

Aus dem

**Institut für normale und pathologische Physiologie
der Philipps-Universität Marburg**

Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. Voigt

Arbeitsgruppe Herz- Kreislaufphysiologie
Leiter: Prof. Dr. R. E. Lang

**Entwicklung eines Radio-Immunoassays und Rezeptor-Assays zum
Nachweis von Leptin**

Inaugural-Dissertation
zum Erlangen des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Martin Klemp
aus Schwabenrod, Vogelsbergkreis, Hessen
Marburg 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
am 11. September 2003
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. B. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. R. E. Lang
Koreferent: Prof. Dr. Renz

Ignoramus–(et) ignorabimus

>Wir wissen es nicht – (und) werden es nie wissen<

Emil Du Bois-Reymond (1816- 1896), Berliner Physiologe

Aus „*Die Grenzen des Naturerkennens*“ (1872): „ In bezug auf die Rätsel der Körperwelt ist der Naturforscher längst gewöhnt, mit männlicher Entsagung sein ignoramus auszusprechen. In Rücksicht auf die durchlaufene siegreiche Bahn, trägt ihn dabei das stille Bewußtsein, daß, wo er jetzt nicht weiß, er wenigstens unter Umständen wissen könnte und dereinst vielleicht wissen wird. In bezug auf das Rätsel aber, was Materie und Kraft seien und wie sie zu denken vermögen, muß er ein für allemal zu dem viel schwerer abzugebenden Wahlspruch sich entschließen: Ignorabimus.“

1 Einleitung

1.1 Einführung

Seit vielen Jahrhunderten wird die Fettsucht oder Adipositas in Verbindung mit Krankheit, Trägheit, Faulheit, ja sogar oft mit Disziplinlosigkeit gebracht.

„Wir leben nicht, um zu essen; wir essen, um zu leben.“ (Sokrates, 470-399v. Chr.)

In späteren Schriften wird oft eine Brücke geschlagen zwischen der oberen Gesellschaftsschicht und Fettleibigkeit durch Überschuß im Nahrungsangebot/-aufnahme. Korpulente Menschen galten (und gelten in manchen Ländern der 2. und 3. Welt noch heute) als angesehen und wohlhabend.

„Die Gesellschaft setzt sich aus zwei großen Klassen zusammen: die einen haben mehr Mahlzeiten als Appetit, und die anderen mehr Appetit als Mahlzeiten.“ (Chamfort, 1741-1794)

Im zwanzigsten Jahrhundert folgten wegweisende Untersuchungen und Studien, deren aller Ziel die Ursache und Entstehung der Adipositas war. In den 50er Jahren belegten Auswertungen großer Datenmengen von Krankenkassen den Zusammenhang von Übergewicht mit Krankheiten wie Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes und andere. 1953 postulierte Kennedy einen vom Hypothalamus gesteuerten Regelkreis, der die Nahrungsaufnahme und den Energiestoffwechsel im Zusammenhang mit den Fettspeichern des Körpers aufrecht erhält. (Kennedy GC, 1953)

Wann spricht man im medizinischen Sinn von Übergewicht / Adipositas?

Ein Erwachsener nimmt pro Jahr etwa vier Gigajoule mit der Nahrung zu sich, es resultiert jedoch lediglich eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 100 bis 400 Gramm Fett, (Hebebrand J et al. 1995) der Rest wird verbrannt. Im Mittel liegt der

Körperfettanteil bei 12-19% des gesamten Körpergewichtes, unterliegt aber teilweise erheblichen Schwankungen.

Das Körpergewicht wird beeinflusst von Geschlecht, Alter und Körperlänge. Um bei gleichem Alter und Geschlecht eine unterschiedliche Körperlänge zu berücksichtigen, wird der „Body Mass Index“ (BMI; Körpergewicht(kg)/ Körperlänge(m)²) verwendet. (Forbes GB et al. 1961, Edwards KDG et al. 1962) Normwerte sind bei Frauen Werte bis 23 kg/m², bei Männern bis 24 kg/m². Ab einem Wert von 27,8 kg/m² (Frauen) bzw. 27,3 kg/m² (Männer) spricht man von Fettsucht. Von morbidier Fettsucht spricht man bei beiden Geschlechtern ab einem BMI von > 40 kg/m². (Keys A et al. 1972) In Industrienationen findet man einen Anteil von über 20% der Gesamtbevölkerung mit einem BMI von >30 (kg/m²), also Adipositas.

Neuere Untersuchungen belegen eindrucksvoll das deutlich erhöhte Risiko, durch Fettleibigkeit an Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Gicht, bestimmte Krebsarten, Schlafapnoe, Hypertonie, Herzinsuffizienz, Gefäßerkrankungen, Gelenkverschleiß u.a. zu erkranken. (Grundy SM & Barnett JP 1990, Hauner H 1995) Die Sterberate durch diese Krankheiten ist bei übergewichtigen Personen im Vergleich zu Normalgewichtigen signifikant erhöht. (Burton BT et al. 1985) Bei einem Übergewicht von 25% liegt die Sterblichkeitsrate bei 128%, d.h. 28% höher als bei vergleichbaren Personen mit Normgewicht. 35-40% Übergewicht führen zu einer Rate von 151%! Reduzieren die übergewichtigen Personen ihr Gewicht auf Durchschnittswerte, fällt auch die Sterblichkeitsrate wieder in den Normbereich. (Bierman EL, Hirsch J 1981, Bengtsson C et al. 1993)

1.2 Leptin

Die autosomal rezessiven Mausmutanten obese (ob/ob) und diabetes (db/db) zeigen im Phänotyp beide eine Verdopplung bis Verdreifachung ihres normalen Körpergewichtes, Diabetes, Hypothermie sowie Infertilität der Weibchen. Aufgrund von Parabiose-Experimenten (Zusammenschluß der Blutkreisläufe zweier Tiere, Hausberger FX 1958, Coleman DL et al. 1969, Coleman DL 1973) postulierte Coleman, daß der ob/ob-Maus ein im Blut zirkulierender Sättigungsfaktor fehlt, der db/db-Maus hingegen der entsprechende Rezeptor. (Coleman DL 1978) Beim Zusammenschluß einer ob/ob-Maus mit einer normalgewichtigen, dünnen Maus klangen alle Symptome (Übergewicht, vermehrte Nahrungsaufnahme, Hypothermie usw.) vollständig ab, der db/db-Maus blieben alle Symptome erhalten, es zeigte sich kein Effekt.

Ende 1994 gelang es der Gruppe um Friedman, bei der Maus das obese-Gen zu identifizieren (Zhang Y et al. 1994), dessen Mutation die Fettsucht bei der ob/ob-Maus hervorruft. Das Genprodukt, Leptin genannt (vom griechischen „leptos“ = dünn, Halaas JL et al. 1995), besteht aus 167 Aminosäuren einschließlich einer typischen Signalsequenz aus 21 Aminosäuren (siehe Abb. 1). Es weist keine Homologien zu bisher bekannten Proteinen auf. Bei der ob/ob-Maus fand sich eine Mutation im Codon 105, was an dieser Stelle zum Abbruch der Translation führte, sowie bei einem anderen Stamm von ob/ob-Mäusen ein Defekt in der Promoter Region, so daß die Transkription des Leptinproteins gänzlich ausblieb. (Zhang Y et al. 1994) Mutationen im Leptinprotein beim Menschen sind im Gegensatz zu den Nagetieren (ob/ob Maus) extrem selten, unterstreichen aber die Rolle des Leptin im Fettstoffwechsel. (Montague et al. 1997)

Appliziert man der ob/ob-Maus rekombinantes Leptin, so kommt es zu einer kompletten Remission aller körperlichen Symptome. Der beobachtete Gewichtsverlust läßt sich auf eine Einschränkung der Energieaufnahme (Nahrung) und auf eine Erhöhung des Energieverbrauches durch eine Kerntemperaturerhöhung (Grundumsatz) und eine vermehrte Spontanaktivität zurückführen (Pellemounter MA

et al. 1995). Auch die Fertilität der weiblichen ob/ob-Maus stellt sich wieder ein. (Chehab FF et al. 1996)

Mensch	M <u>H</u> W <u>G</u> T <u>L</u> C <u>G</u> F <u>L</u> WLW <u>P</u> Y <u>L</u> F <u>Y</u> V <u>Q</u> AVPIQKVQDD TKTLIKTIVT RINDISHTQS	50
Maus	C PR R S S	
Mensch	V <u>S</u> S <u>K</u> Q <u>R</u> V <u>T</u> G <u>L</u> DFIPGLHPIL <u>T</u> LSKMDQTLA VY <u>Q</u> <u>I</u> L <u>T</u> S <u>L</u> P <u>S</u> R <u>N</u> V <u>L</u> Q <u>I</u> S <u>N</u> D	100
Maus	A S V I Q A	
Mensch	LENLRDLL <u>H</u> V LAFSKS <u>C</u> H <u>L</u> P <u>W</u> AS <u>G</u> L <u>E</u> T <u>L</u> T <u>S</u> <u>L</u> G <u>G</u> V <u>L</u> E <u>A</u> S <u>G</u> Y STEVVALSRL	150
Maus	L S QT QKPE D L	
Mensch	Q <u>G</u> S <u>L</u> Q <u>D</u> <u>M</u> <u>L</u> Q <u>Q</u> LD <u>L</u> S <u>P</u> G <u>C</u>	167
Maus	I L V E	

Abbildung 1: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des ob-Proteins von Mensch und Maus. **Fett** und unterstrichen die (darunterstehenden) Unterschiede. Es findet sich eine 84%ige Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch. (Zhang Y et al. 1994)

Ein Vergleich von hypothetischen dreidimensionalen Modellen für Leptin mit allen experimentell bisher aufgeklärten Proteinstrukturen ergab, daß eine für helikale Cytokine wie IL-2 oder Wachstumshormon typische Faltung mit der Primärstruktur von Leptin kompatibel ist. (Madej T et al. 1995)

1.2.1 Cytokine

Leptin hat neben anderen Wirkungen auch auf das Immunsystem nicht unerheblichen Einfluß. Dies rührt daher, daß Leptin –sowie auch der Leptinrezeptor- eine strukturelle Verwandtschaft (helikale Struktur) mit bestimmten Cytokinen aufweist. (Tartaglia LA et al. 1995, White DW et al. 1996) Diese gehören zu einer Gruppe

löslicher Faktoren, die die Zusammenarbeit und Koordination der verschiedenen Komponenten des Immunsystems ermöglichen, d.h. also das Auslösen, Modifizieren und Beenden einer sehr komplexen Abwehrreaktion. (Kirchner H et al. 1993, Nicos A. Nicola 1994, Thomson A 1992) Cytokine werden zum größten Teil von den Immunzellen selbst gebildet, charakteristisch ist allen eine geringe Produktionsrate (dies entspricht einer meßbar niedrigen Konzentration), verknüpft mit einer extrem hohen biologischen Aktivität und Wirksamkeit. (Kirchner H et al. 1993) Die Übermittlung der Signale erfolgt über Rezeptoren, die sich auf der Oberfläche der Zielzellen befinden.

1.2.2 Physiologische Wirkung des Leptin

Die im Fettgewebe nachweisbare Expression von Leptin mRNA (Zhang Y et al. 1994) korreliert wie auch der Plasma-Leptin-Spiegel sehr eng mit der totalen Masse an Körperfett. Dies gilt für den Menschen wie auch für Nagetiere gleichermaßen. (Lonnqvist F et al. 1995, Maffei M, Halaas J et al. 1995, McGregor GP et al. 1996) Bezieht man den Leptin-Spiegel nicht auf die totale Masse an Körperfett, sondern auf den prozentualen Anteil an Körperfett, entfallen die geschlechtsspezifischen Unterschiede zwischen Mann und Frau. (Jensen MD et al. 1999) Expression von Leptin mRNA findet man nicht nur im weißen Fettgewebe (Masuzaki H et al. 1995, Kline AD et al. 1997), auch in braunen Fettspeichern (Maffei M, Fei H et al. 1995), in der Plazenta (Senaris R et al. 1997, Gong DW et al. 1996) , in β - Zellen des Pankreas (Kieffer TJ et al. 1996), in Leberzellen (Henriksen JH et al. 1999), im Epithel des Magens (Konturek PC et al. 1999) sowie in der Skelettmuskulatur (Wang J et al. 1998), konnte die OB-Gen mRNA nachgewiesen werden.

