix, 1  $\mu$ l Primer, DNA (entweder 10 – 100 ng PCR-Produkt oder 200 – 500 ng Plasmid) und aq. dest. (Reaktionsvolumen: 15  $\mu$ l) zusammen. Das Amplifikationsprogramm war: 25 Zyklen: 10 s 96 °C, 5 s 50 – 60 °C (je nach Primer), 4 min 60 C. Als Thermocycler wurde der GeneAmp 9600 [*Perkin Elmer*] verwendet. Nach erfolgter PCR wurde der Reaktionsansatz mit aq. dest. auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und Ethanol-präzipitiert (s. 2.1.14.). Das getrocknete Pellet wurde in 4  $\mu$ l EDTA aufgenommen, 2 min auf 90 °C erhitzt und auf Eis gestellt. Die automatische Sequenzierung aus diesem Ansatz wurde mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer [*Perkin Elmer*] durchgeführt.

### 2.1.24. DIG-cRNA-Sonden-Herstellung

#### Reagenzien:

- dNTP-Markierungs-Mix [*Roche*]
  - 10 mM ATP
  - 10 mM CTP
  - 10 mM GTP
  - 6,5 mM UTP
  - 3,5 mM DIG-UTP
- 10 x Transkriptionspuffer [*Roche*]
- RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l) [*Roche*]
- RNA-Polymerase (SP6 oder T7) (20 U/ $\mu$ l) [*Roche*]

### Durchführung:

Die DIG-cRNA-Sonden-Herstellung erfolgte durch in vitro-Transkription mit Einbau von DIG-gekoppelten UTP's. Das einzusetzende DNA-Template in Form eines das für die Sonden-Herstellung zu verwendende Insert enthaltenden Vektors mit entsprechender Promotorsequenz für die RNA-Polymerase war durch Restriktion (s. 2.1.16.) stromaufwärts des in der richtigen Orientierung inklonierten PCR-Amplifikates (s. 2.1.17.) mit 5'-Überhang oder blunt end linearisiert worden, so daß bei der in vitro-Transkription, ausgehend vom entsprechenden Promotor, die in cRNA umzuschreibende Sequenz in Antisenserrichtung bis zur Restriktionsstelle abgefahren wurde. Der Reaktionsansatz für die In vitro-Transkription war: 1 µg DNA-Template, aq. dest. (Reaktionsvolumen: 20 µl), 2 µl dNTP-Markierungs-Mix, 2 µl 10 x Transkriptionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor und 1 µl RNA-Polymerase. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert, danach mit aq. dest auf 100 µl aufgefüllt und ohne weitere Aufreinigung in 10 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -20 °C gelagert.

### **2.1.25. Northern Blot**

#### Reagenzien:

- 20 x SSC
  - 3 M Natriumchlorid [Roth]
  - 300 mM Natriumzitat [Roth]
  - auf pH 7,0 einstellen

#### Durchführung:

Die im Northern Blot eingesetzte RNA wurde zunächst in einem Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt (2.1.10.). Je nach zu erwartender Signalstärke wurden zwischen 2,5 und 10 µg Total-RNA pro Spur eingesetzt. Im Rahmen der Vorversuche wurde außerdem mit Poly(A)<sup>+</sup>-mRNA gearbeitet, um die Spezifität des Ergebnisses zu erhöhen. Dann wurde das Gel 2 x 20 min in aq. dest. und 2 x 10 min in 10 x SSC eingelegt. Für den Transfer der RNA vom Gel auf die Nylonmembran [*Hybond-N*, *Amersham*], wurde folgender Blottingaufbau gewählt: In eine mit 10 x SSC gefüllte Plastikwanne war ein auf den Kopf gestellter, quasi als Brücke über den Flüssigkeitsspiegel ragender Gelschlitten plaziert, welcher mit 3 links und rechts in das 10 x SSC eintauchenden Lagen Filterpapier [*3 M Whatman*, *Schleicher und Schuell*] bedeckt war. Die Filterpapiere wurden mit 10 x SSC befeuchtet und das Gel mit der Unterseite nach

oben daraufgelegt. Die nächste Lage bildete die direkt auf das Gel gelegte Membran, welche zuvor in 10 x SSC getränkt worden war. Darauf wurden 3 Lagen mit 10 x SSC befeuchtetes Filterpapier gelegt und darauf viele Lagen trockener Zellstoff [*Pehazell, Hartmann*] (ca. 10 cm hoch). Es war darauf zu achten, daß sich zwischen den einzelnen Lagen des Blottingaufbaus, insbesondere zwischen Gel und Membran, keine Luftblasen bildeten, welche den Transfer an dieser Stelle verzögert oder sogar unterbrochen hätten. Der Aufbau wurde mit einer kleinen Glasplatte beschwert. Die Plastikwanne wurde mit Frischhaltefolie abgedichtet, damit das 10 x SSC nicht verdunsten konnte. Der Blottingaufbau blieb über Nacht stehen; während dieser Zeit konnte der RNA-Transfer vom Gel auf die Nylonmembran über Kapillarkräfte stattfinden. Am nächsten Tag wurde die Transfereffizienz unter UV-Licht [*Fluo-Link, Vilber Lourmat*] kontrolliert und die Höhe der 18 S- und 28 S-Banden auf der Membran durch Nadeleinstiche markiert. Die RNA wurde durch Backen für 2 h bei 80 °C oder durch UV-Bestrahlung für 10 min bei 312 nm an die Membran fixiert. Die Membran konnte bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung für mehrere Monate gelagert werden.

### 2.1.26. Hybridisierung

#### Reagenzien:

- Hybridisierungspuffer
  - 5 x SSC (s. 2.1.25.)
  - 50 % Formamid [*Roth*]
  - 0,1 % N-Lauroylsarkosin [*Sigma*]
  - 0,02 % SDS [*Serva*]
  - 5 % Blockierungslösung (s. u.)
- Maleinsäurepuffer
  - 100 mM Maleinsäure [*Roth*]
  - 150 mM Natriumchlorid [*Roth*]
  - auf pH 7,5 einstellen
- 10 %-ige Blockierungslösung
  - 100 g Blockierungsreagenz [*Roche*]
  - ad 1 l Maleinsäurepuffer (s. o.); autoklavieren

#### Durchführung:

Eine Nylonmembran [*Hybond-N, Amersham*], an die via Northern-Blot RNA fixiert worden war, wurde zunächst für 1 h bei 65 °C mit 10 ml Maleinsäurepuffer pro 100 cm<sup>2</sup> Membranfläche prähybridisiert, indem die Membran mit dem vorerhitzten Puffer in eine Polypropylentüte [*Brand*] eingeschweißt und in einem entsprechend heißen Wasserbad

geschüttelt wurde. Danach folgte die Hybridisierung, wobei mit einem DIG-cRNA-Sonden-Aliquot (s. 2.1.24.) versetzter Maleinsäurepuffer in eben beschriebener Weise eingesetzt wurde. Die Hybridisierungstemperatur war dabei sehr stringent; sie lag in Abhängigkeit von der Sonde zwischen 65 und 68 °C. Hybridisiert wurde über Nacht. Am nächsten Tag schloß sich die Detektion (s. 2.1.27.) an.

### 2.1.27. CDP-Chemilumineszenzdetektion

#### Reagenzien:

- 20 x SSC
  - 3 M Natriumchlorid [Roth]
  - 300 mM Natriumzitat [Roth]
  - auf pH 7,0 einstellen
- SDS [Serva]
- Maleinsäurepuffer
  - 100 mM Maleinsäure [Roth]
  - 150 mM Natriumchlorid [Roth]
  - auf pH 7,5 einstellen
- 2 %-ige Blockierungslösung
  - 20 g Blockierungsreagenz [Roche]
  - ad 1 l Maleinsäurepuffer (s. o.); autoklavieren
- AP-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper (150 mU/μl) [Roche]
- Detektionspuffer
  - 100 mM Tris-HCl [Gerbu]
  - 100 mM Natriumchlorid [Roth]
  - 50 mM Magnesiumchlorid [Roth]
- CDP-Star (gebrauchsfertig) [Tropix]

#### Durchführung:

Eine Nylonmembran [Hybond-N, Amersham], an die via Northern-Blot RNA fixiert und die mit einer DIG-cRNA-Sonden hybridisiert worden war, wurde 2 x 5 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC plus 0,1 % SDS, 2 x 15 min bei 65 °C in 0,1 % SSC plus 0,1 % SDS und 5 min bei Raumtemperatur in Maleinsäurepuffer plus 0,5 % SDS geschüttelt. Dann wurde der Blot 30 min bei Raumtemperatur in 2 %-iger Blockierungslösung, für 30 min bei Raumtemperatur in 2 %-iger Blockierungslösung plus 0,01 % AP-gekoppeltem Anti-DIG-Antikörper und dann wieder 30 min bei Raumtemperatur in 2 %-iger Blockierungslösung geschüttelt. Schließlich wurde 2 x 20 min bei Raumtemperatur in Maleinsäurepuffer plus 0,5 % SDS gewaschen und 2 x 2 min bei Raumtemperatur mit Detektionspuffer gespült. Schließlich wurde der Blot 5 min bei Raumtemperatur mit einer in Detektionspuffer 1:10 verdünnten Lösung des Chemilumineszenz-

substrats für alkalische Phosphatase CDP-Star befeuchtet und im noch angefeuchteten Zustand in eine Klarsichttüte eingeschweißt. Nach ca. 2 h Aufbewahrung im Dunkeln hatte die Lichtemission des Chemilumineszenzsubstrats ihr Maximum erreicht und wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms [*Hyperfilm MP, Amersham*] dokumentiert; die Belichtungszeit schwankte je nach Signalintensität zwischen 10 s und 10 min. Der Film wurde maschinell entwickelt [*Crurix 60, Agfa*], über eine Videoeinheit [*MWG Biotech*] auf einen Datenträger gespeichert und mit der „ONE-Dscan“-Software [*Scanalytics*] die integrierte optische Dichte bestimmt. Als Bezugsgröße wurde von sämtlichen Proben die GAPDH-Message bestimmt. Mittels einer Verdünnungskurve wurde die Linearität der Meßdaten gezeigt.

## 2.2. Biochemische Arbeitstechniken

### 2.2.1. SDS-Page

#### Reagenzien:

- Acrylamidlösung (30 %)
  - 292 g Acrylamid [Serva]
  - 8 g Bisacrylamid [Serva]
  - ad 1 l aq. dest; Zugabe von Amberlite [Roth], 1 h rühren lassen und filtrieren
- 4 x Trenngelpuffer
  - 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) [Gerbu]
  - 0,4 % SDS [Serva]
- APS(10 %) [Roth]
- TEMED [Roth]
- 4 x Sammelgelpuffer
  - 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) [Gerbu]
  - 0,4 % SDS [Serva]
- 5 x Laufpuffer
  - 125 mM Tris-HCl [Gerbu]
  - 960 mM Glycin [Roth]
  - 0,5 % SDS [Serva]
- Protein-Probenpuffer
  - 62,5 mM Tris-HCl [Gerbu]
  - 10 % Glycerin (87 %) [Roth]
  - 2 % SDS [Serva]
  - 1 % 2-Merkaptoethanol [Fluka]
  - 0,25 % Bromphenolblau [Sigma]
- SDS-Page-Molekulargewichtsstandard Broad Range [Bio-Rad]
- Coomassie Blue-Färbelösung
  - 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G [Sigma]
  - 50 % Methanol [Roth]
  - 10 % TCA [Roth]
- Entfärber
  - 25 % Methanol [Roth]
  - 7,5 % Essigsäure [Roth]

#### Durchführung:

Es wurden 6,25 %-ige Vertikalgele mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Als Gießvorrichtung wurden zwei mit Klammern zusammengehaltene und mit Agarose an den Rändern abgedichtete Glasplatten verwendet, die sich durch Spacer in einem definierten Abstand zueinander befanden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen. Das Pipettierschema für das Trenngel war: 20,83 % Acrylamidlösung, 53,73 % aq. dest., 25 % Trenngelpuffer, 0,4 % APS und 0,04 % TEMED. Das noch flüssige Trenngel wurde vorsichtig mit etwas aq. dest. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das aq. dest. abgekippt und das Sammelgel gegossen, welches sich, wie folgt, zusammensetzte:

13,31 % Acrylamidlösung, 61,25 % aq. dest., 25 % Sammelgelpuffer, 0,4 % APS und 0,04 % TEMED. Dann wurde ein Gelkamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm wieder gezogen, die Klammern und Spacer entfernt und das zwischen den Glasplatten befindliche Gel in eine Gelkammer eingesetzt, welche mit 1 x Laufpuffer angefüllt war. Nachdem sämtliche Luftblasen entfernt worden waren, wurden die in Protein-Probenpuffer aufgenommenen und 5 min auf 95 °C erhitzten und auf Eis abgekühlten Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Marker diente der SDS-Page-Molekulargewichtsstandard Broad Range. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V [*Power Supply Model 493, ISCO*] bis zur gewünschten Laufstrecke. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Baden des Gels für ca. 10 min in Coomassie Blue-Färbelösung und anschließend im Entfärber, bis der Gelhintergrund wieder transparent war. Der SDS-Page wurde entweder im Entfärber aufbewahrt oder mit einem Gelrockner [*Biotec-Fischer*] auf ein Filterpapier [*3 M Whatman, Schleicher und Schuell*] aufgetrocknet.

### **2.2.2. Proteinpräzipitation**

#### Reagenzien:

- TCA (20 %) [*Roth*]
- Azeton [*Roth*]

#### Durchführung:

Proteine wurden aus einer Lösung entweder durch Zugabe von 2 Vol. TCA oder durch Zugabe von 4 Vol. eiskaltem Azeton gefällt. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung für mindestens 1 h (bei geringen Proteinmengen auch über Nacht) entweder bei 4 °C (TCA-Fällung) oder bei -20 °C (Azetonfällung) gelagert. Das sich während dieser Zeit gebildete Präzipitat wurde durch Zentrifugation (2.000 x g, 30 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*] pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und konnte dann im gewünschten Puffer oder in aq. dest. aufgenommen werden.

### 2.2.3. Proteinquantifizierung

#### Reagenzien:

- PBS plus Proteaseinhibitoren
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
  - 2 mg Aprotinin [Roth]
  - 500 mg Bazitrazin [Roth]
  - 370 mg EDTA [Roth]
  - 1 mg Pepstatin A [Sigma]
  - 100 mg PMSF [Sigma]

→ ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml Hepes (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]
- BSA (2 mg/ml) [Pierce]
- Coomassie Protein-Assay-Reagenz [Pierce]

#### Durchführung:

Für die fotometrische Vermessung der Proteinkonzentration wurden Leerprobe, Standardproben und Meßproben in einem Volumen von jeweils 1 ml in Plastikkuvetten [Brand] pipettiert. Als Leerprobe diente der Puffer (PBS plus Proteaseinhibitoren), in welchem das zu vermessende Protein gelöst war. Die Standardproben wurden von einer BSA-Verdünnungsreihe (gelöst in PBS plus Proteaseinhibitoren) gebildet, wobei der für die Meßproben erwartete Meßbereich abgedeckt werden sollte; die Standardproben lagen meist zwischen 10 und 250 µg/ml BSA. Die Meßproben wurden in 2 verschiedenen Verdünnungen (meist 1:100 und 1:200) eingesetzt. Alle Proben lagen als Doppelwerte vor. Zu sämtlichen Proben wurde je 1 ml Coomassie Protein-Assay-Reagenz zugegeben, gemischt und für die Ausbildung des Farbumschlags 10 min stehengelassen. Die sich zur Proteinkonzentration proportional verhaltende Farbintensität wurde fotometrisch [Spektralfotometer U-2000, Hitachi] bei 595 nm gemessen.

### 2.2.4. Sephadex G-75-Chromatografie

#### Reagenzien:

- PBS plus Proteaseinhibitoren
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]

- 2 mg Aprotinin [Roth]
  - 500 mg Bazitrazin [Roth]
  - 370 mg EDTA [Roth]
  - 1 mg Pepstatin A [Sigma]
  - 100 mg PMSF [Sigma]
- ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml Hepes (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]
- Natriumazid [Roth]

#### Durchführung:

4 g Säulenmaterial [*Sephadex G-75, Pharmacia*] quellten über Nacht in 100 ml aq. dest. auf, wurden am nächsten Tag 1,5 h auf 90 °C erhitzt, etwas abgekühlt und in eine 35 ml-Säule [*Pharmacia*], welche bereits mit aq. dest. angefüllt war, gegossen. Nachdem sich das Säulenmaterial gesetzt hatte, wurde die Säule mit PBS plus Proteaseinhibitoren plus 0,02 % Natriumazid gespült und in einem Kühlraum (4 °C) aufgestellt. Die Detektion der chromatografisch aufgetrennten Substanzen erfolgte bei 215 nm und wurde über einen Mehrkanalschreiber [*BBC Goerz-Metrawatt*] aufgezeichnet. Die Flußrate betrug 15 ml/h. Es wurden 1 ml-Fraktion gesammelt und vakuumgetrocknet [*Speed Vac, Bachofer*].

## 2.3. Immunologische Arbeitstechniken

### 2.3.1. $^{125}\text{J}$ -Tracer-Herstellung

#### Reagenzien:

- Jodo-Gen (4 mg/ml) [*Pierce*]
- Humanes Leptin [*Biotrend*]
- Murines Leptin [*Hoechst*]
- Humanes Erythropoetin [*Roche*]
- $^{125}\text{J}$  [*Amersham*]
- Natriumphosphatpuffer (100 mM)
  - 77,4 ml 1 M Diatriumhydrogenphosphat [*Roth*]
  - 22,6 ml 1 M Natriumdihydrogenphosphat [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest
- Säulenlaufpuffer
  - 0,2 % BSA [*Sigma*]
  - 0,1 % Kaliumjodid [*Roth*]
  - ad 1 l PBS (s. 2.3.8.)

#### Durchführung:

Ein 1,5 ml-Tube wurde durch gleichmäßiges Drehen und Erwärmen mit der Hand am Boden und der bodennahen Wandung mit 20  $\mu\text{l}$  verdunstetem Jodo-Gen benetzt. In das so vorbehandelte Reaktionsgefäß wurden 10  $\mu\text{g}$  Protein (hier:Leptin oder Erythropoetin) sowie 500  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{J}$  in Natriumphosphatpuffer bei einem Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  gegeben und 15 min unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt über eine mit Säulenlaufpuffer äquilibrierte Sephadex G25-Säule [*NAP, Pharmacia*] gegeben. Es wurden 200  $\mu\text{l}$ -Eluatfraktionen gesammelt und im  $\gamma$ -Counter [*1277 Gammamaster, LKB Wallac*] vermessen. Die Fraktionen des 1. Peaks ( $^{125}\text{J}$ -Leptin oder  $^{125}\text{J}$ -Erythropoetin) wurden gesammelt, gepoolt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3.2. RIA

#### Reagenzien:

- Essigsäure [*Roth*]
- Ethanol [*Roth*]
- Methanol [*Roth*]
- TFA [*Merck*]
- Azetonitril [*Merck*]

- RIA-Puffer
  - 100 mM Tris-HCl (pH 7,4) [Gerbu]
  - 0,1 % Polygeline aus Hämakzel [Behring]
  - 0,1 % Triton X-100 [Roth]
  - 0,01 % Natriumazid [Roth]
- Humanes Leptin [Biotrend]
- 1. Antikörper (gegen die ersten 20 N-terminalen AS von Leptin gerichtet)
- NRS [selbst gewonnen]
- 2. Antikörper (Anti-Kaninchen) [Sigma]
- Präzipitationspuffer
  - 100 g PEG [Roth]
  - ad 1 l PBS (s. 2.3.8.)

#### Durchführung:

Die Plasma- oder Serumproben wurden für den RIA folgendermaßen vorbereitet: 1 ml Plasma/Serum wurde mit 3 ml 4 %-iger Essigsäure versetzt und zentrifugiert (2.000 x g, 20 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich] und über eine Sep-Pak-Kartusche [Waters] gegeben, welche zuvor mit 5 ml 4 %-iger Essigsäure in 86 %-igem Ethanol, dann mit 5 ml Methanol, dann mit 5 ml aq. dest. und schließlich mit 5 ml 4 %-iger Essigsäure vorgespült worden war. Nach dem Auftragen der Probe wurde mit 4 %-iger Essigsäure und mit 5 ml 20 % Azetonitril in 0,1 % TFA nachgespült. Die Elution erfolgte mit 3 x 1 ml 50 % Azetonitril in 0,1 % TFA. Die Eluate wurden vakuumgetrocknet [Speed Vac, Bachofer] und, wie folgt, untersucht: Pro RIA-Ansatz wurden 100 µl in RIA-Puffer aufgenommene Probe (Plasma/Serum; die geeignete Gesamtmenge an eingesetztem Probenmaterial war durch Vorversuche ermittelt worden) oder in RIA-Puffer angesetzter Standard (humanes Leptin), 200 µl RIA-Puffer, 100 µl 1. Antikörper (1:80.000 verdünnt in RIA-Puffer) und 100 µl <sup>125</sup>J-Leptin (ca. 5.000 cpm in RIA-Puffer) (s. 2.3.1.) in Polystyrenröhrchen [Greiner] zusammenpipettiert. Die Standards wurden als 1:2-Verdünnungsreihe von 2 – 1.024 pg angesetzt. Desweiteren wurden Ansätze für die Bestimmung der Gesamtaktivität (nur 100 µl <sup>125</sup>J-Leptin), der Gesamtbindung (300 µl RIA-Puffer, 100 µl 1. Antikörper und 100 µl <sup>125</sup>J-Leptin) sowie des Blankwertes (400 µl RIA-Puffer und 100 µl <sup>125</sup>J-Leptin) hergestellt. Die Polystyrenröhrchen mit den 100 µl Tracer für die Gesamtaktivitätsbestimmung wurden direkt verschlossen. Alle anderen RIA-Ansätze wurden gevortext und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl RNS (1:300 verdünnt in RIA-Puffer) und 100 µl 2. Antikörper (1:20 verdünnt in RIA-Puffer) hinzugegeben, gevortext und wieder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze gefällt, indem 1 ml Präzipitationspuffer zugefügt, gevortext und zentrifugiert (2.500 x g, 30 min, 4 °C) [Cryofuge 500, Heraeus]

wurde. Die Überstände wurden abgesaugt, die Polystyrenröhrchen verschlossen und im  $\gamma$ -Counter [1277 Gammamaster, LKB Wallac] vermessen.

### 2.3.3. Bindungsstudie

#### Reagenzien:

- RPMI-Puffer
  - 3,6 g Hepes [Roth]
  - 10 g BSA [Sigma]
  - 2 mg Aprotinin [Roth]
  - 500 mg Bazitrazin [Roth]
  - 370 mg EDTA [Roth]
  - 1 mg Pepstatin A [Sigma]
  - 100 mg PMSF [Sigma]
 → ad 1 l RPMI- Medium [PAA]; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml Hepes (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]
- Humanes Leptin [Biotrend]
- Murines Leptin [Hoechst]
- Humanes Erythropoetin [Roche]
- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
 → ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen

#### Durchführung:

Das Bindungsverhalten wurde sowohl an Zellmembranen (s. 2.4.10.) als auch an intakten Zellen untersucht. Pro Ansatz wurden 100  $\mu$ l in RPMI-Puffer aufgenommene Probe (Zellmembranen/Zellen; die geeignete Gesamtmenge an eingesetztem Probenmaterial war durch Vorversuche ermittelt worden), 200  $\mu$ l RPMI-Puffer, 100  $\mu$ l kaltes Protein (Leptin/Erythropoetin in RPMI-Puffer; unterschiedliche Konzentrationen (s. u.)) und 100  $\mu$ l Tracer ( $^{125}$ J-Leptin/ $^{125}$ J-Erythropoetin (ca. 100.000 cpm) in RPMI-Puffer) (s. 2.3.1.) in einem 1,5 ml-Tube zusammenpipettiert. Um die Affinität der Rezeptorbindungsstellen herauszufinden, wurde in Gegenwart von kaltem Protein in steigenden Konzentrationen (zwischen  $10^{-12}$  und  $10^{-7}$  M) inkubiert und somit eine Verdrängungskurve erstellt. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurde die Hälfte aller Ansätze mit einem sämtliche Bindungsstellen absättigenden Überschuss ( $10^{-6}$  M) an kaltem Protein durchgeführt. Desweiteren wurden Ansätze für die Bestimmung der Gesamtkativität (nur 100  $\mu$ l Tracer), der Gesamtbindung (100  $\mu$ l Probe, 300  $\mu$ l RPMI-Puffer, und

100 µl Tracer) sowie des Blankwertes (400 µl RPMI-Puffer und 100 µl Tracer) hergestellt. Um zu überprüfen, ob die Bindung auch den Gesetzen einer Sättigungskinetik unterliegt, wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe vom Tracer (ca. 2.000.000 – 1.000 cpm in RPMI-Puffer) bei einer konstanten Menge an kaltem Leptin unterhalb der vollständigen Verdrängung angesetzt. Die Ansätze mit den 100 µl Tracer für die Gesamtaktivitätsbestimmung wurden direkt in Polystyrenröhrchen [Greiner] überführt und verschlossen. Alle anderen Ansätze wurden gevortext und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zentrifugiert ( bei Zellmembranen: 500 x g, 10 min, 4 °C [Rotanta 128, Hettich]; bei Zellen: 10.000 x g, 10 min, 4 °C [Mikroliter 1394, Hettich]) und 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde die Spitzen des Reaktionsgefäßes mit einer Zange gekappt, in Polystyrenröhrchen überführt und im  $\gamma$ -Counter [1277 Gammamaster, LKB Wallac] vermessen.

### 2.3.4. Internalisierungsassay

#### Reagenzien:

- RPMI-Puffer
  - 3,6 g Hepes [Roth]
  - 10 g BSA [Sigma]
  - 2 mg Aprotinin [Roth]
  - 500 mg Bazitrazin [Roth]
  - 370 mg EDTA [Roth]
  - 1 mg Pepstatin A [Sigma]
  - 100 mg PMSF [Sigma]
  - ad 1 l RPMI- Medium [PAA]; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml Hepes (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]
- Humanes Leptin [Biotrend]
- Murines Leptin [Hoechst]
- Humanes Erythropoetin [Roche]
- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
  - ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- Säurewaschpuffer
  - 29 g Natriumchlorid [Roth]
  - ad 1 l aq. dest; mit Essigsäure auf pH 2,5 einstellen
- Lysepuffer
  - 200 mM Natronlauge [Roth]
  - 0,1 % SDS [Serva]

### Durchführung:

Das Internalisierungsverhalten wurde sowohl an adhärennten Zellen in Kultur (hier: porcine Plexus chorioideus-Epithelzellen) als auch an in Suspension kultivierten Zellen (hier: K562-Zellen) untersucht. Im folgenden wird das Procedere für die adhärennten Zellen beschrieben. (Das für die in Suspension befindlichen Zellen unterscheidet sich von jenem lediglich darin, daß sie bei jedem Lösungswechsel oder Waschschrift pelletiert werden mußten (500 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich], nicht lysiert werden brauchten und alle Arbeitsschritte in Polystyrenröhrchen [Greiner] durchgeführt wurden.) Bei den adhärennten Zellen, welche sich in 8 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen [Nunc] befanden, wurde das Medium abgenommen und bei der einen Hälfte durch einen Mix aus 2 ml RPMI-Puffer und 1 ml Tracer (<sup>125</sup>J-Leptin/<sup>125</sup>J-Erythropoetin (ca. 200.000 cpm) in RPMI-Puffer) (s. 2.3.1.), bei der anderen Hälfte durch einen Mix aus 2 ml kaltem Protein (Leptin/Erythropoetin in RPMI-Puffer) im Überschuß (10<sup>-6</sup> M) und 1 ml Tracer ersetzt. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Ansätze in 6 Gruppen (Kontrollwert, 0 min-Wert, 5 min-Wert, 10 min-Wert, 20 min-Wert, 40 min-Wert) gestaffelt weiterverarbeitet: Es wurde 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 3 ml auf 37 °C vorgewärmtem RPMI-Puffer 0, 5, 10, 20 bzw. 40 min im 37°C warmem Wasserbad inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf die Zellen 3 ml eiskalter Säurewaschpuffer gegeben und 20 min auf Eis inkubiert; lediglich die Ansätze für den Kontrollwert wurden nicht mit Säurewaschpuffer behandelt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 3 ml Lysepuffer vom Kulturgefäßboden abgelöst, in Polystyrenröhrchen überführt und im  $\gamma$  Counter [1277 Gammamaster, LKB Wallac] vermessen..

### **2.3.5. Cross-Linking**

#### Reagenzien:

- RPMI-Puffer
  - 3,6 g Hepes [Roth]
  - 10 g BSA [Sigma]
  - 2 mg Aprotinin [Roth]
  - 500 mg Bazitrazin [Roth]
  - 370 mg EDTA [Roth]
  - 1 mg Pepstatin A [Sigma]
  - 100 mg PMSF [Sigma]

→ ad 1 l RPMI- Medium [PAA]; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml Hepes (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]

- Humanes Leptin [Biotrend]
- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
 → ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- DSS-Lösung
  - 3,61 mg DSS [Pierce]
 → ad 1 ml DMF [Roth]
- Hepes-Puffer
  - 11,9 g Hepes [Roth]
  - 910 mg Magnesiumchlorid [Roth]
 → ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- Stop-Puffer
  - 242 g Tris-Base [Roth]
 → ad 1 l aq. dest; auf pH 6,8 einstellen
- Protein-Probenpuffer
  - 62,5 mM Tris-HCl [Gerbu]
  - 10 % Glyzerin (87 %) [Roth]
  - 2 % SDS [Serva]
  - 1 % 2-Merkaptoethanol [Fluka]
  - 0,25 % Bromphenolblau [Sigma]

### Durchführung:

Das Cross-Linking wurde mit in Suspension kultivierten Zellen (hier: K562-Zellen) durchgeführt. Ein Ansatz setzte sich aus 300 µl in RPMI-Puffer aufgenommene Probe (Zellen; die geeignete Gesamtmenge an eingesetztem Probenmaterial war durch Vorversuche ermittelt worden), 150 µl RPMI-Puffer und 150 µl Tracer (<sup>125</sup>J-Leptin (ca. 400.000 cpm) in RPMI-Puffer) (s. 2.3.1.) zusammen, der andere Ansatz bestand aus 300 µl Probe, 150 µl kaltem Protein (Leptin in RPMI-Puffer) im Überschuß (10<sup>-6</sup> M) und 150 µl Tracer. Die Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich], 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen und in 750 µl Hepes-Puffer resuspendiert. Dann wurden 75 µl DSS-Lösung hinzupipettiert, gemixt, 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen und schließlich die Reaktion durch 15 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 90 µl Stop-Puffer beendet. Danach wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und durch dreimaliges Frieren (Trockeneis/Ethanol) und Tauen (37 °C warmes Wasserbad) sowie durch Pottern [Glas/Teflon-Potter, Braun Melsungen] lysiert. Schließlich wurde zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich], der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (10.000 x g, 10 min, 4 °C) [Mikroliter 1394,

*Hettich*]. Die Pellets wurden in 25 – 50 µl Protein-Probenpuffer aufgenommen und via SDS-Page (s. 2.2.1.) elektrophoretisch aufgetrennt. Mit dem Gel wurde ein Röntgenfilm [*Hyperfilm MP, Amersham*] belichtet, wobei die Belichtungszeit je nach Signalintensität zwischen 1 und 3 d schwankte, und der Film maschinell entwickelt [*Crurix 60, Agfa*].

### 2.3.6. Western Blot

#### Reagenzien:

- Methanol [*Roth*]
- Kathodenpuffer
  - 25 mM Tris-Base [*Roth*]
  - 40 mM 6-Aminohexansäure [*Roth*]
  - 20 % Methanol [*Roth*]
  - Methanol erst direkt vor Gebrauch dazugeben
- Anodenpuffer I
  - 30 mM Tris-Base [*Roth*]
  - 20 % Methanol [*Roth*]
  - Methanol erst direkt vor Gebrauch dazugeben
- Anodenpuffer II
  - 300 mM Tris-Base [*Roth*]
  - 20 % Methanol [*Roth*]
  - Methanol erst direkt vor Gebrauch dazugeben
- Ponceau S
  - 400 mg Ponceau S [*Roth*]
  - 100 ml Essigsäure [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest; sterilfiltrieren
- Entfärber
  - 7,5 % Essigsäure [*Roth*]
- 10 x TBS
  - 12,1 g Tris-Base [*Roth*]
  - 87,1 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest.; auf pH 7,4 einstellen
- Tween 20 [*Roth*]

#### Durchführung:

Das im Western Blot eingesetzte Protein wurde zunächst in einem SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.). Je nach zu erwartender Signalstärke wurden zwischen 10 und 500 µg Protein pro Spur eingesetzt. Für den Transfer der RNA vom Gel auf die Zellulosemembran [*Immobilon-P Typ PVDF, Millipore*], wurde folgender Blottingaufbau gewählt: Auf das Anodenblech der Blotkammer [*Trans-Blot Semi-Dry, Bio-Rad*], das mit einem aq. dest.-getränkten Tuch angefeuchtet worden war, wurden 4 in

Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere [3 M Whatman, Schleicher und Schuell] und auf diese 4 in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere gelegt. Darauf wurde die Zellulosemembran gelegt, die vorher kurz in Methanol, dann kurz in aq. dest. und schließlich mindestens 10 min in Kathodenpuffer eingelegt war. Auf die Membran kam das Gel, welches zuvor mindestens 10 min in Kathodenpuffer gelegen hatte. Obenauf wurden 4 in Kathodenpuffer II getränkte Filterpapiere gelegt und der Kathodendeckel der Blotkammer geschlossen. Dann wurde der Strom angeschlossen [Electrophoresis Power Supply Model 493, ISCO], wobei pro cm<sup>2</sup> Blotfläche 0,8 mA für 1 h angelegt wurden. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran 30 s in Ponceau S und dann 3 min in den Entfärber gelegt, um die Proteinbanden anzufärben und somit die Transfereffizienz zu dokumentieren. Anschließend wurde die Membran mit TBS plus 0,05 % Tween 20 abgespült. Sie konnte in TBS plus 0,05 % Tween 20 luftdicht verpackt bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung für einige Tage gelagert werden.

