

Aus der Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung von Orexinrezeptoren in
3T3-L1 Adipozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Thao Thu Le

aus Puerto Princesa City

Datum der Promotion: 25.10.2013

Der Preis des Erfolges ist Hingabe,
harte Arbeit und unablässiger Einsatz für das,
was man erreichen will.
(Frank Lloyd Wright)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
Abstrakt (deutsch)	9
Abstract (englisch)	11
1. Einleitung	13
1.1 Orexin und Rezeptoren.....	13
1.2 Expression von Orexinrezeptoren	14
1.2.1 Zentrales Nervensystem	14
1.2.2 Periphere Organe.....	14
1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Orexin A und B.....	15
1.3.1 Zentrales Nervensystem	15
1.3.2 Peripheres Gewebe.....	16
1.3.2.1 Fettgewebe	16
1.3.2.2 Hypophyse.....	18
1.3.2.3 Endokrines Pankreas	18
1.3.2.4 Adrenerges System.....	19
1.3.3 Klinische Bedeutung von Orexin A und B (Narkolepsie und Übergewicht).....	19
1.4 Wirkungen von Orexin A auf den Stoffwechsel	20
2. Aufgabenstellung	22
2.1 Regulation der Funktionen von Adipozyten durch Orexin A	22
3. Material, Reagenzien und Methoden	24
3.1 Geräte	24
3.2 Materialien	25
3.3 Chemikalien	26
3.4 Lösungen und Puffer	29
3.5 Kit-Systeme.....	30
3.6 Antikörper	31
3.7 Primersequenzen und Sonden für die quantitative PCR	31
3.8 siRNS Sequenzen für die transienten Transfektionen.....	32
3.9 Software	32
3.10 Zellen.....	32
3.11 Methoden.....	33
3.11.1 Kultivieren der 3T3-L1 Zellen	33

3.11.2 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten	34
3.11.3 Inkubationsexperimente mit Testpeptiden	34
3.11.4 Proteinisolation.....	35
3.11.4.1 Zytoplasmatischer Proteinextrakt und Membranproteinfraction	35
3.11.4.2 Gesamtproteinisolation.....	35
3.11.5 Messung der Proteinkonzentration.....	36
3.11.6 Western Blot.....	36
3.11.7 RNS-Isolation.....	38
3.11.8 Quantitative real-time PCR	39
3.11.9 Bestimmung des Fettgehalts der Zellen	42
3.11.10 Glukoseaufnahme in die Zellen.....	45
3.11.11 ATP Bestimmung.....	46
3.11.12 Messung von Adiponectin.....	47
3.11.13 Indirekte Immunfluoreszenz	48
3.11.14 Transiente Transfektionen mit siRNS	49
3.12 Statistische Auswertung	50
4. Ergebnisse	51
4.1 Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen Adipozyten	51
4.2 Expression von Orexinrezeptoren-1 und Orexinrezeptoren-2 in 3T3-L1 Fibroblasten und Adipozyten	53
4.3 Effekte von Orexin A auf die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten	55
4.4 Regulation des Glukosetransporters GLUT4 in der Plasmamembran von Adipozyten durch Orexin A.....	60
4.5 Effekte von Orexin A auf die Triglyceridakkumulation	65
4.5.1 Mechanismen der Orexin A-abhängigen Regulation der Lipidakkumulation	72
4.6 Effekte von Orexin A auf die Adiponectinsekretion und -expression	80
5. Diskussion	84
5.1 Expression von Orexinrezeptoren in 3T3-L1 Fibroblasten und Adipozyten.....	84
5.2 Orexin A steigert die Glukoseaufnahme und GLUT4 Translokation	84
5.3 Orexin A steigert die Lipidakkumulation und hemmt die Lipolyse.....	86
5.4 Rolle von PPAR γ für die Regulation der Lipidakkumulation	88
5.5 Orexin A steigert die Adiponectinsekretion und -expression über PPAR γ	89
5.6 Klinische Relevanz des Themas.....	89
5.7 Stärken und Schwächen der Ergebnisse.....	90