Läsionsversuche im ZNS haben ergeben, daß dem Hypothalamus eine zentrale Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes zukommt. Schon 1959 demonstrierte Hervey in Parabiose-Experimenten, (-bei denen er einem der Versuchstiere die hypothalamische Region gezielt zerstörte, woraufhin das mit diesem

zusammengeschlossene, gesunde Tier an Unterernährung starb-) die Anwesenheit eines Faktors, der als peripheres Signal den Zustand der Energie- / Fettspeicher dem Hypothalamus übermittelt. (Hervey GR 1959) Neuere Untersuchungen zeigen auch, daß hier wichtige Sättigungsfaktoren wie Neuropeptid Y (NPY) (Stephens TW et al. 1995) oder Glukagon Like Peptide 1 (GLP-1) (Turton MD et al. 1996) exprimiert werden. Anhaltende Gabe von Leptin führt zu einem Absinken der Expression von NPY mRNA im Nucleus arcuatus sowie auch eine direkte Hemmung der Freisetzung von NPY (aus isoliert perfundierten Hypothalamuszellen der Ratte und bei der ob/ob-Maus). (Schwartz MW, Baskin DG et al. 1996, Schwartz MW, Peskind E et al. 1996) NPY gilt als einer der wichtigsten Botenstoffe in der Regulation des Ernährungszustandes, was auch die direkte neurale Verbindung des Nucleus arcuatus mit bedeutenden Ernährungszentren im Gehirn beweist. (Stephens TW et al. 1995) Eine längere Gabe von NPY intracerebroventrikulär löst –als bisher einziges, bekanntes Peptid- bei gesunden Ratten reversibel starke Fettsucht und Resistenz gegen Insulin aus. (Vettor R et al. 1994)

Eine weitere Aufgabe von Leptin (gezeigt an isolierten Fettzellen der Ratte) ist die antagonistische Wirkung in bezug auf Insulin. Es wirkt gegenläufig auf die Insulinvermittelte Aktivierung des Glucosetransportes, die Glykogensynthese, sowie die Fettsynthese. (Muller G et al. 1997) Weiterhin hemmt Leptin die Insulin Freisetzung direkt durch ein erhöhtes Membranpotential und ein Absinken des intrazellulären Calciums. (Stephens TW et al. 1995, Fehmann HC et al. 1997) Im Hypothalamus bewirkt Insulin –synergistisch zu Leptin- eine erhöhte Glucose Aufnahme und auch eine Hemmung der Freisetzung von NPY, was zu einem verminderten Appetit führt. Daraus kann geschlossen werden, daß Leptin und Insulin interagieren, den (Fett)-Stoffwechsel jedoch auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. (Schwartz MW et al. 1997)

Leptin führt desweiteren zu einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumshormon (GH, STH). (Unveröffentlichte Beobachtung der Gruppe um Jose F. Caro 1997, Bennek C et al. 1999) Den selben Effekt beobachtet man bei stark sinkenden Blutzucker-Spiegeln (s.o. Interaktion Leptin Insulin). Ein Rückkopplungsmechanismus scheint jedoch nicht vorzuliegen, da eine Stimulation von

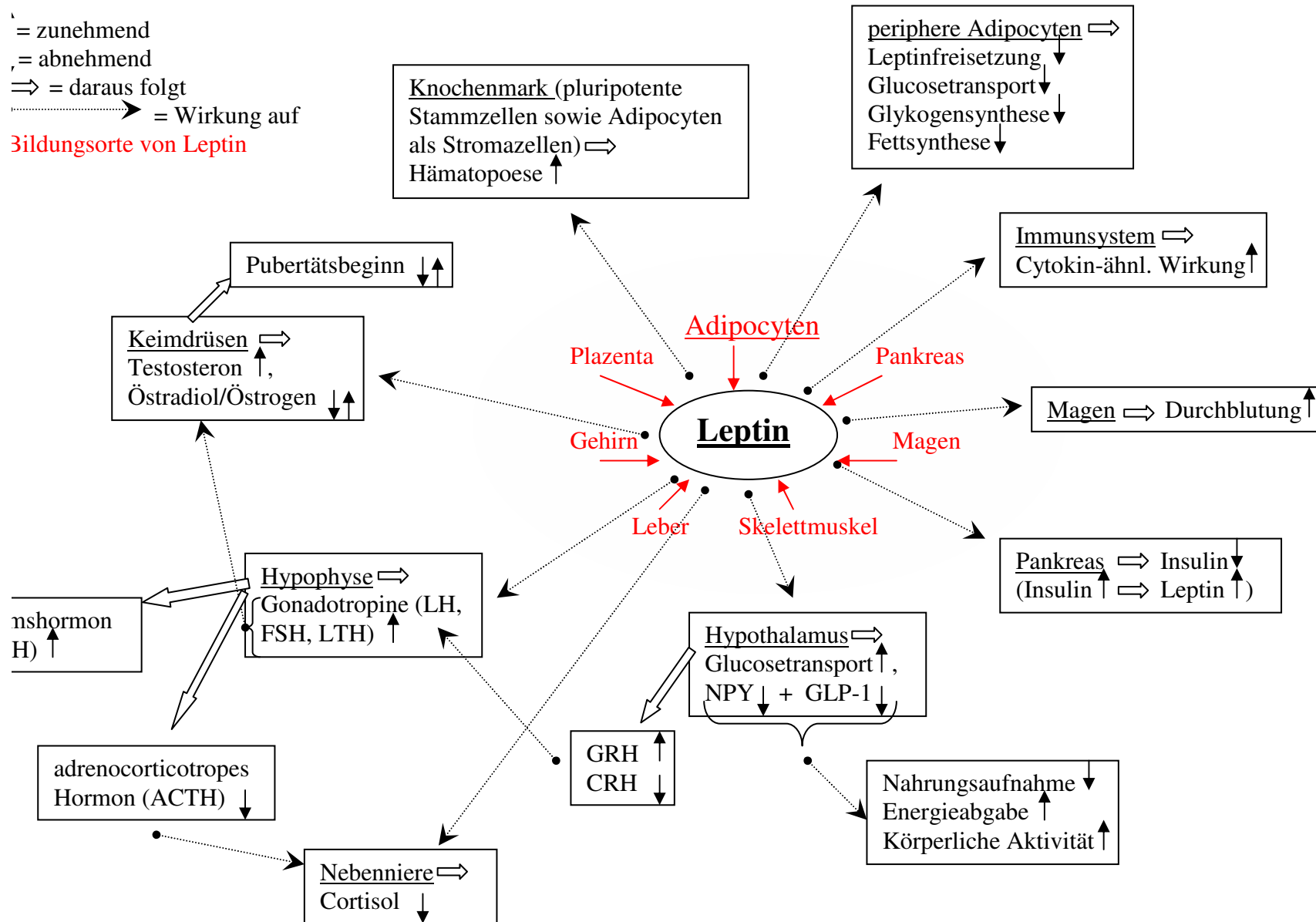
Wachstumshormon über Arginin bei Kindern und Erwachsenen den Leptin-Spiegel nicht verändert. (Bennek C et al. 1999)

In den 60er und 70er Jahren fand man heraus, daß der Beginn der Pubertät weniger vom Alter als vom Geschlecht und Körpergewicht (Körperfettanteil) des Individuums abhängig ist. (Kennedy GC et al. 1963, Frisch RE et al. 1974) Im Zuge der Erforschung der Adipositas und der Entdeckung des Fetthormons Leptin wurde schnell deutlich, daß auch in diesem Regelkreis das OB- Genprodukt eine entscheidende Rolle spielt. (Hassink SG et al. 1996) Ein Beweis für die Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HHG-Achse) durch Leptin ist die hohe Dichte an Leptin Rezeptoren (mit langer intrazellulärer Domäne, OB-Rb) in den Keimdrüsen. (Zamorano PL et al. 1997) Hier beeinflusst Leptin u.a. die Produktion von Östradiol in den Ovarien. (Zachow RJ et al. 1997) Ein weiterer Beweis der Interaktion mit der HHG-Achse ist die Freisetzung von Gonadotropinen (über Gonadotropin Releasing-Hormon, GRH) aus der Hypophyse. Daraus leitet sich ein erhöhter Spiegel von Östrogenen bzw. Testosteron ab. (Barash IA et al. 1996)

Die Feststellung, daß bei der db/db-Maus eine Störung im lymphopoetischen System vorliegt –die Spiegel von im peripheren Blut gemessenen B- und T-Lymphozyten sind hier erniedrigt- (Bennett BD et al. 1996), läßt den Schluß einer Beeinflussung der gesamten Hämatopoese durch Leptin zu. Adipocyten –nachweislich der Ort der Expression des Zytokin-ähnlichen OB-Gen Produktes Leptin- bilden als Stromazellen den größten Teil des Knochenmarks, befinden sich also topographisch in nächster Nähe der Stammzellen (Gimble JM et al. 1996). Von einigen Cytokinen ist die Einflußnahme auf pluripotente Stammzellen schon länger bekannt, z.B. IL-6, siehe 1.3.1 Cytokine. (Ikebuchi K et al. 1987) 1997 bewies die Gruppe um Mikhail eine Stimulation der Entwicklung von Zellreihen fetaler und adulter Erythrozyten und Myelozyten durch Leptin (Mikhail A et al. 1997).

Abbildung 2: (Wechsel-)Wirkungen des Leptin

↑ = zunehmend
 ↓ = abnehmend
 ⇒ = daraus folgt
 ⋯ ⇒ = Wirkung auf
Bildungsorte von Leptin



1.2.3 Leptin-Spiegel im Blut

Der Leptin-Spiegel unterliegt bei dünnen wie bei adipösen Probanden einer Tagesrhythmik, d.h. er variiert innerhalb von 24 Stunden mit einem Gipfel um Mitternacht und fällt in den frühen Morgenstunden ab. (Wolthers OD et al. 1999) Durch einzelne Mahlzeiten ist der Leptin-Spiegel nicht zu beeinflussen. (Sinha MK, Ohannesian JP et al. 1996) Diese Tagesrhythmik verläuft spiegelbildlich zum Cortisol Spiegel. Erhöhte Cortisol-Spiegel findet man in den Morgenstunden, also genau zu der Zeit, in der der Leptin-Spiegel sein Minimum erreicht. Es handelt sich hierbei um einen negativ rückgekoppelten Regelkreis, bei dem Leptin direkt die Cortisol Synthese und Freisetzung in der Nebenniere hemmt. (Bornstein SR et al. 1997) Die Hemmung der Freisetzung von adrenocorticotropem Releasing Hormon (Heiman ML et al. 1997) führt ebenfalls zu einem Absinken des Cortisolspiegels.

1.2.4 Elimination von Leptin

In Tierversuchen (Ratte) zeigte sich nach beidseitiger Nephrektomie ein schneller Anstieg der Leptin-Spiegel, was die Rolle der Niere in der Ausscheidung unterstreicht. Leptin wird im intakten / aktiven Zustand von der Niere aus dem Blut gefiltert und im weiteren Verlauf zu großen Teilen in den Tubuli verstoffwechselt. Dieser Weg ist über einen weiten Bereich von Leptin-Spiegeln konstant, hat also eine hohe Kapazität und ist nicht sättigbar. (Cumin F et al. 1997)

Anhand von Untersuchungen bei Patienten mit Leberzirrhose im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne Leberschaden ergab sich ebenfalls ein erhöhter Leptin-Spiegel, was auf eine Beteiligung der Leber an der Elimination des OB-Gen Produktes hindeutet. (Shimizu H et al. 1998) Die hierbei gehobenen Leptin-Spiegel entstehen

jedoch auch durch eine vermehrte Freisetzung aus dem Fettgewebe sowie einer verminderten Ausscheidung über die Nieren. (Henriksen JH et al. 1999)

1.3 Leptinrezeptor

Die Hypothese von Coleman (Coleman DL 1978), daß der db/db-Maus der entsprechende (funktionsfähige) Rezeptor zur Signalvermittlung fehlt, wurde 1995 durch die Klonierung des Leptinrezeptors aus dem Plexus choroideus der Maus bestätigt. (Tartaglia LA et al. 1995) Hierbei fand sich eine Mutation der 106ten Base der OB-Rezeptor mRNA. (Chen H et al. 1996) Ähnliches gilt auch für die im Phänotyp ebenfalls adipöse fa/fa-Ratte, bei der in Position 269 (der extrazellulären Domäne) Prolin für Glutamat eingebaut wird und somit eine funktionslose Variante des OB-Rezeptors entsteht. (Chua SC, J.r. et al. 1996, Iida M et al. 1996) Mutationen im Leptin Rezeptor, wie bei der db/db Maus nachgewiesen, konnten beim Menschen bisher nicht gefunden werden. (Cosidine RV et al. 1996)

Das Rezeptorprotein besteht aus ca. 900 Aminosäuren und beinhaltet eine Transmembranregion sowie eine intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne weist Homologien zu Cytokinrezeptoren der Klasse I auf (siehe auch 1.3.1 Cytokine). Beim alternativen Spleißen entsteht u.a. eine Variante des Rezeptors, der die Transmembranregion und der intrazelluläre Anteil fehlt. Es entsteht ein lösliches Rezeptorprotein, das Transportfunktionen übernehmen kann. (Lee GH et al. 1996)

Bisher sind fünf Varianten des OB-Rezeptors (OB-R) beschrieben worden, OB-Ra, OB-Rb, OB-Rc, OB-Rd und OB-Re. Allen gemeinsam ist ein extrazellulärer Anteil, der sich aus 840 Aminosäuren zusammensetzt. Die transmembranäre Domäne beinhaltet 34 Aminosäuren, der intrazelluläre Anteil ist variabel. OB-Rb besitzt die längste intrazelluläre Form (304 Aminosäuren), worin zwei Kopplungsdomänen enthalten sind, die mit den Stoffwechselwegen der Janus Protein-Tyrosin Kinase (JAK) und dem der STAT (Signal Transducers and Aktivators of Transcription) wechselwirken. Bekannt ist dieser Stoffwechselweg über JAK und STAT von den Klasse I Cytokinrezeptoren. (Kishimoto T et al. 1994) Die oben erwähnten zwei Domänen fehlen jedoch den Varianten OB-Ra, OB-Rc und OB-Rd, ihr intrazellulärer Teil ist wesentlich verkürzt. OB-Re besteht nur aus dem extrazellulären Anteil.