### 2.3.7. Antikörper-Peroxidase-Chemilumineszenzdetektion

#### Reagenzien:

- 10 x TBS
  - 12,1 g Tris-Base [Roth]
  - 87,1 g Natriumchlorid [Roth]
  - ad 1 l aq. dest.; auf pH 7,4 einstellen
- Tween 20 [Roth]
- Magermilchpulver [Heirler]
- 1. Antikörper (gegen die ersten 20 N-terminalen AS von OB-R gerichtet)
- 2. Antikörper (Anti-Kaninchen-Peroxidase) [Pierce]
- Super-Signal Ultra-Chemilumineszenz-Peroxid [Pierce]
- Super-Signal Ultra-Chemilumineszenz-Substrat [Pierce]

#### Durchführung:

Eine Zellulosemembran [Immobilon-P Typ PVDF, Millipore], an die via Western-Blot Protein gebunden worden war, wurde zunächst 2 x 5 min in TBS plus 0,05 % Tween 20 gewaschen. Dann wurde durch 30 min Schütteln in mit 5 % Magermilchpulver versetzten TBS plus 0,05 % Tween 20 blockiert und abermals 2 x 5 min mit TBS plus 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (1:500 verdünnt in mit 5 % Magermilchpulver versetzten TBS plus 0,05 % Tween 20) erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde 5 x 5 min mit TBS plus 0,05 % Tween 20 gewaschen, 2 h mit dem

2. Antikörper (1:20.000 verdünnt in mit 0,5 % Magermilchpulver versetzten TBS plus 0,05 % Tween 20) inkubiert und wieder 5 x 5 min mit TBS plus 0,05 % Tween 20 gewaschen. Danach schloß sich die Detektion an: Dazu wurden Super-Signal Ultra-Chemilumineszenz-Peroxid und Super-Signal Ultra-Chemilumineszenz-Substrat im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und der Blot 10 min damit befeuchtet und im noch angefeuchteten Zustand in eine Klarsichttüte eingeschweißt. Nach ca. 2 h Aufbewahrung im Dunkeln hatte die Lichtemission des Chemilumineszenzsubstrats ihr Maximum erreicht und wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms [*Hyperfilm MP, Amersham*] dokumentiert, wobei die Belichtungszeit je nach Signalintensität zwischen 5 s und 5 min schwankte. Der Film wurde maschinell entwickelt [*Crurix 60, Agfa*].

### 2.3.8. Fluoreszenzimmunhistochemie

#### Reagenzien:

- Zamboni
  - 150 ml Pikrinsäure [*Merck*]
  - 50 ml Formaldehyd (37 %) [*Roth*]
  - 500 ml Natriumphosphatpuffer (200 mM) (s. u.)
  - 350 ml aq. dest.
- Natriumphosphatpuffer (200 mM)
  - 154,8 ml 1 M Diatriumhydrogenphosphat [*Roth*]
  - 45,2 ml 1 M Natriumdihydrogenphosphat [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest
- Kryoprotektionspuffer
  - 180 g Saccharose [*Roth*]
  - ad 1 l 100 mM Natriumphosphatpuffer (s. o.)
- Absättigungspuffer
  - 4,48 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - 10 % NSS [*Schlachthof Gießen*]
  - 0,1 % BSA [*Sigma*]
  - 0,5 % Tween 20 [*Roth*]
  - ad 1 l 100 mM Natriumphosphatpuffer (s. o.)
- 1. Antikörper (gegen die ersten 20 N-terminalen AS von Leptin bzw. OB-R gerichtet)
- Natriumchloridpuffer
  - 8,96 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - ad 1 l 100 mM Natriumphosphatpuffer (s. o.)
- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - 200 mg Kaliumchlorid [*Roth*]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [*Roth*]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen

- 2. Antikörper (Anti-Kaninchen-Biotin) [Amersham]
- Streptavidin-CY-3-Konjugat [Amersham]
- Glycerinpuffer  
→ 2 Teile Glycerin (wasserfrei) [Roth] plus 1 Teil Natriumkarbonatlösung (500 mM, pH 8,6) (500 mM Natriumhydrogenkarbonat [Roth]) mit 500 mM Natriumkarbonat [Roth] auf pH 8,6 einstellen)
- Murines Leptin [Hoechst]

#### Durchführung:

Das für die Fluoreszenzimmunhistochemie zu verwendende Gewebestück wurde 6 h in 10 Vol. Zamboni-fixiert, 4 x 1 h und 1 x über Nacht in 100 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen, zum Gefrieschutz über Nacht in Kryoprotektionspuffer eingelegt, in flüssigem Stickstoff weggefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Schließlich wurde das so vorbehandelte Gewebestück mit Tissue Tek [O.C.T.-Compound, Sakura] auf dem Probenplättchen des Krystaten [500 OM Microm, Walldorf] befestigt, und es wurden 8  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht und 30 min getrocknet. Nachdem auf den Objektträgern die Areale, die von Interesse waren, mit einem Fettstift umrandet worden waren, wurde die Schnitte als erstes mit Absättigungspuffer beträufelt und 1 h in einer feuchten Kammer belassen. Es folgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper (1:600 (Leptin) bzw. 1:1.000 (OB-R) verdünnt in Natriumchloridpuffer) über Nacht in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 2 x 10 min mit PBS gewaschen und mit dem 2. Antikörper (1:400 verdünnt in Natriumchloridpuffer) 1 h im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde wieder 2 x 10 min mit PBS gewaschen, mit Streptavidin-CY-3-Konjugat (1:100 verdünnt in Natriumchloridpuffer) 1 h im Dunkeln in einer feuchten Kammer inkubiert und erneut 2 x 10 min mit PBS gewaschen. Zum Schluß wurden die Schnitte in Glycerinpuffer eingedeckelt und lichtdicht gelagert. Die Auswertung der Schnitte erfolgte fluoreszenzmikroskopisch [Epifluoreszenzmikroskop BX, Olympus]. Zur Ermittlung der Spezifität der Immunreaktivität wurde der 1. Antikörper durch eine Inkubation über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $1\ \mu\text{g/ml}$  Leptin präabsorbiert.

## 2.4. Zellbiologische Arbeitstechniken

### 2.4.1. Anlegen einer Primärzellkultur

#### Reagenzien:

- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - 200 mg Kaliumchlorid [*Roth*]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [*Roth*]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [*Roth*]
  - ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- Trypsin/EDTA (500 mg Trypsin [1:250] + 200 mg EDTA / 1 PBS) [*PAA*]
- FCS [*PAA*]
  - Hitzeinaktivierung für 30 min bei 56 °C
- Kulturmedium
  - RPMI-Medium [*PAA*]
  - 10 % FCS [*PAA*]
  - 200 mM L-Glutamin [*PAA*]
  - 100 U/ml Penizillin G [*Biochrom*]
  - 100 µg/ml Streptomycin [*Biochrom*]
- Poly-D-Lysin [*Sigma*]
- Zytosin-Arabinofuranosid [*Sigma*]

#### Durchführung:

Zum Anlegen einer Primärzellkultur aus porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen wurden im Schlachthof halbe Schweinehirne entnommen, in kaltem PBS aufbewahrt und ins Labor transportiert. Dort wurden die Plexus mit einer Pinzette entnommen, in kaltem PBS gesammelt und 5 x mit kaltem PBS gewaschen. Ca. 40 Plexus wurden in 20 ml 37 °C warmem Trypsin/EDTA unter vorsichtigem Schwenken im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Die 1. Fraktion (30 min) wurde verworfen, die Fraktionen 2 – 7 (40, 50, 60, 70, 80 und 90 min) wurden nach mikroskopischer Kontrolle (es sollten keine Einzelzellsuspensionen, sondern kleine Zellcluster vorliegen) unter Trypsininhibition (Zugabe von 0,2 Vol. FCS) auf Eis gestellt. Die gesammelten Fraktionen wurden abzentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*], 2 x mit kaltem PBS gewaschen und (in Abhängigkeit von der Zellausbeute) in ca. 50 ml warmem Kulturmedium aufgenommen. Schließlich wurden die Zellen in mit Poly-D-Lysin beschichteten Kulturgefäßen [*Nunc*] (Poly-D-Lysin war in einer Konzentration von 0,1 mg/ml aq. dest. in das zu beschichtende Kulturgefäß mit einem Volumen von 100 µl/cm<sup>2</sup> Kulturgefäßbodenfläche pipettiert, 30 min bei 37 °C inkubiert und wieder abpipettiert worden; danach war 3 x mit PBS gewaschen worden) ausgesät. Die Kultivierungsbedingungen

im Brutschrank [*Hera Cell, Heraeus*] waren: 37 °C, 100 % rel. Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub>. Nach 16 – 24 h wurden die bereits adhärenen Zellen 3 x sehr gründlich mit 37 °C PBS gewaschen, um die Erythrozyten zu entfernen, und neues Kulturmedium zugegeben, welches zur Inhibition des Fibroblastenwachstums mit Zytosin-Arabinofuranosid in einer Endkonzentration von  $2 \times 10^{-5}$  M versetzt worden war. Die Zellen wurden bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz weiterkultiviert, wobei durchschnittlich 2 x wöchentlich das Kulturmedium plus Zytosin-Arabinofuranosid gewechselt wurde. Passagiert wurden die Zellen nicht, weil sie sich erst dann ausreichend ablösten, wenn sie durch die Trypsinierung vereinzelt worden waren, danach aber sehr sehr schlecht wieder anwuchsen.

#### 2.4.2. Mediumwechsel

##### Reagenzien:

- Kulturmedium
  - RPMI-Medium [*PAA*]
  - 10 % FCS [*PAA*]
  - 200 mM L-Glutamin [*PAA*]
  - 100 U/ml Penizillin G [*Biochrom*]
  - 100 µg/ml Streptomycin [*Biochrom*]

##### Durchführung:

Nachdem die Zellen zunächst unter einem Inversmikroskop [*Wilovert, Will*] bezüglich Konfluenz, Morphologie und etwaiger Verkeimung begutachtet worden waren, wurde bei adhärenen Zellen (hier: porcine Plexus chorioideus-Epithelzellen) das Medium nach vorsichtigem Schwenken des Kulturgefäßes [*Nunc*] abpipettiert und durch frisches, auf Brutschranktemperatur erwärmtes Medium ersetzt; bei als Suspensionskultur (hier: K562-Zellen) wachsenden Zellen wurden diese abzenrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*], in frischem, auf Brutschranktemperatur erwärmtem Medium resuspendiert und in ein Kulturgefäß [*Nunc*] gegeben. Die porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen sowie die K562-Zellen wurden mit dem gleichen Medium kultiviert.

### 2.4.3. Passagieren

#### Reagenzien:

- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
  - ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- Trypsin/EDTA (500 mg Trypsin [1:250] + 200 mg EDTA / 1 PBS) [PAA]
- Kulturmedium
  - RPMI-Medium [PAA]
  - 10 % FCS [PAA]
  - 200 mM L-Glutamin [PAA]
  - 100 U/ml Penizillin G [Biochrom]
  - 100 µg/ml Streptomycin [Biochrom]

#### Durchführung:

Nach mikroskopischer [Wilovert, Will] Kontrolle der adhärennten Zellen (Konfluenz, Morphologie, Verkeimung) wurde das Medium nach vorsichtigem Schwenken des Kulturgefäßes [Nunc] abpipettiert und der Kulturgefäßboden mit auf Brutschranktemperatur erwärmtem PBS gespült. Dann wurden für jeden cm<sup>2</sup> Kulturgefäßbodenfläche ca. 25 µl Trypsin/EDTA zugegeben und 5 – 10 min (in Abhängigkeit von der Stärke der Adhärenz) im Brutschrank [Hera Cell, Heraeus] bei 37 °C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FCS-haltigem Medium aufgenommen, abzentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich], in frischem, auf Brutschranktemperatur erwärmtem Medium resuspendiert und die gewünschte Menge (s. 2.4.6.) lebender Zellen (s. 2.4.7. oder 2.4.8.) in neue Kulturgefäße ausgesät.

### 2.4.4. Einfrieren von Zellen

#### Reagenzien:

- Trypsin/EDTA (500 mg Trypsin [1:250] + 200 mg EDTA / 1 PBS) [PAA]
- Kulturmedium
  - RPMI-Medium [PAA]
  - 10 % FCS [PAA]
  - 200 mM L-Glutamin [PAA]
  - 100 U/ml Penizillin G [Biochrom]
  - 100 µg/ml Streptomycin [Biochrom]
- DMSO [Roth]

#### Durchführung:

Die einzufrierenden Zellen wurden, wenn sie adhärent waren, mit Trypsin vom Kulturgefäßboden [Nunc] gelöst (s. 2.4.3.), als Suspension gesammelt und gezählt (s. 2.4.6.). Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (500 x g, 10 min, 4 °C) [Rotanta 128, Hettich], das Pellet in nicht erwärmten (4 °C) Kulturmedium aufgenommen und dann DMSO in einer Endkonzentration von 8 % hinzugegeben.. Die Mediummenge war so gewählt, daß die Zellkonzentration  $2 \times 10^6$  lebender Zellen/ml betrug (für Zellzählung s. 2.4.9.; für Vitalitätsbestimmung s. 2.4.7. oder 2.4.8.). Jeweils 500 µl wurden in ein Einfrierröhrchen [Nunc] pipettiert. Die Einfrierröhrchen wurden nun stufenweise abgekühlt: 30 min auf Eis, 1 h bei -20 °C, 8 – 16 h bei -80 °C, um schließlich in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert zu werden.

### **2.4.5. Auftauen von Zellen**

#### Reagenzien:

- Kulturmedium
  - RPMI-Medium [PAA]
  - 10 % FCS [PAA]
  - 200 mM L-Glutamin [PAA]
  - 100 U/ml Penizillin G [Biochrom]
  - 100 µg/ml Streptomycin [Biochrom]

#### Durchführung:

Die benötigte Einfrierampulle [Nunc] wurde aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in einem 37 °C warmen Wasserbad unter vorsichtigem Schwenken aufgetaut. Unmittelbar danach wurde die Zellsuspension in auf Brutschranktemperatur erwärmtes Kulturmedium gegeben, wobei das Volumen von der gewünschten Aussaatdichte abhängig, und in Kulturgefäße [Nunc] überführt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt (s. 2.4.2.), um das vorhandene DMSO zu eliminieren.

### **2.4.6. Zellzählung**

#### Reagenzien:

- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]

- 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
- ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen

#### Durchführung:

Die zu zählenden Zellen wurden, wenn sie adhärent waren, mit Trypsin vom Kulturgefäßboden [Nunc] gelöst (s. 2.4.3.) und als Suspension gesammelt. Bei sehr hoher Zelldichte wurde die Suspension ggf. mit PBS verdünnt. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer [Brand] unter dem Mikroskop [Wilovert, Will] ausgewertet: 4 große Quadrate (ein großes Quadrat beinhaltet mit einer Fläche von 1 mm<sup>2</sup> und einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl) wurden ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Dieser Wert, multipliziert mit 10<sup>4</sup>, ergab die Zellzahl pro ml.

### **2.4.7. Trypanblau-Vitalitätsfärbung**

#### Reagenzien:

- PBS
    - 8 g Natriumchlorid [Roth]
    - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
    - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
    - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
- ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- Trypanblau (0,5 %) [Sigma]

#### Durchführung:

Die auf ihre Vitalität zu testenden Zellen wurden, wenn sie adhärent waren, mit Trypsin vom Kulturgefäßboden [Nunc] gelöst (s. 2.4.3.) und als Suspension gesammelt. 100 µl Zellsuspension wurden mit 3,7 ml auf 37 °C erwärmtem PBS verdünnt; dann wurden 2,7 ml auf 37 °C erwärmtes Trypanblau hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach nochmaligem vorsichtigem Mischen wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer [Brand] mikroskopisch [Wilovert, Will] ausgewertet. Alle angefärbten Zellen, auch diejenigen, die nur sehr schwach angefärbt waren, wurden als tot betrachtet. Als Ergebnis der Vitalfärbung wurde der Prozentsatz der lebenden Zellen angegeben.

### 2.4.8. MTT-Test

#### Reagenzien:

- PBS
  - 8 g Natriumchlorid [Roth]
  - 200 mg Kaliumchlorid [Roth]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [Roth]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [Roth]
  - ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen
- MTT [Sigma]
  - 5 mg werden in 1 ml PBS (s. o.) gelöst; sterilfiltrieren
- Lysepuffer
  - 7,5 g SDS [Serva]
  - 20 ml DMF [Roth]
  - 10 ml Essigsäure [Roth]
  - 2 ml Salzsäure (5 %) [Roth]
  - 20 ml aq. dest.

#### Durchführung:

Mit dem MTT-Test wurden Zellen direkt im Kulturgefäß (meist Wellplates) [Nunc] auf ihre Vitalität getestet, ohne daß sie, wenn sie adhärent waren, abtrypsiniert werden mußten. Pro  $\text{cm}^2$  Kulturgefäßbodenfläche wurden 20  $\mu\text{l}$  MTT zugegeben und 2 h bei 37 °C im Brutschrank [Hera Cell, Heraeus] inkubiert. Dann wurden 200  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  Lysepuffer hinzugefügt und bei über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Auswertung erfolgte fotometrisch [Spektralfotometer U-2000, Hitachi] bei 570 nm gegen einen Leerwert (Probe ohne Zellen). Je stärker die Farbstoffbildung war, desto größer war (eine konstante Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen vitaler Zellen vorausgesetzt) der Anteil lebender Zellen.

### 2.4.9. Mykoplasmentest

#### Reagenzien:

- Wandantikörper [Roche]
- Blockierungslösung [Roche]
- Waschpuffer [Roche]
- Probenpuffer [Roche]
- Kontrollösung [Roche]
- Detektionsantikörper [Roche]
- Streptavidin-alkalische Phosphatase [Roche]
- Substratlösung [Roche]

### Durchführung:

Zum Ausschluß der in Säugerzellkulturen am häufigsten vorkommenden Mykoplasmen / Acholeplasmen (*M. arginini*, *M. hyorhina*, *M. orale* und *A. laidlawii*) wurden in regelmäßigen Abständen Mykoplasmentests durchgeführt. Für jede einzelne Spezies stand ein polyklonaler Antikörper zur Verfügung, so daß 4 getrennte Bestimmungen durchzuführen waren; 250 µl Antikörper (wegen seiner Adsorption an Plastikkulturgefäßwände „Wandantikörper“ genannt) wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (96-Wellplate) [*Nunc*] pipettiert und die Platte 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Fixierung des Antikörpers wurde die restliche Lösung entfernt, 250 µl Blockierungslösung zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Blockierungslösung entfernt und die Mikrotiterplattenvertiefung 3 x mit Waschpuffer gespült. Schließlich wurden die Proben (Überstände adhärent wachsender Zellen oder Zellsuspensionen) mit Probenpuffer verdünnt (2 ml Probe plus 500 µl Probenpuffer) sowie die Kontrollen (Negativkontrolle: Kulturmedium; Positivkontrolle: Kontrollösung) entsprechend vorbereitet und je 200 µl in die Mikrotiterplattenvertiefung pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag folgten 3 Waschschrte mit Waschpuffer. Dann wurden 200 µl Detektionsantikörper hinzugefügt, 2 h bei 37 °C inkubiert, die restliche Lösung entfernt, 4 x mit Waschpuffer gespült, 200 µl Streptavidin-alkalische Phosphatase zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und wieder 4 x mit Waschpuffer gespült. Nun wurden 200 µl Substratlösung hineinpipettiert und die Mikrotiterplatte 1 h bei Raumtemperatur stengelassen Die Auswertung erfolgte visuell (farblos = negativ; gelb = positiv).

### **2.4.10. Zellmembranpräparation**

#### Reagenzien:

- PBS plus Proteaseinhibitoren
  - 8 g Natriumchlorid [*Roth*]
  - 200 mg Kaliumchlorid [*Roth*]
  - 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat [*Roth*]
  - 240 mg Kaliumdihydrogenphosphat [*Roth*]
  - 2 mg Aprotinin [*Roth*]
  - 500 mg Bazitrazin [*Roth*]
  - 370 mg EDTA [*Roth*]
  - 1 mg Pepstatin A [*Sigma*]
  - 100 mg PMSF [*Sigma*]

→ ad 1 l aq. dest; auf pH 7,4 einstellen; Stammlösungen der nicht in aq. dest gelösten eingesetzten Proteaseinhibitoren: 10 mg Aprotinin / ml HEPES (10 mM, pH 8,0) [Roth], 1 mg Pepstatin A / ml Ethanol [Roth], 1,74 mg PMSF / ml Isopropanol [Roth]

Durchführung:

Ca. 1 g Gewebe wurde mit Skalpell oder Schere in mehrere kleine Stückchen zerteilt, in 30 ml PBS plus Proteaseinhibitoren gegeben und mit einem Dispergiergerät [*Polytron, Kinematica*] unter Eiskühlung homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat unter Eiskühlung gepottert [*Glas/Glas-Potter, Braun Melsungen*], danach zentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4 °C) [*Rotanta 128, Hettich*] und der Überstand unter Eiskühlung durch 5 Lagen Mull gesiebt. Das Filtrat wurde ultrazentrifugiert (100.000 x g, 1 h, 4 °C) [*L7-65, Beckman*] und das Pellet in 1 ml PBS plus Proteaseinhibitoren aufgenommen und erneut gepottert [*Glas/Teflon-Potter, Braun Melsungen*]. Die auf diese Weise präparierten Membranen wurden bei -20 °C gelagert.

## 3. ERGEBNISSE

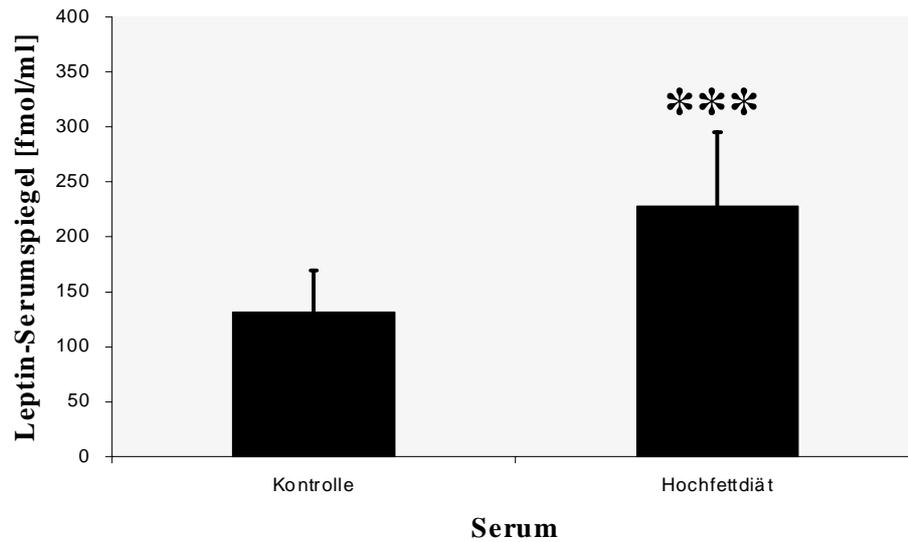
### 3.1. Untersuchungen zum Einfluß einer Hochfettdiät auf das Leptinsystem

#### Fragestellung:

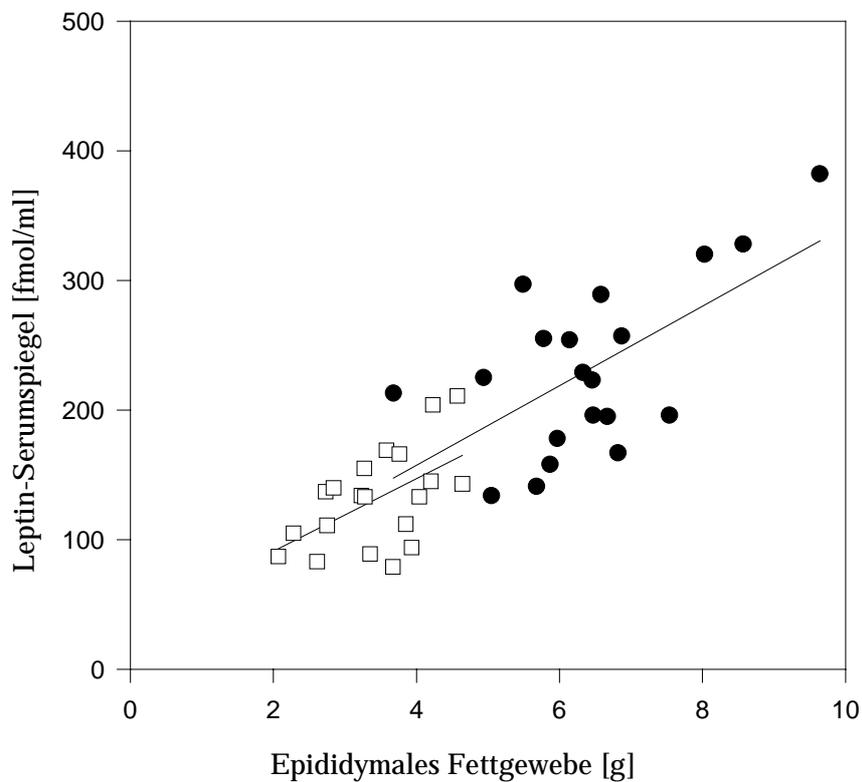
**Wie wirkt sich eine langfristige Hochfettdiät auf den Expressionsspiegel des Leptinrezeptors aus, und hat sie einen Einfluß auf die Expression von Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion?**

Die Untersuchungen des Leptinsystems sowie der Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion SOCS-3 und PIAS-3 wurden mit Geweben und Organen von männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die wie folgt vorbehandelt worden waren: Insgesamt 40 Tiere wurden für 144 d zu gleichen Teilen einer Normalfuttergruppe (6,5 g Fett/100 g [= 15 % der metabolisierbaren Energie], 47,0 g Kohlenhydrat/100 g und 23,5 g Protein/100 g) und einer Hochfettdiätgruppe (21,0 g Fett/100 g [= 42 % der metabolisierbaren Energie], 49,2 g Kohlenhydrat/100 g und 19,8 g Protein/100 g) zugeordnet und konnten ad libidum fressen. Die fettreich ernährten Tiere fraßen auf Gewichtsbasis des Futters bezogen weniger als die Kontrolltiere, so daß sie sogar auf einen etwas geringeren kalorischen Intake kamen ( $93,5 \pm 14,3$  kcal/d/Ratte in der Hochfettdiätgruppe vs.  $103,5 \pm 14,7$  kcal/d/Ratte in der Normalfuttergruppe). Trotzdem entwickelten sich die Körpergewichtskurven nach 7 Wochen signifikant auseinander; die Hochfettdiättiere wurden adipös. Das Ausgangsgewicht der Ratten hatte im Mittel  $70,4 \pm 4,1$  g betragen, das Endgewicht lag bei den normal gefütterten Tieren bei  $411,5 \pm 40,7$  g, bei den fettreich ernährten bei  $449,8 \pm 39,4$  g. Die stärkere Gewichtszunahme betraf im wesentlichen das Fettgewebe; die epididymalen Fettpolster waren deutlich vergrößert (Kontrollgruppe:  $3,4 \pm 0,7$  g; Hochfettdiätgruppe:  $6,4 \pm 1,3$  g).

Die Leptinmessung erfolgte per RIA. Der Leptinserumspiegel war bei den adipösen Ratten auf etwa das Doppelte erhöht ( $P < 0,001$ ), wie in *Abb. 1* zu sehen ist. Bei beiden Tiergruppen korrelierten Leptinserumspiegel und Gewicht des epididymalen Fettgewebes hochsignifikant (Kontrollgruppe:  $y = 30,7 x + 34,5$ ;  $r^2 = 0,376$ ;  $P < 0,001$ ; Hochfettdiätgruppe:  $y = 35,1 x + 28,0$ ;  $r^2 = 0,297$ ;  $P < 0,001$ ), wie in *Abb. 2* dargestellt ist.



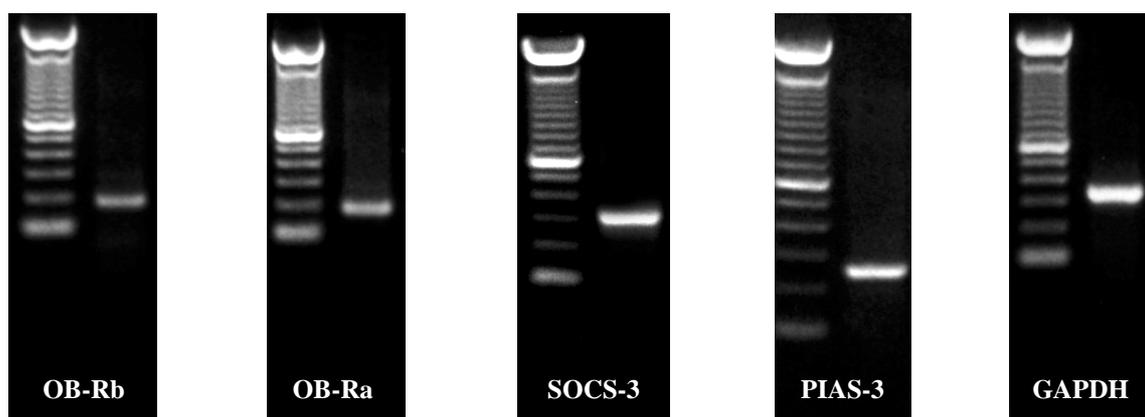
**Abb. 1:**  
*Ergebnis der radioimmunologischen Bestimmung des Leptinserumspiegels von einer Hochfett-diät unterzogenen Ratten (n = 20) im Vergleich zu normal ernährten Kontrolltieren (n = 20)*



**Abb. 2:**  
*Die Leptinserumspiegel der Ratten aus der Hochfett-diätgruppe (Kreise) sowie aus der Kontrollgruppe (Quadrate) korrelieren hochsignifikant mit dem Gewicht des epididymalen Fettgewebes.*

Um zu überprüfen, ob es auch beim Leptinrezeptor zu Veränderungen gekommen ist, wurden in beiden Tiergruppen im Hypothalamus, im Fettgewebe und verschiedenen anderen peripheren Geweben und Organen OB-Rb und OB-Ra auf transkriptionaler Ebene quantifiziert. Desweiteren wurden die Expressionsspiegel der Suppressoren der Zytokin- und somit auch Leptin-induzierten Signaltransduktion SOCS-3 und PIAS-3 gemessen. Die experimentelle Durchführung erfolgte mittels semiquantitativer RT-PCR. Dabei wurden für die jeweiligen Templates die PCR-Protokolle so festgelegt, daß die exponentielle bzw. (semilogarithmisch) lineare Phase nicht überschritten wurde; die PCR-Amplifikate wurden per Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung visualisiert, mittels einer Densitometrie-Software die integrierte Dichte der Banden gemessen und diese auf das aus derselben cDNA ermittelte GAPDH-Signal bezogen. Die auf diese Weise von jeweils 10 Gewebe- bzw. Organproben je Tiergruppe und zu untersuchendem Template erhaltenen Meßwerte wurden mit der Fragestellung nach signifikanten Unterschieden statistisch ausgewertet. Die Intra-Assay-Variation betrug 13,9 %.

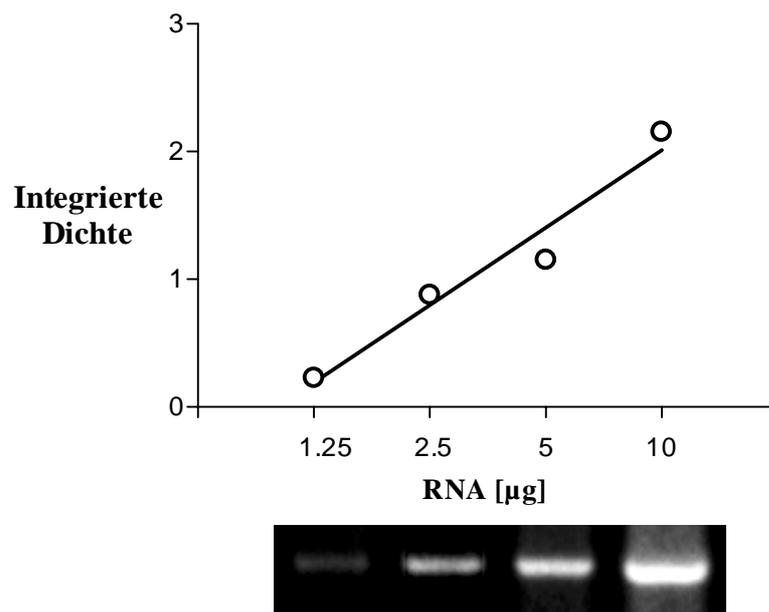
Abb. 3 zeigt die RT-PCR-Produkte von OB-Rb (189 bp), OB-Ra (188 bp), SOCS-3 (328 bp), PIAS-3 (258 bp) und GAPDH (342 bp). Auf der jeweils ersten Spur der dargestellten Gele ist ein Längenmarker (100 bp-Leiter) aufgetragen. Die Spezifität der Amplifikate wurde durch Sequenzierung bestätigt.