5.8 Ausblick (Forschungsbedarf)	91
6. Literaturverzeichnis	92
7. Anhang	97
Eidesstattliche Versicherung	97
Lebenslauf	99
Publikationsliste	101
Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AKT	Protein-Kinase B
APS	Ammoniumpersulfat
BADGE	Bisphenol A Diglyceridylether
BMI	Body Mass Index
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	engl.: bovine serum albumin
cDNS	komplementäre DNS
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
Da	Dalton
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
ERK1/2	engl.: extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Ethanol
Fabp4	engl.: fatty acid binding protein
FBS	engl.: fetal bovine serum
FCS	engl.: Fetal Calf Serum
Gapdh	engl.: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
Hcrt	Hypocretin
HRP	engl.: Horseradish Peroxidase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

HSL	hormonsensitive Lipase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
Ins	Insulin
KRBH	Krebs Ringer Bikarbonat Hepes Puffer
LH	luteinisierendes Hormon
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NREM	engl.: non-rapid eye movement
nTZD	engl.: non-thiazolidinedione PPAR γ activator
OD	optische Dichte
OXA	Orexin A
OXB	Orexin B
OXR1	Orexinrezeptor-1
OXR2	Orexinrezeptor-2
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK	Phosphatidylinositol-Phosphat-abhängige Kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Protein-Kinase B
PPAR γ	engl.: peroxisomal-proliferator-activated-receptor gamma
P/S	Penicillin/Streptomycin
REM	engl.: rapid eye movement
RIPA	Radio-Immunopräzipitations-Assay
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SD	Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNS	small interfering Ribonukleinsäure
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
ZNS	Zentralnervensystem

Abstrakt (deutsch)

Einleitung: Orexin ist ein Neuropeptid, das in 2 Isoformen, Orexin A und B, vorkommt und über 2 Rezeptortypen, Orexinrezeptor-1 und Orexinrezeptor-2, interagiert.

Patienten mit Narkolepsie haben einen niedrigeren Orexin A Spiegel im Liquor, häufiger einen Diabetes mellitus Typ 2 und Übergewicht. Auch bei übergewichtigen Individuen ohne Diabetes mellitus wurden niedrigere Orexin A Plasmaspiegel als bei Normalgewichtigen gemessen.

Fettgewebe exprimiert Orexinrezeptoren. In vitro wurde gezeigt, dass Orexin A die PPAR γ Expression im Fettgewebe erhöht. Da PPAR γ eine Rolle im Lipidstoffwechsel spielt und die Insulinempfindlichkeit steigert, stellte sich die Frage, welchen Einfluss Orexin A auf den Lipidstoffwechsel und Glukosemetabolismus in Adipozyten hat.

Methoden: 3T3-L1 Fibroblasten wurden zunächst zu reifen Adipozyten differenziert. Diese wurden anschließend mit Orexin A und in An- bzw. Abwesenheit von Insulin inkubiert. Um die Expression der Orexinrezeptoren-1 und -2, sowie von Adiponectin, PPAR γ und den Glukosetransporter 4 (GLUT4) zu quantifizieren, wurde aus den reifen Adipozyten RNS isoliert und deren Konzentration mithilfe der quantitativen PCR bestimmt. Eine qualitative Bestimmung der Proteine erfolgte mit dem Western Blot. Die Glycerolkonzentration wurde im Inkubationsmedium bestimmt. Der Triglyceridgehalt und die Glukoseaufnahme wurden in den Adipozyten gemessen und die intrazelluläre Fettakkumulation mithilfe des Oil Red O dargestellt. Die indirekte Immunfluoreszenz diente zur Visualisierung der GLUT4 Rezeptoren. Die quantitative Bestimmung der Adiponectinsekretion erfolgte mit dem Radioimmunoassay. Die Hemmung der PPAR γ Expression wurde mithilfe der siRNS durchgeführt. Validierung des Versuches erfolgte mittels real-time PCR und Western Blot.