Beim Menschen konnten bisher vier Isoformen des Rezeptors gefunden werden, darunter zwei mit großer Homologie zu OB-Ra und OB-Rb. (Cioffi JA et al. 1996)

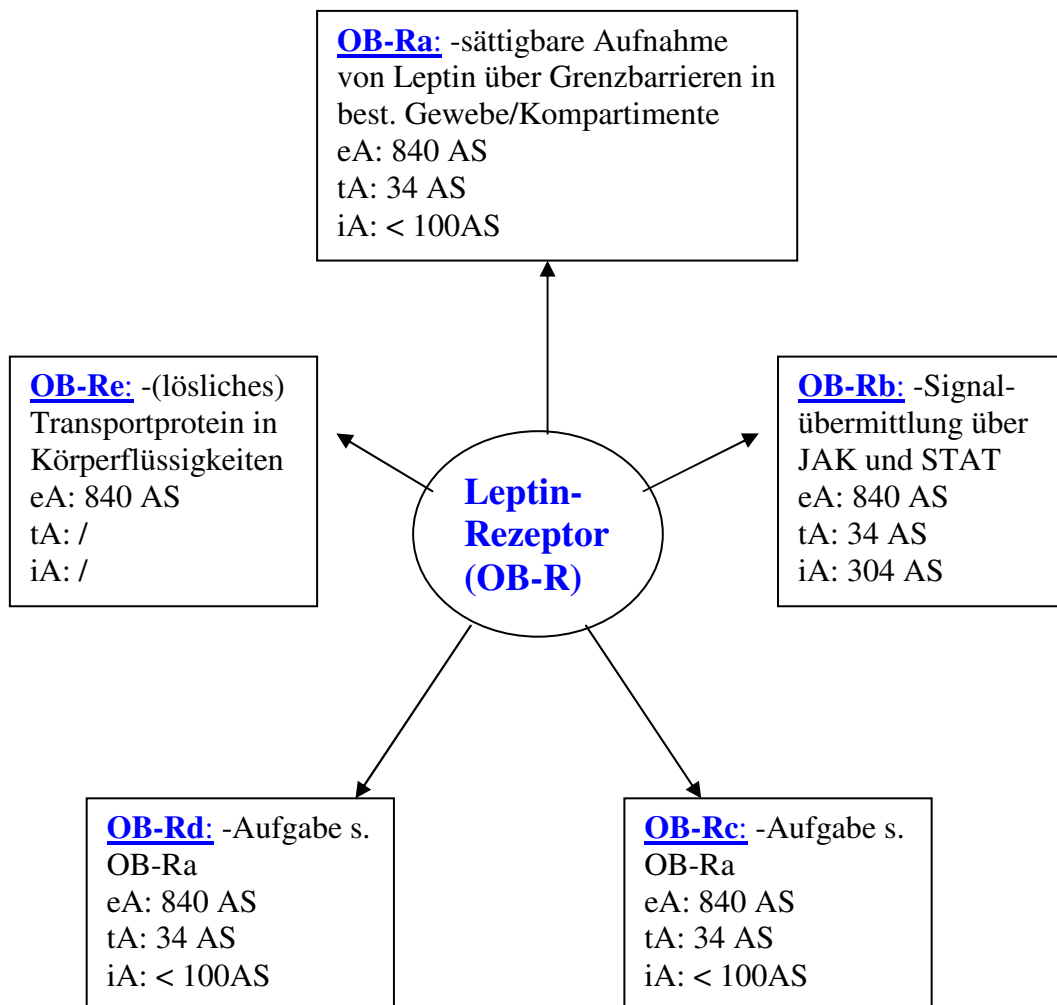


Abbildung 3: Aufgaben und Aufbau der Leptin Rezeptor-Varianten

eA = extrazellulärer Anteil: aus X Aminosäuren (AS)

tA = transmembranärer Anteil: - “ -

iA = intrazellulärer Anteil: - “ -

1.3.1 Lokalisation der Rezeptorexpression, Funktion

Ein Ort größter OB-Rezeptorendichte findet sich im ZNS, genauer gesagt im Hypothalamus. Hier findet sich eine extrem hohe Zahl an Rezeptoren mit langer, intrazellulärer Domäne (Ghilardi N et al. 1996), also der Typ OB-Rb. Neuere Untersuchungen zeigen eine noch größere Dichte von OB-Rb im Kleinhirn, Cerebellum. (Burguera B et al. 2000) In den weichen Hirnhäuten sowie im Plexus Choroideus wird der Leptinrezeptor ebenfalls gefunden. (De Vos R et al. 1996, Malik KF et al. 1996), weiterhin fast im gesamten Gehirn, Nucleus arcuatus, Hippocampus, Thalamus, im Cortex, (Mercer JG et al. 1996) der Hypophyse (Dyer CJ et al. 1997) etc. Jedoch auch in der Peripherie konnte der Leptinrezeptor nachgewiesen werden. Er findet sich in der Lunge, den Nieren, den Ovarien (Chen H et al. 1996), im Herz, der Leber, dem Dünndarm, der Prostata, dem Hoden, Fettgewebe und Milz (Cioffi JA et al. 1996, Zamorano PL et al. 1997), den Nebennieren (Bornstein SR et al. 1997), Skelettmuskel (Berti L et al. 1997), Knochenmark (hämatopoetisches Gewebe, Gainsford T et al. 1996) sowie in β - und δ - Zellen des Pankreas (OB-Rb) (Kieffer TJ et al. 1996, Kieffer TJ et al. 1997, Fehmann HC et al. 1997).

Das gehäufte Vorliegen der kurzen Formen des Rezeptors (OB-Ra, OB-Rc und OB-Rd) im Plexus choroideus mit einer sättigbaren Aufnahme von (markiertem) Leptin läßt darauf schließen, daß die kurzen Formen die Funktion der Aufnahme u.a. in das zentrale Nervensystem übernehmen (Banks WA et al. 1996). Diese These wird gestützt durch die Tatsache, daß kleinste Gefäße / Kapillaren im Gehirn, die an der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind, die kurze Rezeptorform (z.B. OB-Ra) in großer Zahl exprimieren und hier ein unidirektionaler Transport (apikal nach basal) von ^{125}I -Leptin über diese Rezeptorform nachgewiesen ist. (Hileman SM et al. 2000)

OB-Rb ist der Rezeptor der eigentlichen Signalübermittlung, die über das JAK und STAT System abläuft. (Lee GH et al. 1996)

OB-Re ist, wie oben bereits erwähnt, das lösliche Transportprotein für Leptin. (Tartaglia LA et al. 1995, Lee GH et al. 1996, Chen H et al. 1996)

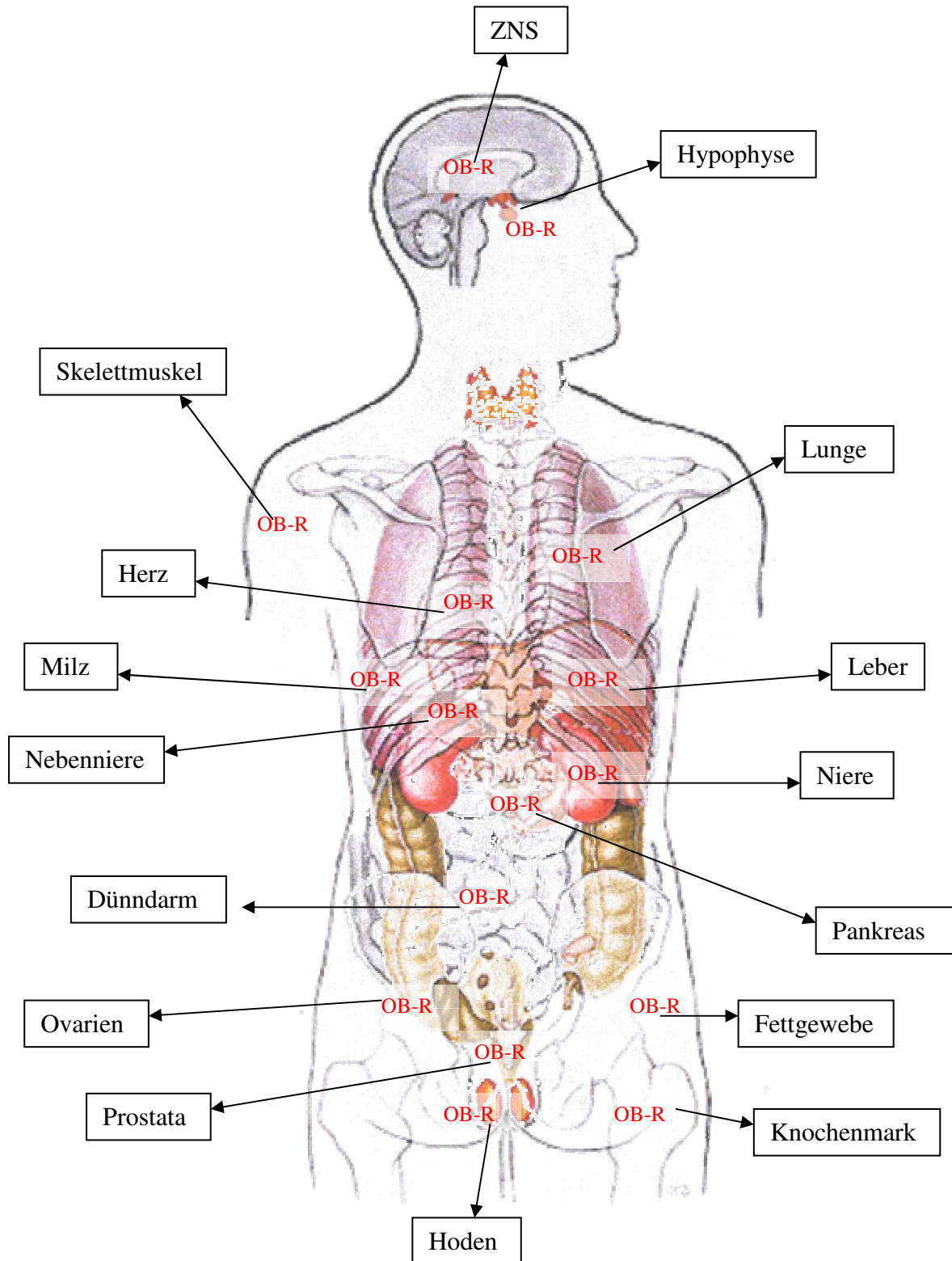


Abbildung 4: Lokalisation des Leptin Rezeptors (OB-R), Ansicht von dorsal

2 Aufgabenstellung

Immunoassays, entweder als RIA (Radioimmunoassay) oder ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), sind die klassische Nachweismethode für Peptidhormone. Ihre Durchführung ist ohne großen Aufwand möglich und kann teilweise durch den Einsatz von Laborrobotern rationalisiert werden. Was die Immunoassays messen, entzieht sich meist der genaueren Kenntnis der Anwender. Peptidhormone zirkulieren in freier und damit biologisch verfügbarer Form, sind zum Teil aber auch an Plasmaproteine oder zirkulierende Rezeptoren gebunden. Dies trifft auch für Leptin zu. Funktionell entscheidend ist aber die Menge an Leptin, die wirklich den Rezeptor erreicht. Aus diesem Grunde erscheint die Hormonbestimmung durch einen Rezeptorbindungstest (RBT) biologisch relevanter, da hier eher die biologisch wirksame Menge an Leptin, die tatsächlich den Rezeptor erreicht, gemessen werden kann. Der bei einem RIA benötigte erste Antikörper gegen das zu bestimmende Peptid wird im RBT gewissermaßen durch den vollständigen, natürlich in der Zellwand integrierten Rezeptor ersetzt.

Ein weiterer Vorteil des Rezeptorbindungstests gegenüber dem RIA oder ELISA könnte sein, daß biologisch inaktive Fragmente zwar von Antikörpern erkannt werden können und damit biologische Aktivität vorgetäuscht wird, jedoch im allgemeinen nicht im Stande sind, eine Rezeptorbindung einzugehen.

Als diese Arbeit begonnen wurde, war noch kein standardisierter Test zum Nachweis von Leptin am Markt etabliert.

Ziel der Experimente war es also, zum Nachweis von Leptin

- 1.) einen Radioimmunoassay aufzubauen
 - 2.) einen Rezeptorbindungstest zu entwickeln
- und nach Möglichkeit beide Methoden hinsichtlich der Erfassung von Leptin in humanem Blut zu vergleichen.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

- Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (Dihydrat) (EDTA; Roth)
- Natrium-Acid (Fluka)
- Polyethylenglykol 6000 (PEG; Serva)
- Polygeline aus Hämaccel (Behring)
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Roth)
- Triton-X (Sigma)

3.1.2 Geräte

- Gamma-Counter: LKB-Wallac 1277 Gammamaster
- PH-Meter: Radiometer PHM 62 Standard
- Schüttler: Edmund Bühler KS10
- Vortex: Heidolph Reax 2000
- Wasseraufbereitung: Millipore

- Sephadex-Säule: Nick® Columns, Sephadex® G-50, DNA Grade,
Pharmacia Biotech
- Tischzentrifuge: Hettich Mikroliter
- Zentrifuge: Hettich Rotana RP
- Zentrifuge: Heraeus Sepatech Cryofuge 5000
- Zentrifuge: Beckmann Zentrifuge des Typs J-218 mit JA-20 Rotor

3.1.3 Proben

Blut für die Versuche wurde den Probanden an einer peripheren Vene mit einer 20 ml Luer Lock Spritze (Braun) und einer Microlance Einmal Kanüle entnommen. Daraufhin wurde das Blut in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Greiner), welches 1mg/ml EDTA enthielt, überführt. Im Anschluß daran wurde das Plasma durch 20minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 4000 Upm gewonnen. Sodann wurde das Plasma in Portionen zu 2ml in Eppendorf Gefäße überführt und bei –80°C tiefgefroren gelagert.

Es handelte sich um Plasma von insgesamt 15 Probanden, Alter zwischen 20 und 66 Jahren (Mittelwert 42,1 Jahre), mit einem BMI von 18,5 bis 39,0 kg/m² (Mittelwert 27,6 kg/m²).

Sieben Frauen befanden sich in der Gruppe. Alter 20-66 Jahre (Mittelwert 42,1 Jahre), BMI 18,5 – 39,0 kg/m² (Mittelwert 27,6 kg/m²). Acht Männer im Alter von 25-60 Jahren (Mittelwert 39,6 Jahre), BMI 21,6 – 32,7 kg/m² (Mittelwert 24,5 kg/m²).