**Abb. 3:**

***Qualitative RT-PCR's von RNA aus dem Hypothalamus der Ratte (linke Spur eines jeden Gels: 100 bp-Leiter; OB-Rb: 189 bp, OB-Ra: 188 bp, SOCS-3: 328 bp, PIAS-3: 258 bp, GAPDH: 342 bp.***

Um die Diskriminierungsfähigkeit der Methode zu bestimmen, wurden innerhalb der Präplateausphase RT-PCR's mit unterschiedlichen Mengen an eingesetzter RNA durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein Faktor 2 eindeutig zu erkennen war, wie in *Abb. 4* exemplarisch gezeigt ist. Hier wurden 1,25 µg, 2,5 µg, 5 µg und 10 µg Hypothalamus-RNA mit Primern für OB-Ra in 24 Zyklen amplifiziert und die RT-PCR-Banden, wie beschrieben, densitometrisch ausgewertet:



***Abb. 4:***  
*Beziehung zwischen in die RT-PCR-Reaktion eingesetzte RNA-Menge und Intensität des Amplifikationssignals*

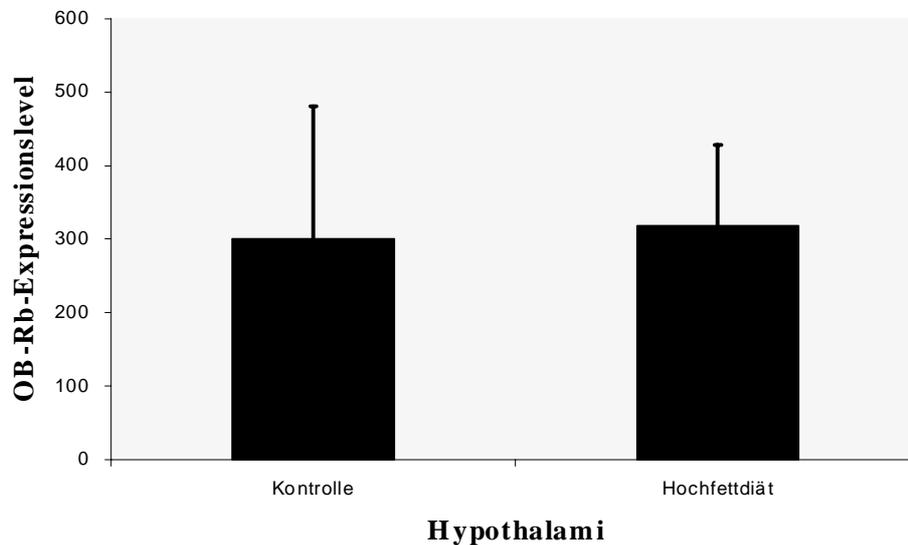
*Abb. 5* gibt einen Überblick über die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR's. Es wurden folgende Zykluszahlen verwendet: OB-Rb: 27 Zyklen, OB-Ra: 24 Zyklen, SOCS-3: 27 Zyklen, PIAS-3: 24 Zyklen, GAPDH: 21 Zyklen. Die auf GAPDH bezogenen gemessenen integrierten Dichtewerte ergaben, daß sich sowohl das Expressionsverhalten der kurzen und langen Form des Leptinrezeptors als auch das von SOCS-3 und PIAS-3 stabil verhielt, sich zwischen Hochfettdiätgruppe und Kontrollgruppe also kein statistisch signifikanter Unterschied einstellte.

		Kontrolle	Hochfettdiät
<b>OB-Rb</b>	Hypothalamus	0,965 ± 0,088	0,855 ± 0,056
	Weißes Fettgewebe	0,273 ± 0,070	0,351 ± 0,353
	Braunes Fettgewebe	5,653 ± 1,605	6,296 ± 0,947
	Leber	0,454 ± 0,562	0,248 ± 0,241
<b>OB-Ra</b>	Hypothalamus	3,064 ± 0,078	3,227 ± 0,154
	Weißes Fettgewebe	2,161 ± 1,034	2,693 ± 0,128
	Braunes Fettgewebe	6,038 ± 1,084	6,345 ± 0,993
	Leber	4,307 ± 0,281	4,026 ± 0,462
<b>SOCS-3</b>	Hypothalamus	2,753 ± 0,210	2,196 ± 0,177
	Weißes Fettgewebe	2,522 ± 0,248	2,104 ± 0,276
	Braunes Fettgewebe	1,197 ± 0,697	1,012 ± 0,525
	Leber	2,974 ± 0,730	2,814 ± 0,620
<b>PIAS-3</b>	Hypothalamus	2,109 ± 0,279	2,208 ± 0,278
	Weißes Fettgewebe	0,775 ± 0,330	1,031 ± 0,178
	Leber	1,282 ± 0,139	1,405 ± 0,180
	Skelettmuskulatur	1,199 ± 0,112	1,262 ± 0,159
	Herz	1,273 ± 0,196	1,077 ± 0,152
	Lunge	1,282 ± 0,378	1,295 ± 0,172

**Abb. 5:**  
*Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR-Analyse von Hypothalamus, weißem Fettgewebe und anderen peripheren Geweben bzw. Organen von einer Hochfettdiät unterzogenen Ratten (n = 10) im Vergleich zu normal ernährten Kontrolltieren (n = 10) bezüglich des OB-Rb-, OB-Ra-, SOCS-3- und PIAS-3-Expressionsspiegels (angegeben als auf GAPDH normalisierte integrierte Dichte der Intensität der durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erhaltenen Bande des RT-PCR-Produkts)*

Zusätzlich zu den semiquantitativen RT-PCR-Messungen wurde die OB-Rb-Message im Hypothalamus auch mittels Real-time-PCR quantifiziert (Abb. 6). Die Meßdaten wurden auf ebenfalls per Real-time-PCR ermitteltes GAPDH bezogen und als auf eine Standardkurve bezogene Relativwerte angegeben. Bei der Standardkurve handelte es sich um eine 1:2-Verdünnungsreihe (beginnend mit der cDNA-Menge eines RT-Ansatzes mit 1 µg RNA), deren Verdünnungsschritte mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256,

512 und 1024 bezeichnet wurden; der Korrelationskoeffizient der Standardkurve für OB-Rb betrug 0,940.



**Abb. 6:**  
*Ergebnis der quantitativen RT-PCR-Analyse von Hypothalami von einer Hochfett-diät unterzogenen Ratten (n = 10) im Vergleich zu normal ernährten Kontrolltieren (n = 10) bezüglich des OB-Rb-Expressionsspiegels (angegeben als auf die Standardkurve bezogener dimensionsloser Wert)*

Die Wirkung der Hochfett-diät auf das Leptinsystems läßt sich somit folgendermaßen zusammenfassen: Trotz Adipositas mit einem auf im Vergleich zu den Kontrolltieren ungefähr auf das Doppelte angestiegenen Leptinserumspiegel gab es bezüglich des Expressionsspiegels des Leptinrezeptors zentral wie peripher keine Veränderung, weder für die lange, noch für die kurze Spleißvariante. Die Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion SOCS-3 und PIAS-3 verhielten sich ebenfalls stabil.

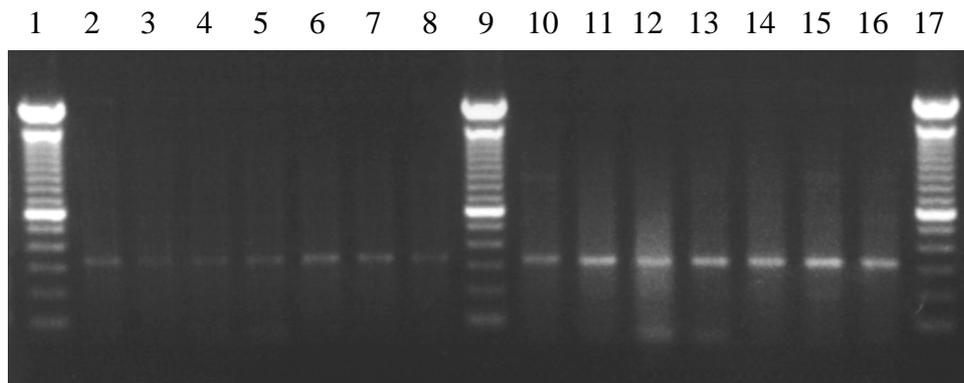
Da die im Rahmen der fettreichen Diät entwickelte Verdopplung des Leptinserumspiegels nicht ausreichte, Veränderungen der OB-Rb-, OB-Ra-, SOCS-3- oder PIAS-3-Message zu bewirken, wurde in einem weiteren tierexperimentellem Ansatz überprüft, wie sich die entsprechenden mRNA-Spiegel verhalten, wenn Ratten exogenes Leptin zugeführt wird. Dazu wurde normal ernährten männlichen Wistar-Ratten (n = 7) an 2 aufeinanderfolgenden Tagen um 9.00 Uhr und um 18.00 Uhr jeweils 1,5 mg/kg Körpergewicht Leptin intraperitoneal appliziert; einer gleich großen Kontrollgruppe wurde 0,9 % NaCl injiziert.

Die nur zweitägige Leptinadministration reduzierte die Futtermittelaufnahme um 11,8 % verglichen mit der Kontrollgruppe. So war die Zunahme des Körpergewichts bei den Leptin-behandelten Ratten signifikant geringer ( $8,2 \pm 5,8$  g vs.  $15,0 \pm 2,9$  g;  $p < 0,05$ ). Während die Leptinapplikation auf OB-Rb und OB-Ra keinen Einfluß hatte, gab es deutliche Veränderungen beim SOCS-3-Expressionsspiegel, sowohl im Hypothalamus ( $P < 0,001$ ), als auch in der Leber ( $P = 0,0011$ ), im Sinne eines Anstiegs um etwa den Faktor 2,5. Bei PIAS-3 konnte ein lediglich grenzwertig signifikanter ( $P = 0,0488$ ) Anstieg in der Leber verzeichnet werden. Die Ergebnisse der auf GAPDH bezogenen semiquantitativen RT-PCR's sind in *Abb. 7* zu sehen. *Abb. 8* zeigt exemplarisch hypothalamische SOCS-3-PCR-Amplifikate von Leptin- und Kontrollgruppe im Vergleich.

		Kontrolle	Leptingabe	
<b>OB-Rb</b>	Hypothalamus	0,257 ± 0,110	0,416 ± 0,149	
	Leber	0,352 ± 0,067	0,480 ± 0,111	
<b>OB-Ra</b>	Hypothalamus	0,466 ± 0,232	0,552 ± 0,203	
	Leber	0,194 ± 0,040	0,502 ± 0,156	***
<b>SOCS-3</b>	Hypothalamus	0,262 ± 0,080	0,836 ± 0,333	**
	Leber	0,646 ± 0,198	0,567 ± 0,134	
<b>PIAS-3</b>	Hypothalamus	0,505 ± 0,699	1,194 ± 0,243	*
	Leber			

***Abb. 7:***

*Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR-Analyse von Hypothalamus und Leber von Leptin-behandelten Ratten (n = 7) im Vergleich zu Kontrolltieren (n = 7) bezüglich des OB-Rb-, OB-Ra-, SOCS-3- und PIAS-3-Expressionsspiegels (angegeben als auf GAPDH normalisierte integrierte Dichte der Intensität der durch Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung erhaltenen Bande des RT-PCR-Produkts)*



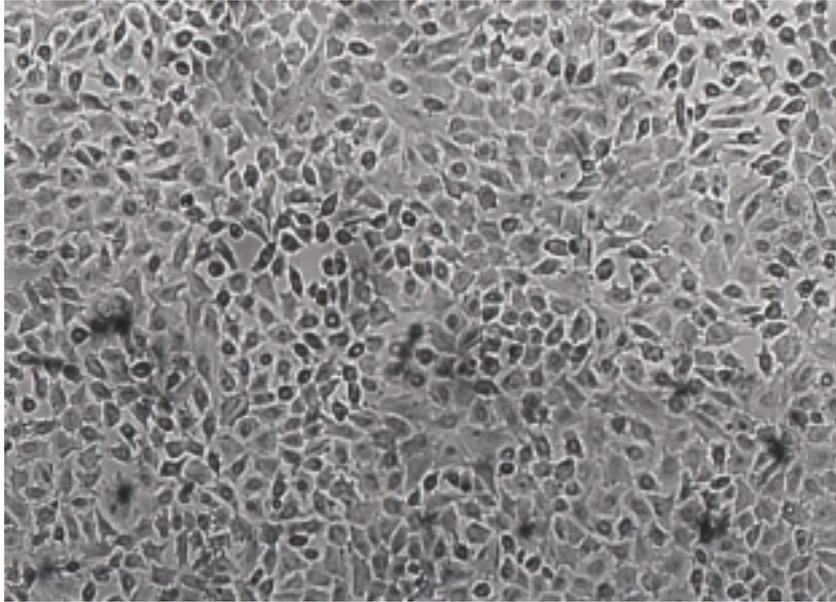
**Abb. 8:**  
*SOCS-3-RT-PCR-Amplifikate (328 bp) von RNA aus dem Hypothalamus der Ratte nach Leptingabe (Spuren 10 - 16) und bei Kontrolltieren (Spuren 2 - 8); auf den Spuren 1, 9 und 17 ist die 100 bp-Leiter aufgetragen.*

## 3.2. Untersuchungen zum Leptintransport durch die Blut-Liquor-Schranke

### Fragestellung:

**Kann die Blut-Liquor-Barriere für Leptin durch einen Leptinrezeptor-vermittelten Transport überwunden werden?**

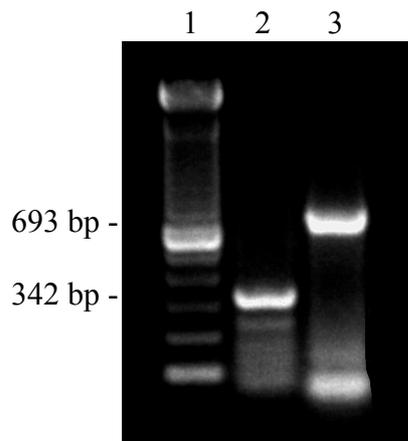
Es ist bekannt, daß Leptin über einen sättigbaren Transport ins Gehirn gelangt (*Banks et al., 1996*). Außerdem weiß man, daß der Plexus chorioideus, die Barriere zwischen Blut und Liquor (*Johanson, 1995; Cserr, 1971*) und der Entstehungsort des Liquor cerebrospinalis (*Spector und Johanson, 1989*), eine besonders hohe Rezeptordichte, und zwar fast ausschließlich der kurzen Spleißform, aufweist (*Tartaglia et al., 1995*). Wenn es stimmt, daß der kurze Rezeptor ein Transporter für Leptin durch die Blut-Liquor-Schranke ist, dann sollten die Plexus chorioideus-Epithelzellen in der Lage sein, Leptin spezifisch zu internalisieren. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden als Testsystem porcine Plexus chorioideus-Zellen primärkultiviert und bezüglich der Leptininternalisation untersucht. Aus Schweinehirnen vom Schlachthof wurden die Plexus entnommen und von diesen mittels Trypsinverdau kleine Zellcluster abgelöst, welche auf ungecoatete Plastikkulturgefäße ausgesät wurden. Nach 10 - 14 d Kultivierung unter Zusatz von Zytosin-Arabinosid zur Inhibition der Fibroblastenproliferation lagen gleichmäßig konfluente Monolayer mit einer für Epithelzellen typischen Pflastersteinmorphologie vor (*Abb. 9*).



**Abb. 9:**  
***Konfluenten Monolayer von porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen***  
***(Vergrößerung: 400-fach)***

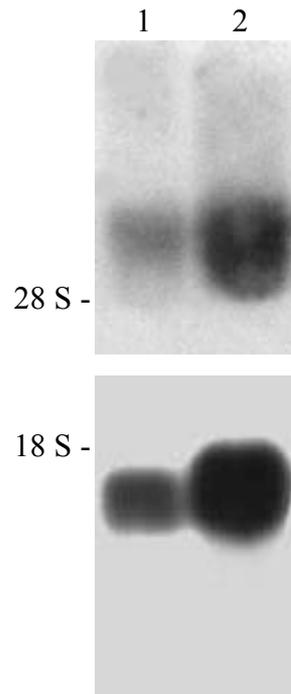
Um zu überprüfen, ob nach bis zu zweiwöchiger Kultivierung der Leptinrezeptor weiterhin exprimiert wird, wurden die Zellen diesbezüglich zunächst durch RT-PCR- und Northern Blot-Analyse auf RNA-Ebene untersucht.

Die PCR-Primer waren gegen die extrazelluläre Rezeptordomäne und somit gegen sämtliche Spleißvarianten gerichtet. Das Resultat ist in *Abb. 10* dargestellt: Spur 1 zeigt eine 100 bp-Leiter als Marker, Spur 2 das RT-PCR-Produkt von GAPDH als Positivkontrolle und internen Standard und schließlich Spur 3 das RT-PCR-Amplifikat des Leptinrezeptors.



**Abb. 10:**  
*RT-PCR-Analyse von RNA aus kultivierten porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen (Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 2: GAPDH, Spur 3: OB-R [sämtliche Spleißformen])*

Die Hybridisierungssonde für die Northern Blot-Analyse, die als DIG-gelabelte cRNA-Probe angefertigt wurde, erkannte ebenfalls den Extrazellulärbereich des Leptinrezeptors. Wie auf *Abb. 11* zu sehen, liegt das Leptinrezeptorsignal oberhalb von 28 S (5,1 kb), das von GAPDH unterhalb von 18 S (1,9 kb). Auf der rechten Seite wurden 10  $\mu$ g Total-RNA aus der Plexuskultur auf das Formaldehydgel aufgetragen, links 10  $\mu$ g Total-RNA vom intakten Plexus chorioideus; der Vergleich der Quotienten der Bandenintensitäten von Leptinrezeptor durch GAPDH zeigt, daß die kultivierten Zellen einen gleich hohen Leptinrezeptor-mRNA-Spiegel aufwiesen wie das native Gewebe. Die absolut geringeren Bandenintensitäten auf der linken Seite sind durch Teildegradation der RNA im Schlachthof bzw. während des Transportes ins Labor zu erklären.



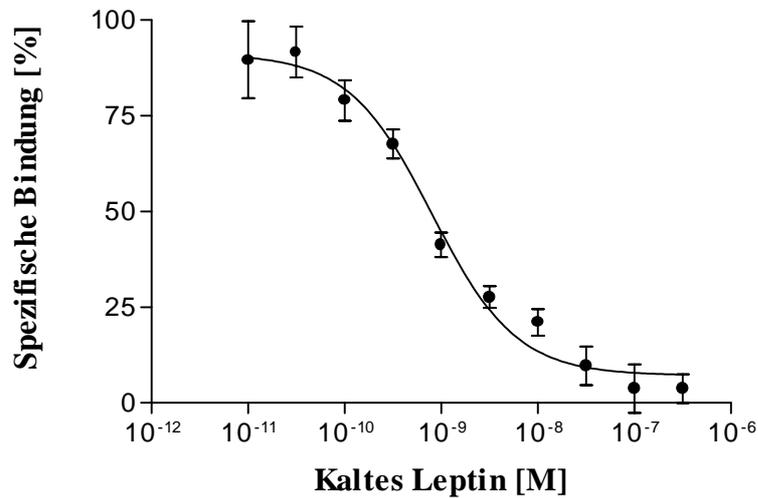
**Abb. 11:**

***Northern Blot-Analyse von RNA aus dem porcinen Plexus chorioideus (Spur 1: 10 µg Total-RNA vom intakten Plexus, Spur 2: 10 µg Total-RNA von kultivierten Plexuszellen). Das Leptinrezeptorsignal liegt oberhalb von 28 S, das GAPDH-Signal unterhalb von 18 S.***

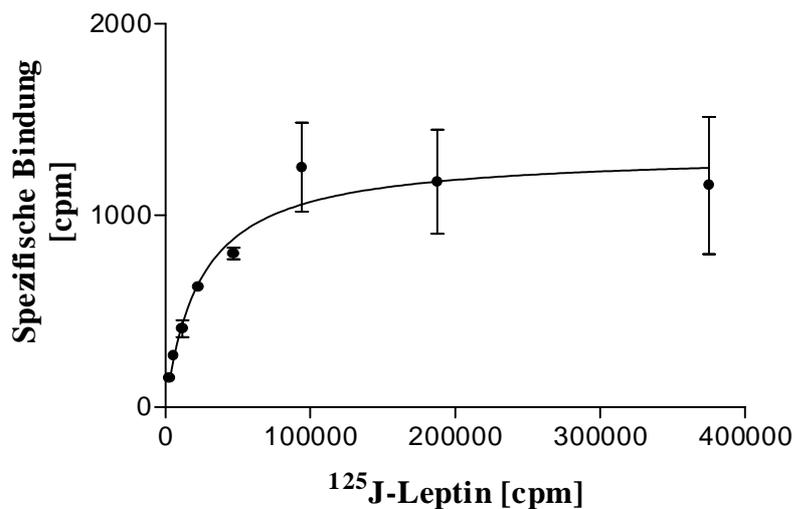
Nach der Charakterisierung der kultivierten Plexuszellen auf transkriptionaler Ebene wurden Funktionsstudien bezüglich des Ligand-Rezeptor-Bindungsverhaltens abgeschlossen, zuerst mit aus frischen Plexus präparierten Zellmembranen, dann mit Zellen in Kultur; die Ergebnisse waren absolut vergleichbar.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens wurden die Zellen bei 4 °C für 4 h mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem rekombinanten murinen Leptin mit einer spezifischen Aktivität von ca. 500 Ci/mmol inkubiert, wobei 1 % BSA zur Reduzierung der unspezifischen Bindung und ein Cocktail aus verschiedenen Proteaseinhibitoren zum Schutz von Rezeptor und Tracer zugegeben waren. Um die Affinität der Leptinbindungsstellen zu bestimmen, wurden die Inkubationen in Gegenwart von kaltem Leptin in steigenden Konzentrationen durchgeführt. Zur Ermittlung der nicht vermeidbaren verbleibenden unspezifischen Bindung wurde die Hälfte der Kulturen mit einem Überschuß an kaltem Leptin inkubiert, um die Rezeptorbindungsstellen vollständig abzusättigen. In *Abb. 12* ist eine Verdrängungskurve dargestellt; auf der Abszisse ist die Molarität des nicht markierten Leptins, auf der Ordinate die spezifische Bindung aufgetragen. Der  $K_D$ -Wert liegt bei

$8 \times 10^{-10}$ . Neben der spezifischen Verdrängbarkeit ist die Sättigbarkeit der spezifischen Bindung ein zu forderndes Kriterium für eine Ligand-Rezeptor-Bindung; die Plexuszellkulturen erfüllen, wie Sättigungskinetiken ergeben haben, auch diese Bedingung (Abb. 13). Der  $B_{\max}$ -Wert beträgt 171 fmol/mg Protein.

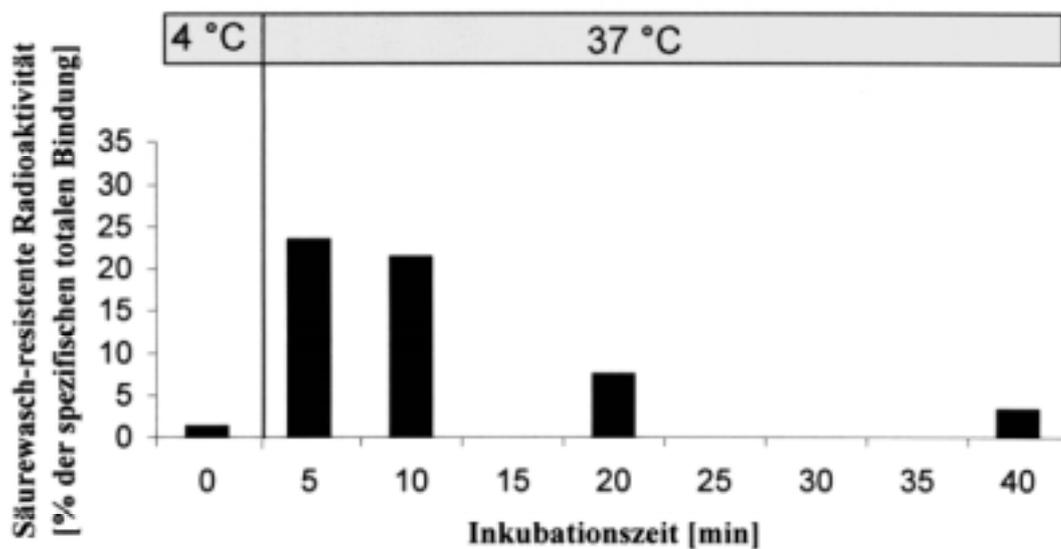


**Abb. 12:**  
Verdrängungskurve an kultivierten porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin



**Abb. 13:**  
Sättigungskinetik an kultivierten porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin

Die bisher vorgestellten Ergebnisse an den kultivierten Plexus chorioideus-Epithelzellen waren Voraussetzung für den bezüglich der Fragestellung entscheidenden Versuch, die Internalisierungsstudie. Dabei wurden die Plexuszellmonolayer mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem Leptin inkubiert und anschließend gründlich mit eiskaltem Puffer gespült, um ungebundenen Liganden zu entfernen. Dann wurden die Zellen für 0, 5, 10, 20 und 40 min mit einem  $37\text{ °C}$  warmen Puffer unter Konstanthaltung der Temperatur inkubiert, um ihnen zu ermöglichen, das während der Inkubation bei  $4\text{ °C}$  gebundene Leptin oder den gesamten Rezeptor-Ligand-Komplex zu internalisieren. Kontrollzellen wurden auf die gleiche Weise, allerdings bei  $4\text{ °C}$ , behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit einem sauren Puffer versetzt, welcher eine Dissoziation der Leptinbindung vom Rezeptor bewirkt, und die säureresistente Radioaktivität (sie repräsentiert das internalisierte  $^{125}\text{J}$ -markierte Leptin) im  $\gamma$ -Counter gemessen. Innerhalb der ersten 10 min kam es zu einem rapiden Anstieg und danach zu einem allmählichen Absinken (Abb. 14).



**Abb. 14:**  
*Internalisation von  $^{125}\text{J}$ -Leptin in kultivierte porcine Plexus chorioideus-Epithelzellen*

Somit sind die porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen dazu in der Lage, Leptin schnell und spezifisch zu internalisieren, was der erste Schritt des Transportes durch die Blut-Liquor-Schranke sein könnte.

### 3.3. Untersuchungen zur möglichen Existenz eines löslichen Leptinrezeptors beim Menschen

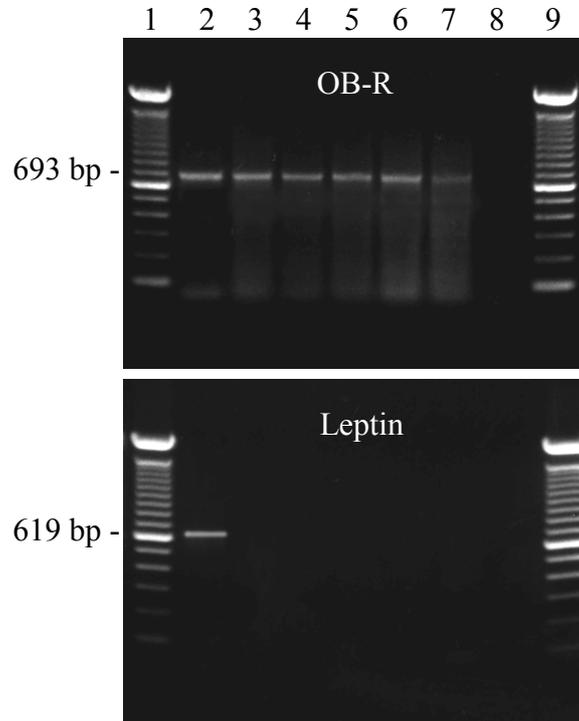
#### Fragestellung:

#### Gibt es beim Menschen eine lösliche Form des Leptinrezeptors?

Bezüglich des löslichen Leptinrezeptors ging es zunächst um die Suche nach einer geeigneten Quelle für eine zirkulierende Form zur Durchführung entsprechender Studien. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Gewebe, Organe und Zellen von Mensch, Ratte, Maus, Hamster, Meerschweinchen und Schwein mittels RT-PCR bezüglich der Leptinrezeptorexpression überprüft, und zwar mit Primern, die gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet waren, also alle Spleißvarianten erkannten. Die folgende Aufzählung gibt einen kleinen Eindruck von der ubiquitären Verteilung des Leptinrezeptors, wie sie im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigt wurde: Subkutanes Fettgewebe (Mensch), viszerales Fettgewebe (Mensch), Plazenta (Mensch), Nabelschnur (Mensch), Herz (Mensch), Niere (Mensch), Vene (Mensch), fetales Herz (Mensch), fetale Leber (Mensch), Leukozyten (Mensch), Erythroleukämiezelllinie K562 (Mensch), Neuroblastomazelllinie SKNMC (Mensch), Hepatomazelllinie Hep G2 (Mensch), subkutanes Fettgewebe (Ratte), viszerales Fettgewebe (Ratte), braunes Fettgewebe (Ratte), Herz (Ratte), Lunge (Ratte), Bronchus (Ratte), Trachea (Ratte), Leber (Ratte), Niere (Ratte), Nebenniere (Ratte), Skelettmuskulatur (Ratte), Ganglion nodosum (Ratte), Ganglion trigeminale (Ratte), Hypothalamus (Ratte), Zerebellum (Ratte), Hippokampus (Ratte), Mesencephalon (Ratte), Kortex (Ratte), Kardiomyozyten (Ratte), Kardiomyoblasten (Ratte), Insulinomazelllinie RIN (Ratte), Insulinomazelllinie INS-1 (Ratte), Insulinomazelllinie  $\beta$ TC-3 (Maus), Insulinomazelllinie HIT (Hamster), Herz (Meerschweinchen), Plexus chorioideus (Schwein).

Aufgrund der Tatsache, daß bei der Ratte in allen untersuchten Arealen des Gehirns die Message für OB-R nachweisbar war, stellte sich die Frage, ob eventuell auch Transkripte für den Liganden vorhanden seien, welcher im ZNS parakrin wirken könnte. Die in *Abb. 15* dargestellten RT-PCR-Ergebnisse zeigen allerdings, daß ein Leptinsignal nur im als Positivkontrolle mitgeführtem Fettgewebe erhalten wurde. Selbstverständlich wurden bei allen PCR's die üblichen Negativkontrollen (keine cDNA-Zugabe zur Erkennung einer Kontamination mit Template sowie keine Reverse Transkriptase-Zugabe

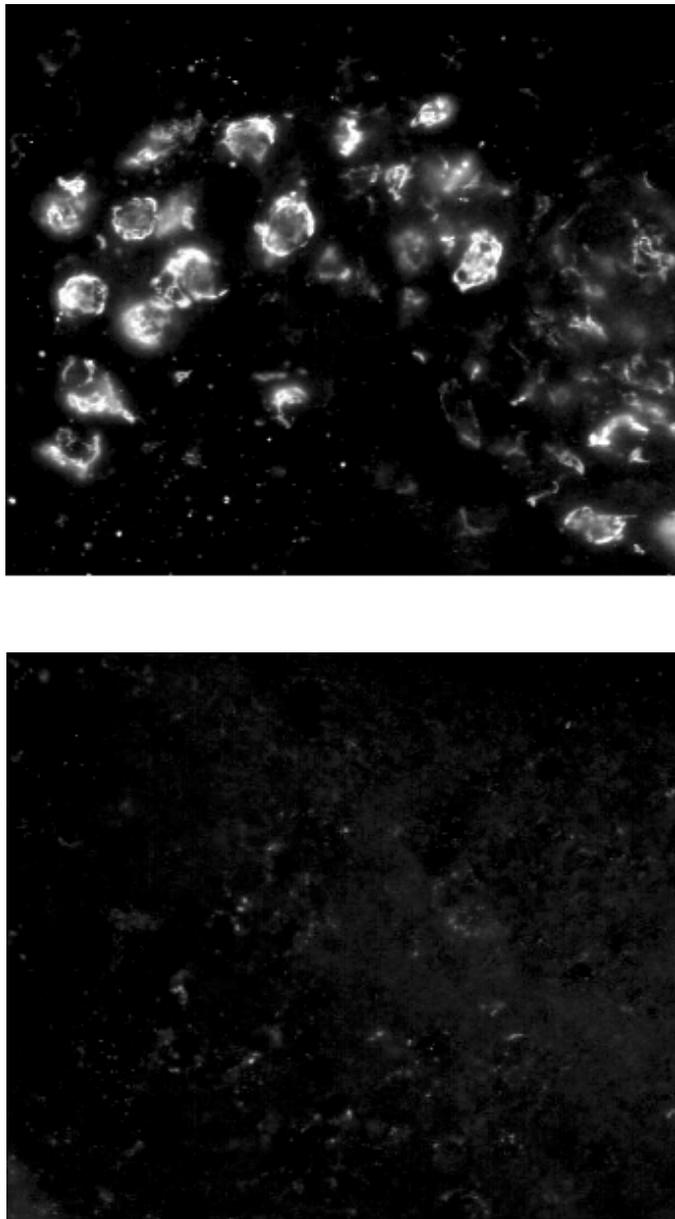
zur Erkennung einer Kontamination mit genomischer DNA) durchgeführt und wurden die Amplifikate sequenziert, um ihre Spezifität zu beweisen.