Ergebnisse: Die Orexinrezeptoren-1 und -2 werden sowohl in unreifen als auch in reifen Adipozyten exprimiert. In reifen Adipozyten ließ sich eine stärkere Expression von Orexinrezeptoren-1 im Vergleich zu Orexinrezeptoren-2 nachweisen.

Orexin A erhöht die Glukoseaufnahme in reifen 3T3-L1 Adipozyten. Dieser Vorgang ist von einer Zunahme der GLUT4 Translokation aus dem Zytoplasma in die Plasmamembran begleitet. Pharmakologische Blockade der PI3K-abhängigen Signaltransduktionskaskade führt zu einer Inhibition der Glukoseaufnahme und Blockade der GLUT4 Translokation.

Die Lipolyse in den 3T3-L1 Adipozyten wurde durch Orexin A gehemmt, die Lipidakkumulation über einen PI3K- und PPAR γ -abhängigen Mechanismus stimuliert. Die PPAR γ mRNA Expression nahm nach Inkubation mit Orexin A signifikant zu. Orexin A verstärkte zusätzlich die Insulin-stimulierende PPAR γ mRNA Expression.

Die Adiponectinsekretion und -expression wurden ebenfalls durch Orexin A stimuliert. Die Inkubation mit einem PPAR γ Antagonisten bzw. die experimentelle Suppression der PPAR γ Expression führte zu einer signifikanten Hemmung der Lipidakkumulation und Adiponectinexpression.

Schlussfolgerung: Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Orexin A Ähnlichkeit mit den in der Klinik bereits bekannten Insulinsensitizern (PPAR γ Rezeptor-Aktivatoren) im Hinblick auf die Regulation der Glukoseutilization und Lipidakkumulation hat. Daher könnte Orexin A eine mögliche Therapieoption beim Diabetes mellitus Typ 2 werden.

Abstract (englisch)

Introduction: Orexin is a neuropeptide which exists in two isoforms: orexin A and B. Both orexins interact with 2 receptor subtypes, orexin receptor-1 and orexin receptor-2.

Patients with narcolepsy show lower levels of orexin A in the cerebro spinal fluid. Higher incidences of type 2 diabetes and obesity are reported in narcoleptic patients. According to this, obese non-diabetic patients show lower plasma orexin A levels than individuals of normal body weight.

Adipocytes express orexin receptors. Orexin A increases the PPAR γ expression in adipocytes. Because the PPAR γ plays a role in lipid metabolism and improves insulin sensitivity, I investigated if orexin A influences lipid and glucose metabolism in adipocytes.

Materials and Methods: 3T3-L1 fibroblasts were differentiated to mature adipocytes. Mature adipocytes were incubated with orexin A in the presence or absence of insulin. To determine the expression of orexin receptor-1 and -2, adiponectin, PPAR γ and glucose transporter 4 (GLUT4) proteins and RNA were isolated and the concentration was measured. Proteins were detected using Western blot; RNA was measured by real-time PCR.

The glycerol concentration was quantified in the incubation medium. The triglyceride concentration and glucose uptake were measured in adipocytes. The intracellular lipid accumulation was determined by Oil Red O assay. Visualization of GLUT4 receptors were performed by immunofluorescence. Adiponectin secretion was measured by using a radioimmunoassay. PPAR γ expression was reduced using small interfering RNA. Validation was performed using real-time PCR and Western blot.

Results: Orexin receptor-1 and -2 are expressed in 3T3-L1 fibroblasts (preadipocytes) and in mature adipocytes. In mature adipocytes the expression of orexin receptor-1 is higher than the expression of orexin receptor-2.

Orexin A stimulates glucose uptake in mature 3T3-L1 adipocytes, which is accompanied by a GLUT4 translocation from cytoplasm into the plasma membrane. Pharmacological blockade of the PI3K-dependent signal transduction cascade results in inhibition of glucose uptake and attenuation of GLUT4 translocation.