Nr.	Name	Alter Jahre	Größe cm	Gewicht kg	BMI in kg/m ²
1	Fr. D	66	168	110	39,0
2	Fr. P	65	156	90	37,0
3	Hr. H	60	175	100	32,7
4	Fr. G	63	166	103	37,4
5	Fr. Y	42	160	90	35,2
6	Hr. L	53	193	95	25,5
7	Fr. F	31	160	75	29,3
8	Fr. D	28	174	66	21,8
9	Hr. Z	32	172	64	21,6
10	Fr. W	20	180	60	18,5
11	Hr. L	56	181	78	23,8
12	Hr. S	25	176	77	24,9
13	Hr. D	34	182	72	21,7
14	Hr. M	27	180	77	23,8
15	Hr. K	30	172	64	21,6

Abbildung 5: Tabelle der Plasmaspender

3.2 Methoden

3.2.1 RIA (Radioimmunoassay)

Zum Nachweis einer Substanz (hier Leptin) werden spezifische Antikörper(Ak) gegen diese Substanz mit einer bekannten Menge radioaktiv markierten Antigens (Tracer, hier Leptin, markiert mit ^{125}Jod) vermischt. Die beiden Komponenten verbinden sich nach dem Massen-Wirkungsgesetz. Die Antikörperverdünnung wird so gewählt, daß etwa 30-40% des Tracers gebunden werden. Durch Zugabe von unmarkiertem Ag der gleichen Spezifität (Testprobe, hier Plasmaproben mit Leptin) kann ein Teil des markierten Antigens aus seiner Antikörperbindung verdrängt werden. Es folgt die Trennung der Ag-Ak-Komplexe vom freien, markierten Ag (Leptin). In unserem Fall wurde dies durch Immunpräzipitation mit einem zweiten Ak gegen Kaninchen-Ak(Kaninchen IgG) erreicht. Nach Trennung und Zählung im Szintillationszähler (Gamma-Counter) läßt sich aus dem Verhältnis von freiem (Überstand) zu gebundenem (unlöslicher Ag-Ak-Komplex, Pellet) radioaktiv markiertem Antigen die Menge des in der Probe vorhanden gewesenen Antigens(Leptin) bestimmen.

3.2.1.1 Lösungen

RIA-Puffer: 0,1M Tris-Puffer (121g Tris-Base /l H₂O, mit HCl auf pH 7,4)
10% Natrium-Acid (100mg NaN₃)
0,1% Polygeline aus Hämaccel (1000mg Polygeline)
0,1% Triton-X (1ml Triton X-100 auf 1000ml H₂O, mit HCl auf pH 7,4)

Polyethylenglykol (PEG)-Lösung: 1000 ml 0,1M Tris-Puffer (pH 7,4) oder 1000ml PBS
10% Polyethylenglykol 6000 (100g)

3.2.1.2 Immunisierung

Durch intradermale Injektionen (5ml Luer Lock Spritze; Braun) wurden Kaninchen (männliche, weiße Neuseelandkaninchen) mit dem kompletten Maus-Leptin immunisiert, das vorher mittels Carbodiimid als Kopplungsreagenz, an Thyreoglobulin gekoppelt wurde(s.u.). Regelmäßig im Abstand von vier Wochen wurden die Tiere geboostert. Um den Antikörper zu gewinnen, wurde den Kaninchen aus einer peripheren Vene Blut abgenommen, in ein mit EDTA benetztes Röhrchen gefüllt und anschließend zentrifugiert. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 in RIA-Puffer als Stammlösung angesetzt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.1.2.1 Thyroglobulin-Peptid-Kopplung :

1mg Peptid (hier Leptin) einwiegen, 5mg Thyroglobulin in 1ml H₂O lösen zum Peptid geben und mixen (Vortex).

12mg Sulfo-NHS in 0,12ml H₂O lösen,

12mg EDC ebenfalls in 0,12ml H₂O lösen.

Zum Peptid/Globulin-Ansatz 0,1ml der Sulfo-NHS-Lösung unter Mixen tropfenweise zugeben, und danach 0,1ml der EDC-Lösung ebenfalls tropfenweise unter Mixen zugeben.

Röhrchen in Alufolie lichtdicht einpacken, und über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen.

3,5mg Hydroxylamin in 0,33ml H₂O lösen, und zum Ansatz geben, gut mixen und 3 Stunden bei Raumtemperatur. stehen lassen.

Anm.: Wird mit Freundschem Adjuvans gemixt und Kaninchen zur Immunisierung intradermal injiziert.

3.2.1.3 Tracer (markiertes Peptid)

Das Leptin, welches für die Antikörpergewinnung verwendet wurde, wurde mit ¹²⁵Jod, unter Zuhilfenahme des oxidierenden Agens Iodogen (Pierce, ca. 10 Minuten Inkubation) markiert und über eine Sephadex-Säule (G-50, Pharmacia Biotech) gereinigt. Der Tracer wurde mit RIA-Puffer auf 4000 bis 6000 cpm/50µl eingestellt.

3.2.1.4 Standards (Verdünnungsreihe)

Bezeichnung	Standards	Ausgl.-(RIA-)Puff.	1.Antikörper	Tracer
3x Total Count (TC)				50
3x Total Bindg.(TB)		200	100	50
3x Blank (BL)		300		50
3x Standard 1	100 aus St.1	100	100	50
3x Standard 2	100 aus St.2	100	100	50
3x Standard 3	100 aus St.3	100	100	50
3x Standard 4	100 aus St.4	100	100	50
3x Standard 5	100 aus St.5	100	100	50
3x Standard 6	100 aus St.6	100	100	50
3x Standard 7	100 aus St.7	100	100	50
3x Standard 8	100 aus St.8	100	100	50
3x Standard 9	100 aus St.9	100	100	50
3x Standard 10	100 aus St.10	100	100	50
Probe 1 bis n	100 Probe X**	100**	100	50

Abbildung 6: Ansatzprotokoll, Mengen in µl

** : Es können auch 200µl Probe eingesetzt werden, dann müsste der Ausgleichspuffer (RIA-) entfallen.

3.2.1.5 Durchführung RIA

Die Durchführung vom Ansetzen des RIA bis zur Vermessung dauerte insgesamt 4 Tage:

1.Tag:

Der erste Antikörper(Ak) wird, je 100 μ l, in einer Verdünnung von 1:8000 (Endkonzentration 8000 x 3,5) in RIA-Puffer zugegeben. Der Ansatz wird bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.Tag:

Zugabe von je 50 μ l Tracer pro Röhrchen. Die Aktivität dieser 50 μ l beträgt 2500 und 3000cpm. Nach der Zugabe werden die Röhrchen durch mixen an einem Vortex gut durchgemischt und für 24h bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.Tag:

Durch Ak gebundenes und nicht gebundenes Leptin wird durch die Zugabe von 100 μ l Anti-Kaninchen-IgG (Sigma) -in einer Verdünnung von 1:20 (zwischen 1:20 und 1:80) in RIA-Puffer pro Röhrchen- getrennt und mit 100 μ l Begleitserum (Kaninchen-normal-Serum) eine Verdünnung 1:300 (zwischen 1:100 und 1:500) erreicht. Nach der Zugabe werden die Röhrchen durch mixen am Vortex gut durchgemischt und für 24h bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.Tag:

Zur Fällung werden pro Röhrchen 1ml 10%ige PEG-Lösung in PBS zugegeben und am Vortex gut durchgemischt. Daraufhin werden die Röhrchen in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) 30 Minuten bei 3200Upm (Rotordurchmesser 30cm) zentrifugiert. Anschließend werden die Überstände sehr vorsichtig abgesaugt, um das Pellet nicht zu zerstören. Sodann werden die Röhrchen verschlossen und im Gamma-Counter („RIA-CALC-Programm“) vermessen. Die IC-50 lag um 30 fmol/tube.

3.2.2 Rezeptorbindungstest (RBT)

In unseren Studien wurden K562-Zellen (humane Erythroleukämie-Zellen) als Träger der Leptinrezeptoren verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine etablierte Zelllinie mit ungewöhnlich hoher und stabiler Expression des Leptin Rezeptors. Der Rezeptorbindungstest entspricht dem Prinzip eines RIA, der 1. Antikörper wird hierbei jedoch durch die Rezeptoren (auf den K562-Zellen) ersetzt. Auf den 2. Antikörper zur Trennung von gebundenem und freiem Leptin kann verzichtet werden, da man durch Zentrifugieren eine gute Trennung der Zellen vom freien Tracer erreicht.

3.2.2.1 Lösungen

Zellsuspension: Zellen aus 8 Plates in 6ml mit RPMI-Puffer (Sigma).

Dies entspricht im Mittel 30 Zellen/1 μ l Suspension (19-41 Zellen)

Puffer: RPMI-Puffer incl.:

-1% L-Glutamine (100x, 29,3mg/ml, PAA)

-1% Penicillin (Penicillin / Streptomycin, 100x,
10000 Units / 10mg/ml, PAA)

-0,36% HEPES (HEPES Buffer Solution, PAA)

-1% BSA (Albumin Fraktion V, Roth)

-pH 7,4 (eingestellt mit 1-M NaOH)

PBS :	NaCl	16g
	KCl	0,4g
	Na ₂ HPO ₄	2,88g
	KH ₂ PO ₄	0,48g
	pH	7,4

3.2.2.2 Züchtung der K562 Zellen

Zelllinie : K562 (humane Erythroleukämie-Zellen, Suspensionskultur)

Gezüchtet bei 37°C im Brutschrank (HERA cell, Heraeus), mit 5% CO₂

Nährmedium: RPMI – 1640 (Sigma)

Gewebekulturflaschen 250ml, 75cm² (Greiner)

3.2.2.3 Tracer (markiertes Peptid)

Das gleiche Peptid, welches für die Antikörpergewinnung verwendet wurde, nur mit einem Tyrosin am C-terminalen Ende versehen, wurde mit ¹²⁵Jod, unter Zuhilfenahme des oxidierenden Agens Iodogen (Pierce, ca. 10 Minuten Inkubation) markiert. Etwa 100000 cpm/tube, hier 120000 cpm/tube in 50µl

3.2.2.4 Standards (siehe 3.2.1.4.)

Unmarkiertes Peptid wurde in den unten angegebenen Konzentrationen und Mengen (siehe Ansatzprotokoll) in RPMI-Puffer zur Erstellung einer Standardkurve eingesetzt.

3.2.2.5 Durchführung RBT

Die Durchführung vom Ansetzen des Rezeptorbindungstests bis zur Vermessung dauerte ca. 30 Stunden.

Bezeichnung (je3-fach)	Zellsusp. (μ l)	Standards aus Verd.Reihe(μ l)	Plasmaprob. (μ l)	Puffer RPMI(μ l)	Strip-Plasma (μ l)*	Tracer (μ l)
Total Counts (Tc)						50
Max. Bindg. (Tb)	100			100	100	50
Unspez. Bdg. an Röhrchen (bl)				200	100	50
Standards (10x)	100	100			100	50
Plasmapr. (Nx)	100		100	100		50

Abbildung 7: Ansatzprotokoll Rezeptorbindungstest

*Anmerkung: Da Plasmaproteine die Bindung von (mit Jod markiertem) Leptin beeinflussen, wurde zur Standardkurve Leptin-freies Plasma ("Strip-Plasma") zugegeben. Dieses Plasma war zuvor mittels Aktivkohle von Leptin befreit worden.

Inkubation:

Ansatz über Nacht bei 4°C inkubieren

Waschung der Zellen: Danach 10 Min. bei 900 UPM und maximal 4°C abzentrifugieren (Hettich Zentrifuge, 20cm Rotordurchmesser), dann vorsichtig abkippen. Pellets mit je 500 μ l eisgekühlter PBS resuspendieren, nochmals zentrifugieren und abkippen wie oben.

Die Pellets werden mit je 500 μ l PBS (kalt) resuspendiert und in neue Röhrchen umgefüllt. Die alten Röhrchen mit eben dieser Menge PBS nachspülen, in die neuen Röhrchen dazukippen. Diese 1000 μ l Suspension ein letztes mal zentrifugieren und

abkippen (wie oben), Pellets (nach Verschluss der Röhren) im Gamma-Counter vermessen.

Das Umfüllen der Suspension nach der Waschung in neue Röhren ist nötig, da nur so diejenige Radioaktivität, die sich während der Inkubation an der Röhrenwand unspezifisch angelagert hat, eliminiert werden kann.

3.2.3 Statistische Auswertung

Die Werte sind als Mittelwerte \pm SE (Standardfehler) dargestellt.

Lineare Regressionen wurden erstellt mit der Least Squares Methode.

Die Ergebnisse wurden statistisch unter Anwendung des Student's t-Test verglichen.

Ein p-Wert von $\leq 0,01$ kennzeichnet eine signifikante Differenz.

4 Ergebnisse

4.1 Immunisierungserfolg, Titerkurven

Die Immunisierungserfolge wurden jeweils durch einen Vergleich der 30%igen Bindung des Tracers bei entsprechender Serumverdünnung erstellt. Nach der dritten Boosterung zeigen sich gute Titer bei Kaninchen 2 und 3. Diese Antikörper wurden im Verlauf der Studie verwendet.