**Abb. 15:**

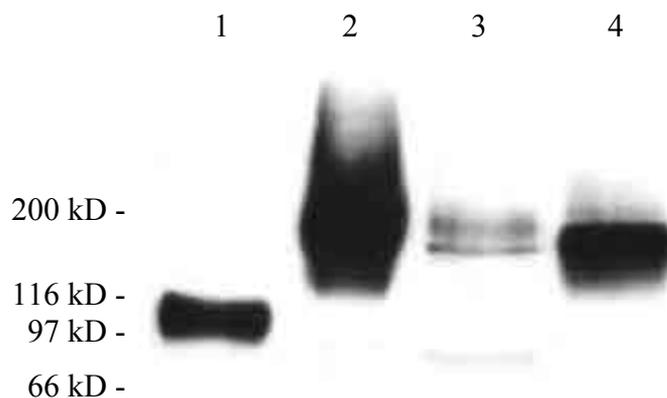
***RT-PCR-Analyse von RNA aus Fettgewebe und verschiedenen Hirnarealen der Ratte mit gegen sämtliche Spleißformen von OB-R (oben) sowie gegen Leptin (unten) gerichteten Primern (Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 2: Fettgewebe, Spur 3: Hypothalamus, Spur 4: Hippokampus, Spur 5: Mesenzephalon, Spur 6: Zerebellum, Spur 7: Kortex, Spur 8: Negativkontrolle (Wasser), Spur 9: 100 bp-Leiter)***

Im Hippokampus der Ratte wurde der Leptinrezeptor auch auf Translationsebene, und zwar per Fluoreszenzimmunhistologie mit einem alle Spleißformen des Leptinrezeptors erkennenden Antikörper detektiert. *Abb. 16* zeigt die Fotos vom Hippokampus; das obere Bild ist der Positivbefund ohne Zugabe von Antiserum, unten ist die Präabsorptionskontrolle dargestellt.



**Abb. 16:**  
*Fluoreszenzimmunhistologie im Hippokampus der Ratte mit einem gegen sämtliche OB-R-Isoformen gerichteten Antiserum (oben: ohne Präabsorption, unten: mit Präabsorption; Vergrößerung: 900-fach)*

Das Vorkommen des Leptinrezeptors wurde in einigen Organen auch mittels Western-Blot gezeigt. Der eingesetzte polyklonale Antikörper erkannte die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren der humanen Sequenz und damit alle OB-R-Isoformen. In *Abb. 17* ist das Ergebnis des Western-Blots für humanen Plexus chorioideus, humanes Fettgewebe und humane Leber gezeigt. Lange und kurze Spleißvarianten lassen sich nur schwer voneinander diskriminieren, weil beide Formen aufgrund der Bandbreite unterschiedlicher Glykosilierungsgrade ineinander konfluieren; am ehesten kann man noch bei dem schwächeren Signal in Spur 3 zwei Banden erkennen. Ganz links ist als Positivkontrolle eingesetzter rekombinanter Leptinrezeptor zu sehen; er lief im SDS-Page schneller als die humanen Gewebe, weil er nicht glykosiliert ist und deshalb ein niedrigeres Molekulargewicht hat.



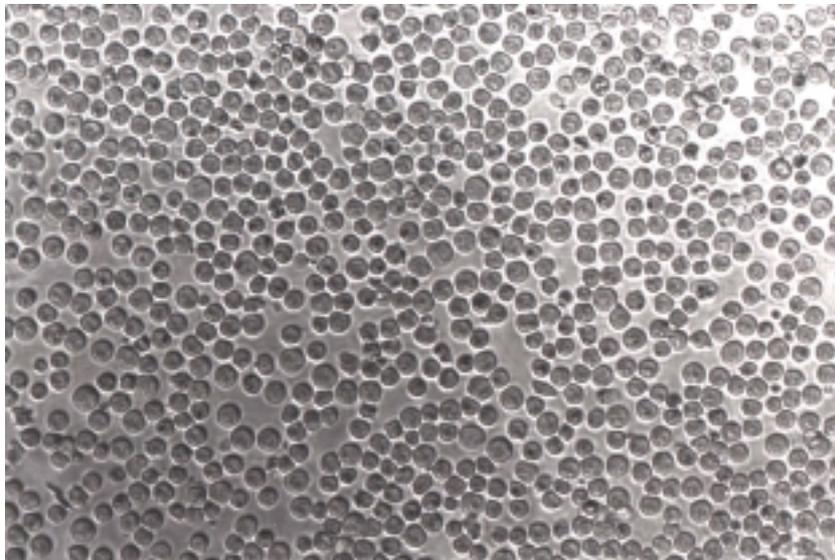
**Abb. 17:**

***Western-Blot-Analyse von verschiedenen humanen Geweben bzw. Organen mit einem gegen sämtliche Spleißformen von OB-R gerichteten Antikörper (Spur 1: rekombinanter humaner OB-R, Spur 2: humaner Plexus chorioideus, Spur 3: humanes Fettgewebe, Spur 4: humane Leber).***

Der mit unterschiedlichen Methoden durchgeführte OB-R-Nachweis in mehreren exemplarischen Geweben, Organen und Zellen verschiedener Spezies verdeutlicht, daß der Leptinrezeptor im Geno- wie im Phänotyp ubiquitär präsent ist. Über seine Aufgaben in der Peripherie ist auch heute noch viel unbekannt und bedarf weiterer Erforschung. Insbesondere besteht die Frage nach einem löslichen Leptinrezeptor beim Menschen. Zwar gibt es eine entsprechende Spleißvariante wie beim Nagetier (*Fei et al., 1997; Takaya et al., 1996a*) beim Menschen nicht (*Chua et al., 1997*), aber es

könnte sein, daß durch enzymatisches Shedding ein zirkulierender Rezeptor von einer anderen Isoform abgespalten wird.

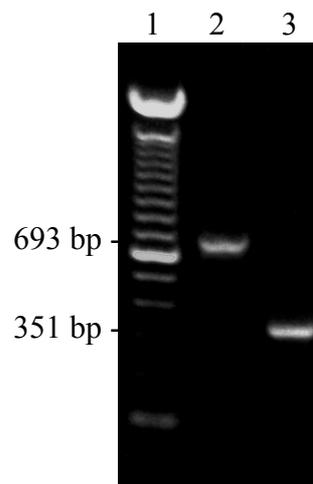
Als Testsystem zur Klärung der Frage nach einer löslichen OB-R-Form diente die humane Erythroleukämiezelllinie K562 (*Lozzio und Lozzio, 1975*). Sie wurde 1971 aus einem Pleuraerguß eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie während des terminalen Blastenschubs gewonnen. Die pluripotente Zelllinie hat mit 12 h eine sehr kurze Populationsverdopplungszeit und liegt entsprechend ihrem anchorage independent-Wachstum als Suspensionskultur vor (*Abb. 18*).



**Abb. 18:**  
***Suspensionskultur von K562-Zellen (Vergrößerung: 400-fach)***

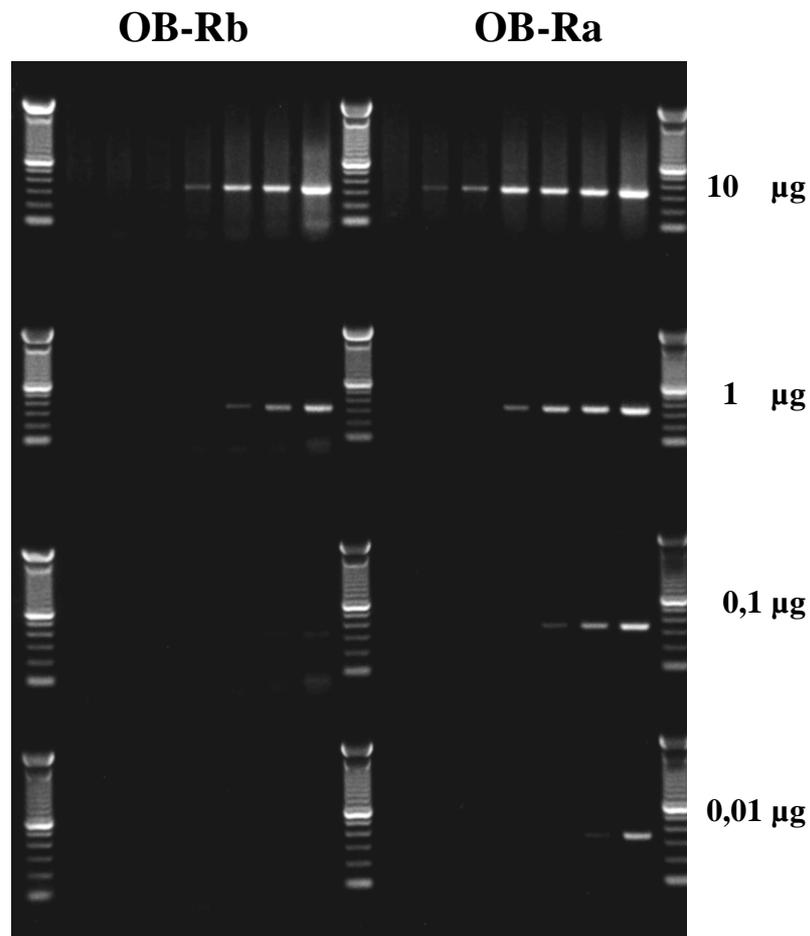
Der Grund, warum die K562-Zelllinie als Testsystem gewählt wurde, war die Tatsache, daß sie sich durch eine besonders hohe Leptinrezeptorexpression auszeichnet und sich deshalb gut als Modell für Studien des Leptinrezeptors eignen sollte. Zunächst war es notwendig, die K562-Zellen auf Transkriptions-, Translations- und Funktionsebene diesbezüglich genau zu charakterisieren, um entscheiden zu können, ob sie auch wirklich als Testsystem geeignet waren.

Die in *Abb. 19* dargestellte RT-PCR zeigt, daß die Zellen sowohl die lange wie auch die kurze Rezeptorform besitzen. In Spur 1 ist die 100 bp-Leiter zu sehen, Spur 2 zeigt das Leptinrezeptoramplifikat mit einem gegen alle Spleißvarianten gerichteten Primerpaar und Spur 3 das PCR-Produkt des langen Rezeptors.



***Abb. 19:***  
***RT-PCR-Analyse von RNA aus K562-Zellen (Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 2: OB-R [sämtliche Spleißformen], Spur 3: OB-Rb)***

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte weiterhin gezeigt werden, daß die kurze Isoform bevorzugt exprimiert wird. Dazu wurden RT-PCR's mit unterschiedlich vielen Zyklen durchgeführt, wobei (beginnend mit so geringen Zykluszahlen, daß das Amplifikat per Ethidiumbromidgelelektrophorese noch nicht zu detektieren war, und endend in der Plateauphase) der gesamte exponentielle Bereich der PCR-Reaktion erfaßt wurde. In *Abb. 20* sind die RT-PCR-Amplifikate von OB-Rb und OB-Ra nach 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36 Zyklen zu sehen, wobei 4 verschiedene RNA-Mengen (10 µg, 1 µg, 0,1 µg und 0,01 µg) eingesetzt wurden. Unter der Voraussetzung, daß sich die Effizienz des Primer-Annealings nicht erheblich unterscheidet, zeigt das erheblich frühere Auftreten der PCR-Signale bei der kurzen Leptinrezeptorisoform deren mengenmäßiges Überwiegen.



**Abb. 20:**  
*RT-PCR-Analyse von unterschiedlichen RNA-Mengen (10 µg, 1 µg, 0,1 µg und 0,01 µg) aus K562-Zellen nach 18, 21, 24, 27, 30, 33 und 36 Zyklen (links: OB-Rb, rechts: OB-Ra; Marker: 100 bp-Leiter)*

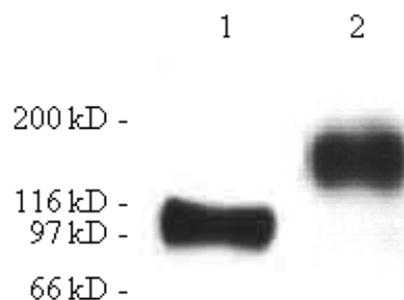
Daß das Leptinrezeptortranskript in den K562-Zellen in außerordentlich großen Mengen vorkommt, ist daran zu erkennen, daß auch mit weit weniger sensitiven Methoden deutliche Signale zu erzielen sind. Im Northern-Blot ließ sich, wie in *Abb. 21* gezeigt ist, bereits mit 2,5 µg Total-RNA und einer Fimexpositionszeit von 1 min eine kräftige Bande erhalten. Die Hybridisierungssonde, eine DIG-gelabelte cRNA-Probe, war gegen die extrazelluläre Domäne des Leptinrezeptors gerichtet, erkannte also alle Isoformen. Das Leptinrezeptorsignal liegt oberhalb von 28 S (5,1 kb), das von GAPDH unterhalb von 18 S (1,9 kb).



**Abb. 21:**

***Northern Blot-Analyse von RNA aus K562-Zellen (2,5 µg Total-RNA pro Spur). Das Leptinrezeptorsignal liegt oberhalb von 28 S, das GAPDH-Signal unterhalb von 18 S.***

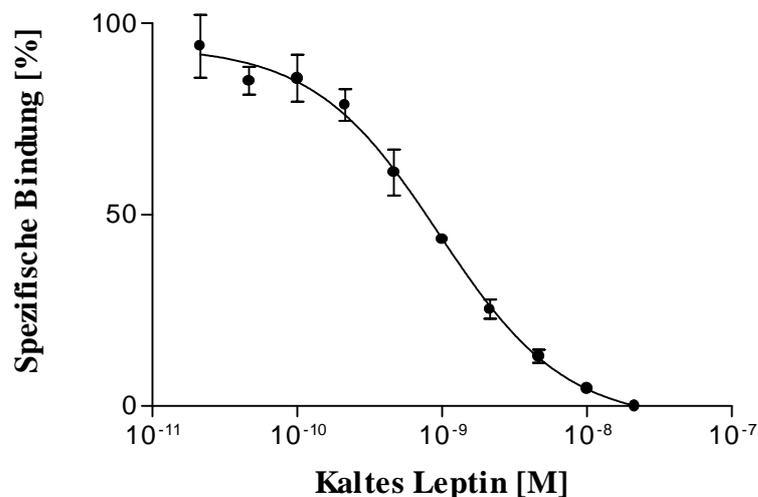
Auf Translationsebene ließ sich der Leptinrezeptor ebenfalls gut nachweisen. Der in *Abb. 22* dargestellte Western-Blot mit einem gegen die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren gerichteten polyklonalen Antikörper zeigt in Spur 2 das Signal der K562-Zellen. In Spur 1 befindet sich als Positivkontrolle rekombinanter Leptinrezeptor, der unglykosiliert und damit niedermolekularer ist.



**Abb. 22:**

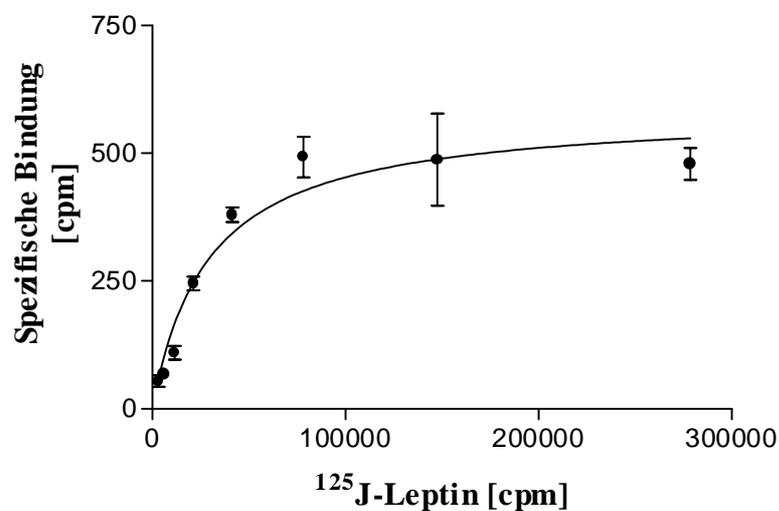
***Western-Blot-Analyse von K562-Zellmembranen mit einem gegen sämtliche Spleißformen von OB-R gerichteten Antikörper (Spur 1: rekombinanter humaner OB-R, Spur 2: K562-Zellen).***

Auch in Funktionsstudien bezüglich des Ligand-Rezeptor-Bindungsverhaltens erwies sich die Zelllinie K562 als geeignetes Studienobjekt für Untersuchungen des Leptinrezeptors. Bei der Bindungsstudie wurden sowohl intakte Zellen als auch aus diesen präparierte Zellmembranen bei 4 °C für 4 h mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem rekombinantem humanem Leptin (spezifische Aktivität: ca. 500 Ci/mmol) inkubiert und durch Zugabe von steigenden Konzentrationen von kaltem Leptin die Bindungsaffinität ermittelt. In *Abb. 23* ist die Verdrängungskurve zu sehen; der  $K_D$ -Wert liegt bei  $1 \times 10^{-9}$ :



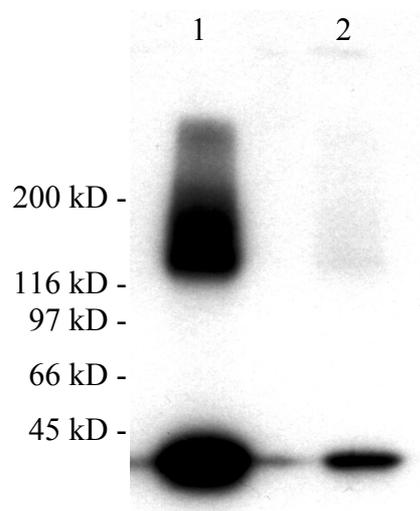
**Abb. 23:**  
*Verdrängungskurve an K562-Zellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin*

*Abb. 24* zeigt die Sättigungskinetik; der  $B_{\max}$ -Wert beträgt 75 fmol/mg Protein:



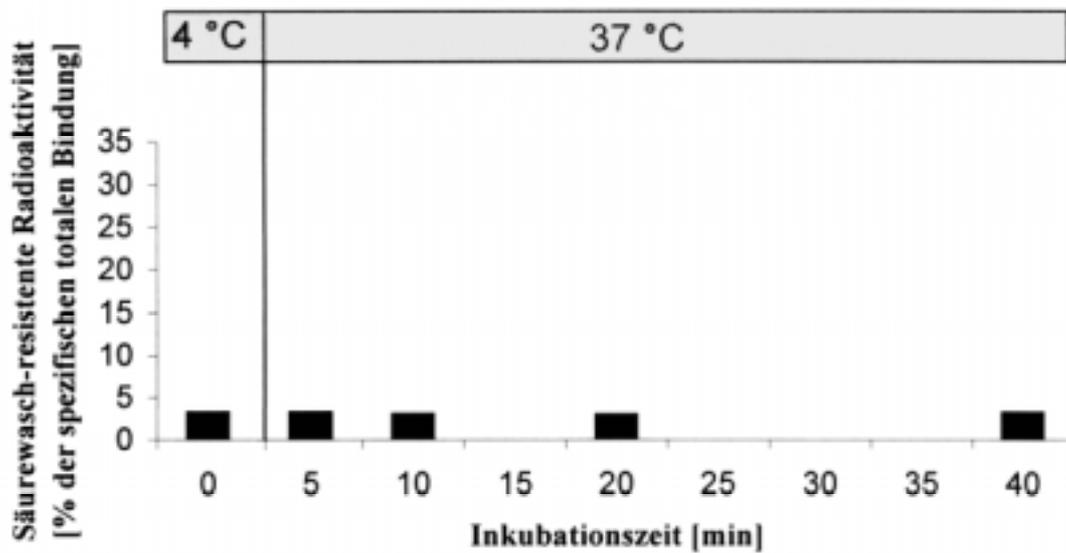
**Abb. 24:**  
*Sättigungskinetik an K562-Zellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin*

Außerdem wurde mit intakten K562-Zellen eine Cross-Linking-Studie durchgeführt, indem die Zellen nach  $^{125}\text{J}$ -Leptin-Inkubation mit Disuccinimidylsuberat kreuzvernetzt wurden. In *Abb. 25* ist die Autoradiografie des entsprechenden SDS-Page's dargestellt. Man sieht einen Komplex von ca. 170 kD und einen im weit höhermolekularen Bereich, woraus man schließen kann, daß Leptin an Rezeptormonomere und -di- bzw. -polymere bindet (Spur 1). Die Spezifität ist durch die Verdrängbarkeit durch einen Überschuß an kaltem Leptin gezeigt (Spur 2). Die Filmschwärzung im Bereich der Lauffront ist durch freies  $^{125}\text{J}$  bewirkt.



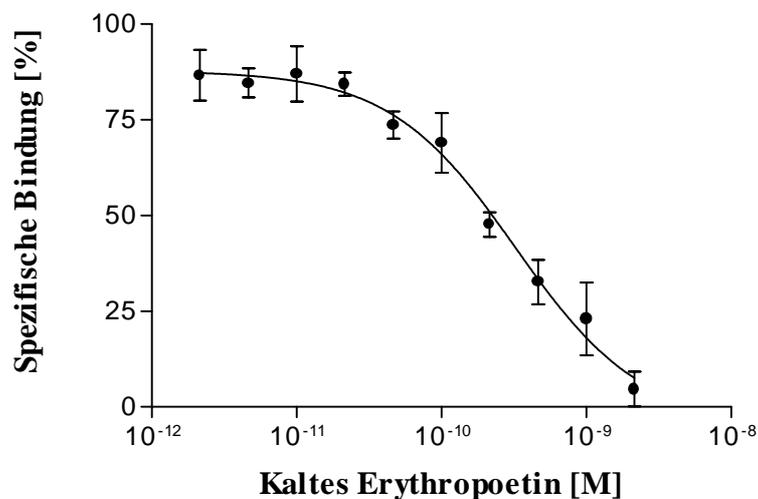
***Abb. 25:***  
***Cross-Linking-Studie an K562-Zellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin ohne (Spur 1) und mit (Spur 2) einem Überschuß an kaltem Leptin***

Da die K562-Zellen OB-Ra in besonders hohem Maße exprimieren, könnte man (analog zu den Plexus chorioideus-Epithelzellen) erwarten, daß im Sinne einer Transportfunktion der kurzen Leptinrezeptorspleißvariante die Erythroleukämiezelllinie zur Leptininternalisation befähigt sein sollte. Entsprechende, häufig wiederholte Experimente (Inkubation der Zellen mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin, Entfernen von ungebundenem Liganden durch eiskalten Puffer, Inkubation für 0, 5, 10, 20 und 40 min mit 37 °C warmem Puffer zur Ermöglichung einer Internalisierung von gebundenem Liganden, Spülen mit saurem Puffer zur Dissoziation der Leptinbindung vom Rezeptor und schließlich Messung der Säurewasch-resistenten Radioaktivität im  $\gamma$ -Counter) führten allerdings zu der Erkenntnis, daß entgegen oben genannter Annahme die K562-Zellen nicht dazu in der Lage sind, Leptin zu internalisieren, wie in *Abb. 26* zu sehen ist.

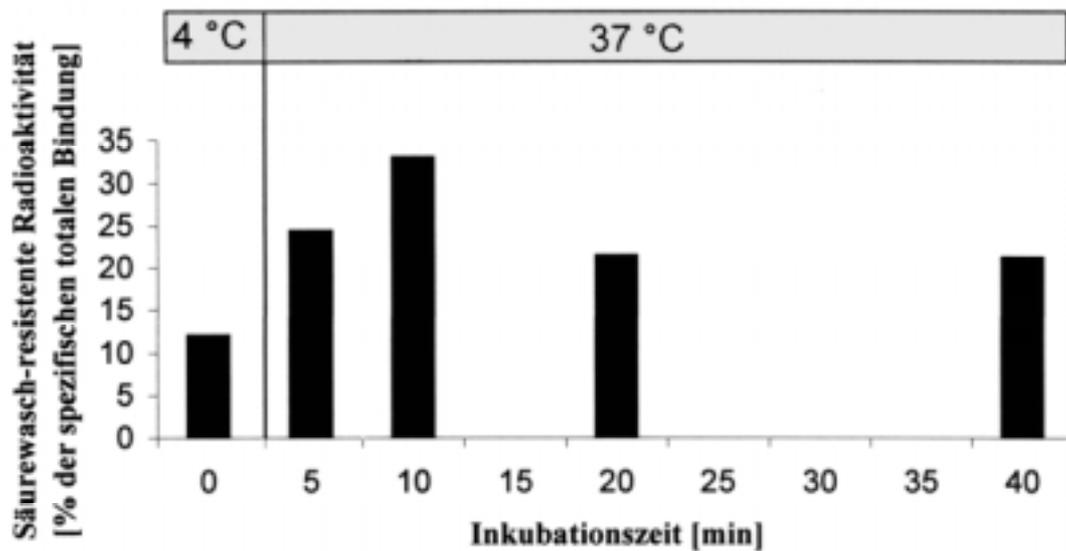


**Abb. 26:**  
Keine Internalisation von  $^{125}\text{J}$ -Leptin in K562-Zellen

Um sicherzustellen, daß dieser Negativbefund keine methodische Ursache hat, wurden parallel zu den Leptininternalisierungsstudien Kontrollexperimente mit Erythropoetin durchgeführt. Dazu mußte zunächst das Bindungsverhalten untersucht werden (Abb. 27), um schließlich die Fähigkeit zur Internalisierung von Erythropoetin zu überprüfen. In Abb. 28 ist gezeigt, daß die K562-Zellen Erythropoetin internalisieren können.



**Abb. 27:**  
Verdrängungskurve an K562-Zellen mit  $^{125}\text{J}$ -Erythropoetin



**Abb. 28:**  
**Internalisation von  $^{125}\text{J}$ -Erythropoetin in K562-Zellen**

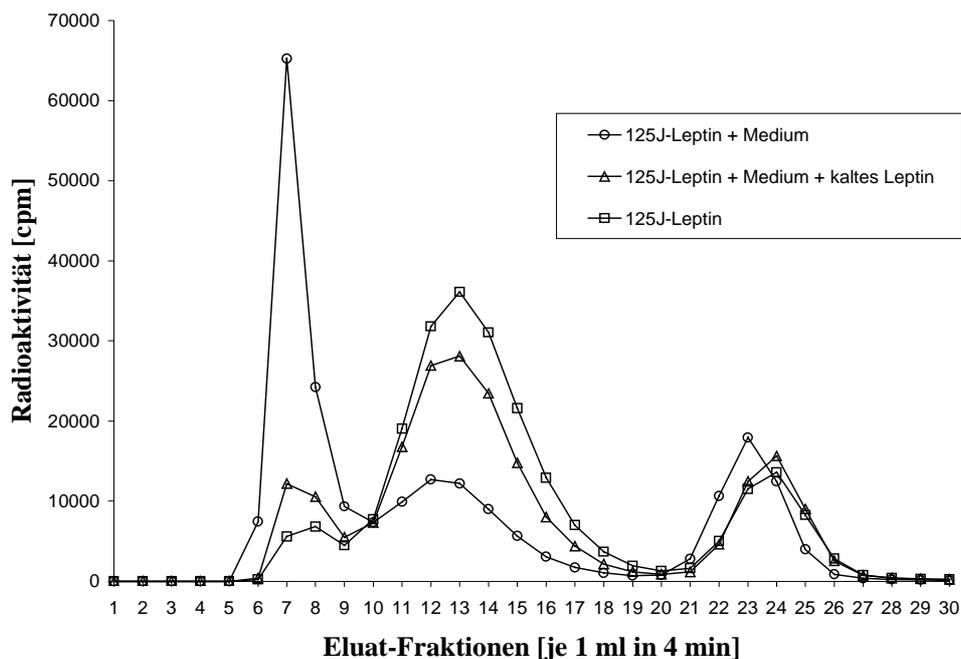
Nachdem die Erythroleukämiezelllinie K562 auf Transkriptions-, Translations- sowie Funktionsebene ausgiebig charakterisiert worden war, wurde im folgenden die Frage nach einem etwaigen löslichen Rezeptor untersucht. Wenn man Analogien zwischen in vitro-Modellen und der in vivo-Situation bilden möchte, dann könnte man das Kulturmedium der K562-Zellen mit dem im menschlichen Körper zirkulierenden Blutplasma vergleichen, d. h. sollten die K562-Zellen einen löslichen Leptinrezeptor produzieren, dann müßte dieser ins Medium abgegeben werden und dort nachzuweisen sein.

Das diesbezüglich untersuchte Medium von serumfrei kultivierten K562-Zellen wurde nach Filtration durch ein 0,22  $\mu\text{m}$ -Filter und Volumeneinengung per Centricon über eine Sepharose-Säule gegeben, um eventuell noch vorhandene winzige Zellbruchstücke, welche den membranständigen Rezeptor enthalten würden, mit Sicherheit zu eliminieren.

Nachdem das auf diese Weise vorbehandelte Medium bei 4 °C für 4 h mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem Leptin inkubiert worden war, die eine Hälfte nur mit Tracer, die andere mit einem Überschuß an kaltem Leptin, wurden die Ansätze über eine Sephadex G-75-Säule laufen gelassen und die Eluate fraktioniert gesammelt. Der Background wurde durch

einen Kontrolllauf nur mit Tracer („ $^{125}\text{J}$ -Leptin“) ohne Inkubation mit Medium bestimmt.

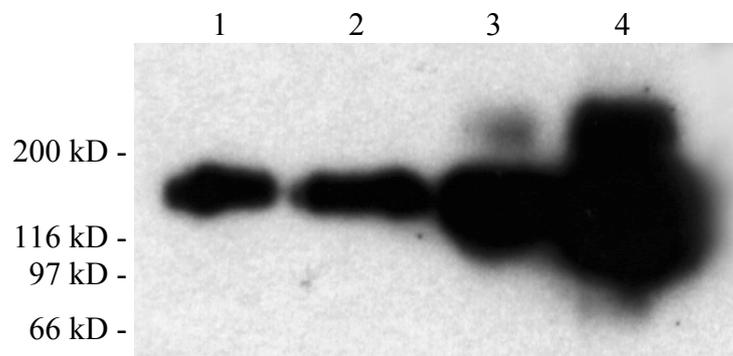
Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Fraktionen ergab beim Ansatz „ $^{125}\text{J}$ -Leptin + Medium“ einen deutlichen Peak zu Beginn des Säulenlaufs mit Maximum in den Fraktion 7 - 8, der durch das unmarkierte Leptin („ $^{125}\text{J}$ -Leptin + Medium + kaltes Leptin“) praktisch vollständig verdrängt wurde; es handelte sich bei diesem Peak somit um einen Komplex spezifischer Bindung zwischen Leptin und einem löslichen Bindungsprotein. Der zweite Peak mit Maximum in den Fraktion 12 – 13 ist freier Tracer. Beim dritten Peak mit Maximum in den Fraktion 23 – 24 handelt es sich um Tracerabbauprodukte. In *Abb. 29* sind die Radioaktivitätsmessungen dieser 3 Säulenläufe dargestellt.



**Abb. 29:**

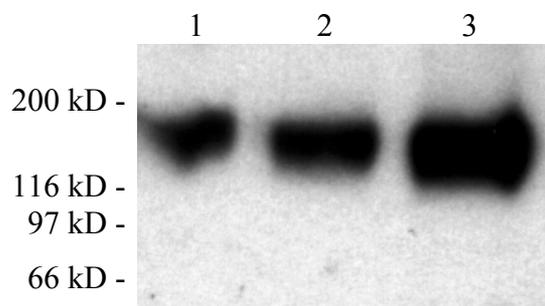
*Chromatografische Auftrennung via Sephadex G-75-Säulenlauf von aus K562-Zellkulturen gewonnenem Medium, welches (nach Filtration durch ein 0,22  $\mu\text{m}$ -Filter, Volumeneinengung per Centricon und Aufreinigung über eine Sepharose-Säule) mit  $^{125}\text{J}$ -Leptin inkubiert worden war (Kreise), im Vergleich zu einem entsprechendem Ansatz, dem zusätzlich ein Überschuß an kaltem Leptin zugesetzt worden war (Dreiecke), sowie zu einem Säulenlauf mit reinem Tracer (Vierecke). Auf der Ordinate sind die einzelnen Eluat-Fractionen aufgetragen, auf der Abszisse deren gemessene Radioaktivität*

Daß es sich bei dem löslichen Bindungsprotein um den Leptinrezeptor handelt, konnte durch Western Blot-Analyse gezeigt werden. In *Abb. 30* ist dargestellt, daß das Leptinrezeptorsignal im K562-Medium mit zunehmender Kultivierungsdauer (6 h, 12 h, 24 h, 48 h) stärker wird. In *Abb. 31* ist zu sehen, daß auch die Kultivierungstemperatur über einen Zeitraum von 24 h einen Einfluß auf die freigesetzte Leptinrezeptormenge hat; so wird die Bande von 4 °C über 20 °C bis zu 37 °C zunehmend kräftiger. Diese beiden Befunde sprechen für eine aktive kontinuierliche Freisetzung eines löslichen Leptinrezeptors von den K562-Zellen ins Medium.



**Abb. 30:**

*Western-Blot-Analyse mit einem gegen sämtliche Spleißformen von OB-R gerichteten Antikörper von aus K562-Zellkulturen gewonnenem Medium nach unterschiedlich langen Kultivierungszeiten unter Standardbedingungen (Spur 1: 6 h, Spur 2: 12 h, Spur 3: 24 h, Spur 4: 48 h)*



**Abb. 31:**

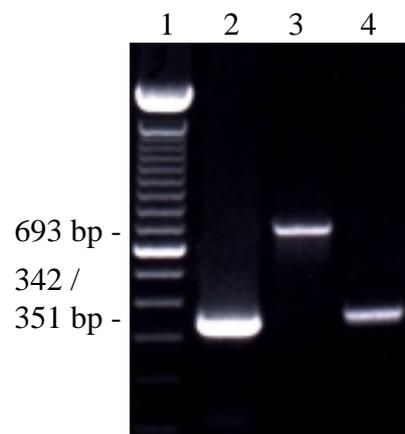
*Western-Blot-Analyse mit einem gegen sämtliche Spleißformen von OB-R gerichteten Antikörper von aus K562-Zellkulturen gewonnenem Medium nach 24 h Kultivierung bei unterschiedlichen Temperaturen (Spur 1: 4 °C, Spur 2: 20 °C, Spur 3: 37 °C)*

### 3.4. Untersuchungen zur möglichen Leptin-vermittelten Signalübertragung über nervale Afferenzen

#### Fragestellung:

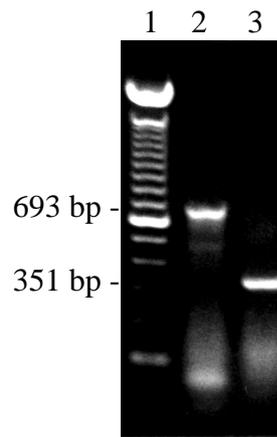
Gibt es neben dem humoralen Weg auch nervale Afferenzen, die die Signalübertragung von Leptin aus der Peripherie zum ZNS vermitteln?