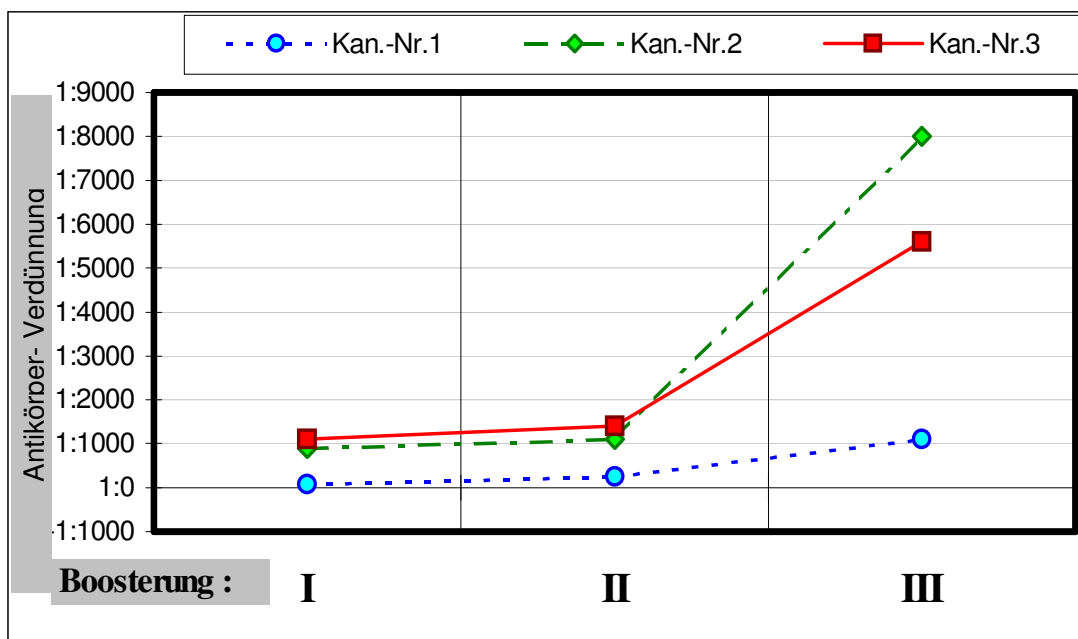


Abbildung 8: Antikörper - Titerentwicklung mit zunehmender Boosterung. Es wurde jeweils der Titer gewählt, bei dem 30% Bindung vorlag. Die Titerangabe bezieht sich auf die Verdünnung im Volumen des zugegebenen Antikörpers. Um die Endverdünnung im Ansatz zu berechnen, muß die angegebene Antikörperverdünnung mit dem Faktor 3,5 multipliziert werden.

4.2 Standardkurven

4.2.1 RIA

Nach der Titer-Bestimmung wurden Standardkurven in 3fach-Werten erstellt. Als Beispiel ist eine repräsentative RIA Standardkurve mit einer 50%igen Verdrängung bei 64 fmol unten aufgeführt (Bei einem Molekulargewicht des Leptin von 16000 entsprechen 64 fmol 1024 pg)

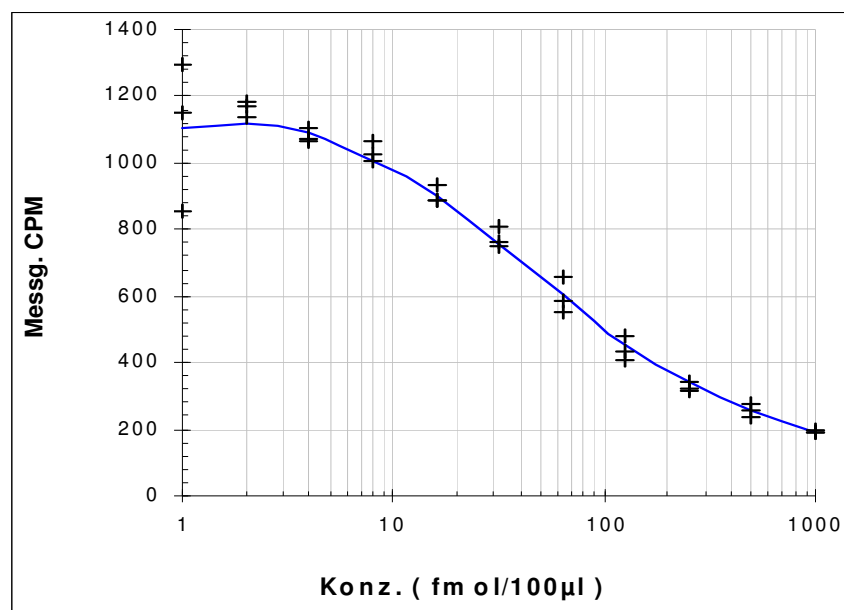


Abbildung 9: Standardkurve RIA

4.2.2 RBT

Als Beispiel für eine Bindungskurve an K562 Zellen ist eine repräsentative Standardkurve, 50%ige Verdrängung bei 8,5 fmol (entspricht 136 pg), unten aufgeführt.

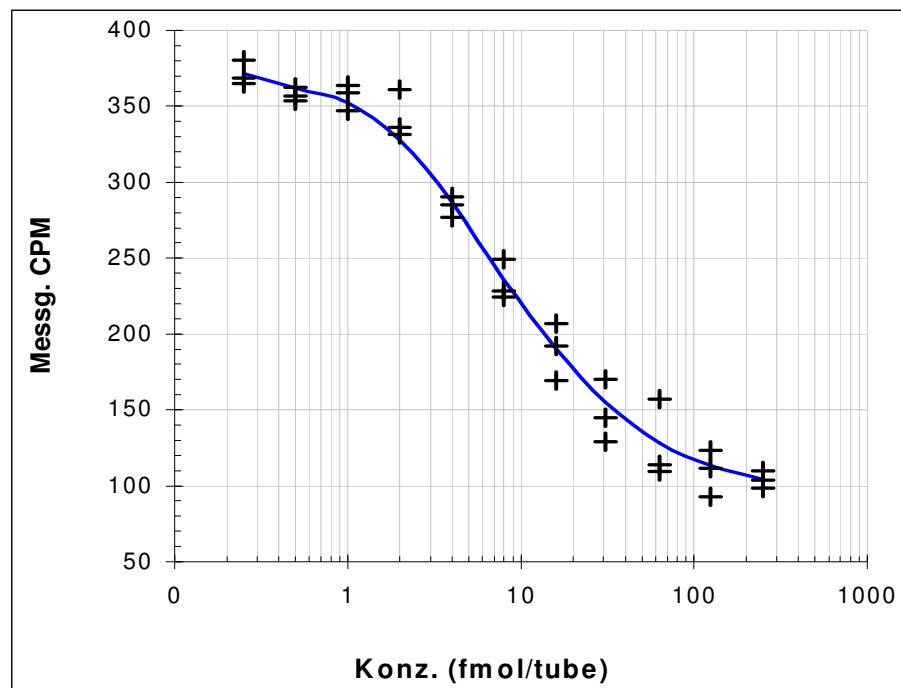


Abbildung 10: Standardkurve RBT

4.3 Korrelation der Meßwerte (Leptin) mit dem BMI

Die bekannte, positive Korrelation zwischen dem aus Körpergröße und Körpergewicht errechneten body mass index (BMI, Körpergröße in kg / Körperlänge (m)²) und dem Leptinwert (in fmol) war auch in unseren Untersuchungen nachweisbar. Die Korrelation entspricht am ehesten einer logarithmischen Beziehung.

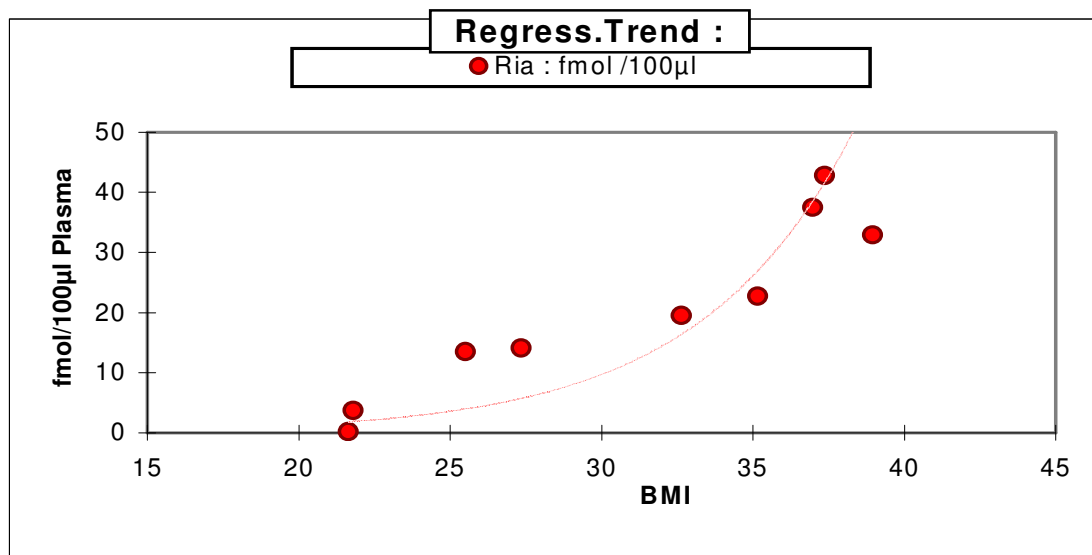


Abbildung 11: Korrelation des body mass index mit dem Plasma Leptin Spiegel, gemessen mit einem RIA

4.4 Vergleich RIA – Rezeptorbindungstest (RBT) als Meßmethoden für Plasma Leptin

Die Plasmaproben von insgesamt 15 Personen unterschiedlichen Körpergewichts (BMI 19-39) wurden zum einen mit unserem RBT (K562 Zellen) und zum anderen mit unserem RIA unter gleichen Bedingungen vermessen.

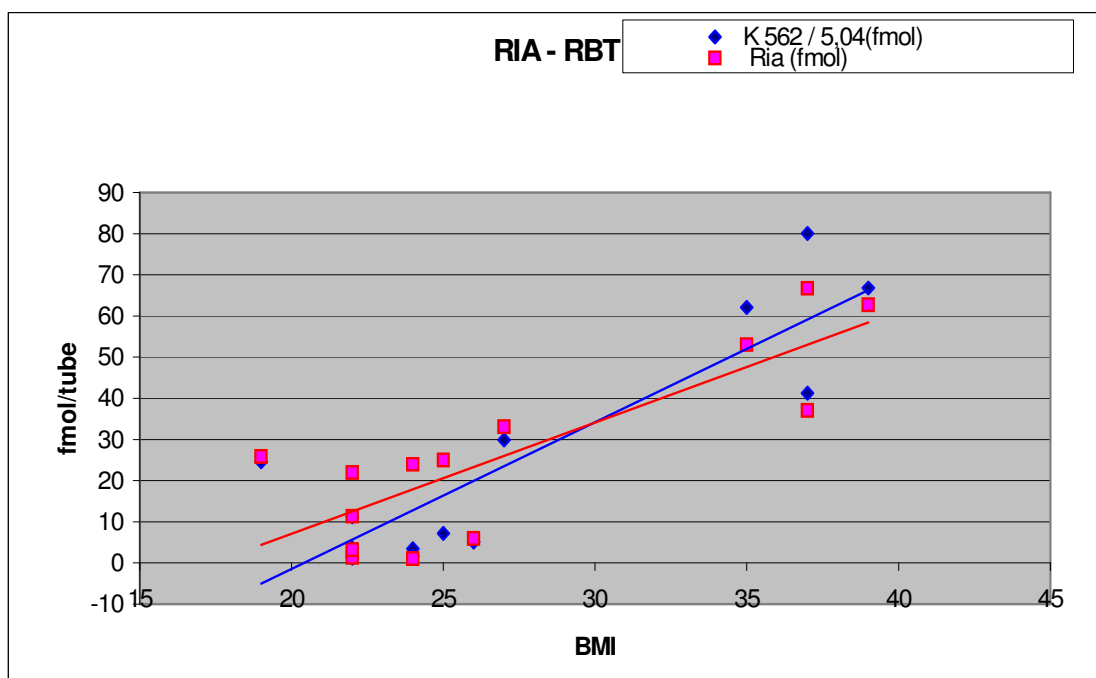


Abbildung 12: Beziehung zwischen BMI und Leptin-Spiegel, Gegenüberstellung

RIA (□) und RBT (◇)

Gesamtvolumen / tube ist 400µl (100µl Plasma)

Abbildung 13 zeigt den direkten Vergleich der Meßergebnisse des RIA gegenüber den Meßergebnissen des Rezeptorbindungstest (RBT) bei gleichen Plasmaproben. Die erhaltenen Messwerte sind gegeneinander gestellt.

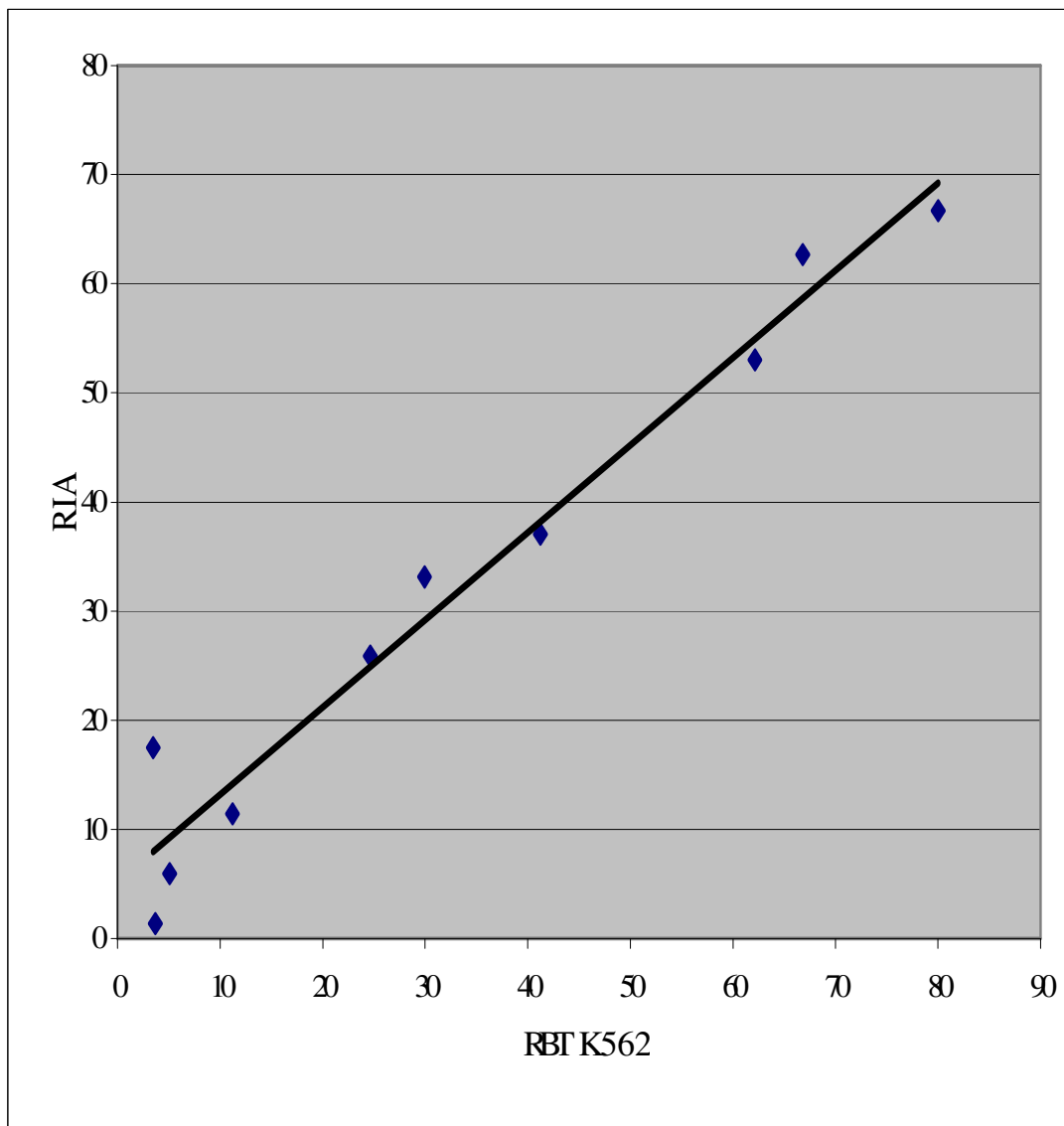


Abbildung 13: Regression Rezeptorbindungstest (RBT) mit K562 Zellen gegen den RIA, gleiche Plasmaproben, Werte in fmol/tube, Gesamtvolumen / tube ist 400 μ l (100 μ l Plasma). Die Abweichungen von der linearen Trendlinie zeigen die Abweichung der Meßmethoden untereinander an.

Korrelationskoeffizient $r=0,896$

4.5 Intraassay – Varianz des RIA

Um zu prüfen, wie groß die Abweichung / Streuung der Meßergebnisse der gleichen Probe innerhalb eines einzelnen Assays ist, wurde die Intraassay–Varianz bestimmt. Hier als Beispiel aufgeführt ist eine Meßreihe innerhalb eines RIA mit einem Serum mit hoher und einem solchen mit niedriger Aktivität, von dem jeweils 24 Proben eingesetzt wurden.. Aufgeführt ist jeweils der Mittelwert aus einer 3fach Bestimmung.

Assay-Nr.:	fmol/tube // %	
	High	Low
1	11,6//22,25	4,6//8,55
2	14,0//6,17	4,3//14,51
3	13,6//8,85	3,8//24,45
4	12,2//18,23	4,2//16,50
5	15,1//1,21	3,8//24,45
6	14,7//1,47	4,5//10,54
7	14,4//3,49	4,5//10,54
8	13,8//7,51	4,8//4,57
9	14,6//2,14	4,1//18,49
10	14,4//3,49	6,2//23,26
11	14,3//4,16	4,7//6,56
12	13,9//6,84	5,7//13,32
13	12,7//14,88	4,3//14,51
14	13,3//10,86	5,2//3,38
15	14,4//3,49	5,0//0,56
16	15,9//6,57	3,8//24,45
17	15,1//1,21	5,5//9,34
18	15,6//4,56	5,6//11,33
19	15,1//1,21	5,4//7,36
20	17,3//15,95	6,2//23,26
21	18,2//21,98	6,0//19,28
22	17,9//19,97	6,3//24,45
23	18,5//23,99	6,2//23,26
24	17,7//18,63	5,9//17,30

Abbildung 14: fmol//% Abweichung vom Mittelwert

	High	Low
Mittelwerte	14,92	5,03
Stabw.	1,85	0,85
Stabw. %	12,39	16,83

Abbildung 15: Mittelwerte mit Standardabweichung der Intraassay - Varianz

4.6 Interassay – Varianz des RIA

Um zu prüfen, wie groß die Abweichung der Meßergebnisse der gleiche Probe innerhalb fünf einzelner Assays ist, wurde die Interassay-Varianz gemessen. Hier aufgeführt sind fünf Meßreihen mit je 2 Proben.

	gemess. Aliquots v.:	HIGH	LOW
Dat.-Nr.:	Ria v., (Datum)	fmol/ 100µl	fmol/ 100µl
1	08-Dez- 1999	143,76	6,21
2	11-Jan- 2000	128,46	4,75
3	17-Jan- 2000	151,05	4,46
4	25-Jan- 2000	118,37	7,46
5	08-Feb- 2000	131,44	4,19

Abbildung 16: Quelldatei Interassay-Varianz

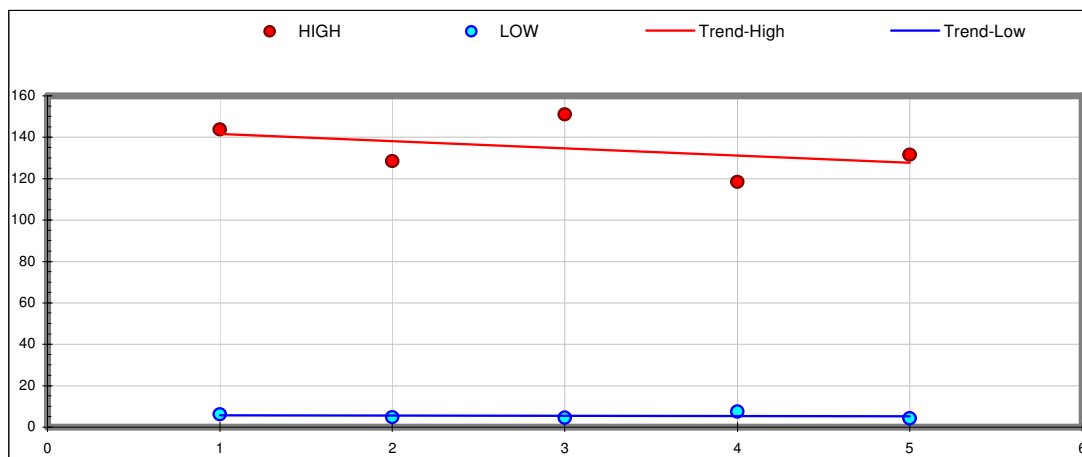


Abbildung 17: Interassay-Varianz (Daten aus Abb. 16)

Mittelwerte: High 134,62 fmol/100µl, Low 5,41 fmol/100µl. Dies entspricht einer prozentualen Abweichung im Mittel von 7,6% (High) bzw. 21% (Low).

4.7 Einfluß von Frieren/Tauen und Hämolyse auf die Leptin-Immuno-reaktivität im Plasma

4.7.1 Frieren / Tauen der zu bestimmenden Proben

Vor der Messung wurden die Proben 1-5x über mehrere Stunden bei ca. -70°C weggefroren, danach wieder bis auf $+30^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. RIA vom 08.12.1999, ED50 = 19,22 fmol.

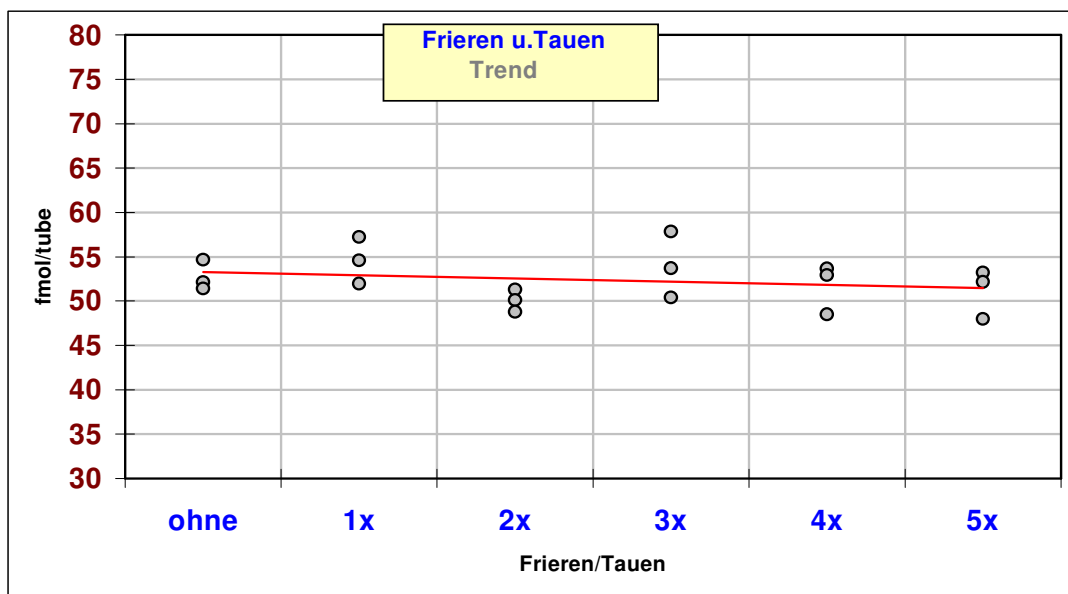


Abbildung 18: Graphische Darstellung Frieren und Tauen

Gesamtvolumen / tube 500 μl , 100 μl Plasma.

4.7.2 Hämolyse der zu bestimmenden Proben

Vor der Messung und vor der Trennung des Plasma wurden die Proben durch schnelles Auf und Ab durch eine 14`er Kanüle mechanisch hämolysiert. Im histologischen Ausstrich waren nur noch sehr wenige, intakte Erythrozyten (<5%) erkennbar.

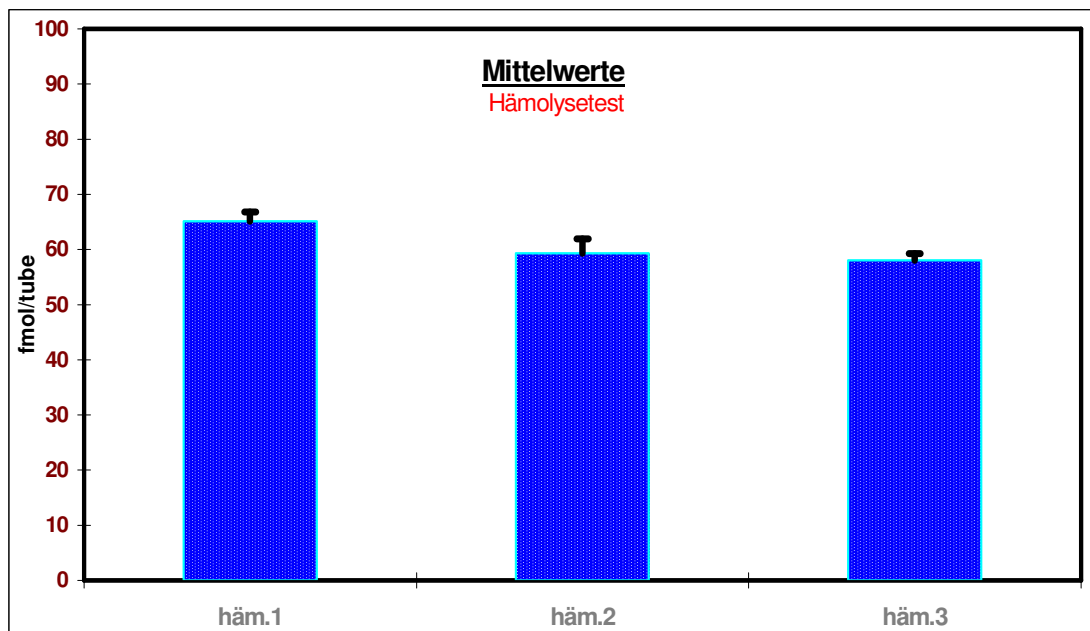


Abbildung 19: Graphische Darstellung des Effektes einer Hämolyse auf die radioimmunologisch gemessenen Leptin-Spiegel.

Gesamtvolumen / tube 500 μ l, 100 μ l Plasma.

5 Diskussion

Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen war es, als Alternative zu der radioimmunologischen Bestimmung, einen Rezeptor-Bindungs-Assay für Leptin aufzubauen und zu überprüfen, ob sich dieser für die Bestimmung von Leptin im menschlichen Plasma ebenfalls eignet.

Ausgangspunkt war die Überlegung, daß im Unterschied zum Radioimmunoassay die Bestimmung mittels Rezeptor-Bindungs-Assay mit größerer Zuverlässigkeit das tatsächlich biologisch verfügbare Hormon erfaßt, da hier zu Detektion genau das Instrument eingesetzt wird, welches seine Wirkung an der Zelle vermittelt, also der Rezeptor. Die im Radioimmunoassay eingesetzten Antikörper erkennen vorzugsweise Epitope des Hormonmoleküls, die hohe Antigenizität aufweisen, für die biologische Aktivität aber ohne Bedeutung sein können. Das birgt die Gefahr in sich, daß das Hormon auch in biologisch unwirksamer Form erkannt wird, beispielsweise in Assoziation mit Bindungsproteinen oder als inaktives Abbauprodukt. Dies kann zu verfälschten Meßergebnissen und unkorrekten Interpretationen führen.

Die Erythroleukämie-Zell-Linie K562, die im Bindungsassay zum Einsatz kam, wurde ursprünglich aus dem Pleuraexsudat eines Patienten mit leukämischem Blastenschub isoliert. Die Zellen weisen eine lymphoblasten-ähnliche Morphologie auf und verfügen, wie für einige hämatopoietische Vorläuferzellen beschrieben, über eine ungewöhnlich hohe Expressionsrate für den Leptin-Rezeptor. Nach Untersuchungen in unserem Labor bilden sie sowohl die lange (OB-Rb) als auch die kurze (OB-Ra) Form des Rezeptors. Die Bindung des Leptin an den Rezeptor erfolgt mit hoher Affinität. Nach unseren Untersuchungen beläuft sich der KD-Wert auf 10^{-9} M bis 10^{-10} M. Die Plasmaspiegel für Leptin normalgewichtiger Personen bewegen sich ebenfalls in diesem Bereich (Considine RV et al. 1996, McGregor GP et al. 1996). Dies zusammen mit der hohen Rezeptordichte ließ erwarten, daß sich K562 Zellen als ausgezeichnetes Werkzeug in der Erstellung eines Bindungsassays erweisen könnten.