Im N. vagus verlaufen afferente Neurone, die Reize vom Magen-Darm-Trakt (sowie auch von Herz und Lunge) zentripetal weiterleiten. Deren Perikaryen befinden sich im Ganglion nodosum. Sollte das im Magen sezernierte Leptin tatsächlich über diese Neurone wirken, dann müßten an den gastralen Nervenendigungen Leptinrezeptoren existieren, deren Synthese in den Zellkörpern und somit im Ganglion nodosum lokalisiert wäre. Im Ganglion nodosum der Ratte (Sprague-Dawley) durchgeführte RT-PCR's mit gegen sämtliche Spleißvarianten gerichteten Primern sowie mit Primern, die nur die lange Isoform erkennen, ergaben positive Signale (*Abb. 32*). Auf die gleiche Weise wurde außerdem auch das Ganglion trigeminale der Ratte untersucht; auch dort war eine Leptinrezeptorexpression nachweisbar (*Abb. 33*).



#### Abb. 32:

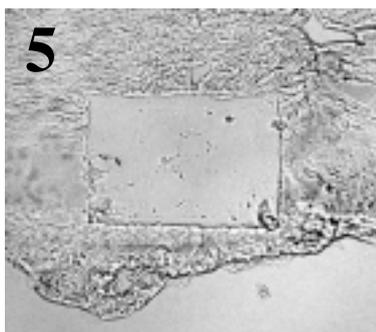
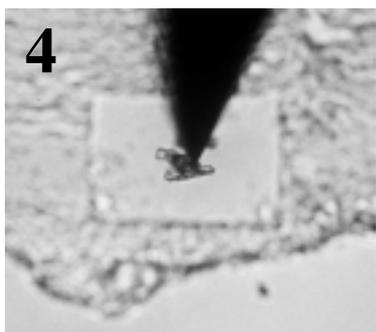
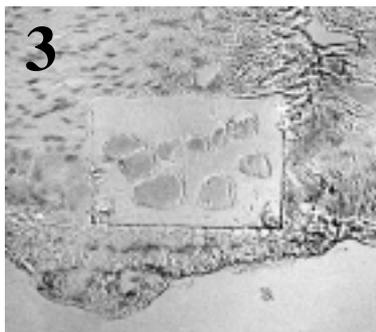
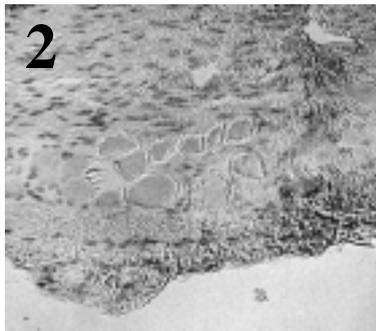
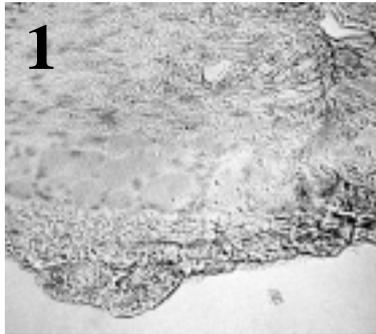
*RT-PCR-Analyse von RNA aus dem Ganglion nodosum der Ratte (Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 2: GAPDH, Spur 3: OB-R [sämtliche Spleißformen], Spur 4: OB-Rb)*



**Abb. 33:**

***RT-PCR-Analyse von RNA aus dem Ganglion trigeminale der Ratte (Spur 1: 100 bp-Leiter, Spur 2: OB-R [sämtliche Spleißformen], Spur 3: OB-Rb)***

Um sicherzustellen, daß die per RT-PCR amplifizierten Transkripte neuronalen Ursprungs sind, wurden mit einem Laser-Mikroskop-System einzelne Neurone isoliert und von diesen mit Primern gegen die lange sowie mit selektiv gegen die kurze Spleißform gerichteten Primern RT-PCR's durchgeführt. Bei der relativ neuen Methode der Laser-assistierten Zellisolierung werden 6 µm dicke Gefrierschnitte nach Azeton/Ethanol-Fixierung und Hämalaun-Färbung wie folgt behandelt: Per UV-Laser-Fotolyse werden einzelne Zellen vom Umgebungsgewebe separiert, dieses weggebrannt und die so frei-präparierten Zellen mit einer per Mikromanipulator zu bewegenden Nadel gesammelt. Pro Reaktionsansatz wurden 10 - 15 Zellquerschnitte gesammelt. In *Abb. 34* sind die einzelnen Schritte des Zellpickens dokumentiert:



**Abb. 34:**

*Laser-assistierte Zellisolierung von Neuronen aus dem Ganglion nodosum der Ratte*

*Foto 1 → Es liegt ein 6 µm dicker fixierter und gefärbter Gefrierschnitt vor; die einzelnen Neurone sind gut zu erkennen und deutlich abgrenzbar; oberhalb davon befindet sich Glia, unterhalb die bindegewebige Kapsel*

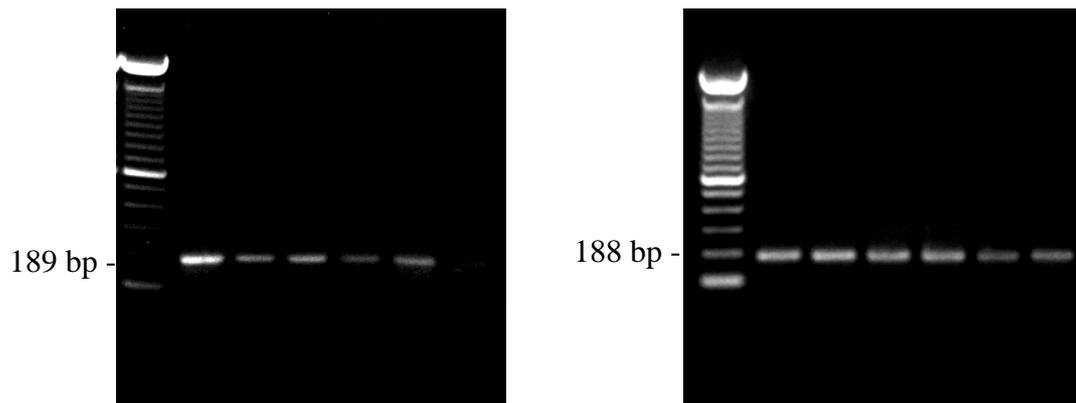
*Foto 2 → Mit einem Laserstrahl werden einzelne Neurone umfahren und so vom Umgebungsgewebe separiert.*

*Foto 3 → Das zwischen diesen Neuronen befindliche Gewebe wird per Laser-Fotolyse weggebrannt, so daß die zu untersuchenden Zellen freiliegen.*

*Foto 4 → Die freipräparierten Neuronquerschnitte werden mit einer Mikromanipulator-gesteuerten Nadel aufgesammelt und in ein Reaktionstube für die RT-PCR überführt.*

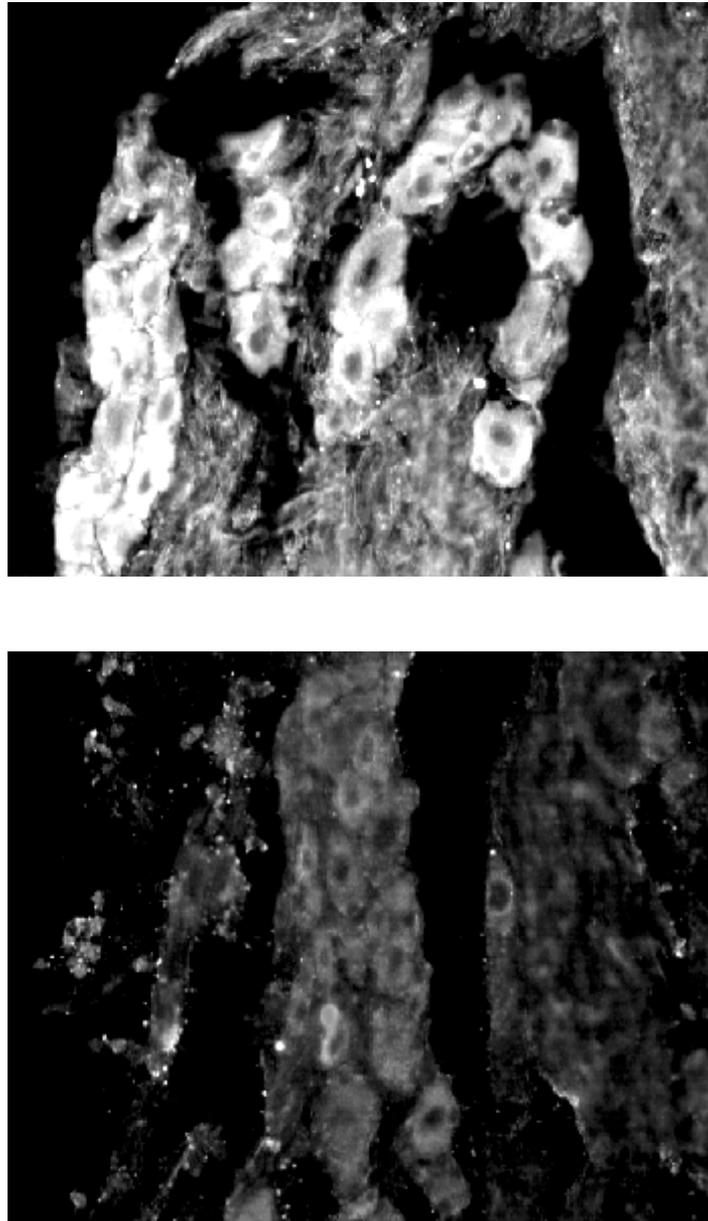
*Foto 5 → Das Zellpicken ist abgeschlossen.*

Da aufgrund der kleinen Materialmenge die Reverse Transkription direkt ohne vorherige RNA-Extraktion durchgeführt wurde, war es notwendig, Intron-überspannende Primer zu verwenden. In 75 % aller RT-PCR's hat sich ein positives spezifisches Signal gefunden, und zwar sowohl für die lange als auch gegen die kurze Spleißvariante (*Abb. 35*):



***Abb. 35:***  
***RT-PCR-Analyse von RNA aus mittels Laser-assistierter Zellisolierung***  
***gepickten Neuronen des Ganglion nodosum der Ratte (linkes Foto: OB-***  
***Rb, rechtes Foto: OB-Ra; jeweils erste Spur: 100 bp-Leiter)***

Im Ganglion nodosum ließ sich der Leptinrezeptor per Fluoreszenzimmunhistologie mit einem gegen sämtliche Spleißvarianten gerichteten Antikörper auch auf Proteinebene nachweisen;  $8,4 \pm 0,7$  % der Perikarya reagierten mit dem Antikörper. Von diesen hatten  $81,4 \pm 0,9$  % einen großen ( $\geq 25 \mu\text{m}$ ) und  $18,6 \pm 0,9$  % einen kleinen ( $< 25 \mu\text{m}$ ) Durchmesser. Das obere Foto der *Abb. 36* zeigt einen Cluster mit besonders vielen Leptinrezeptor-positiven Neuronen; auf dem unteren Foto ist die Präabsorptionskontrolle zu sehen:



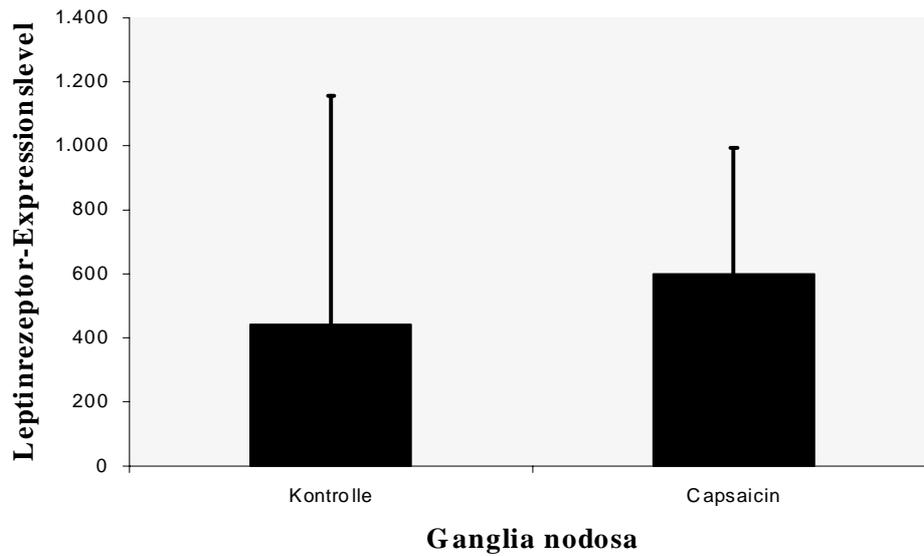
**Abb. 36:**

*Fluoreszenzimmunhistologie im Ganglion nodosum der Ratte mit einem gegen sämtliche OB-R-Isoformen gerichteten Antiserum (oben: ohne Präabsorption, unten: mit Präabsorption; Vergrößerung: 450-fach)*

Um die den Leptinrezeptor exprimierenden Neurone weiter zu charakterisieren, wurde in den Ganglia nodosa und trigeminalia von 8 Ratten, welchen am 2. und 3. postnatalen Tag das Neurotoxin Capsaicin in einer Dosierung von 100 mg/kg KG intraperitoneal injiziert worden war (die Effektivität der Capsaicinapplikation war 5 Monate später durch den radioimmunologisch gemessenen Abfall der Neuropeptide CGRP [calcitonin gene-related peptide] und Substanz P in der Lunge bestätigt worden) mittels quantitativer RT-PCR ein möglicher Capsaicineinfluß auf den Leptinrezeptor-mRNA-Spiegel untersucht; 10 unbehandelte Ratten dienten als Kontrolltiere.

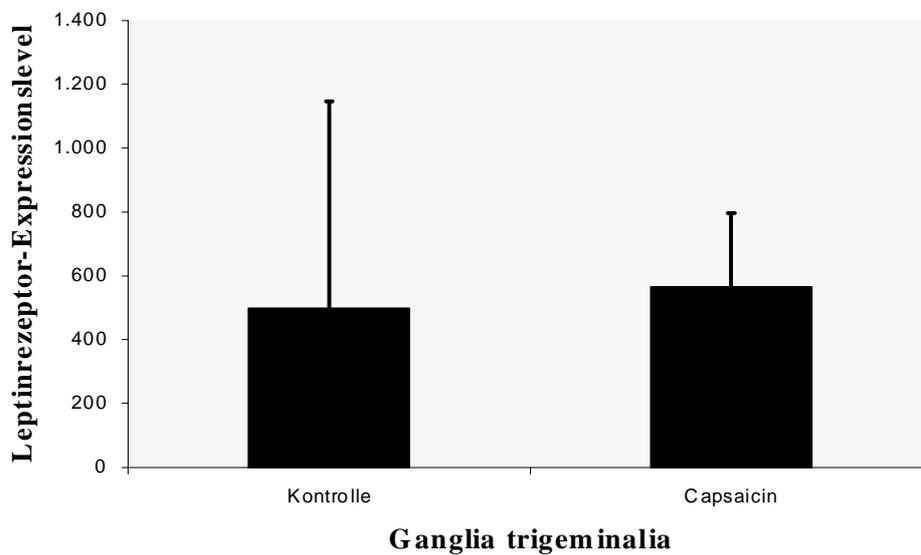
Die für die Real-time-PCR designten Primer und Sonde erkannten spezifisch die Sequenz von OB-Rb. Zusätzlich wurde für alle Proben auch GAPDH quantitativ bestimmt, so daß die gemessenen OB-Rb-Spiegel nicht nur auf die eingesetzte RNA-Menge, sondern auch auf diesen internen Standard bezogen werden konnten. Da es sich um eine vergleichende Untersuchung (Behandlungs- versus Kontrollgruppe) handelte, waren nur Relationsangaben zwischen diesen von Interesse; so wurden die 1:2-Verdünnungsschritte der Standardkurve (beginnend mit der cDNA-Menge eines RT-Ansatzes mit 1 µg RNA) mit 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 und 1024 bezeichnet und die von den Proben erhaltenen Meßwerte auf diese Standardkurvenwerte bezogen. Der Korrelationskoeffizient der OB-Rb-Standardkurve betrug 0,984.

Weder in den Ganglia nodosa noch in den Ganglia trigeminalia ergab sich bezüglich der OB-Rb-mRNA-Menge kein Unterschied zwischen beiden Tiergruppen. Dabei spielte es, da die GAPDH-Mengen konstant waren keine Rolle, ob die Meßwerte auf die RNA oder GAPDH bezogen wurden. Aufgrund der bei PCR-Reaktionen unvermeidbaren starken Schwankungen sind die Standardabweichungen groß. In den beiden folgenden Säulendiagrammen sind die Ergebnisse für die Ganglia nodosa (*Abb. 37*) und trigeminalia (*Abb. 38*) gezeigt. Daß die Capsaicin-sensitiven Neurone bezüglich der Leptinrezeptorsynthese offenbar lediglich eine untergeordnete Rolle spielen, paßt gut zu der immunhistologischen Beobachtung, daß mehr als vier Fünftel aller Leptinrezeptor-immunoreaktiven Neurone einen großen Durchmesser haben und damit nicht Capsaicin-sensitiv sind.



**Abb. 37:**

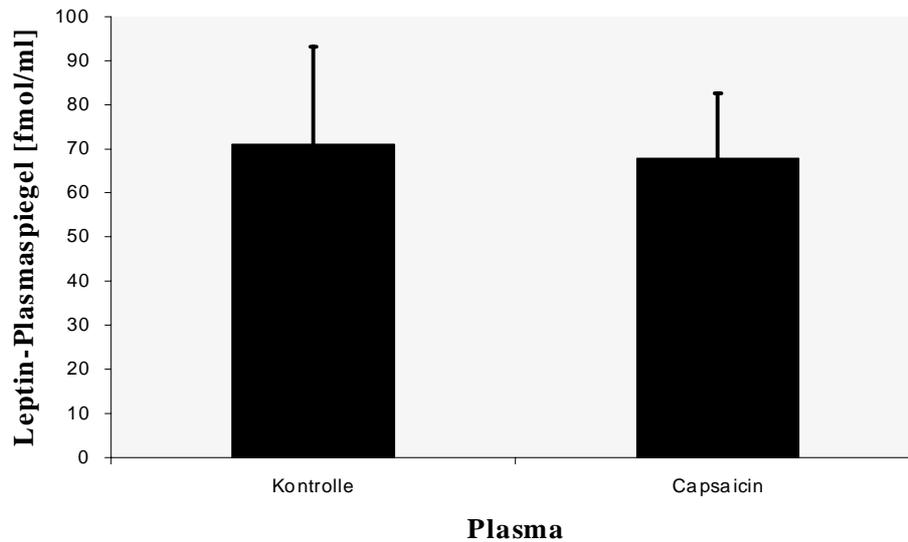
*Ergebnis der quantitativen RT-PCR-Analyse von Ganglia nodosa von Capsaicin-behandelten Ratten ( $n = 8$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $n = 8$ ) bezüglich des OB-Rb-Expressionsspiegels (angegeben als auf die Standardkurve bezogener dimensionsloser Wert)*



**Abb. 38:**

*Ergebnis der quantitativen RT-PCR-Analyse von Ganglia trigeminalia von Capsaicin-behandelten Ratten ( $n = 8$ ) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ( $n = 8$ ) bezüglich des OB-Rb-Expressionsspiegels (angegeben als auf die Standardkurve bezogener dimensionsloser Wert)*

Im Plasma der Ratten wurde mit der Fragestellung einer möglichen Beeinflussung des Leptinsystems durch die Capsaicin-bedingte nervale Schädigung der Leptinplasmaspiegel radioimmunologisch bestimmt. Doch auch hier unterschieden sich die beiden Tiergruppen nicht voneinander, wie in *Abb. 39* zu sehen ist:



***Abb. 39:***  
***Ergebnis der radioimmunologischen Bestimmung des Leptinplasmaspiegels von Capsaicin-behandelten Ratten (n = 8) im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (n = 8)***

Faßt man die Daten der Leptinrezeptorexpression im Bereich der gastralen vagalen Afferenzen zusammen, so läßt sich sagen, daß knapp ein Zehntel der im Ganglion nodosum vorhandenen Neurone (und zwar überwiegend die großen, Capsaicin-insensitiven) an der Leptinrezeptorsynthese beteiligt sind. Dieser Befund unterstützt die Hypothese einer direkten, parakrinen Wirkung des im Magenfundus produzierten und insbesondere bei fettreicher Nahrung durch Cholezystokinin verstärkt freigesetzten Leptins auf seinen unmittelbar benachbarten Rezeptor im Sinne einer im Vergleich zum Blutweg schnelleren und effektiveren kurzzeitregulatorischen Signalübermittlung zum Gehirn.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. Untersuchungen zum Einfluß einer Hochfettdiät auf das Leptinsystem

Daß Menge (hyperkalorisch vs. hypokalorisch) und Zusammensetzung (fettreich vs. fettarm) der Nahrungsaufnahme auf die Entstehung der Adipositas und diese wiederum auf die Leptinproduktion einen großen Einfluß haben, ist hinreichend bekannt. Doch wie reagiert das Leptinsystem in seiner Gesamtheit, also nicht nur das Hormon Leptin, sondern auch der Signaltransduktor OB-Rb sowie die kurze Isoform OB-Ra, auf eine besonders fettreiche Ernährung, und gibt es Veränderungen bei den mit der Leptinsignaltransduktion interferierenden Faktoren SOCS-3 und PIAS-3?

Zur Klärung dieser Fragen wurde folgendes Studiendesign gewählt: Jeweils 20 männliche Wistar-Ratten wurden über einen Zeitraum von über 4 Monaten einer Normalfuttergruppe sowie einer Hochfettdiätgruppe zugeführt. Das Normalfutter setzte sich aus 6,5 g Fett/100 g (= 15 % der metabolisierbaren Energie), 47,0 g Kohlenhydrat/100 g und 23,5 g Protein/100 g zusammen, das fettreiche Futter bestand aus 21,0 g Fett/100 g (= 42 % der metabolisierbaren Energie), 49,2 g Kohlenhydrat/100 g und 19,8 g Protein/100 g. Die Tiere konnten sich ad libidum ernähren und wurden in regelmäßigen Abständen gewogen.

Obwohl die Hochfettdiättiere zwar eine geringere Futtermenge zu sich nahmen, so daß der aufgrund des größeren Fettgehaltes höhere Brennwert des Futters sogar überkompensiert wurde und der kalorische Intake unter dem der normal ernährten Ratten lag, zeigte sich bei ihnen ein um ca. 10 % stärkerer Anstieg der Körpergewichtskurven im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtung geht mit dem Sachverhalt konform, daß Fette (im Gegensatz zu Kohlenhydraten) kaum oxidiert, sondern vorwiegend gespeichert werden (*Schutz et al., 1989; Flatt et al., 1985*). Entsprechend dem höheren Körpergewicht war das viszerale Fettgewebe deutlich vermehrt und der Leptingehalt im Serum etwa verdoppelt.

Beim Leptinrezeptor und den untersuchten Suppressoren der Signaltransduktion gab es keine Veränderungen; die mRNA-Mengen von OB-Rb und OB-Ra sowie von SOCS-3 und PIAS-3, gemessen im Hypothalamus sowie in mehreren peripheren Geweben wie

weißem Fettgewebe, Leber usw., waren bei beiden Tiergruppen gleich. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Studie, daß Leptinsynthese und OB-R-Expression unter den Bedingungen dieses Experiments unabhängig voneinander reguliert werden und daß eine Hochfettdiät keinen SOCS-3- oder PIAS-3-Expressionsanstieg induziert.

Experimentelle Studien mit verschiedenen Spezies haben gezeigt, daß eine fettreiche Ernährung generell eine stärkeren Gewichtszunahme bewirken als fettarme Nahrung, allerdings meistens durch Hyperphagie bedingt (*Scafani, 1980*). Der Grund, warum in dieser Studie der ad libidum-Konsum einer Hochfettdiät zu keinem erhöhten kalorischen Intake geführt hat, ist zwar nicht ganz klar, aber der Befund wird durch ähnliche Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die vergleichbare Protokolle verwendet haben, gestützt (*Chavez et al., 1998; Giraud et al., 1994*). Daß es, obwohl die aufgenommene kcal-Menge sogar etwas geringer war, bei den Hochfettdiättieren zu einer Fettgewebs- und damit Körpergewichtszunahme gekommen ist, demonstriert eindrücklich, daß mit der Nahrung aufgenommenes Fett in besonders hohem Maße im Körperfettdepot gespeichert wird und so zu einer stärkeren Körperfettzunahme führt als bei einer Nahrungszusammensetzung mit einem geringeren Fettanteil (*Boozer et al., 1995; Flatt, 1992*).

Während im Rahmen der vorliegenden Studie der Leptinserumspiegel proportional zum Gewicht des epididymalen Fettgewebes anstieg, blieb der Expressionsspiegel des Leptinrezeptors unverändert. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, welche bei ob/ob-Mäusen eine inverse Beziehung zwischen Leptinsignal und hypothalamischer Leptinrezeptor-Expression festgestellt hat: Die ob/ob-Mäuse hatten 2 - 3-fach erhöhte OB-Rb-mRNA-Spiegel im Vergleich zu Wildtypkontrollen; eine systemische Leptinapplikation führte bei den aufgrund einer Mutation im Leptingen nicht zur Leptinproduktion befähigten ob/ob-Mäusen zu einer Reduktion der OB-Rb-Expression, woraus man einen direkten oder indirekten Suppressoreffekt des Hormons auf seinen Rezeptor ableiten kann (*Baskin et al., 1998*). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei db/db-Mäusen erhalten: Auch hier war im Hypothalamus die OB-Rb-mRNA auf das 2 - 3-fache der Norm erhöht; zwar haben diese Mäuse eine sehr hohe Leptinproduktion, doch ist aufgrund einer Mutation im Leptinrezeptorgen die Leptinsignalwirkung gestört (*Baskin et al., 1998; Mercer et al., 1997*). Die Frage, welchen Einfluß eine akute Reduktion der Leptinsynthese durch Fasten auf die Leptinrezeptortranskription hat, wird in der Literatur unterschiedlich beantwortet. Befunden eines Anstiegs der hypothalamischen Leptinrezeptorexpression

(Baskin *et al.*, 1998), die mit deren inversen Beziehung zum Leptinsignal konform gehen, stehen Daten eines Abfalls der Leptinrezeptor-mRNA im Hypothalamus unter Fasten entgegen (Cai und Hyde, 1999; Bennett *et al.*, 1998). Diese Diskrepanz macht deutlich, daß zumindest im Zustand des Fastens die Leptinrezeptorexpression nicht ausschließlich unter der Kontrolle des zirkulierenden Leptins steht, sondern zusätzliche Faktoren wie z. B. Metabolite andere Hormone eine Rolle spielen.

Bisher gibt es nur eine Studie, in welcher bei Ratten der Effekt einer Hochfettdiät auf die Leptinrezeptorexpression untersucht worden ist: Dabei kam es bei männlichen Wistar-Ratten nach einer Hochfettdiät mit 34,0 g Fett/100 g über einen Zeitraum von 98 d in den Hirnkapillaren zu einem Anstieg der OB-Ra-mRNA auf das 11-fache des Wertes einer Kontrollgruppe, wobei die Leptinserumspiegel in der Hochfettdiätgruppe trotz Körpergewichtsanstieg um mehr als 20 % bezogen auf die Kontrolltiere nicht angestiegen waren (Boado *et al.*, 1998). Daraus schlossen die Autoren, daß die Hochregulation der OB-Ra-Expression unmittelbar durch die fettreiche Ernährung bewirkt worden sei und kein Zusammenhang mit dem zirkulierenden Leptin bestanden habe. Leider gibt die Studie keinerlei Information zur OB-Ra-Expression in neuronalen Geweben, was keinen direkten Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ermöglicht. Offenbar wird die OB-Ra-Expression in Abhängigkeit von einer Hochfettdiät in Hirnkapillaren und hypothalamischen Neuronen unterschiedlich reguliert.

Es ist bekannt, daß Leptin seine Effekte durch Aktivierung von OB-Rb und anschließende Stimulation des JAK-STAT-Systems bewirkt, welches an der Signaltransduktion einer Reihe von Zytokinen beteiligt ist (Wang *et al.*, 1997a). Außerdem gibt es mehrere Zytokin-induzierbare Inhibitoren der JAK-STAT-Signalweiterleitung, wie den Suppressor der Zytokinsignaltransduktion SOCS und den Proteininhibitor der aktivierten Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren PIAS. In vitro-Experimente haben gezeigt, daß SOCS-3 die Leptin-induzierte Signaltransduktion blockiert (Bjorbaek *et al.*, 1999). Die Tatsache, daß Leptin bei Ratten die SOCS-3-Expression im Hypothalamus und einigen peripheren Geweben nach zentraler sowie nach peripherer Applikation induziert (Emilsson *et al.*, 1999; Bjorbaek *et al.*, 1999), legt die Vermutung nahe, daß die Aktivierung von SOCS-3 an der Entwicklung der Leptinresistenz beteiligt ist. Da bei der vorliegenden Arbeit die durch die Hochfettdiät verursachte Adipositas mit einem Anstieg des Leptinserumspiegels einherging, wurde bei den Hochfettdiättieren die Möglichkeit einer Leptin-induzierten SOCS-3-mRNA-Zunahme im Hypothalamus und einigen peripheren Geweben untersucht. Zusätzlich wurde der PIAS-3-

Expressionsspiegel bestimmt, von dem bekannt ist, daß er durch Interleukin-6, welches ebenso wie Leptin über den JAK-STAT-Weg agiert, erhöht wird (*Chung et al., 1997*).

Ein möglicher Grund, warum in dieser Arbeit die Transkription von SOCS-3 und PIAS-3 unter der Hochfettdiät unverändert blieb, während exogen zugeführtes Leptin durchaus zu einer deutlichen Erhöhung des SOCS-3-mRNA-Gehaltes sowohl im Hypothalamus als auch in der Peripherie führte, könnte darin liegen, daß der Leptinserumspiegel unter der fettreichen Ernährung trotz annähernder Verdoppelung im Vergleich zur Kontrollgruppe für die Aktivierung dieser Gene zu niedrig war. In den oben genannten Experimenten mit der SOCS-3-Expressionsinduktion nach Leptinapplikation wurden sehr hohe Dosen verwendet (*Emilsson et al., 1999; Bjorbaek et al., 1999*), so daß die Serumspiegel um ein Vielfaches höher waren.

Somit führen die im Rahmen des Hochfettdiätexperimentes gewonnenen Daten, nämlich daß trotz Adipositas, Fettgewebiszunahme und Leptinserumspiegelanstieg eine Veränderung der Expressionsspiegel von OB-Rb, OB-Ra, SOCS-3 und PIAS-3 ausgeblieben ist, zu der Aussage, daß fettreiche Ernährung per se keinen meßbaren Einfluß auf die Transkription des Leptinrezeptors oder die untersuchten Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion hat.

## **4.2. Untersuchungen zum Leptintransport durch die Blut-Liquor-Schranke**

Die Hypothesen, daß das im Blut zirkulierende Leptin über den Plexus chorioideus, der Barriere zwischen Blut und Liquor cerebrospinalis (*Johanson, 1995; Cserr, 1971*) und der Stätte der Liquorproduktion (*Spector und Johanson, 1989*), aufgenommen und in den Liquor cerebrospinalis transportiert wird oder daß es über den Plexus chorioideus eine Leptin-clearance aus dem Liquor cerebrospinalis in die Blutzirkulation gibt, sind so alt wie die Entdeckung des Leptinrezeptors selbst. Schließlich wurde der Leptinrezeptor erstmals im murinen Plexus chorioideus durch Expressionsklonieren und Sequenzieren identifiziert, und zwar in überaus hohem Ausmaß die trunkierte Spleißform OB-Ra (*Tartaglia et al., 1995*).

Einige indirekte experimentelle Hinweise scheinen die Richtigkeit dieser Hypothese zu untermauern. Zum einen sind dies tierexperimentelle Untersuchungen, welche gezeigt haben, daß Leptin über einen sättigbaren Transportmechanismus aus dem in der Peri-

pherie zirkulierenden Blut ins Gehirn gelangt (*Banks et al., 1996*) und daß bei adipösen Mäusen bei Leptingabe via peripherer Infusion eine Leptinresistenz vorliegt, bei icv.-Applikation hingegen die Leptinwirkung nicht eingeschränkt ist (*Halaas et al., 1997*), woraus man die Vermutung ableiten kann, daß die Leptinresistenz bei peripherer Gabe durch einen Transportdefekt ins ZNS bedingt sein könnte. Zum anderen gibt es experimentelle Beobachtungen an Menschen: Die Leptinkonzentration im Liquor cerebrospinalis hat sich bei adipösen Probanden nicht proportional zum Leptinplasmaspiegel erhöht, sondern ist niedriger geblieben (*Caro et al., 1996; Schwartz et al., 1996*), was zu der Annahme führen kann, daß es im Bereich der Blut-Liquor-Schranke eine limitierte Transportkapazität gibt. Außerdem konnte beim Menschen über die radioimmunologische Messung des Liquor/Serum-Albumin-Quotienten gezeigt werden, daß es einen sättigbaren Transport von zirkulierendem Leptin in den Intrathekalspalt gibt (*Koistinen et al., 1998*).