Im Gegensatz zu früheren Immunisierungen in diesem Labor, in denen eine kurze Teilsequenz des humanen Leptin zur Gewinnung von AK diente, wurde in den hier

beschriebenen Experimenten eine rekombinante Form des gesamten Moleküls des Leptin der Maus als Antigen verwendet. Grund für die erneute Immunisierung war das Bestreben, einen AK zu gewinnen, der das Leptin von Ratte und Maus erkennt. Die Teilsequenz, die in unseren früheren Immunisierungen als Antigen Verwendung fand, wies nur eine geringe Homologie zum korrespondierenden Abschnitt im Leptin der Nager auf, so daß es auch nur zu einer sehr geringen Kreuzreaktion mit dieser Spezies kam. Wie aus den hier vorgestellten Daten hervorgeht, sind die mit dem rekombinanten Leptin der Maus entwickelten Antiseren auch für den Nachweis des menschlichen Leptin geeignet. Offenbar existieren auf dem Hormon Epitope mit Homologie zwischen Maus und Mensch, die immunologisch bevorzugt erkannt werden.

Der Radioimmunoassay ist mit einer Nachweisgrenze von unter 1fmol/100µl gut für die Messung im Plasma geeignet. Da die Messung des Leptin ohne vorhergehende Extraktion direkt im Plasma erfolgt, wurde den Standards Plasma hinzugefügt, welches über Aktivkohle vom endogenen Leptin gereinigt wurde. Dies ist zur Kompensation unspezifischer Effekte der Plasmaproteine auf die Antigen-/Antikörperbindung erforderlich. Wir haben in Vorexperimenten festgestellt, daß die Konfiguration einer Standardkurve ohne Plasmazusatz erheblich von solchen, die in Anwesenheit von leptin-freiem Plasma erstellt wurden, abweicht und somit nicht zur Ablesung von Proben verwendet werden kann. Der Versuch der Kompensation unspezifischer Effekte von Plasmaproteinen auf die Bindung durch Supplementierung der Standards mit Plasma aus einem leptin-freien Pool ist allerdings ebenfalls fragwürdig. Exakterweise müßte für jedes Probanden- oder Patientenplasma eine leptin-freie Kontrolle mitgeführt werden, da es denkbar ist, daß individuelle Plasmen die Bindung unspezifisch in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Dieses Problem bedarf einer weiteren Abklärung in zukünftigen Versuchen.

Mit den gleichen Vorbehalten ist der Bestimmung des Leptin im Bindungstest zu begegnen. Auch hier war zu beobachten, daß Plasma unspezifisch mit der Ligand-/Rezeptorbindung interferiert. Der Effekt vermindert sich mit der Reduktion des Probenvolumens, dem seinerseits aber aus Gründen der Nachweisempfindlichkeit nach unten Grenzen gesetzt sind.

Die Stabilität des Leptin im Blut scheint außerordentlich hoch zu sein. Weder mehrfaches Frieren und Tauen noch ausgeprägte Hämolyse vermochten die Immunreaktivität des Hormons in unseren Versuchen zu beeinträchtigen. Hämolyse ist im allgemeinen bei der Bestimmung von bioaktiven Peptiden streng zu vermeiden, da sie zur Freisetzung von Peptidasen und damit zum Abbau der Peptide führt. Da wir in den vorliegenden Experimenten die Intaktheit des Moleküls nicht chromatographisch untersucht haben, können wir allerdings nicht ausschließen, daß es doch zum partiellen Verdau kam und in unserem RIA Fragmente erkannt wurden.

Mit beiden Nachweismethoden, Radioimmunoassay und Rezeptor-Bindungs-Assay, wurde erwartungsgemäß eine Abhängigkeit der Plasmaspiegel vom BMI beobachtet. Die geringe Zahl der Probanden erlaubt allerdings keine statistische Analyse der Korrelation. In der Literatur wird, große Fallzahlen vorausgesetzt, eine logarithmische Beziehung zwischen den beiden Größen gefunden.

Zur Übereinstimmung der Meßergebnisse von RIA und RBT können nur grobe Angaben gemacht werden, da die Zahl der Proben in den Vergleichsmessungen äußerst gering ist. Es zeichnet sich aber ab, daß beide Meßmethoden zu vergleichbaren Ergebnissen kommen. Es wäre somit davon auszugehen, daß aus die radioimmunologische Messung lediglich die Konzentration des zirkulierenden Leptins mißt, die für den Rezeptor verfügbar und damit auch biologisch wirksam ist. In der Literatur finden sich inzwischen eine ganze Reihe von Hinweisen auf die Existenz von Plasmaproteinen, die Leptin zu binden vermögen (Sinha M.K. et al. 1996, Lewandowski K et al. 1999, Lammert A et al. 2001). Die ersten Befunde am Menschen deuteten eher auf eine unspezifische Assoziation des sehr basischen Leptin an Plasmaproteine hin. Untersuchungen an der Maus und der Ratte führten jedoch bald zu der Erkenntnis, daß sich in diesen Tieren eine lösliche Form des Leptinrezeptors (OB-Re) im Blut befindet. Bei OB-Re handelt es sich um eine Splice-Variante des OB-R Gens, die lediglich aus dem extrazellulären Teil des Rezeptors besteht und somit nicht in die Plasmamembran integriert werden kann. Besonders hohe Spiegel des zirkulierenden OB-Re wurden in trächtigen Tieren entdeckt. Sie sind vermutlich auf seine exzessive Produktion in der Plazenta zurückzuführen (Senaris R et al. 1997, Gong DW et al. 1996). Eine Analyse des humanen OB-R Gens hat ergeben, daß diese Splice-Variante beim Menschen nicht existiert. Neueste Studien

zeigen aber, daß auch beim Menschen ein Protein im Blut zirkuliert, welches mit AK gegen OB-R reagiert, Leptin zu binden vermag und eine Größe aufweist, die der des OB-Re entsprechen könnte (Lammert A et al. 2001). Es bedarf weiterführender Experimente um herauszufinden, welchen Geweben diese lösliche Rezeptorform entstammt und ob sie möglicherweise enzymatisch von der Zelloberfläche durch Abspaltung einer langen Rezeptor-Variante abgelöst wird. Fest steht, daß die Konzentration des löslichen Rezeptors variiert und über den Anteil an freiem Leptin im Plasma entscheidet. (Landt M 2000). Somit kommt ihm auch eine funktionelle und möglicherweise klinisch relevante Aufgabe zu. Die hier präsentierten Daten zeigen, daß es prinzipiell möglich ist, einen Rezeptorbindungstest für den Nachweis von Leptin im Blut zu verwenden. Bedingung für seine Realisierung ist die Verfügbarkeit von Zellen mit ausreichend hoher Dichte hoch affiner Rezeptoren. Diese Voraussetzung wird von den K562 Zellen in idealer Weise erfüllt. Die praktische Durchführung des Bindungstestes ist komplexer als die des Radioimmunoassays. Die Züchtung der Zellen ist aufwendiger, weniger reproduzierbar und kostspieliger als die Gewinnung von Antiseren, die sich auf einen einmaligen Arbeitsgang beschränkt. Die Handhabung der Zellen im eigentlichen Arbeitsgang erfordert wesentlich mehr Sorgfalt als der Umgang mit RIA Reagenzien. Dies betrifft besonders die Waschschrte, die für Zellen schonender gestaltet werden müssen als für AK. Man wird deshalb bei gleicher Meßleistung aber wesentlich geringerer Praktikabilität des Bindungsassays in jedem Fall dem RIA den Vorzug in der Bestimmung des Leptin geben.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde ein Radioliganden-Rezeptor-Bindungstest zum Nachweis des Plasma-Leptin entwickelt und seine Praktikabilität im Vergleich zur Radioimmunologischen Bestimmung überprüft. Zur Gewinnung von AK gegen Leptin wurden Kaninchen mit rekombinantem Leptin der Maus immunisiert. Alle Tiere antworteten mit einer positiven Immunreaktion. Das Antiserum mit dem höchsten Titer kam im Radioimmunoassay in einer Endverdünnung von 1:28000 zum Einsatz, die Kreuzreaktion mit humanem Leptin belief sich auf 100%. Die IC-50 lag um 30 fmol/tube(350µl) humanem Leptin. In der Durchführung der RBT's kamen Zellen der Erythroleukämie-Zelllinie K562, die sich durch einen besonders hohen Besatz von Leptinrezeptoren auszeichnen, zur Anwendung. 50% Verdrängung des Radioliganden wurden bei ca. 10 fmol/100µl Leptin beobachtet. Mit beiden Nachweismethoden wurde eine positive Beziehung zwischen BMI und Leptinkonzentration im Plasma gefunden. Die Analyse der Meßwerte in einer limitierten Zahl von Patienten deutet darauf hin, daß mit beiden Verfahren vergleichbare Meßergebnisse erzielt werden. Dies läßt, mit Einschränkung, den Schluß zu, daß mit beiden Methoden das biologisch verfügbare Hormon gemessen wird. Angesichts ähnlicher Leistung bei weitaus höherer Praktikabilität des RIA bleibt die Anwendung des RBT speziellen Studien der Rezeptorphysiologie vorbehalten.

7 Literatur

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996): Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17: 305-311

Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA (1996): Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology* 137: 3144-3147

Bengtsson C, Björkelund C, Lapidus L, Lissner L (1993): Associations of serum lipid concentrations and obesity with mortality in women: 20 years follow up of participants in prospective population study in Gothenburg, Sweden. *British medicine Journal* 307: 1385-1387

Bennek C, Gehrt I, Keller A, Keller I, Kratzsch J, Blum WF, Kiess W (1999): Arginine infusion and / or acute changes of growth hormone levels do not acutely alter leptin serum levels. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 12 (6): 847-851

Bennett BD, Solar GP, Yuan JQ, Mathias J, Thomas GR, Matthews W (1996): A role for leptin and its cognate receptor in hematopoiesis. *Curr. Biol.* 6: 1170-1180

Berti L, Kellerer M, Capp E, Haring HU (1997): Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: Evidence for a PI3-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40: 606-609

Bierman EL, Hirsch J (1981): Obesity in: Textbook of Endocrinology. Hrsg. R. H. Williams. W. B. Saunders Company, 907-921

Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA (1997): Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland. Leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46: 1235-1238

Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV (2000): The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 71(3): 187-195

Burton BT, Foster WR, Hirsch J, Van Itallie TB (1985): Proceedings, NIH consensus development conference, health implications of obesity. *Int. J. Obesity* 9: 155

Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996): Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* 12: 318-320

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP (1996): Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84: 491-495

Chua SC,J.r., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L, Leibel RL (1996): Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271: 994-996

Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HR (1996): Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat. Med.* 2: 585-589

Coleman DL, Hummel KP (1969): Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice. *Am. J. Physiol.* 217: 1298-1304

Coleman DL (1973): Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9: 294-298

Coleman DL (1978): Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes- obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141 – 148

Considine RV, Considine RL, Williams CJ, Hyde TM, Caro JF (1996): The hypothalamic leptin receptor in humans: identification of incidental sequence polymorphisms and absence of the db/db mouse and fa/fa rat mutations. *Diabetes* 45: 992-994

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, Mc Kee LJ, Bauer TL et al. (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* Feb 1; 334 (5): 292-295

Cumin F, Baum HP, Levens N (1997): Mechanism of leptin removal from the circulation by the kidney. *J. Endocrinol.* 155(3): 577-585

De Vos R, Richards JG, Campfield LA, Tartaglia LA, Guisez Y, van der Heyden J, Tavernier J, Plaetinck G, Burn P (1996): OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 5668-5673

Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH (1997): Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 14: 119-128

Edwards KDG, Whyte HM (1962): The simple measurement of obesity. Clin.Sci.22:347

Fehmann HC, Peiser C, Bode HP, Stamm M, Staats P, Hedetoft C, Lang RE, Goke B (1997): Leptin: a potent inhibitor of insulin secretion. Peptides 18 (8): 1267-1273

Forbes GB, Gallup J, Hirsch JB (1961): Estimation of total body fat from 40K content. Science 133: 101-102

Frisch RE, McArthur J (1974): Menstrual cycles: Fatness as a determinant of minimum weight or height necessary for maintenance or onset. Science 185: 949-951

Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, Handman E, Mc Farlane C, Ng A, Nicola NA, Alexander WS, Hilton DJ (1996): Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14564-14568

Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A, Stoffel R, Heim MH, Skoda RC (1996): Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 93: 6231-6235

Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA (1996): The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. *Bone* 19: 421-428

Gong DW, Bi S, Pratley RE, Weintraub BD (1996): Genomic structure and promoter analysis of the human obese gene. *J. Biol. Chem.* 271: 3971-3974

Grundy SM & Barnett JP (1990): Metabolic and health complications of obesity. *Disease-a-month* 36: 645-696

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546

Hassink SG, Sheslow DV, de Lancey E, Opentanova I, Considine RV, Caro JF (1996): Serum leptin in children with obesity: relationship to gender and development. *Pediatrics* 98: 201-203

Hauner H (1995): Abdominelle Adipositas und koronare Herzkrankheit. *Herz* 20: 47-55

Hausberger FX (1958): Parabiosis and transplantation experiments in hereditarily obese mice. *Anat. Rec.* 130: 313

Hebebrand J, Hinney A, Klug J (1995): Neue molekularbiologische Befunde zur Regulation des Körpergewichtes. *Schlaglicht, Biospektrum* 3.95 2. Jahrgang: 30-32