All diese Experimente, bei denen eine systemische Leptininfusion mit gleichzeitiger Leptinmessung im Liquor cerebrospinalis durchgeführt worden waren, sind zwar Methoden der Wahl für die Untersuchung der Transportkinetik, sie sind aber nicht dazu geeignet, den exakten Transportweg aufzuzeigen. Es gab bisher noch keine direkte experimentelle Bestätigung der Hypothese, daß der Leptintransport zwischen Blutzirkulation und Gehirn spezifisch über die am Plexus chorioideus lokalisierte kurze Spleißvariante des Leptinrezeptors vermittelt wird.

Da für die Barrierefunktion der Blut-Liquor-Schranke sowie für die Liquorproduktion die Epithelzellen des Plexus chorioideus verantwortlich sind (*Netzky und Shuanghoti, 1975*), wurden im Rahmen dieser Arbeit Primärzellkulturen von Epithelzellen des porcinen Plexus chorioideus angelegt. Aus anderen Studien war bereits bekannt, daß Plexus chorioideus-Zellen in Kultur etliche für die Blut-Liquor-Schranke charakteristische Merkmale beibehalten (*Gath et al., 1997*).

Der Grund, warum die Plexusepithelzellen über den langen Zeitraum von 10 - 14 d kultiviert wurden, bestand zum einen in der Tatsache, daß die Zellen eine sehr langsame Populationsverdopplungszeit aufweisen, welche durch das zwecks Hemmung des Fibroblastenwachstums zugesetzte Zytosin-Arabinosid noch zusätzlich reduziert wurde, und zum anderen in der Eigenheit der Zellen, nur in Form von Zellclustern gut an den Kulturgefäßboden anzuwachsen, weshalb die Zellaussaat nie so gleichmäßig wie bei einer Einzelzellsuspension sein konnte und ein vollständig konfluenter Monolayer deshalb erst nach entsprechend längerer Kultivierungsdauer ausgebildet war. Wegen der

mangelnden Adhärenz als Einzelzellsuspension ließen sich die Plexuszellen auch nicht trypsinieren. Da Primärzellkulturen oftmals schon nach kurzer Kultivierungszeit dedifferenzieren und somit typische Charakteristika verlieren können (*Beuckmann et al., 1995; Hirota et al., 1989*), war es zunächst notwendig, die kultivierten porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellkulturen bezüglich Expression und Funktion des Leptinrezeptors zu überprüfen:

Mittels RT-PCR wurde gezeigt, daß die Zellen über die OB-R-Message verfügen. Die Polymerasekettenreaktion wurde in Ermangelung der porcinen Sequenz mit gegen den humanen Leptinrezeptor gerichteten Primern durchgeführt. Mit einem an das Transkript der extrazellulären Domäne annealenden und somit sämtliche Isoformen erkennenden Primerpaar ließ sich das zu erwartende Signal für die OB-R-Amplifikation erhalten; die Spezifität wurde durch Sequenzieren bestätigt. Der Versuch, mit einem zweiten Primerpaar OB-Rb zu detektieren, schlug fehl, entweder weil die lange Spleißvariante in nur geringen Maße exprimiert wird oder weil aufgrund der unterschiedlichen Spezies (Schwein vs. Mensch) ein Primer-Mismatch vorlag.

Zusätzlich wurde eine Northern Blot-Analyse mit einer DIG-gelabelten cRNA-Sonde, welche alle Leptinrezeptorisoformen erkannte, durchgeführt. Das durch Hybridisierung und anschließende Detektion erhaltene Signal für den Leptinrezeptor befand sich knapp oberhalb von 28 S und hatte damit ein sehr ähnliches gelelektrophoretisches Laufverhalten wie entsprechende Northern Blot-Ergebnisse bei der Maus (*Tartaglia et al., 1995*). Beim Vergleich von frischem Plexus chorioideus mit 2 Wochen lang kultivierten Zellen zeigte sich, daß der OB-R-Expressionsspiegel bezogen auf GAPDH gleich geblieben war. Absolut betrachtet war die Bandenintensität des Leptinrezeptorsignals bei den Plexus chorioideus-Zellen in Kultur sogar stärker als beim direkt vom Schlachthof geholten Gewebe, bei welchem trotz Kühlung eine Transport-bedingte teilweise RNA-Degradation unvermeidbar war.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen in Kultur nicht nur Leptinrezeptortranskripte, sondern auch das intakte und funktionstüchtige Rezeptorprotein in hohem Maße produzieren. Die für die Ligand-Rezeptor-Funktionsstudien notwendigen Inkubationen wurden mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem rekombinantem murinem Leptin durchgeführt. Die spezifische Aktivität des Tracers betrug ca. 500 Ci/mmol. Das Bindungsverhalten der kultivierten Zellen wurde mit dem von aus frischen porcinen Plexus chorioidei präparierten Zellmembranen verglichen und ergab eine nahezu identische Bindungsaffinität mit einer Dissoziationskonstanten von

$8 \times 10^{-10}$ . Dieser  $K_D$ -Wert stimmt gut mit der Affinität der Leptinbindung an mit OB-R transfizierten COS-7-Zellen überein (Tartaglia et al., 1995). Die Bindung war mit kaltem Leptin verdrängbar; außerdem war sie sättigbar.

Aufgrund der Charakterisierung der porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen hatten sich die Primärkulturen für Studien der Leptin-OB-R-Interaktion als äußerst geeignet erwiesen. Um herauszufinden, welchen Weg das  $^{125}\text{J}$ -Leptin nach der Bindung an seinen Rezeptor geht, wurde überprüft, ob die porcinen Plexus chorioideus-Zellen in der Lage sind, Leptin spezifisch, d. h. Leptinrezeptor-vermittelt, zu internalisieren. Es ist bereits gezeigt worden, daß Leptin über den auf den Hirnkapillaren der Ratte lokalisierten Leptinrezeptor internalisiert werden kann (Bjorbaek et al., 1998; Golden et al., 1997), und Studien an mit OB-R transfizierten COS-7-Zellen (Barr et al., 1999) bzw. CHO-Zellen (Uotani et al., 1999) ergaben ebenfalls die Möglichkeit der Leptininternalisation. Bezüglich des Internalisierungsverhaltens gibt es Parallelen zum verwandten Interleukin-6-Rezeptor, weil dessen mit OB-R strukturelle Ähnlichkeit aufweisende gp 130-Untereinheit eine für die Fähigkeit zur Internalisation wichtige Dileuzinsequenz aufweist (Dittrich et al., 1994).

Um zu klären, wie es sich bezüglich der OB-R-vermittelten Leptininternalisierung bei den Plexus chorioideus-Zellen verhält, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Zellen in Kultur nach Tracerinkubation bei 4 °C für 4 h gründlich mit PBS gewaschen, um nichtgebundenen Liganden möglichst vollständig zu entfernen, und dann durch Inkubation bei 37 °C für unterschiedlich lange Intervalle von 0 - 40 min dem Leptinrezeptor die Gelegenheit gegeben, das gebundene  $^{125}\text{J}$ -Leptin zu internalisieren. Schließlich wurden die Zellen zwecks Dissoziation nicht internalisierten  $^{125}\text{J}$ -Leptins vom Rezeptor mit einem sauren Puffer (pH 2,5) gewaschen und die Säurewasch-resistente Radioaktivität als Maß für die Menge an internalisiertem  $^{125}\text{J}$ -Leptin bestimmt. Das Maximum der Internalisierung wurde nach 5 - 10-minütiger 37 °C-Inkubation erreicht, danach kam es zu einem stetigen Abfall der Radioaktivität. Ein solcher Abfall wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, und zwar bei Internalisationsstudien von anderen Zytokinen wie Erythropoetin und Interleukin-6; gedeutet wurde er als Freisetzung der Radioaktivität nach Degradation des Liganden innerhalb der Zelle (Barr et al., 1999). Vielleicht trifft diese Möglichkeit auch für den Abfall der gemessenen Radioaktivität im Rahmen dieser Arbeit zu; es könnte aber auch sein, daß es sich um eine Leptinrezeptor-vermittelte Exozytose des internalisierten Hormons handelt. Letztere Inter-

pretation paßt am ehesten zu der postulierten Transzytosefunktion des Plexus chorioideus.

Aufgrund der mit den kultivierten porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen erhaltenen Ergebnisse bezüglich Expression und Funktion des Leptinrezeptors läßt sich konstatieren, daß es sich um ein praktikables und geeignetes in vitro-Modell für Untersuchungen der Leptin-OB-R-Interaktionen inklusive Transportstudien handelt, mit dem man auf zellulärer Ebene Aussagen über den Weg von  $^{125}\text{J}$ -Leptin nach dessen Bindung an seinen Rezeptor machen kann. Die Beobachtung, daß die Zellen Leptin schnell und spezifisch internalisieren, könnte den ersten Schritt des Transportes durch die Blut-Liquor-Schranke darstellen.

Ob ein Einwärtstransport in Richtung ZNS, wie er von einigen Autoren angenommen wird (*Devos et al., 1996; Lynn et al., 1996*) funktionell tatsächlich sinnvoll ist, ist nicht endgültig geklärt. Leptin hatte in Tierexperimenten, wenn es icv. injiziert wurde, zwar ähnliche Effekte bezüglich der Körpergewichtsregulation wie nach peripherer Applikation (*Campfield et al., 1995; Stephens et al., 1995*), wurde jedoch die Dosis reduziert, verschwand die Wirkung, obwohl dieselbe Leptinmenge, direkt in den Hypothalamus appliziert, die Nahrungsaufnahme deutlich verringerte (*Jacob et al., 1997*). Ein anderes Ergebnis läßt ebenfalls an der physiologischen Relevanz eines Plexus chorioideus-vermittelten Einwärtstransportes von Leptin ins Gehirn zweifeln, nämlich der Befund, daß die Koletsky-Ratte (ihr fehlen aufgrund eines mutationsbedingten prämaturnen Stop-Codons in der extrazellulären Domäne sämtliche OB-R-Isoformen (*Ishizuka et al., 1998; Takaya et al., 1996b*)) keinen niedrigeren Leptingehalt im Liquor cerebrospinalis aufweist als normale Kontrolltiere (*Wu-Peng et al., 1997*). Zwar hat die Koletsky-Ratte einen im Vergleich zur Norm etwa 10-fach erhöhten Leptinplasmaspiegel (*Wu-Peng et al., 1997*) und ist bei ihr der Transport von Leptin aus dem Blut ins Gehirn reduziert (*Kastin et al., 1999*), doch läßt sich das Vorkommen von Leptin im Liquor trotz fehlenden OB-R-Besatzes der Epithelzellen der Blut-Liquor-Schranke nur dadurch erklären, daß es neben einem spezifischen Transport durch den Plexus chorioideus einen anderen, Leptinrezeptor-unabhängigen Weg der zentralen Leptinaufnahme geben muß und das Hormon per diffusionem von den zirkumventrikulären Organen in den Liquor gelangen kann (*Bjorbaek et al., 1998*). Bedenkt man weiterhin, daß die Oberfläche der Blut-Hirn-Schranke die der Blut-Liquor-Schranke um mehr als das 1.000-fache überschreitet (*Pardridge, 1997*), erscheint die Möglichkeit, daß der Plexus chorioideus das Leptin nicht aus dem Blut, sondern aus dem Gehirn erhält, eher plausibel. Dann

wäre die OB-R-vermittelte Transportaufgabe der Blut-Liquor-Schranke vielmehr in einem Auswärtstransport im Sinne einer Leptin-clearance zu sehen (*Uotani et al., 1999; Elmquist et al., 1998*). Welche dieser Optionen tatsächlich von biologischer Bedeutung ist, bleibt noch zu klären. Sicher ist jedenfalls, daß die Plexus chorioideus-Epithelzellen zu einer entsprechenden Internalisation befähigt sind.

### **4.3. Untersuchungen zur möglichen Existenz eines löslichen Leptinrezeptors beim Menschen**

Im Rahmen der Suche nach geeigneten Geweben, Organen oder Zellen als Quelle für einen löslichen Leptinrezeptor, wurden in dieser Arbeit eine Vielzahl von OB-R-Nachweisen durchgeführt, welche die vielseitige Existenz des Rezeptors deutlich machen und zeigen, daß die Betrachtung von Leptin als bloßen Sättigungsfaktor mit Wirkung an hypothalamischen Kerngebieten bei weitem nicht dem gesamten Spektrum des Hormons gerecht wird; denn Leptin hat zusätzlich zu seiner zentralen Aufgabe mannigfaltige Funktionen in der Peripherie (*Cioffi et al., 1996; Lee et al., 1996; Tartaglia et al., 1995*).

Während der Leptinrezeptor ubiquitär vorkommt, wird Leptin zum überwiegenden Teil von den Adipozyten produziert und sezerniert, und zwar sowohl vom weißen (*Masuzaki et al., 1995; Zhang et al., 1994*) als auch vom braunen Fettgewebe (*Maffei et al., 1995a*). Die Leptin-mRNA ist in den subkutanen Adipozyten höher exprimiert als im omentalem Fettgewebe (*Montague et al., 1997b; Masuzaki et al., 1995*). Bei einer ausgeglichenen Energiebilanz ist das im Blut zirkulierende Leptin ein biologischer Marker für die Größe der Fettgewebsdepots (*Van Gaal et al., 1999*), also für die vorhandenen Energiespeicher, und korreliert deshalb mit dem Körperfettgehalt bzw. dem BMI (*Sinha et al., 1997; Considine et al., 1996; McGregor et al., 1996; Rosenbaum et al., 1996; Maffai et al., 1995b*).

Ist die Energiebilanz jedoch nicht im Steady-State, kommt es zu überschießenden Veränderungen des Leptinspiegels im Blut; so führt plötzliches Fasten vorübergehend zu einem heftigen Leptinabfall (*Boden et al., 1996; Kolaczynski et al., 1996a*), und eine akute Steigerung der Nahrungsaufnahme bewirkt einen passageren Leptinanstieg (*Kolaczynski et al., 1996b*).

Desweiteren verändert sich der Leptinspiegel proportional zur Leptin-mRNA (MacDougald *et al.*, 1995), wobei der Leptinexpressionsspiegel pro Zelle mit dem Fettgehalt und der korrespondierenden Größe des einzelnen Adipozyten korreliert (Halaas *et al.*, 1995). Auf welche Weise Adipozyten in der Lage sind, ihren eigenen Fettgehalt zu messen und die Leptinexpression daran anzupassen, ist unbekannt (Friedman und Halaas, 1998). Es gibt allerdings Hinweise auf einen direkten parakrinen oder sogar autokrinen Effekt von Leptin auf die lipolytische Aktivität von isolierten Adipozyten (Frühbeck *et al.*, 1997), und man weiß, daß Leptin die Genexpression der Azetyl-CoA-Karboxilase, die Fettsäuresynthese und die Lipidsynthese, biochemische Reaktionen, die ohne den Einfluß zentral vermittelter Regulationsvorgänge zur Fettakkumulation beitragen, reduziert (Frühbeck *et al.*, 1998b; Bai *et al.*, 1996) sowie zusätzlich zu dieser Inhibition der Lipogenese die Lipolyse stimuliert (Frühbeck *et al.*, 1997). Sympathikusaktivierung, z. B. durch Kälteexposition, führt zu einem Abfall der Leptin-mRNA-Menge und im gleichen Verhältnis zu einem Abfall des Leptinspiegels im Blut (Trayhurn, 1996; Trayhurn *et al.*, 1995).

Zwar ist das Fettgewebe die bei weitem überwiegende Produktionsstätte für Leptin, doch wird das Hormon auch von den Synzytiotrophoblasten der Plazenta (Hassink *et al.*, 1997; Hoggard *et al.*, 1997; Masuzaki *et al.*, 1997), den Epithelzellen der weiblichen Brustdrüse (O'Brien *et al.*, 1999; Smith-Kirwin *et al.*, 1998), der Magenfundusmukosa (Mix *et al.*, 1999; Bado *et al.*, 1998) sowie in mehreren Hirnarealen der Ratte (Morash *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999) synthetisiert, allerdings in so geringen Mengen, daß sie im Vergleich zum Fettgewebe quantitativ kaum ins Gewicht fallen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei der Ratte mit gegen die Leptin-mRNA gerichteten Primern ausschließlich im Fettgewebe eine starke Amplifikation erhalten, doch weder im Hypothalamus, noch im Hippokampus, dem Mesenzephalon, dem Zerebellum oder dem Kortex kam es zu einem positiven Signal. Der Widerspruch zur Literatur ist wahrscheinlich durch eine geringere methodische Sensitivität zu erklären; es könnte aber auch sein, daß der jeweilige Tierstamm oder der aktuelle Ernährungsstatus des Tieres Einflußgrößen bezüglich einer zentralen Leptinsynthese darstellen.

Im Gegensatz zum Hormon kommt der Leptinrezeptor im Organismus an den unterschiedlichsten Lokalisationen vor, wie u. a. in nicht-hypothalamischen Hirnarealen, in subkutanem und viszeralem Fettgewebe, in der Plazenta, der Nabelschnur, dem kardiovaskulären System, den Nieren, dem Pankreas, den Knochenmarkzellen und den Leukozyten, um nur einige wenige Beispiele zu nennen.

Der Befund, daß der Leptinrezeptor nicht nur im Hypothalamus, sondern in vielen anderen Bereichen des Gehirns exprimiert wird, macht deutlich, daß nicht bloß das Sättigungszentrum Wirkort des Leptinsystems ist. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde der unerwartete Befund erhoben, daß der OB-Rb-Expressionsspiegel im Zerebellum den im Hypothalamus um das 5-fache übersteigt (*Bjorbaek et al., 1998*); eine funktionelle Erklärung dafür steht noch aus.

Auf seine eigene Produktionsstätte, das Fettgewebe, wirkt Leptin vielleicht im Sinne eines negativen feed back, eventuell sogar para- oder autokrin (*Frühbeck et al., 1997*).

Das Vorkommen des Leptinrezeptors in Plazenta und Nabelschnur läßt auf eine direkte periphere Wirkung auf Wachstum und Entwicklung des Feten schließen. Die Bedeutung von Leptin in der fetoplazentaren Einheit wird allein schon durch die Leptineigenproduktion der Plazenta deutlich (*Henson et al., 1998; Hassink et al., 1997; Hoggard et al., 1997; Masuzaki et al., 1997*). In diesem Kontext sei der Einfluß des Leptinsystems auf die Reproduktion erwähnt, welcher bereits durch die durch Leptingabe reversible Infertilität der ob/ob-Mäuse (*Mounzih et al., 1997; Barash et al., 1996; Chehab et al., 1996*) sowie die Amenorrhö bei Anorexia nervosa (*Audi et al., 1998; Stoving et al., 1998*) offenkundig ist. In der Evolution ist es sicher sinnvoll, wenn eine Substanz wie Leptin das reproduktive System via Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse darüber informiert, ob die Fettdepots für eine erfolgreiche Fortpflanzung ausreichen; in Hungerperioden wäre das Überleben des Nachwuchses kaum gewährleistet.

Die Wirkung des Leptinsystems auf das Gefäßendothel wurde durch in vitro- und in vivo-Experimente aufgezeigt, in welchen eine angiogenetische Aktivität von Leptin nachgewiesen wurde (*Bouloumie et al., 1998*); so induziert Leptin bei normalen Ratten in der Kornea eine Neovaskularisation, während bei den Leptinrezeptor-defizienten fa/fa-Ratten diese Wirkung ausbleibt (*Sierra-Honigmann et al., 1998*).

Leptin wirkt außerdem auf das Tubulussystem der Nieren im Sinne einer Steigerung der Diurese und Natriurese. Eine zweistündige Leptininfusion in eine *A. renalis* führt bei der Ratte zu einer ipsilateralen Erhöhung des Urinvolumens und der Natriumausscheidung ohne Veränderung der glomerulären Filtrationsrate (*Haynes et al., 1997*).

Sehr interessant ist die Rolle von Leptin und seinem Rezeptor beim Pankreas. Leptin ist ein Inhibitor der Insulinsekretion (*Ahren und Havel, 1999; Poitout et al., 1998; Emilsson et al., 1997; Fehmann et al., 1997; Kieffer et al., 1997*), indem es das Zellmembranpotential erhöht und die intrazelluläre Kalziumkonzentration erniedrigt. Man kann sich die adipoinsuläre Achse so vorstellen, daß einerseits Insulin eine Signalwir-

kung für den Adipozyten hat und die Leptinexpression und -sekretion erhöht (*Rentsch und Chiesi, 1996; Wabitsch et al., 1996*), andererseits das von diesem freigesetzte Leptin im Sinne eines negativen feed back dem endokrinen Pankreas meldet, daß kein weiteres Insulin mehr benötigt wird, um die Fettspeicher aufzufüllen. Insofern könnte eine nicht ausreichende Insulinsuppression durch Leptin, sei es durch einen Hormon- oder einen Rezeptordefekt, zu einer Hyperinsulinämie mit einer Beeinträchtigung des Glukosemetabolismus führen.

Im Knochenmark scheint Leptin an der Hämatopoese beteiligt zu sein (*Umemoto et al., 1997; Bennett et al., 1996*). Die unmittelbare räumliche Nähe des Fettmarks zum blutbildenden Marks könnte auf einen lokalen Effekt des dort produzierten Leptins hinweisen.

Bei Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten liegt eine Leptinbeteiligung an Proliferation und Differenzierung vor (*Santos-Alvarez et al., 1999; Lord et al., 1998; Gainsford et al., 1996*).

Alles in allem sind die Kenntnisse über die spezifischen Aufgaben von Leptin an den peripheren Organen bzw. Geweben bislang nur fragmentarisch. Die Tatsache, daß praktisch jede Zelle den Leptinrezeptor aufweist, läßt, neben den lokalen Effekten, zusätzlich eine nicht-organspezifische periphere Leptinwirkung vermuten, in dem Sinne, daß jede einzelne Zelle zum Zwecke der Kontrolle ihres eigenen Energiestoffwechsels über den Energiehaushalt des Gesamtorganismus informiert wird. Es wird davon ausgegangen, daß Leptin in Nonadipozyten die intrazelluläre Homöostase von Fettsäuren und Triglyzeriden reguliert; bleibt dieser Regulationsmechanismus wegen eines OB-R-Defektes aus, so kann es in den betroffenen Zellen zu einem 100-fachen Anstieg kommen (*Unger et al., 1999*).

Über die Funktion des löslichen, zirkulierenden Leptinrezeptors OB-Re weiß man bislang nur wenig. Während OB-Re lediglich bei Maus und Ratte nachgewiesen wurde (*Fei et al., 1997; Takaya et al., 1996a*) und dort u. a. von der Plazenta freigesetzt wird (*Yamaguchi et al., 1998; Gavrilova et al., 1997*), scheint beim Menschen diese Spleißvariante nicht zu existieren (*Chua et al., 1997*). Doch könnte der lösliche Leptinrezeptor beim Menschen durch enzymatisches Shedding gebildet werden.

Um Funktionsstudien bezüglich des löslichen Leptinrezeptors beim Menschen durchzuführen, wurde als Testsystem eine humane Zelllinie verwendet, welche sich durch eine besonders hohe Leptinrezeptorexpression auszeichnet. Es handelt sich um die Erythroleukämiezelllinie K562, die 1971 aus dem Pleuraerguß eines an chronisch myeloischer

Leukämie erkrankten Patienten im terminalen Blastenschub isoliert wurde (Lozzio und Lozzio, 1975). Die undifferenzierten Blastenzellen weisen mit einer Populationsverdopplungszeit von 12 h ein sehr schnelles Wachstum auf und liegen als Suspensionskultur vor oder wachsen in einer Soft-Agar-Matrix (Koeffler und Golde, 1980). Die pluripotenten Zellen besitzen die Fähigkeit, sich myeloid oder erythroid zu differenzieren (Shen et al., 1992; Gahmberg und Andersson, 1981), weshalb sie u. a. den Erythropoetinrezeptor exprimieren (McCaffery et al., 1989; Fraser et al., 1988). Die Erkenntnis, daß sie auch den Leptinrezeptor in besonders hohem Maße exprimieren (Cioffi et al., 1996), machte diese Zelllinie als mögliches in vitro-Modell für Untersuchungen des Leptinrezeptors interessant.

Deshalb wurden die K562-Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst auf Transkriptionsebene (RT-PCR, Northern Blot), Translationsebene (Western Blot) und Funktionsebene (Ligand-Rezeptor-Bindungsstudien, Cross-Linking, Internalisierungssassay) charakterisiert: Die Zelllinie exprimiert sowohl die lange als auch die kurze OB-R-Isoform, letztere in weit größerer Menge; dabei ist sie gegenüber äußeren Stimuli wie Leptin, Insulin, Dexamethason oder Östradiol unter Konstanthaltung der Leptinrezeptor-Message weitgehend stabil. Das Western Blot-Signal befindet sich auf der gleichen Höhe wie das im humanen Plexus chorioideus. Die K562-Zellen zeichnen sich weiterhin durch ein hochaffines, sättig- und verdrängbares Bindungsverhalten gegenüber Leptin aus. Beim Cross-Linking ergibt sich ein Komplex von ca. 170 kD. Warum die Zellen trotz ihres starken OB-Ra-Besatzes Leptin nicht internalisieren, ist unklar.

Wenn man im Zellkulturüberstand das mögliche Vorhandensein eines löslichen Leptinrezeptors überprüfen möchte, muß man absolut sicherstellen, daß keinerlei Artefakte zu einem falsch positiven Ergebnis führen. Das Vorliegen von OB-R im Kulturmedium selbst konnte leicht ausgeschlossen, indem dieses als Background-Negativkontrolle mitgemessen wurde. Weitaus aufwendiger war der sichere Ausschluß einer Kontamination mit in das Medium übergegangenen Zellmembranbruchstücken; dazu wurde der zu untersuchende Kulturüberstand zunächst durch ein 0,22 µm-Filter gegeben und nach anschließender Volumenreduktion über eine Sepharose-Säule aufgetrennt, um Eluate mit höhermolekularen Bestandteilen auszuschließen. Somit weiß man, daß die nach dem Sephadex G75-Säulenlauf im Überstand gemessene, verdrängbare <sup>125</sup>J-Leptin-Bindung durch ein lösliches Bindungsprotein mit hoher und spezifischer Affinität bewirkt wird, und man weiß aufgrund der nachfolgenden Western Blot-Analyse weiterhin, daß das Laufverhalten dieses Bindungsproteins dem des Leptinrezeptors entspricht. Aufgrund

der Glykosylierung des Rezeptors verläuft die Bande im SDS-Page sehr breit, so daß es kaum möglich ist, die kurze von einer löslichen Spleißform sicher zu unterscheiden, zumal diese in ihrem Molekulargewicht um höchstens 10 kD auseinanderliegen (OB-Ra: 894 AS vs. OB-Re: 805 AS).

Könnte es also auch möglich sein, daß K562-Zellen untergehen und dabei noch nicht membranständiger OB-Ra aus dem endoplasmatischen Retikulum passiv freigesetzt wird? Auch diese Möglichkeit wurde durch die folgenden Zusatzexperimente ausgeschlossen: Erstens wurde gezeigt, daß es auch bei längerer Kultivierungsdauer zu keinem meßbarem Zelluntergang gekommen war, da intrazelluläre Substanzen, wie beispielsweise LDH, nicht angestiegen waren. Zweitens wurden K562-Zellen unterschiedlich lang unter Standardbedingungen kultiviert, oder sie wurden über einen konstanten Zeitabschnitt bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert, wobei sich herausstellte, daß die im Western Blot erhaltene Leptinrezeptorbande aus dem Zellkulturüberstand beim längsten Kultivierungszeitraum (48 h) sowie der höchsten Inkubationstemperatur (37 °C) am intensivsten war, was für eine aktive kontinuierliche Freisetzung eines löslichen Leptinrezeptors spricht. Unklar bleibt allerdings, ob es sich um OB-Re oder um einen durch enzymatisches Shedding aus einer anderen Isoform, wie z. B. OB-Ra, hervorgegangenen löslichen Rezeptor handelt.

Welche physiologische Rolle könnte dem löslichen Leptinrezeptor zukommen?

Als zirkulierendes Vehikel könnte er Leptin durch Bindung inaktivieren, also quasi als Puffer für das im Blut befindliche Leptin fungieren (*Lollmann et al., 1997*), indem er das Andocken an den membranständigen Rezeptor antagonisiert, wie Studien an mit der extrazellulären Domäne von OB-R transfizierten COS-7-Zellen ergeben haben (*Liu et al., 1997*). Diese Hypothese wurde durch Messungen der Serumspiegel des löslichen Leptinrezeptors bei Patienten mit Diabetes mellitus bekräftigt, bei welchen, insbesondere bei denjenigen mit einer Insulinresistenz, erhöhte Werte an zirkulierendem OB-R gefunden wurden, die (im Gegensatz zu Normalprobanden) mit dem BMI korrelierten (*Lewandowski et al., 1999*); die nun nicht mehr ausreichende Insulinsuppression durch Leptin könnte ein Grund für das Vorliegen einer Hyperinsulinämie sein. Desweiteren wurde bei gesunden Probanden herausgefunden, daß der Spiegel an löslichem Rezeptor im Verlauf der Pubertät abfällt, woraus die Autoren dieser Studie folgerten, daß dieses Abfallen eine Reduktion der Expression von trunkiertem OB-R reflektiere und damit das Leptin dem langen, zur Signaltransduktion und somit zur Vermittlung einer biologischen Wirkung befähigten Rezeptor vermehrt zur Verfügung stehe (*Quinton et al.,*

1999). Außerdem ist bekannt, daß auch andere Zytokine in löslicher Form im Blut zirkulieren (Leung *et al.*, 1987), wobei sie in den meisten Fällen die Wirkung ihres Liganden inhibieren (Li *et al.*, 1998).

Andere Autoren hingegen postulieren eine gegensätzliche Funktion des zirkulierenden Leptinrezeptors, da bei schlanken Menschen der Hauptanteil des Leptins in gebundener Form vorliegt, während es bei adipösen Menschen vorwiegend in seiner freien Form vorkommt (Sinha und Caro, 1998).

Zusammenfassend läßt sich bezüglich der humanen Zelllinie K562 sagen, daß die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Zellen auf Transkriptions-, Translations- und Funktionsebene sie nunmehr zu einem gut geeigneten und besonders interessanten Studienobjekt für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich des Leptinrezeptors gemacht hat.

#### **4.4. Untersuchungen zur möglichen Leptin-vermittelten Signalübertragung über nervale Afferenzen**

Gemäß seiner Kontrollfunktion bei Nahrungsaufnahme und Energiestoffwechsel findet sich der Leptinrezeptor, insbesondere OB-Rb, im zentralen Nervensystem (Lee *et al.*, 1996; Tartaglia *et al.*, 1995), aber auch in peripheren Geweben und Organen wie z. B. dem Fettgewebe und dem Gastrointestinaltrakt (Fei *et al.*, 1997). Der humorale Weg von Leptin als vom Fettgewebe sezerniertem Hormon (Zhang *et al.*, 1994), welches über den Blutweg ins Gehirn gelangt (Golden *et al.*, 1997), ist hinreichend beschrieben. Doch ist es auch möglich, daß Leptin die Botschaft des Sättigungsgefühls aus der Peripherie ins ZNS auf dem Nervenweg übermittelt?

Dieser potentielle Weg der Signalweiterleitung erscheint insbesondere wegen der Tatsache, daß Leptin in geringen Mengen im Magenfundus synthetisiert wird, wie mittels RT-PCR und Immunhistologie in gastralen Mukosazellen gezeigt worden ist (Mix *et al.*, 1999; Bado *et al.*, 1998), funktionell besonders interessant zu sein, und zwar insofern, als eine Wirkung des im Magen produzierten Hormons durch parakrine Wirkung auf afferente Nervenfasern eine besonders schnelle und effektive Form der Signalweitergabe wäre. Weiterhin ist bekannt, daß Nahrungsaufnahme und die Hormone Cholezystokinin und Gastrin Reize für eine verstärkte Sekretion von Leptin von der Magenschleimhaut darstellen (Bado *et al.*, 1998), was die Möglichkeit eines diesbezüglichen

physiologischen Mechanismus' der Kurzzeitregulation des Sättigungsgefühls umso wahrscheinlicher wirken läßt.

Daß den Magen innervierende vagale Afferenzen auf Leptin ansprechen könnten, wurde bereits vor der Entdeckung der gastralen Leptinsynthese vermutet und als mögliche Wirkung des zirkulierenden Hormons angegeben (*Wang et al., 1997b*). Die Autoren identifizierten in elektrophysiologischen Experimenten an einer isolierten Magen-Vagus-Präparation nach intraarterieller Bolusinjektion von Leptin zwei unterschiedliche Typen von Leptin-empfindlichen Vagusafferenzen. Die Leptin-induzierte Steigerung der Nervenaktivität wurde beim Typ 1 durch Cholezystokinin nicht beeinflusst, während beim Typ 2 zur Aktivierung eine Vorbehandlung mit Cholezystokinin notwendig war. Beide Typen wiesen eine Mechanosensitivität auf und reagierten auf intraarterielle Cholezystokininapplikation, was wahrscheinlich macht, daß es sich um C-Faser-Neurone handelt. Daß die meisten dieser Leptin-sensitiven Nervenendigungen im Fundusbereich lokalisiert wurden, paßt sehr gut zu der ebenfalls dort vorhandenen Leptinsynthese (*Mix et al., 1999; Bado et al., 1998*) und läßt vermuten, daß nicht zirkulierendes, sondern gastrales Leptin die genannten Effekte bewirkt.

Wenn entsprechende parakrine Reaktionswege tatsächlich existieren, dann sollten die gastralen Nervenendigungen den Leptinrezeptor tragen und die Leptinsynthese in den Perikaryen dieser Neurone, welche sich im Ganglion nodosum, zu welchem u. a. Vagusafferenzen aus dem Magen ziehen, lokalisiert sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Ratte in den im Ganglion nodosum befindlichen Perikaryen der vagalen Afferenzen nach der OB-R-Message gesucht. RT-PCR's mit gegen sämtliche Spleißvarianten sowie gegen die lange Isoform gerichteten Primern ergaben positive Signale. Darüberhinaus wurden mit der Methode der Laser-assistierten Zellisolierung (*Fink et al., 1998; Kummer et al., 1998*) in 6 µm-Kryoschnitten des Ganglion nodosum einzelne Neurone von der umgebenden Glia separiert und in ihnen mit gegen OB-Rb sowie gegen OB-Ra gerichteten Primerpaaren die entsprechenden Leptinrezeptoren nachgewiesen. Die Primer waren Intron-überspannend, so daß bei dieser Methode, bei der aus den Zellen direkt, ohne vorherige RNA-Extraktion, die RT-Reaktion durchgeführt wird, weshalb das Vorhandensein von genomischer DNA möglich ist, ein falsch positives Ergebnis ausgeschlossen werden konnte; selbstverständlich wurden sämtliche PCR-Amplifikate sequenziert, um ihre Spezifität zu verifizieren. Während Ob-Rb zur Signaltransduktion via JAK-STAT-vermittelter Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren befähigt ist (*Hakansson und Meister, 1998; Baumann*

*et al.*, 1996; Ghilardi *et al.*, 1996; Vaisse *et al.*, 1996) und auf diese Weise zentral ein Sättigungsgefühl auslösen kann, kann OB-Ra dieser Aufgabe nur in geringerem Maße nachkommen (Bjorbaek *et al.*, 1997), besitzt aber, wie bei nicht-neuronalen Zellen gezeigt wurde, die Fähigkeit zur Leptininternalisation (Bjorbaek *et al.*, 1998), was die Frage aufwirft, ob diese Form der Ligand-Rezeptor-Interaktion im Sinne eines retrograden axonalen Transports auch bei den gastralen Afferenzen des N. vagus eine Rolle spielen könnte.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekularbiologisch gewonnenen Befunde wurden durch Fluoreszenzhistochemie auch für die Proteinebene bestätigt. Ungefähr 8 % der im Ganglion nodosum mit einem gegen sämtliche Spleißformen gerichteten Antikörper untersuchten Neurone waren OB-R-immunoreaktiv; die Spezifität wurde durch Verdrängung nach Präabsorption gezeigt. Von den OB-R-positiven Neuronen hatten ca. 80 % einen großen ( $\geq 25 \mu\text{m}$ ) und ca. 20 % einen kleinen ( $< 25 \mu\text{m}$ ) Durchmesser.

Zwecks weiterer Charakterisierung der den Leptinrezeptor exprimierenden Neurone wurde untersucht, ob in den Ganglia nodosa von am 2. und 3. postnatalen Tag mit Capsaicin behandelten Ratten die Ob-R-Expression verändert ist. Capsaicin, die scharfe Komponente der Peperoni (Helliwell *et al.*, 1998), ist ein Neurotoxin (Maggi und Meli, 1988), welches selektiv auf unmyelinisierte Nervenfasern wirkt (Lynn, 1990; Fitzgerald, 1983). Capsaicin-sensitive Nervenfasern befinden sich u. a. auch im Gastrointestinaltrakt (Rodrigo *et al.*, 1985; Matthews und Cuello, 1984). Obwohl, wie die Messungen von Substanz P und CGRP gezeigt haben, die Capsaingabe wirksam war, blieb der OB-Rb-Expressionsspiegel konstant. Dieser Befund stimmt gut mit der Beobachtung überein, daß in der Immunhistochemie ca. 80 % der OB-R-positiven Neurone einen großen Durchmesser haben und deshalb wahrscheinlich myelinisiert, also Capsaicin-insensitiv sind. Bedenkt man, daß insgesamt nur etwa 8 % der im Ganglion nodosum befindlichen Neurone mit dem OB-R-Antikörper anfärbbar waren und bei der Methode der quantitativen RT-PCR ein zu diskriminierender Unterschied mindestens den Faktor 1,5 betragen muß, geht das erhaltene Ergebnis mit den anderen Daten konform.

Die bisher genannten Ergebnisse wurden durch die folgenden Daten einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Fischer, *persönliche Mitteilung*) ergänzt:

Um die OB-R-Immunoreaktivität in den Neuronen des Ganglion nodosum neurochemisch zu beschreiben, wurden Doppelfärbungen mit gegen Substanz P sowie gegen das Lektin IB4 gerichteten Antikörpern durchgeführt, die jeweils mit dem OB-R-Antikörper

kombiniert wurden. Dabei waren die OB-R-immunoreaktiven Neurone mit großem Durchmesser Substanz P- und Lektin IB4-negativ; bei den kleinen OB-R-immunoreaktiven Neuronen wurden drei Subgruppen identifiziert, und zwar zeigten 59 % weder eine Reaktion mit dem Substanz P- noch mit dem Lektin IB4-Antikörper, 33 % waren Substanz P-immunoreaktiv und 8 % Lektin IB4-positiv. Diese Befunde machen deutlich, daß die OB-R-immunoreaktiven Neurone des Ganglion nodosum eine heterogene Gruppe darstellen; die allesamt Lektin IB4-negativen Neurone mit einem Durchmesser  $\geq 25 \mu\text{m}$  könnten myelinisierte A-Faser-Neurone sein, während es sich bei den Substanz P-positiven kleinkalibrigen Neuronen um C-Faser-Neurone handeln könnte und die Lektin IB4-positiven Neurone Nicht-Peptid-C-Faser-Primärafferenzen zuzuordnen sein könnten (Ambalavanar und Morris, 1992). In Anbetracht der Tatsache, daß der abdominale N. vagus der Ratte fast vollständig aus unmyelinisierten Fasern besteht (Prechtl und Powley, 1990), erscheint es sinnvoll, davon auszugehen, daß ein Teil der großkalibrigen OB-R-immunoreaktiven Neurone nicht zu den subdiaphragmalen Eingeweiden projiziert, sondern eher die Lunge innerviert, zumal über 90 % der vom Ganglion nodosum zum Respirationstrakt ziehenden Nervenfasern mechanosensitive A $\delta$ -Fasern sind (Ricco et al., 1996).

Zum Ganglion nodosum ziehen nicht nur Nervenfasern vom Magen, sondern auch von anderen Bereichen des Gastrointestinaltrakts sowie von thorakalen Organen wie der Lunge und dem Herz (Zhuo et al., 1997). Um sicherzustellen, daß zumindest einige der OB-R-immunoreaktiven Neurone im Ganglion nodosum das Leptinsignal im Magen aufnehmen, wurde ein retrogrades neuronales Tracing durchgeführt. Dazu wurde in die Magenfunduswand der fluoreszierende Farbstoff Fast Blue injiziert und überprüft, ob dieser Marker zu den Ganglionzellen transportiert wird. Etliche Neurone des Ganglion nodosum färbten sich an; 16 % davon waren OB-R-positiv, ein Befund, der die Hypothese untermauert, daß vagale Afferenzen gastrales Leptin detektieren können (Bado et al., 1998).

Desweiteren wurde ein Vagusnerv der Ratte in vitro mit einer Pinzette gequetscht und 24 h später immunhistochemisch untersucht. Dabei war eine deutliche Akkumulation der OB-R-Immunoreaktivität proximal der mechanischen Läsion zu sehen. Diese Beobachtung zeigt, daß die Leptinrezeptoren nach ihrer Synthese in den Perikaryen zu den Nervenendigungen transportiert werden, wo sie die Aufgabe der Leptin-induzierten Signalweiterleitung übernehmen können. Indirekte Evidenz dafür, daß vagale Afferenzen den peripheren Leptinspiegel messen und diese Information zur Medulla oblongata

weiterleiten können, wurde durch Studien erhalten, welche demonstrierten, daß Zellen des ventrobasalen Hypothalamus und des Stammhirns, vor allem des Nucl. tractus solitarii und des Nucl. parabrachialis, durch eine systemische Leptingabe aktiviert wurden (*Elmqvist et al., 1997*).

Immunhistologische Studien bei der Ratte bezüglich der OB-R-Immunoreaktivität in der Magenwand des Fundus zeigten zwar selten, aber dennoch regelmäßig OB-R-positive Nervenfasern. Wenn das primäre Antiserum mit dem Peptid präabsorbiert wurde, verschwand die Anfärbung; sie war somit spezifisch.

Faßt man all die genannten Befunde zusammen, kann man folgenden Pathway der kurzzeitregulatorischen Wirkung durch das in der Magenfundusmukosa produzierte Leptin postulieren: Das besonders nach Aufnahme fettreicher Nahrung Cholezystokinin-vermittelt verstärkte sezernierte Leptin könnte parakrin an den an freien Nervenendigungen vagaler Afferenzen lokalisierten Leptinrezeptoren binden und auf diese Weise schneller und effizienter als über die Blutzirkulation ein Sättigungssignal zu den hypothalamischen Kerngebieten weiterleiten.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Leptin ist ein hauptsächlich von den Adipozyten sezerniertes Proteohormon, das dem Hypothalamus den Status quo der Fettgewebsspeicher meldet und via Reduktion der Nahrungsaufnahme und Stimulation des Energieverbrauchs maßgeblich an der Regulation des Körpergewichts beteiligt ist.

Seine Wirkung wird über den nicht nur in den hypothalamischen Kerngebieten lokalisierten, sondern ubiquitär vorhandenen membranständigen Leptinrezeptor (OB-R) vermittelt. OB-R unterliegt am 3'-Ende posttransmembranal einem alternativen Spleißen, das zu verschieden langen Isoformen führt. OB-Rb, die lange Spleißform, ist zur Signaltransduktion befähigt. Bei OB-Ra, OB-Rc und OB-Rd, den kurzen Spleißvarianten, ist der intrazelluläre Bereich trunziert, so daß sie an der Signalvermittlung kaum beteiligt sind; ihnen wird eine Transportfunktion für Leptin, z. B. beim Übergang vom Blut ins Gehirn, zugeschrieben. OB-Re, der bisher nur beim Nager nachgewiesene lösliche Rezeptor, endet bereits vor der transmembranalen Domäne und zirkuliert im Blut, möglicherweise als Vehikel für Leptin.

Beim Menschen ist die Ätiologie der Adipositas multifaktoriell. In den Fällen, in denen das Leptinsystem in die Pathogenese der Adipositas involviert ist, sind prinzipiell zwei Defekte vorstellbar: Entweder ist die Leptinproduktion zu gering, oder es liegt eine Leptinresistenz vor. Diese könnte durch eine fehlerhafte Bildung des OB-Rb oder Veränderungen im Signaltransduktionssystem, einen OB-Ra,c,d-Fehler (unzureichender Transport von Leptin ins Gehirn) oder ein Übermaß an OB-Re (mangelnde biologische Verfügbarkeit von Leptin durch Bindung an das lösliche Vehikel) bedingt sein. Unter diesem Aspekt wurden in der vorliegenden Arbeit vier Forschungskomplexe bearbeitet:

1. Wie wirkt sich eine langfristige Hochfettdiät auf den Expressionsspiegel des Leptinrezeptors aus, und hat sie einen Einfluß auf die Expression von Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion?
2. Kann die Blut-Liquor-Barriere für Leptin durch einen Leptinrezeptor-vermittelten Transport überwunden werden?
3. Gibt es beim Menschen eine lösliche Form des Leptinrezeptors?
4. Gibt es neben dem humoralen Weg auch nervale Afferenzen, die die Signalübertragung von Leptin aus der Peripherie zum ZNS vermitteln?

Die Experimente ergaben folgende Ergebnisse:

- Ad 1: Eine langfristige Hochfettdiät führte bei ad-libidum-fressenden Wistar-Ratten trotz einer im Vergleich zu einer normal ernährten Kontrollgruppe geringeren kalorischen Aufnahme zur Adipositas mit einem vergrößerten Anteil an viszeralem Fettgewebe und einem erhöhten Leptinserumspiegel. Die im Hypothalamus und mehreren peripheren Geweben gemessenen mRNA-Spiegel von OB-Rb und OB-Ra sowie den Suppressoren der Zytokin-induzierten Signaltransduktion SOCS-3 und PIAS-3 blieben stabil, d. h. deren Expression wurde weder durch den erhöhten Fettanteil in der Nahrung noch durch die gesteigerte Leptinsynthese reguliert. Es ist somit anzunehmen, daß bei genetisch nicht zur Fettsucht neigenden Tieren eine Hochfettdiät eine Leptinresistenz nicht auf dem Boden einer verminderten OB-R- oder einer erhöhten Signaltransduktionssuppressor-Expression induziert.
- Ad 2: Es wurden Primärkulturen von porcinen Plexus chorioideus-Epithelzellen angelegt und gezeigt, daß die Zellen OB-R exprimieren. Leptin wird spezifisch und mit hoher Affinität gebunden und internalisiert. Dies könnte der erste Schritt eines Transportes von Leptin durch die Blut-Liquor-Schranke sein.
- Ad 3: Die sich durch einen sehr hohen OB-R-Gehalt auszeichnende humane Erythroleukämiezelllinie K562 wurde bezüglich OB-Ra und OB-Rb auf mRNA- und Proteinebene sowie durch Ligand-Rezeptor-Bindungsassays umfangreich charakterisiert. Es wurde gezeigt, daß die Zellen temperatur- und zeitabhängig löslichen OB-R sezernieren.
- Ad 4: Es konnte bei Sprague-Dawley-Ratten erstmalig das Vorhandensein von OB-R in gastralen Vagusafferenzen auf Transkriptions- ( RT-PCR´s von OB-Rb und OB-Ra in durch Laser-assistiertes Zellpicken isolierten Neuronen des Ganglion nodosum) und Translationsebene (immunhistochemische Detektion von OB-R in Neuronen des Ganglion nodosum) gezeigt werden, ein Befund, der die Hypothese unterstützt, daß in der Magenfundusmukosa synthetisiertes und bei fettreicher Nahrungsaufnahme durch Cholezystokinin verstärkt sezerniertes Leptin im Sinne eines kurzzeitregulatorischen parakrinen Wirkmechanismus´ anstelle des humoralen einen direkten nervalen Weg der Signalübermittlung zum Hypothalamus einschlagen kann.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

**Ahren, B., Havel, P.J.**

Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells).

*Am J Physiol*, 277, R959-66 (1999).

**Ambalavanar, R., Morris, R.**

The distribution of binding by isolectin I-B4 from *Griffonia simplicifolia* in the trigeminal ganglion and brainstem trigeminal nuclei in the rat.

*Neuroscience*, 47, 421-9 (1992).

**Audi, L., Mantzoros, C.S., Vidal-Puig, A., Vargas, D., Gussinye, M., Carrascosa, A.**

Leptin in relation to resumption of menses in women with anorexia nervosa.

*Mol Psychiatry*, 3, 544-7 (1998).

**Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., Lewin, M.J.**

The stomach is a source of leptin.

*Nature*, 394, 790-3 (1998).

**Bai, Y., Zhang, S., Kim, K.S., Lee, J.K., Kim, K.H.**

Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones.

*J Biol Chem*, 271, 13939-42 (1996).

**Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., Maness, L.M.**

Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin.

*Peptides*, 17, 305-11 (1996).

**Barash, I.A., Cheung, C.C., Weigle, D.S., Ren, H., Kabigting, E.B., Kuijper, J.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A.**

Leptin is a metabolic signal to the reproductive system.

*Endocrinology*, 137, 3144-7 (1996).

**Barinaga, M.**

"Obese" protein slims mice.

*Science*, 269, 475-6 (1995).

**Barr, V.A., Lane, K., Taylor, S.I.**

Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms.

*J Biol Chem*, 274, 21416-24 (1999).

**Baskin, D.G., Seeley, R.J., Kuijper, J.L., Lok, S., Weigle, D.S., Erickson, J.C., Palmiter, R.D., Schwartz, M.W.**

Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting.

*Diabetes*, 47, 538-43 (1998).

**Baumann, H., Symes, A.J., Comeau, M.R., Morella, K.K., Wang, Y., Friend, D., Ziegler, S.F., Fink, J.S., Gearing, D.P.**

Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells.

*Mol Cell Biol*, 14, 138-46 (1994).

**Baumann, H., Morella, K.K., White, D.W., Dembski, M., Bailon, P.S., Kim, H., Lai, C.F., Tartaglia, L.A.**

The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8374-8 (1996).

**Bennett, B.D., Solar, G.P., Yuan, J.Q., Mathias, J., Thomas, G.R., Matthews, W.**

A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis.

*Curr Biol*, 6, 1170-80 (1996).

**Bennett, P.A., Lindell, K., Karlsson, C., Robinson, I.C., Carlsson, L.M., Carlsson, B.**

Differential expression and regulation of leptin receptor isoforms in the rat brain: effects of fasting and oestrogen.

*Neuroendocrinology*, 67, 29-36 (1998).

**Beuckmann, C., Hellwig, S., Galla, H.J.**

Induction of the blood/brain-barrier-associated enzyme alkaline phosphatase in endothelial cells from cerebral capillaries is mediated via cAMP.

*Eur J Biochem*, 229, 641-4 (1995).

**Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., Flier, J.S.**

Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor.

*J Biol Chem*, 272, 32686-95 (1997).

**Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L., Flier, J.S.**

Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels.

*Endocrinology*, 139, 3485-91 (1998).

**Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., El-Haschimi, K., Kelly, J., Ahima, R.S., Hileman, S., Flier, J.S.**

Activation of SOCS-3 messenger ribonucleic acid in the hypothalamus by ciliary neurotrophic factor.

*Endocrinology*, 140, 2035-43 (1999).

**Blundell, J.E., Latham, C.J.**

Serotonergic influences on food intake: effect of 5-hydroxytryptophan on parameters of feeding behaviour in deprived and free-feeding rats.

*Pharmacol Biochem Behav*, 11, 431-7 (1979).

**Blundell, J.E.**

Food intake and body weight regulation.

In: Bouchard, C. and Bray, G.A. (Hrsg.), *Regulation of body weight; biological and behavioral mechanisms*, 111-33, John Wiley, London (1996).

**Boado, R.J., Golden, P.L., Levin, N., Pardridge, W.M.**

Up-regulation of blood-brain barrier short-form leptin receptor gene products in rats fed a high fat diet.

*J Neurochem*, 71, 1761-4 (1998).

**Boden, G., Chen, X., Mozzoli, M., Ryan, I.**

Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects.

*J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3419-23 (1996).

**Boozer, C.N., Schoenbach, G., Atkinson, R.L.**

Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically.

*Am J Physiol*, 268, E546-50 (1995).

**Bouchard, C., Tremblay, A., Despres, J.P., Nadeau, A., Lupien, P.J., Theriault, G., Dussault, J., Moorjani, S., Pinault, S., Fournier, G.**

The response to long-term overfeeding in identical twins.

*N Engl J Med*, 322, 1477-82 (1990).

**Bouloumie, A., Drexler, H.C., Lafontan, M., Busse, R.**

Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis.

*Circ Res*, 83, 1059-66 (1998).

**Bray, G.A.**

Obesity: historical development of scientific and cultural ideas.

*Int J Obes*, 14, 909-26 (1990).

**Bray, G.A.**

Obesity.

In: Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L. and Longo, D.L. (Hrsg.), *Harrison's principles of internal medicine*, 454-62, Mc Graw-Hill, New York (1998).

**Cai, A., Hyde, J.F.**

The human growth hormone-releasing hormone transgenic mouse as a model of modest obesity: differential changes in leptin receptor (OBR) gene expression in the anterior pituitary and hypothalamus after fasting and OBR localization in somatotrophs.

*Endocrinology*, 140, 3609-14 (1999).

**Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., Burn, P.**

Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.

*Science*, 269, 546-9 (1995).

**Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P.**

The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks.

*Horm Metab Res*, 28, 619-32 (1996).

**Campfield, L.A., Smith, F.J.**

Overview: neurobiology of OB protein (leptin).

*Proc Nutr Soc*, 57, 429-40 (1998).

**Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., Considine, R.V.**

Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance.

*Lancet*, 348, 159-61 (1996).

**Chagnon, Y.C., Perusse, L., Bouchard, C.**

The human obesity gene map: the 1997 update.

*Obes Res*, 6, 76-92 (1998).

**Chavez, M., Seeley, R.J., Havel, P.J., Friedman, M.I., Matson, C.A., Woods, S.C., Schwartz, M.W.**

Effect of a high-fat diet on food intake and hypothalamic neuropeptide gene expression in streptozotocin diabetes.

*J Clin Invest*, 102, 340-6 (1998).

**Chehab, F.F., Lim, M.E., Lu, R.**

Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin.

*Nat Genet*, 12, 318-20 (1996).

**Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., Morgenstern, J.P.**

Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice.

*Cell*, 84, 491-5 (1996).

**Chua, S.C., Jr., Koutras, I.K., Han, L., Liu, S.M., Kay, J., Young, S.J., Chung, W.K., Leibel, R.L.**

Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts.

*Genomics*, 45, 264-70 (1997).

**Chung, W.K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Leibel, R.L.**

Mapping of the OB receptor to 1p in a region of nonconserved gene order from mouse and rat to human.

*Genome Res*, 6, 431-8 (1996).

**Chung, C.D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., Shuai, K.**

Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3.

*Science*, 278, 1803-5 (1997).

**Cioffi, J.A., Shafer, A.W., Zupancic, T.J., Smith-Gbur, J., Mikhail, A., Platika, D., Snodgrass, H.R.**

Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction.

*Nat Med*, 2, 585-9 (1996).

**Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P., Guy-Grand, B.**

A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.

*Nature*, 392, 398-401 (1998).

**Cohn, C., Joseph, D.**

Influence of body weight and body fat on appetite of „normal“ lean and obese rats.

*Yale J Biol Med*, 34, 598-607 (1962).

**Coleman, D.L.**

Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice.

*Diabetologia*, 14, 141-8 (1978).

**Considine, R.V., Considine, E.L., Williams, C.J., Nyce, M.R., Magosin, S.A., Bauer, T.L., Rosato, E.L., Colberg, J., Caro, J.F.**

Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity.

*J Clin Invest*, 95, 2986-8 (1995).

**Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L. et al.**

Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N*

*Engl J Med*, 334, 292-5 (1996).

**Coons, E.E., Quartermain, D.**

Motivational depression associated with norepinephrine-induced eating from the hypothalamus: resemblance to the ventromedial hyperphagic syndrome.

*Physiol Behav*, 5, 687-92 (1970).

**Cserr, H.F.**

Physiology of the choroid plexus.

*Physiol Rev*, 51, 273-311 (1971).

**Darnell, J.E., Jr.**

Reflections on STAT3, STAT5, and STAT6 as fat STATs.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6221-4 (1996).

**Devos, R., Richards, J.G., Campfield, L.A., Tartaglia, L.A., Guisez, Y., van der Heyden, J., Tavernier, J., Plaetinck, G., Burn, P.**

OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 5668-73 (1996).

**Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Mullberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P.C., Graeve, L.**

Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand- induced endocytosis of the IL-6 receptor.

*J Biol Chem*, 269, 19014-20 (1994).

**Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., Saper, C.B.**

Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem.

*Endocrinology*, 138, 839-42 (1997).

**Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., Saper, C.B.**

Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain.

*J Comp Neurol*, 395, 535-47 (1998).

**Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A., Morton, N.M., Davenport, M.**

Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion.

*Diabetes*, 46, 313-6 (1997).

**Emilsson, V., Arch, J.R., de Groot, R.P., Lister, C.A., Cawthorne, M.A.**

Leptin treatment increases suppressors of cytokine signaling in central and peripheral tissues.

*FEBS Lett*, 455, 170-4 (1999).

**Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., Cone, R.D.**

Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome.

*Nature*, 385, 165-8 (1997).

**Fehmman, H.C., Peiser, C., Bode, H.P., Stamm, M., Staats, P., Hedetoft, C., Lang, R.E., Goke, B.**

Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion.

*Peptides*, 18, 1267-73 (1997).

**Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., Friedman, J.M.**

Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7001-5 (1997).

**Fink, L., Seeger, W., Ermert, L., Hanze, J., Stahl, U., Grimminger, F., Kummer, W., Bohle, R.M.**

Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking.  
*Nat Med*, 4, 1329-33 (1998).

**Firmbach-Kraft, I., Byers, M., Shows, T., Dalla-Favera, R., Krolewski, J.J.**

tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes.  
*Oncogene*, 5, 1329-36 (1990).

**Fitzgerald, M.**

Capsaicin and sensory neurones--a review.  
*Pain*, 15, 109-30 (1983).

**Flatt, J.P., Ravussin, E., Acheson, K.J., Jequier, E.**

Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances.  
*J Clin Invest*, 76, 1019-24 (1985).

**Flatt, J.P.**

The biochemistry of energy expenditure.  
*In: Bjorntorp, P. and Bordoff, B.N. (Hrsg.), Obesity, 100-16, Lippincott, Philadelphia (1992).*

**Fraser, J.K., Lin, F.K., Berridge, M.V.**

Expression and modulation of specific, high affinity binding sites for erythropoietin on the human erythroleukemic cell line K562.  
*Blood*, 71, 104-9 (1988).

**Friedman, J.M., Halaas, J.L.**

Leptin and the regulation of body weight in mammals.  
*Nature*, 395, 763-70 (1998).

**Fruhbeck, G., Aguado, M., Martinez, J.A.**

In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin.  
*Biochem Biophys Res Commun*, 240, 590-4 (1997).

**Fruhbeck, G., Garcia-Granero, M., Martinez, J.A.**

Age-related differences in the thermogenic and ponderal effects following the administration of fragment peptides from the rat ob protein.  
*Regul Pept*, 73, 83-7 (1998a).

**Fruhbeck, G., Jebb, S.A., Prentice, A.M.**

Leptin: physiology and pathophysiology.  
*Clin Physiol*, 18, 399-419 (1998b).

**Fu, X.Y., Schindler, C., Improta, T., Aebersold, R., Darnell, J.E., Jr.**

The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7840-3 (1992).

**Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Seto, Y., Nagata, S.**

Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor.  
*Cell*, 61, 341-50 (1990).

**Gahmberg, C.G., Andersson, L.C.**

K562--a human leukemia cell line with erythroid features.  
*Semin Hematol*, 18, 72-7 (1981).

**Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S., Hilton, D.J.**

Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14564-8 (1996).

**Gath, U., Hakvoort, A., Wegener, J., Decker, S., Galla, H.J.**

Porcine choroid plexus cells in culture: expression of polarized phenotype, maintenance of barrier properties and apical secretion of CSF-components.

*Eur J Cell Biol*, 74, 68-78 (1997).

**Gavrilova, O., Barr, V., Marcus-Samuels, B., Reitman, M.**

Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor.

*J Biol Chem*, 272, 30546-51 (1997).

**Gearing, D.P., Thut, C.J., VandeBos, T., Gimpel, S.D., Delaney, P.B., King, J., Price, V., Cosman, D., Beckmann, M.P.**

Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130.

*Embo J*, 10, 2839-48 (1991).

**Gemoll, W.**

Griechisch-deutsches Schul- und Handwörterbuch  
*Freitag-Verlag, München (1954).*

**Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H., Skoda, R.C.**

Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6231-5 (1996).

**Gibbs, J., Young, R.C., Smith, G.P.**

Cholecystokinin decreases food intake in rats.

*J Comp Physiol Psychol*, 84, 488-95 (1973).

**Giraud, S.Q., Kotz, C.M., Grace, M.K., Levine, A.S., Billington, C.J.**

Rat hypothalamic NPY mRNA and brown fat uncoupling protein mRNA after high-carbohydrate or high-fat diets.

*Am J Physiol*, 266, R1578-83 (1994).

**Golden, P.L., Maccagnan, T.J., Pardridge, W.M.**

Human blood-brain barrier leptin receptor. Binding and endocytosis in isolated human brain microvessels.

*J Clin Invest*, 99, 14-8 (1997).

**Grandison, L., Guidotti, A.**

Stimulation of food intake by muscimol and beta endorphin.

*Neuropharmacology*, 16, 533-6 (1977).

**Grasso, P., Leinung, M.C., Ingher, S.P., Lee, D.W.**

In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice: localization of leptin activity to domains between amino acid residues 106-140.

*Endocrinology*, 138, 1413-8 (1997).

**Hakansson, M.L., Meister, B.**

Transcription factor STAT3 in leptin target neurons of the rat hypothalamus.

*Neuroendocrinology*, 68, 420-7 (1998).

**Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., Friedman, J.M.**

Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene.

*Science*, 269, 543-6 (1995).

**Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A., Friedman, J.M.**

Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8878-83 (1997).

**Hassink, S.G., de Lancey, E., Sheslow, D.V., Smith-Kirwin, S.M., DM, O.C., Considine, R.V., Opentanova, I., Dostal, K., Spear, M.L., Leef, K., Ash, M., Spitzer, A.R., Funanage, V.L.**

Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development?

*Pediatrics*, 100, E1 (1997).

**Haynes, W.G., Sivitz, W.I., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L.**

Sympathetic and cardiorenal actions of leptin.

*Hypertension*, 30, 619-23 (1997).

**Hebebrand, J., Remschmidt, H.**

Body weight under genetic control.

*Med Klin*, 90, 403-10 (1995).

**Heldin, C.H.**

Dimerization of cell surface receptors in signal transduction.

*Cell*, 80, 213-23 (1995).

**Helliwell, R.J., McLatchie, L.M., Clarke, M., Winter, J., Bevan, S., McIntyre, P.**  
Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia.  
*Neurosci Lett*, 250, 177-80 (1998).

**Henson, M.C., Swan, K.F., O'Neil, J.S.**  
Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term.  
*Obstet Gynecol*, 92, 1020-8 (1998).

**Herold, G.**  
Adipositas.  
*In: Herold, G. (Hrsg.), Innere Medizin, 563-6, Köln (1999).*

**Hervey, G.R.**  
The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats.  
*Am J Physiol*, 145, 336-352 (1959).

**Hirota, K., Kawanishi, T., Sunouchi, M., Ohno, Y., Takanaka, A., Yamazoe, Y., Kato, R., Murakoshi, Y.**  
Induction of cytochrome P-450c and P-450d by metyrapone in the primary culture of rat hepatocytes.  
*Jpn J Pharmacol*, 51, 136-9 (1989).

**Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P., Mercer, J.G.**  
Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 11073-8 (1997).

**Hummel, K.P., Dickie, M.M., Coleman, D.L.**  
Diabetes, a new mutation in the mouse.  
*Science*, 153, 1127-8 (1966).

**Ingalls, A.M., Dickie, M.M., Snell, G.D.**  
Obese, a new mutation in the mouse.  
*J Hered*, 41, 317-8 (1950).

**Ishizuka, T., Ernsberger, P., Liu, S., Bedol, D., Lehman, T.M., Koletsky, R.J., Friedman, J.E.**  
Phenotypic consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene (fak) in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats (SHROB).  
*J Nutr*, 128, 2299-306 (1998).

**Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H., Mori, K., Okazaki, T., Satoh, N., Shigemoto, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S. et al.**  
Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene.  
*J Biol Chem*, 270, 27728-33 (1995).

**Jacob, R.J., Dziura, J., Medwick, M.B., Leone, P., Caprio, S., During, M., Shulman, G.I., Sherwin, R.S.**

The effect of leptin is enhanced by microinjection into the ventromedial hypothalamus.  
*Diabetes*, 46, 150-2 (1997).

**Johanson, C.E.**

Ventricles and cerebrospinal fluid.

In: Michael, P. (Hrsg.), *Neuroscience in medicine*, 171-96, Lippincott, Philadelphia (1995).

**Kastin, A.J., Pan, W., Maness, L.M., Koletsky, R.J., Ernberger, P.**

Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor.

*Peptides*, 20, 1449-53 (1999).

**Kieffer, T.J., Heller, R.S., Leech, C.A., Holz, G.G., Habener, J.F.**

Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in pancreatic beta-cells.

*Diabetes*, 46, 1087-93 (1997).

**Kishimoto, T., Taga, T., Akira, S.**

Cytokine signal transduction.

*Cell*, 76, 253-62 (1994).

**Koeffler, H.P., Golde, D.W.**

Human myeloid leukemia cell lines: a review.

*Blood*, 56, 344-50 (1980).

**Koistinen, H.A., Karonen, S.L., Iivanainen, M., Koivisto, V.A.**

Circulating leptin has saturable transport into intrathecal space in humans.

*Eur J Clin Invest*, 28, 894-7 (1998).

**Kolaczynski, J.W., Considine, R.V., Ohannesian, J., Marco, C., Opentanova, I., Nyce, M.R., Myint, M., Caro, J.F.**

Responses of leptin to short-term fasting and refeeding in humans: a link with ketogenesis but not ketones themselves.

*Diabetes*, 45, 1511-5 (1996a).

**Kolaczynski, J.W., Ohannesian, J.P., Considine, R.V., Marco, C.C., Caro, J.F.**

Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans.

*J Clin Endocrinol Metab*, 81, 4162-5 (1996b).

**Konturek, S.J., Tasler, J., Jaworek, J., Dobrzanska, M., Coy, D.H., Schally, A.V.**

Comparison of TRH and anorexigenic peptide on food intake and gastrointestinal secretions.

*Peptides*, 2 Suppl 2, 235-40 (1981).

**Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S.**  
Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin.  
*Nature*, 393, 72-6 (1998).

**Kummer, W., Fink, L., Dvorakova, M., Haberberger, R., Bohle, R.M.**  
Rat cardiac neurons express the non-coding R-exon (exon 1) of the cholinergic gene locus.  
*Neuroreport*, 9, 2209-12 (1998).

**Kyrkouli, S.E., Stanley, B.G., Seirafi, R.D., Leibowitz, S.F.**  
Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain.  
*Peptides*, 11, 995-1001 (1990).

**Larson, K.A., Anderson, D.B.**  
The effects of lipectomy on remaining adipose tissue depots in the Sprague Dawley rat.  
*Growth*, 42, 469-77 (1978).

**Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., Friedman, J.M.**  
Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.  
*Nature*, 379, 632-5 (1996).

**Leung, D.W., Spencer, S.A., Cachianes, G., Hammonds, R.G., Collins, C., Henzel, W.J., Barnard, R., Waters, M.J., Wood, W.I.**  
Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression.  
*Nature*, 330, 537-43 (1987).