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schonert B, Stephens TW, Flier JS (1997): Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138(9): 3859-3863

Henriksen JH, Holst JJ, Moller S, Brinch K, Bendtsen F (1999): Increased circulating leptin in alcoholic cirrhosis: relation to release and disposal. *Hepatology* 29(6): 1818-1824

Hervey GR (1959): The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J. Physiol.* 145: 336-352

Hileman SM, Tornøe J, Flier JS, Bjorbaek C (2000): Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* 141(6): 1955-1961

Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K (1996): Phenotype-linked amino acid alteration in leptin receptor cDNA from Zucker fatty (fa/fa) rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 19-26

Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M (1987): Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84(24): 9035-9039

Jensen MD, Hensrud D, O'Brien PC, Nielsen S (1999): Collection and interpretation of plasma leptin concentration data in humans. *Obes. Res.* 7 (3): 241-245

Kennedy GC (1953): The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc. R. Soc. Series B.* 140: 578-592

Kennedy GC, Mitra J (1963): Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.* 166: 408-418

Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL (1972): Indices of relative weight and obesity. *J. Chronic. Dis.* 25: 329-343

Kieffer TJ, Heller RS, Habener JS (1996): Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 522-527

Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF (1997): Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 46: 1087-1093

Kirchner H, Kruse A, Neustock P, Rink L (1993): Cytokine und Interferone: Botenstoffe des Immunsystems. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 1.korr. Nachdruck 1994, 30-63

Kishimoto T, Taga T, Akira S (1994): Cytokine signal transduction. *Cell.* 76: 253-262

Kline AD, Becker GW, Churgay LM, Landen BE, Martin DK, Muth WL, Rathnachalam R, Richardson JM, Schonher B, Ulmer M, Hale JE (1997): Leptin is a four-helix bundle: Secondary structure by NMR. *FEBS Lett.* 407: 239-242

Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Hahn EG (1999): Gastroprotection and control of food intake by leptin. Comparison with cholecystokinin and prostaglandins. *J. Physiol. Pharmacol.* 50(1): 39-48

Lammert A, Kiess W, Bottner A, Glasow A, Kratzsch J (2001): Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* May 18; 283(4): 982-988

Landt M (2000): Leptin binding and binding capacity in serum. *Clin. Chem.* 46(3): 379-384

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM (1996): Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635

Lewandowski K, Horn R, O'Callaghan CJ, Dunlop D, Medley GF, O'Hare P, Brabant G (1999): Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(1): 300-306

Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M (1995): Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Medicine* 1: 950-953

Madej T, Boguski MS, Bryant SH (1995): Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine. *Febs Lett.* 373: 13-18

Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy O, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM (1995): 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. 92: 6957-6960

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley E, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM (1995): Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. Nature Medicine 1: 1155-1161

Malik KF, Young WS (1996): Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) C57BL/6L mice. Endocrinology 137: 1497-1500

Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satho N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, Jingami H, Kawada T, Nakao K (1995): Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. Diabetes 44: 855-858

McGregor GP, Desaga JF, Ehlenz K, Fischer A, Heese F, Hegele A, Lammer C, Peiser C, Lang RE (1996): Radioimmunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. Endocrinology 137 (4): 1501-1504

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P (1996): 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: 113-116

Mikhail A, Beck EX, Shafer A, Barut B, Smith Gbur J, Zupancic TJ, Schweitzer AC, Cioffi JA, Lacuaud G, Ooyang B, Keller G, Snodgrass HR (1997): Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. Blood 89: 1507-1512

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly SO (1997): Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 387: 903-908

Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G (1997): Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. J. Biol. Chem. 272: 1585-1593

Nicos A. Nicola (1994): Guidebook to cytokines and their receptors. A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press: 56-61

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F (1995): Effects of the obese gene product and body weight regulation in ob/ob mice. Science 269: 540-543

Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte J.r. D, Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS (1996): Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45: 531-535

Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte J.r. D (1996): Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2: 589-593

Schwartz MW, Seeley RJ (1997): Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *New England Journal of Medicine* 336 J. S. Flier, L. H. Underhill, editors. 1802-1811

Senaris R, Garcia-Cabellero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine RV, Dieguez C, Casanueva FF (1997): Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138(10): 4501-450

Shimizu H, Kakizaki S, Tsuchiya T, Nagamine T, Takagi H, Takayama H, Kobayashi I, Mori M (1998): An increase of circulating leptin in patients with liver cirrhosis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 22(12): 1234-1238

Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker GW, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF (1996): Evidence of free and bound leptin in human circulation: Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J. Clin. Invest.* 98: 1277-1282

Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF (1996): Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J. Clin. Invest.* 97: 1344-1347

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SK, Craft L, Hale J, Hofmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, MacKellar W, Rosteck PR, Schoner B, Smith D, Tinsley FC, Zhang XJ, Heiman M (1995): The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377: 530-532

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield A, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Woolf EA, Monroe CA, Tepper RI (1995): Identification and expression cloning of leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271

Thomson A (1992): *The Cytokine Handbook*. Copyright © 1991 by Academic Press Limited, second printing 1992: 169-184

Turton MD, O'Shea D, Gunn I, Beak SA, Edwards CM, Meeran K, Choi SJ, Taylor GM, Heath MM, Lambert PD, Wilding JP, Smith DM, Ghatgei MA, Herbert J, Bloom SR (1996): A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379(6560): 69-72

Vettor R, Zarjevski N, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1994): Induction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats. *Diabetologia* 37: 1202-1208

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L (1998): A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393(6686): 684-688

White DW, Tartaglia LA (1996): Leptin and OB-R: Body weight regulation by a cytokine receptor. *Cell Growth Factor Rev.* 7: 303-309

Wolthers OD, Heuck C, Skjaerbaek C (1999): Diurnal rhythm in serum leptin. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 12(6): 863-866

Zachow RJ, Magoffin DA (1997): Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138(2): 847-850

Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorich LP, Bhat GK, Brann DW (1997): Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 65: 223-228

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994): Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425-432

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Leptin	3
1.2.1	Cytokine.....	4
1.2.2	Physiologische Wirkung des Leptin	5
1.2.3	Leptin-Spiegel im Blut.....	9
1.2.4	Elimination von Leptin	9
1.3	Leptinrezeptor	11
1.3.1	Lokalisation der Rezeptorexpression, Funktion	13
2	AUFGABENSTELLUNG	15
3	MATERIAL UND METHODIK.....	16
3.1	Materialien	16
3.1.1	Chemikalien	16
3.1.2	Geräte.....	16
3.1.3	Proben	17
3.2	Methoden.....	19
3.2.1	RIA (Radioimmunoassay)	19

3.2.1.1	Lösungen	20
3.2.1.2	Immunsisierung.....	20
3.2.1.2.1	Thyroglobulin-Peptid-Kopplung :.....	21
3.2.1.3	Tracer (markiertes Peptid).....	21
3.2.1.4	Standards (Verdünnungsreihe).....	22
3.2.1.5	Durchführung RIA.....	23
3.2.2	Rezeptorbindungstest (RBT)	24
3.2.2.1	Lösungen	24
3.2.2.2	Züchtung der K562 Zellen.....	25
3.2.2.3	Tracer (markiertes Peptid).....	25
3.2.2.4	Standards (siehe 3.2.1.4.)	25
3.2.2.5	Durchführung RBT.....	26
3.2.3	Statistische Auswertung.....	27
4	ERGEBNISSE	28
4.1	Immunsisierungserfolg, Titerkurven	28
4.2	Standardkurven	29
4.2.1	RIA.....	29
4.2.2	RBT.....	30
4.3	Korrelation der Meßwerte (Leptin) mit dem BMI.....	31
4.4	Vergleich RIA – Rezeptorbindungstest (RBT) als Meßmethoden für Plasma Leptin	32
4.5	Intraassay – Varianz des RIA	34
4.6	Interassay – Varianz des RIA	35

4.7	Einfluß von Frieren/Tauen und Hämolyse auf die Leptin-Immuno-reaktivität im Plasma.....	36
4.7.1	Frieren / Tauen der zu bestimmenden Proben	36
4.7.2	Hämolyse der zu bestimmenden Proben.....	37
5	DISKUSSION	38
6	ZUSAMMENFASSUNG	42
7	LITERATUR	43

CURRICULUM VITAE

M A R T I N K L E M P

Geb. 29.01.1967 in Schwabenrod, ledig, deutsch, evangelisch

DERZEITIGE TÄTIGKEIT

Assistenzarzt im AK Wandsbek HH, II. Chirurgie seit 10/2000

BERUFSERFAHRUNG

- 1987 und 1988 Pflegepraktika , Abt. Innere und Chirurgie
- 1989 und folgende jeweils ca. 6-8 Wochen Aushilfe im Altenwohnheim (Schwerpunkt Gehbehinderte)
- 1994 Famulatur im Kantonsspital Luzern, Abt. prakt. Chirurgie unter der Leitung von Oberarzt Dr. J. Baumgartner
- 1995 Famulatur in der Allgemeinmed. Praxis Dr. B. Amthauer (2 Monate)
- 1995 Famulatur im KKH Alsfeld, Abt. Anästhesie unter der Leitung von Chefarzt Dr. med. J. Pfann
- 1997–1998 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Marburg:
 - 1. Terial Innere Med., Abt. Kardiologie, Leitung Prof. Dr. Maisch
 - 2. Terial Chirurgie, Abt. Traumatologie, Leitung Prof. Dr. Gotzen
 - 3. Terial Orthopädie (Wahlfach), Leitung Prof. Dr. Griss
- 01.07.98 bis 31.12.99 AiP i.d.orthopädischen. Abteilung, AK Barmbek Hamburg, Leitung Prof. Dr. E. Hille
- Erlangung der Vollapprobation zum 01.01.2000

AUSBILDUNG

- 1973-1977 Dorf-/Grundschule Schwabenrod/Heidelberg
- 1977-1987 Albert-Schweitzer Gymnasium Alsfeld
- Studium:
- seit Herbst 1987 an der Philipps-Universität Marburg
- Jan. 1990-1992 Unterbrechung des Studiums, Pflege meines schwerkranken Vaters, in dieser Zeit Schichtarbeit in einem Galvanisierungsbetrieb
- 1992 Nach dem Tod meines Vaters Wiederaufnahme des Studiums
- 1994 1. Staatsexamen, 1997 2. Staatsexamen
- 1998 3. Staatsexamen, Gesamtnote 2,99

DISSERTATION

Seit 1994 am Institut für normale und pathologische Physiologie der Philipps-Universität Marburg, Prof. Dr. R.-E. Lang

Thema: "Entwicklung eines Radio-Immunoassays und Rezeptor-Assays zum Nachweis von Leptin"

HOBBYS

Billard, Fitneß, Badminton, Inline Skaten, Angeln, Motorrad

April 2003

Meine akademischen Lehrer an der Phil.-Uni. Marburg waren:

Prof. Dr. Arnold (Innere Medizin)

Prof. Dr. Aumüller (Anatomie)

Prof. Dr. Dr. Basler (Medizinische Psychologie)

Prof. Dr. Baum (Allgemeinmedizin)

Prof. Dr. Engel (Ökologisches Stoffgebiet)

Prof. Dr. Eschenbach (Kinderheilkunde)

Prof. Dr. Gressner (Klinische Chemie und Hämatologie)

Prof. Dr. Griss (Orthopädie)

Prof. Dr. Habermehl (Radiologie)

Prof. Dr. Happle (Dermatologie)

Prof. Dr. Hoffmann (Neurologie)

Prof. Dr. Kern (Biologie)

Prof. Dr. Kleinsasser (HNO)

Prof. Dr. Klenk (Mikrobiologie und Immunologie)

Prof. Dr. Kretschmer (Transfusionsmedizin)

Prof. Dr. Krieg (Psychiatrie)

Prof. Dr. Lang (Physiologie)

Prof. Dr. Lennartz (Anästhesie und Intensivmedizin)

Prof. Dr. Netter (Pharmakologie)

Prof. Dr. Pohlen (Psychosomatik und Psychotherapie)

Dr. Prinz (Biometrie)

Prof. Dr. Riedmüller (Urologie)

Prof. Dr. Schachtschabel (Biochemie)

Prof. Dr. Schulz (Frauenheilkunde)

Prof. Dr. Thomas (Pathologie)

PD. Dr. Zelder (Chirurgie)

Danksagung

Ich bedanke mich an erster Stelle und ganz besonders bei meinem Doktorvater Prof. Dr. R. E. Lang. Er hat mir durch seine wohl niemals endende Geduld ermöglicht, – erst das dritte Thema brachte das gewünschte Ergebnis- meine Dissertation nun endlich vorzulegen. Vielen Dank.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Mutter Unni Gerda Klemp, die mir immer mit Rat und Tat und viel Gefühl für die eine oder andere Situation zur Seite stand. Sie selbst studierte Medizin bis in das 8. Semester, durfte aber in der jungen DDR nicht mehr Ihr Examen ablegen und mußte Ihren damaligen Traumberuf somit aufgeben. Gott sei Dank ist sie dann meine Mutter geworden.

Last but not least gilt mein Dank all denen, die ich hier nicht erwähnt habe.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Entwicklung eines Radio-Immunoassays und Rezeptor-Assays zum Nachweis von Leptin“ im Institut für normale und pathologische Physiologie unter Leitung von Prof. Dr. R.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- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation eingereicht.

Hamburg im April 2003

Martin Klemp

Widmung

Diese Arbeit widme ich meinem 1992 verstorbenen Vater Gerhard Klemp sowie meine Sohn Felix Martin. Beide waren bzw. sind mir sehr ähnlich und bedeuten mir sehr viel. Das was ich von dem einen gelernt habe, hoffe ich, an den anderen weiter geben zu können.

Leider kann mein Vater diese schönen Momente nicht mehr miterleben und mein Sohn ist wohl noch etwas zu klein, doch ich hoffe, es kommt bei beiden irgendwie an.