**Levine, A.S., Morley, J.E.**  
Peripherally administered somatostatin reduces feeding by a vagal mediated mechanism.  
*Pharmacol Biochem Behav*, 16, 897-902 (1982).

**Lewandowski, K., Horn, R., CJ, O.C., Dunlop, D., Medley, G.F., P, O.H., Brabant, G.**  
Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies.  
*J Clin Endocrinol Metab*, 84, 300-6 (1999).

**Li, C., Ioffe, E., Fidahusein, N., Connolly, E., Friedman, J.M.**  
Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice.  
*J Biol Chem*, 273, 10078-82 (1998).

**Li, H.Y., Wang, L.L., Yeh, R.S.**  
Leptin immunoreactivity in the central nervous system in normal and diabetic rats.  
*Neuroreport*, 10, 437-42 (1999).

**Liu, C., Liu, X.J., Barry, G., Ling, N., Maki, R.A., De Souza, E.B.**

Expression and characterization of a putative high affinity human soluble leptin receptor.

*Endocrinology*, 138, 3548-54 (1997).

**Lollmann, B., Gruninger, S., Stricker-Krongrad, A., Chiesi, M.**

Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues.

*Biochem Biophys Res Commun*, 238, 648-52 (1997).

**Lord, G.M., Matarese, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I.**

Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression.

*Nature*, 394, 897-901 (1998).

**Lozzio, C.B., Lozzio, B.B.**

Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome.

*Blood*, 45, 321-34 (1975).

**Luttinger, D., King, R.A., Sheppard, D., Strupp, J., Nemeroff, C.B., Prange, A.J., Jr.**

The effect of neurotensin on food consumption in the rat.

*Eur J Pharmacol*, 81, 499-503 (1982).

**Lynn, B.**

Capsaicin: actions on nociceptive C-fibres and therapeutic potential.

*Pain*, 41, 61-9 (1990).

**Lynn, R.B., Cao, G.Y., Considine, R.V., Hyde, T.M., Caro, J.F.**

Autoradiographic localization of leptin binding in the choroid plexus of ob/ob and db/db mice.

*Biochem Biophys Res Commun*, 219, 884-9 (1996).

**MacDougald, O.A., Hwang, C.S., Fan, H., Lane, M.D.**

Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9034-7 (1995).

**Maffei, M., Fei, H., Lee, G.H., Dani, C., Leroy, P., Zhang, Y., Proenca, R., Negrel, R., Ailhaud, G., Friedman, J.M.**

Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus.

*Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6957-60 (1995a).

**Maggi, C.A., Meli, A.**

The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons.

*Gen Pharmacol*, 19, 1-43 (1988).

**Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, N., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y. et al.**

Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue.

*Diabetes*, 44, 855-8 (1995).

**Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., Nakao, K.**

Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.

*Nat Med*, 3, 1029-33 (1997).

**Matkovic, V., Ilich, J.Z., Badenhop, N.E., Skugor, M., Clairmont, A., Klisovic, D., Landoll, J.D.**

Gain in body fat is inversely related to the nocturnal rise in serum leptin level in young females.

*J Clin Endocrinol Metab*, 82, 1368-72 (1997).

**Matthews, M.R., Cuello, A.C.**

The origin and possible significance of substance P immunoreactive networks in the prevertebral ganglia and related structures in the guinea-pig.

*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 306, 247-76 (1984).

**McCaffery, P.J., Fraser, J.K., Lin, F.K., Berridge, M.V.**

Subunit structure of the erythropoietin receptor.

*J Biol Chem*, 264, 10507-12 (1989).

**McGregor, G.P., Desaga, J.F., Ehlenz, K., Fischer, A., Heese, F., Hegele, A., Lammer, C., Peiser, C., Lang, R.E.**

Radiomunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects.

*Endocrinology*, 137, 1501-4 (1996).

**Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Trayhurn, P.**

Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization.

*FEBS Lett*, 387, 113-6 (1996).

**Mercer, J.G., Moar, K.M., Rayner, D.V., Trayhurn, P., Hoggard, N.**

Regulation of leptin receptor and NPY gene expression in hypothalamus of leptin-treated obese (ob/ob) and cold-exposed lean mice.

*FEBS Lett*, 402, 185-8 (1997).

**Meyer, J.M., Stunkard, A.J.**

Twin studies of human obesity.

In: Bouchard, C. (Hrsg.), *The genetics of obesity*, 63-78, CRC Press, Boca Raton (1994).

**Misra, A., Garg, A.**

Leptin, its receptor and obesity.  
*J Investig Med*, 44, 540-8 (1996).

**Mix, H., Manns, M.P., Wagner, S., Widjaja, A., Brabant, G.**

Expression of leptin and its receptor in the human stomach.  
*Gastroenterology*, 117, 509 (1999).

**Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., S, O.R.**

Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans.  
*Nature*, 387, 903-8 (1997a).

**Montague, C.T., Prins, J.B., Sanders, L., Digby, J.E., S, O.R.**

Depot- and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution.  
*Diabetes*, 46, 342-7 (1997b).

**Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., Ur, E.**

Leptin gene expression in the brain and pituitary gland.  
*Endocrinology*, 140, 5995-8 (1999).

**Morley, J.E., Levine, A.S., Grace, M., Kneip, J.**

Dynorphin-(1-13), dopamine and feeding in rats.  
*Pharmacol Biochem Behav*, 16, 701-5 (1982).

**Morley, J.E., Levine, A.S., Grace, M., Kneip, J.**

Peptide YY (PYY), a potent orexigenic agent.  
*Brain Res*, 341, 200-3 (1985).

**Mounzih, K., Lu, R., Chehab, F.F.**

Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males.  
*Endocrinology*, 138, 1190-3 (1997).

**Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T., Kishimoto, T.**

Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 11349-53 (1991).

**Nakashima, K., Narazaki, M., Taga, T.**

Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130.  
*FEBS Lett*, 403, 79-82 (1997).

**Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T., Taga, T.**

Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2285-9 (1994).

**Netzky, M., Shuanghoti, S.**

The choroid plexus in health and disease.  
*University Press of Virginia, Charlottesville (1975).*

**Nicholson, S.E., Hilton, D.J.**

The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction.  
*J Leukoc Biol, 63, 665-8 (1998).*

**O'Brien, S.N., Welter, B.H., Price, T.M.**

Presence of leptin in breast cell lines and breast tumors.  
*Biochem Biophys Res Comm, 259, 695-8 (1999).*

**O'Rahilly, S.**

Life without leptin.  
*Nature, 392, 330-1 (1998).*

**Ogawa, Y., Masuzaki, H., Isse, N., Okazaki, T., Mori, K., Shigemoto, M., Satoh, N., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y. et al.**

Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats.  
*J Clin Invest, 96, 1647-52 (1995).*

**Ohki-Hamazaki, H., Watase, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, J., Kikuyama, S., Wada, E., Wada, K.**

Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity.  
*Nature, 390, 165-9 (1997).*

**Pardridge, W.M.**

Drug delivery to the brain.  
*J Cereb Blood Flow Metab, 17, 713-31 (1997).*

**Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., Collins, F.**

Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice.  
*Science, 269, 540-3 (1995).*

**Poitout, V., Rouault, C., Guerre-Millo, M., Briaud, I., Reach, G.**

Inhibition of insulin secretion by leptin in normal rodent islets of Langerhans.  
*Endocrinology, 139, 822-6 (1998).*

**Prechtel, J.C., Powley, T.L.**

The fiber composition of the abdominal vagus of the rat.  
*Anat Embryol (Berl), 181, 101-15 (1990).*

**Pschyrembel, W.**

Klinisches Wörterbuch.  
*De Gruyter, Berlin (1998).*

**Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., Maratos-Flier, E.**

A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour.

*Nature*, 380, 243-7 (1996).

**Quinton, N.D., Smith, R.F., Clayton, P.E., Gill, M.S., Shalet, S., Justice, S.K., Simon, S.A., Walters, S., Postel-Vinay, M.C., Blakemore, A.I., Ross, R.J.**

Leptin binding activity changes with age: the link between leptin and puberty.

*J Clin Endocrinol Metab*, 84, 2336-41 (1999).

**Rentsch, J., Levens, N., Chiesi, M.**

Recombinant ob-gene product reduces food intake in fasted mice.

*Biochem Biophys Res Commun*, 214, 131-6 (1995).

**Rentsch, J., Chiesi, M.**

Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes.

*FEBS Lett*, 379, 55-9 (1996).

**Rezek, M., Novin, D.**

The effects of serotonin on feeding in the rabbit.

*Psychopharmacologia*, 43, 255-8 (1975).

**Ricco, M.M., Kummer, W., Biglari, B., Myers, A.C., Udem, B.J.**

Interganglionic segregation of distinct vagal afferent fibre phenotypes in guinea-pig airways.

*J Physiol (Lond)*, 496, 521-30 (1996).

**Roberts, S.B., Greenberg, A.S.**

The new obesity genes.

*Nutr Rev*, 54, 41-9 (1996).

**Rodrigo, J., Polak, J.M., Fernandez, L., Ghatei, M.A., Mulderry, P., Bloom, S.R.**

Calcitonin gene-related peptide immunoreactive sensory and motor nerves of the rat, cat, and monkey esophagus.

*Gastroenterology*, 88, 444-51 (1985).

**Rohner-Jeanrenaud, F., Walker, C.D., Greco-Perotto, R., Jeanrenaud, B.**

Central corticotropin-releasing factor administration prevents the excessive body weight gain of genetically obese (fa/fa) rats.

*Endocrinology*, 124, 733-9 (1989).

**Rosenbaum, M., Nicolson, M., Hirsch, J., Heymsfield, S.B., Gallagher, D., Chu, F., Leibel, R.L.**

Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin.

*J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3424-7 (1996).

**Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G., Small, C.J., Edwards, C.M., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., Smith, D.M., Yagaloff, K., Ghatei, M.A., Bloom, S.R.**

A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo.

*Endocrinology*, 139, 4428-31 (1998).

**Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., Arch, J.R., Buckingham, R.E., Haynes, A.C., Carr, S.A., Annan, R.S., McNulty, D.E., Liu, W.S., Terrett, J.A., Elshourbagy, N.A., Bergsma, D.J., Yanagisawa, M.**

Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.

*Cell*, 92, 573-85 (1998).

**Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Sanchez-Margalet, V.**

Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes.

*Cell Immunol*, 194, 6-11 (1999).

**Scafani, A.**

Dietary obesity.

*In: Stunkard, A.J. (Hrsg.), Obesity, 166-81, Saunders, Philadelphia (1980).*

**Schäffler, A., Schmidt, S.**

Biologie, Anatomie, Physiologie für die Pflegeberufe.

*Jungjohann, Neckarsulm (1995).*

**Schutz, Y., Flatt, J.P., Jequier, E.**

Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity.

*Am J Clin Nutr*, 50, 307-14 (1989).

**Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., Porte, D., Jr.**

Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans.

*Nat Med*, 2, 589-93 (1996).

**Shen, W.F., Detmer, K., Mathews, C.H., Hack, F.M., Morgan, D.A., Largman, C., Lawrence, H.J.**

Modulation of homeobox gene expression alters the phenotype of human hematopoietic cell lines.

*Embo J*, 11, 983-9 (1992).

**Sierra-Honigmann, M.R., Nath, A.K., Murakami, C., Garcia-Cardena, G., Papapetropoulos, A., Sessa, W.C., Madge, L.A., Schechner, J.S., Schwabb, M.B., Polverini, P.J., Flores-Riveros, J.R.**

Biological action of leptin as an angiogenic factor.

*Science*, 281, 1683-6 (1998).

**Sinha, M.K., Ohannesian, J.P., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Magosin, S., Marco, C., Caro, J.F.**

Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects.

*J Clin Invest*, 97, 1344-7 (1996a).

**Sinha, M.K., Sturis, J., Ohannesian, J., Magosin, S., Stephens, T., Heiman, M.L., Polonsky, K.S., Caro, J.F.**

Ultradian oscillations of leptin secretion in humans.

*Biochem Biophys Res Commun*, 228, 733-8 (1996b).

**Sinha, M.K.**

Human leptin: the hormone of adipose tissue.

*Eur J Endocrinol*, 136, 461-4 (1997).

**Sinha, M.K., Caro, J.F.**

Clinical aspects of leptin.

*Vitam Horm*, 54, 1-30 (1998).

**Smith-Kirwin, S.M., DM, O.C., De Johnston, J., Lancey, E.D., Hassink, S.G., Funanage, V.L.**

Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk.

*J Clin Endocrinol Metab*, 83, 1810-3 (1998).

**Sorensen, T.I., Stunkard, A.J.**

Overview of the adoption studies.

In: Bouchard, C. (Hrsg.), *The genetics of obesity*, 49-61, CRC Press, Boca Raton (1994).

**Spector, R., Johanson, C.E.**

The mammalian choroid plexus.

*Sci Am*, 261, 68-74 (1989).

**Spina, M., Merlo-Pich, E., Chan, R.K., Basso, A.M., Rivier, J., Vale, W., Koob, G.F.**

Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide.

*Science*, 273, 1561-4 (1996).

**Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr., Yancopoulos, G.D.**

Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine- based motifs in cytokine receptors.

*Science*, 267, 1349-53 (1995).

**Stanley, B.G., Leibowitz, S.F.**

Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus.

*Life Sci*, 35, 2635-42 (1984).

**Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A. et al.**

The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product.  
*Nature*, 377, 530-2 (1995).

**Stoving, R.K., Vinten, J., Handberg, A., Ebbesen, E.N., Hangaard, J., Hansen-Nord, M., Kristiansen, J., Hagen, C.**

Diurnal variation of the serum leptin concentration in patients with anorexia nervosa.  
*Clin Endocrinol (Oxf)*, 48, 761-8 (1998).

**Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., Strosberg, A.D.**

A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity.  
*Nat Genet*, 18, 213-5 (1998).

**Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T.**

Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.  
*Cell*, 58, 573-81 (1989).

**Takaya, K., Ogawa, Y., Hiraoka, J., Hosoda, K., Yamori, Y., Nakao, K., Koletsky, R.J.**

Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat.  
*Nat Genet*, 14, 130-1 (1996a).

**Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Nakao, K.**

Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs-- identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats.  
*Biochem Biophys Res Commun*, 225, 75-83 (1996b).

**Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J. et al.**

Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R.  
*Cell*, 83, 1263-71 (1995).

**Tartaglia, L.A.**

The leptin receptor.  
*J Biol Chem*, 272, 6093-6 (1997).

**Trayhurn, P., Duncan, J.S., Rayner, D.V.**

Acute cold-induced suppression of ob (obese) gene expression in white adipose tissue of mice: mediation by the sympathetic system.  
*Biochem J*, 311, 729-33 (1995).

**Trayhurn, P.**

New insights into the development of obesity: obese genes and the leptin system.  
*Proc Nutr Soc*, 55, 783-91 (1996).

**Turton, M.D., D, O.S., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J., Bloom, S.R.**

A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding.  
*Nature*, 379, 69-72 (1996).

**Umemoto, Y., Tsuji, K., Yang, F.C., Ebihara, Y., Kaneko, A., Furukawa, S., Nakahata, T.**

Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells.  
*Blood*, 90, 3438-43 (1997).

**Unger, R.H., Zhou, Y.T., Orci, L.**

Regulation of fatty acid homeostasis in cells: novel role of leptin.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2327-32 (1999).

**Uotani, S., Bjorbaek, C., Tornoe, J., Flier, J.S.**

Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation.  
*Diabetes*, 48, 279-86 (1999).

**Vaccarino, F.J., Bloom, F.E., Rivier, J., Vale, W., Koob, G.F.**

Stimulation of food intake in rats by centrally administered hypothalamic growth hormone-releasing factor.  
*Nature*, 314, 167-8 (1985).

**Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Jr., Stoffel, M., Friedman, J.M.**

Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice.  
*Nat Genet*, 14, 95-7 (1996).

**Van Gaal, L.F., Wauters, M.A., Mertens, I.L., Considine, R.V., De Leeuw, I.H.**

Clinical endocrinology of human leptin.  
*Int J Obes Relat Metab Disord*, 23 Suppl 1, 29-36 (1999).

**Wabitsch, M., Jensen, P.B., Blum, W.F., Christoffersen, C.T., Englaro, P., Heinze, E., Rascher, W., Teller, W., Tornqvist, H., Hauner, H.**

Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells.  
*Diabetes*, 45, 1435-8 (1996).

**Wang Y., Kuropatwinski, K.K., White, D.W., Hawley, R.G., Hawley, T.S., Tartaglia, L.A., Baumann, H.**

Leptin receptor action in hepatic cells.  
*J Biol Chem*, 272, 16216-23 (1997a).

**Wang, Y.H., Tache, Y., Sheibel, A.B., Go, V.L., Wei, J.Y.**

Two types of leptin-responsive gastric vagal afferent terminals: an in vitro single-unit study in rats.  
*Am J Physiol*, 273, R833-7 (1997b).

**Wechsler, G., Schusdziarra, V., Hauner, H., Gries, A.**

Therapie der Adipositas.

*Dt Ärztebl*, 93, A-2214-8 (1996).

**Wechsler, J.G.**

Adipositas und Stoffwechselstörungen.

*Der Internist*, 38, 231-6 (1997).

**Weck, M., Fischer, S.**

Ätiologie der Adipositas.

*Der Internist*, 38, 204-13 (1997).

**Weck, M.**

Ätiologie der Adipositas.

*Akt Ernähr-Med*, 23, 166-71 (1998).

**Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C., Kuijper, J.L.**

Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse.

*J Clin Invest*, 96, 2065-70 (1995).

**White, D.W., Kuropatwinski, K.K., Devos, R., Baumann, H., Tartaglia, L.A.**

Leptin receptor (OB-R) signaling. Cytoplasmic domain mutational analysis and evidence for receptor homo-oligomerization.

*J Biol Chem*, 272, 4065-71 (1997).

**Wirth, A.**

Gesundheitsrisiken der Adipositas.

*Akt Ernähr-Med*, 23, 172-7 (1998).

**Woods, S.C., Chavez, M., Park, C.R.**

The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain.

*Neurosci Biobehav Rev*, 20, 139-44 (1996).

**Wu-Peng, X.S., Chua, S.C., Jr., Okada, N., Liu, S.M., Nicolson, M., Leibel, R.L.**

Phenotype of the obese Koletsky (f) rat due to Tyr763Stop mutation in the extracellular domain of the leptin receptor (Lepr): evidence for deficient plasma-to-CSF transport of leptin in both the Zucker and Koletsky obese rat.

*Diabetes*, 46, 513-8 (1997).

**Yamaguchi, M., Murakami, T., Yasui, Y., Otani, S., Kawai, M., Kishi, K., Kurachi, H., Shima, K., Aono, T., Murata, Y.**

Mouse placental cells secrete soluble leptin receptor (sOB-R): cAMP inhibits sOB-R production.

*Biochem Biophys Res Commun*, 252, 363-7 (1998).

**Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M.**

Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.

*Nature*, 372, 425-32 (1994).

**Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., Schoner, B.E., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Wery, J.P., Schevitz, R.W.**

Crystal structure of the obese protein leptin-E100.

*Nature*, 387, 206-9 (1997).

**Zhuo, H., Ichikawa, H., Helke, C.J.**

Neurochemistry of the nodose ganglion.

*Prog Neurobiol*, 52, 79-107 (1997).

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Acholeplasma
AgRP	Agouti-verwandtes Protein
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
aq. dest.	aqua destillata
B <sub>max</sub>	Maximale Bindung
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Kohlenstoff
CART	Kokain- und Amphetamin-reguliertes Transkript
CCK	Cholezystokinin
cDNA	komplementäre Desoxiribonukleinsäure
CDTA	Diaminozyklohexantetraessigsäure
CGRP	Kalzitoningen-verwandtes Peptin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpm	Zählungen pro Minute
CRH	Kortikotropin-Releasinghormon
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CTP	Zytidintri-phosphat
db	diabetic
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure

---

dNTP	Desoxinukleotidtriphosphat
DSS	Disukzinimidylsuberat
DTT	Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fa	fat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gravitation
GAPDH	Glyzerin-3-phosphatdehydrogenase
G-CSF	Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor
GH-RH	Wachstumshormon-Releasinghormon
GLP	Glukagon-ähnliches Peptid
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
Hepes	Hydroxiethylpiperazinethansulfonsäure
icv.	intrazerebroventrikulär
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
J	Jod
JAK	Januskinase
kD	Kilodalton
K <sub>D</sub>	Dissotiationskonstante
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie-inhibitorischer Faktor
M.	Mycoplasma
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCH	Melanin-konzentrierendes Hormon
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid
N	Stickstoff
NPY	Neuropeptid Y

---

NRS	Normales Kaninchenserum
NSS	Normales Schweineserum
Nucl.	Nucleus
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
ob	obese
OB-R	Leptinrezeptor
O.C.T.	Optimale Schneidetemperatur
OD	Optische Dichte
OH	Hydroxi
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PIAS	Proteininhibitor von aktiviertem STAT
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pwo	Pyrococcus woesei
PYY	Peptid YY
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
S	Svedberg
SDS	Natriumdodekylsulfat
SOCS	Suppressor der Zytokinsignalweiterleitung
SSC	Natriumzitat-Salzlösung
STAT	Signaltransduktor und –aktivator der Transkription
TA	Thymin-Adenosin
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TFA	Trifluoressigsäure

Tris	Tris-(hydroximethyl)-aminomethan
TRH	Thyreotropin-Releasinghormon
U	Einheit
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen / Volumina
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxil- $\beta$ -D-galaktosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

# Lebenslauf

## *P E R S Ö N L I C H E   D A T E N*

Name: Christian Peiser  
 Alter: geboren am 29. 09. 1965 in Koblenz  
 Staatsangehörigkeit: deutsch  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Vater: Gerd Peiser; Schauspieler  
 Mutter: Sigrid Peiser, geb. Haubenhofer; Hausfrau

## *S C H U L B I L D U N G*

1971 – 1972: Buschkampfschule in Bielefeld  
 1972 – 1975: Hehlentorschule in Celle  
 1975 – 1977: Gymnasium Ernestinum in Celle  
 1977 – 1984: Kaiser-Wilhelm-Gymnasium in Hannover  
 Juni 1984: Abitur (beinhaltet Großes Latinum und Graecum)

## *M E D I Z I N S T U D I U M*

Herbst 1984: Aufnahme des Studiums der Medizin an der  
 Medizinischen Hochschule Hannover  
 Herbst 1986: Ärztliche Vorprüfung  
 Frühling 1988: Erstes Staatsexamen der Medizin  
 Herbst 1990: Zweites Staatsexamen der Medizin  
 Herbst 1991: Drittes Staatsexamen der Medizin  
 Krankenpflegepraktikum: DRK-Krankenhaus Clementinenhaus in Hannover  
 Famulaturen: Innere Medizin (Krankenhaus Nordstadt in Hannover)  
 Chirurgie (Krankenhaus Nordstadt in Hannover)  
 Chirurgie (Krankenhaus Siloah in Hannover)  
 Kardiologie (Praxis Dr. med. Bogenstätter in Hannover)  
 Pädiatrie (Praxis Dr. med. Dallmeier in Hannover)  
 Praktisches Jahr: Innere Medizin (Krankenhaus Nordstadt in Hannover)  
 Chirurgie (Medizinische Hochschule Hannover)  
 Anästhesie (Krankenhaus Oststadt in Hannover)  
 Tätigkeit als Tutor: Biologie  
 Mikroskopische Anatomie

## **PHILOSOPHIESTUDIUM**

Frühling 1985: Aufnahme des Studiums der Philosophie an der Universität Hannover als Parallelstudium

Frühling 1987: Magisterzwischenprüfung

Im Rahmen des Hauptstudiums sind alle Leistungsnachweise, die zur Durchführung der Magisterarbeit berechtigen, erfüllt.

## **STUDIENSTIFTUNG DES DEUTSCHEN VOLKES**

Von Januar 1986 bis Dezember 1991 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Vertrauensdozent: Prof. Dr. med. Reinhard Pabst

Gutachter: Prof. Dr. med. Fritz Hartmann

Prof. Dr. med. Ulrich Mohr

Sommerakademie: Im September 1989 Sommerakademie Alpbach: Teilnahme an der Arbeitsgruppe „Karzinogenese und Differenzierung in vitro: zell- und molekularbiologische Vorgänge bei der Karzinogenese“

Forschungspraktikum: Von Mai bis Juni 1990 Absolvierung eines zellbiologischen Forschungspraktikums am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. med. Norbert E. Fusenig

## **MEDIZINISCHE PROMOTION**

Anfertigung der medizinischen Dissertation im Institut für Experimentelle Pathologie der Medizinischen Hochschule Hannover

Es handelt sich um eine experimentelle Arbeit in der in vitro-Krebsforschung mit dem Titel „Einfluß der Passagenhöhe auf Zytokinetik, Xenobiotikametabolismus, Toxizität, Chromosomenstabilität und Transformation bei der klonierten fetalen Hamsterlungenepithelzelllinie M3E3/C3“.

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Makito Emura

März 1994: Promotionsprüfung

## **ARZT IM PRAKTIKUM**

Von Mai 1992 bis Oktober 1993 AiP-Tätigkeit am Klinikum der Philipps-Universität Marburg im Zentrum für Kinderheilkunde (Prof. Dr. med. Hannsjörg W. Seyberth) in Verbindung mit dem Institut für Normale und Pathologische Physiologie (Prof. Dr. med. Rudolf E. Lang)

Februar 1994: Approbation

## **ÄRZTLICHE FORTBILDUNG**

Gentechnikrecht (25 Std.)  
Strahlenschutz (90 Std.)  
Rettungsmedizin (80 Std.)  
Abdomen-Sonografie (30 Std.)

Seit Februar 1994 Mitglied der Akademie für ärztliche Fortbildung und Weiterbildung der Landesärztekammer Hessen (bisher insgesamt über 400 Std. ärztliche Fortbildung)

## **PHILIPPS – UNIVERSITÄT MARBURG**

November 1993 - August 1999: Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Normale und Pathologische Physiologie (Prof. Dr. med. Rudolf E. Lang)

Lehre: Praktika (Kreislaufphysiologie, Nierenphysiologie, Atmungsphysiologie, Leistungsphysiologie, Stoffwechsephysiologie, Sinnesphysiologie);  
Vorlesung, Seminar (Stoffwechselphysiologie)

Nebenamtliche Lehre: Von September 1995 bis August 1999 Dozent an der DRK-Krankenpflegeschule der Philipps-Universität Marburg in den Fächern Anatomie/Physiologie und Innere Medizin

Aufbaustudium: Durchführung des Aufbaustudiums Humanbiologie  
Hauptfach: Physiologie  
Nebenfächer: Molekularbiologie, Biochemie  
Anfertigung der humanbiologischen Dissertation  
(Doktorvater: Prof. Dr. med. Rudolf E. Lang)

## **JUSTUS – LIEBIG – UNIVERSITÄT GIESSEN**

September 1999 - Dezember 1999: Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Anatomie und Zellbiologie (Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer, Arbeitsgruppe PD Dr. med. Axel Fischer)

## **HUMBOLDT – UNIVERSITÄT BERLIN**

Seit Januar 2000: Tätigkeit als Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow-Klinikum

Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie  
(Prof. Dr. med. Ulrich Wahn)

Biomedizinisches Forschungszentrum, Klinische Forschergruppe Allergologie  
(Prof. Dr. med. Axel Fischer)

Marburg, den 29. 09. 2000

# **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren:

Beato, Daut, Koolman, Lang, Müller, Röhm, Seifart, Suske, Voigt

# Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Rudolf E. Lang für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die Unterstützung durch seine fachliche Kompetenz, seine stete Diskussionsbereitschaft und ganz allgemein für die produktive und schöne Zeit in seinem Labor, wo ich mich sehr wohl gefühlt habe.

Ebenfalls gilt mein Dank Herrn PD Dr rer. nat. Gerard McGregor, Herrn PD Dr. med. Ulrich Bickel, Herrn Dr. rer. nat. Jörg Hänze und Herrn Dr. rer. nat. Fernando Pitossi dafür, daß sie immer zu einem kollegialen und anregenden Gespräch bereit waren.

Sehr bedanken möchte ich mich auch bei allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors, vor allem bei Frau Dr. rer. physiol. Karin Hupe-Sodmann, Frau Ibolya Bakos, Frau Doris Wagner, Frau Svaantje Fischer und Herrn Hans Lindt, für die gute Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. rer. physiol. Christian Derst und Frau Dr. rer. nat. Regina Preissig-Müller für die Hilfe beim Sequenzieren, Herrn Stöckert für die Hilfe bei der Tracerherstellung, Herrn Dr. rer. nat. Jörg Hänze für die Benutzung des Real-time-Taqman-Systems sowie Herrn Prof. Dr. med. Axel Fischer für die Benutzung des Laser-Microbeam-Systems; ferner bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Johann Desaga und Frau Dr. med. Constanze Lämmer von der Desaga Klinik (Fachklinik für Stoffwechselkrankheiten) in Lindenfels für die Überlassung der Patientenplasmen sowie den Mitarbeitern des hiesigen Schlachthofs (Marburger Fleisch GmbH) für die Erlaubnis, Schweinehirne zu entnehmen.

# Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Leptinrezeptor: Signaltransduktor und Vehikel“ im Institut für Normale und Pathologische Physiologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Rudolf E. Lang ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ergebnisse aus der vorliegenden Dissertation wurden (oder werden) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

## 1. Originalarbeiten

- 1.1. **Peiser C, Hupe-Sodmann K, Lang RE**  
High abundance of leptin receptor expression in the human erythroleukemia cell line K562  
(in Vorbereitung)
- 1.2. **Peiser C, Springer J, McGregor GP, Fischer A, Lang RE**  
Leptin receptor gene expression and transport in rat vagal afferent neurons innervating the stomach  
(zur Publikation eingereicht)
- 1.3. **Peiser C, McGregor GP, Lang RE**  
Leptin receptor expression and suppressor of cytokine signaling transcript levels in high-fat-fed rats  
*Life Sci* 2000 (im Druck)
- 1.4. **Peiser C, McGregor GP, Lang RE**  
Binding and internalization of leptin by porcine choroid plexus cells in culture  
*Neurosci Lett* 2000; 283(3): 209-212
- 1.5. Fehmann HC, **Peiser C**, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Göke B  
Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion  
*Peptides* 1997; 18(8): 1267-1273

- 1.6. McGregor GP, Desaga JF, Ehlenz K, Fischer A, Heese F, Hegele A, Lämmer C, **Peiser C**, Lang RE  
Radioimmunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects  
*Endocrinology* 1996; 137(4): 1501-1504

2. **Abstracts**

- 2.1. **Peiser C**, Lang RE  
Influence of increased leptin serum levels on the expression of the leptin receptor and suppressors of the signal transduction: comparison of leptin administration and feeding-induced increase of leptin serum level  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108 Suppl. 1: S 114
- 2.2. **Peiser C**, Lang RE  
Choroid plexus epithelial cells in culture: an in vitro model for studies on binding and transport of leptin at the blood cerebrospinal fluid barrier  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 2000; 108 Suppl. 1: S 113
- 2.3. **Peiser C**, Springer J, McGregor GP, Fischer A, Lang RE  
Leptin receptor gene expression and immunoreactivity in rat vagal primary afferent neurons  
*Regul Pept* 2000; 89: 77
- 2.4. **Peiser C**, Lang RE  
Effect of high-fat feeding on expression and regulation of leptin receptor and suppressor of cytokine signaling transcripts  
*Eur J Physiol* 2000; 439(6) Suppl.: R 406
- 2.5. **Peiser C**, Hupe-Sodmann K, Lang RE  
High abundance of leptin receptor expression in the human erythroleukemia cell line K562  
*Eur J Physiol* 2000; 439(6) Suppl.: R 406
- 2.6. **Peiser C**, Springer J, Fischer A, McGregor GP, Hänze J, Hupe-Sodmann K, Lang RE  
Leptin receptor expression in sensory ganglia  
*Eur J Physiol* 1999; 435(6) Suppl.: R 128
- 2.7. **Peiser C**, Hupe-Sodmann K, Lang RE  
Leptin internalization in choroid plexus in vitro  
*Eur J Physiol* 1999; 437(5) Suppl.: R 111
- 2.8. Ray J, Reisinger R, Preisig-Müller R, **Peiser C**, Lang RE, Daut J  
Stimulation of fatty acid metabolism in cardiac ventricular muscle by leptin  
*Eur J Physiol* 1998; 435(6) Suppl.: R 192

**3. Kongreßbeiträge**

**3.1. Peiser C, Lang RE**

Expression of leptin receptors in sensory neurons of the vagus  
*Neuroimmunology Symposium vom 22 – 23. 05. 2000 in Berlin [Poster]*

**3.2. Peiser C**

Das Leptinsystem – Studien zur Langzeit- und Kurzzeitregulation  
*Journalisten-Workshop „Essen als Droge - Neurobiologische Effekte der Nahrung“ am 11. 5. 1999 in Potsdam-Rehbrücke [Vortrag]*

**3.3. Peiser C, Hupe-Sodmann K, Lang RE**

Binding and internalization of leptin in primary cultures of porcine choroid plexus cells  
*1<sup>st</sup> International Workshop on Principles and Perspectives of Tissue Engineering for Basic and Applied Research vom 15. – 17. 10. 1998 in Hannover [Poster]*

**3.4. Peiser C, Hupe-Sodmann K**

Leptin receptor gene is expressed throughout the brain. No evidence for centrally produced leptin  
*7<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Neuropeptide Club vom 21. – 24. 05. 1997 in Marburg [Poster]*

**3.5. Fehmann HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Göke B**

Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion  
*European Leptin Symposium vom 30. 04. – 02. 05. 1997 in Rauischholzhausen [Poster]*

**3.6. Peiser C**

Neue Aspekte der Regelung der Nahrungsaufnahme  
*Lindenfelser Seminar zum Prader-Willi-Syndrom vom 16. – 17. 03. 1996 in Lindenfels [Vortrag]*

Marburg, den 29. 09. 2000