Orexin A inhibits lipolysis and stimulates lipid accumulation via a PI3K- and PPAR γ -dependent pathway. Orexin A stimulates PPAR γ mRNA expression and potentiates insulin-stimulated

PPAR γ mRNA expression. Orexin A stimulates adiponectin secretion and expression. Incubation of adipocytes with a PPAR γ antagonist or experimental suppression of the PPAR γ expression led to an inhibition of lipid accumulation and adiponectin expression.

Conclusion: The results of the study show that orexin A resembles functionally the clinically well-known insulin sensitizers (PPAR γ receptor activators) in view of the regulation of glucose utilization and lipid accumulation. Due to these activities orexin A could offer a new therapeutic option for type 2 diabetes mellitus.

1. Einleitung

1.1 Orexin und Rezeptoren

Orexin ist ein Neuropeptid, das im Jahr 1998 im Hypothalamus von Ratten entdeckt und charakterisiert wurde. Da die Entdeckung dieses Neuropeptids fast zeitgleich durch zwei verschiedene Arbeitsgruppen stattfand, findet man es in der Literatur unter unterschiedlichen Namen [1-2].

Sakurai et al. nannten das Neuropeptid Orexin, nach dem griechischen Wort „orexis“, was übersetzt „Appetit“ heißt, da die zentrale Applikation des Orexins die Nahrungsaufnahme stimulierte [1]. De Lecea et al. nannten es Hypocretin, da es strukturell Ähnlichkeit mit dem Hormon Secretin hatte [2].

Das Orexin gibt es in zwei Isoformen, Orexin A (OXA) und Orexin B (OXB) bzw. Hypocretin-1 (Hcrt1) und Hypocretin-2 (Hcrt2), die vom selben Vorläufer-Peptid (Prepro-Orexin bzw. Preprohypocretin), bestehend aus 131 Aminosäuren, durch proteolytische Spaltung entstehen [1]. Das Gen, welches das Vorläufer-Peptid kodiert, befindet sich auf dem Chromosomen 17q21 [1]. OXA ist ein aus 33 Aminosäuren bestehendes Peptid mit zwei Disulfidbrücken und hat eine Größe von 3,562 Da. OXB ist ein lineares Peptid mit 28 Aminosäuren und hat eine Größe von 2,937 Da. OXA und OXB sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 46 % identisch [1].

Die Aminosäuresequenz des OXA ist zwischen den Säugetieren gleich [3]. In Ratten unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des OXB vom Menschen durch 2 Aminosäuren [3].

Beide Isoformen binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die Orexinrezeptor-1 (OXR1) und Orexinrezeptor-2 (OXR2) genannt werden. Beide Rezeptoren stimmen zu 64 % in ihrer Aminosäuresequenz überein [1]. Zwischen der Ratte und dem Menschen stimmen die Aminosäuresequenzen der OXR1 zu 94 % und der OXR2 zu 95 % überein [1].

Hinsichtlich der Affinität von OXA und OXB zu deren Rezeptoren lassen sich Unterschiede finden.

OXA bindet OXR1 und OXR2 mit nahezu derselben Affinität [1]. OXB bindet an OXR2 mit einer höheren Affinität als an OXR1 [1]. Zwischen der Affinität von OXA und OXB zu OXR2 gibt es kaum Unterschiede, so dass OXR1 ein selektiver Rezeptor für OXA und OXR2 ein nichtselektiver Rezeptor für OXA und OXB ist [1].

Im Jahr 2000 wurde erstmals ein selektiver Orexinrezeptor-1 Antagonist,

1-(2-methylbenzoxazol-6-yl)-3-[1.5]naphthyridin-4-yl Urea Hydrochlorid, auch SB-334687

genannt, beschrieben [4]. Im Jahr 2003 folgte die Entdeckung eines selektiven Orexinrezeptor-2

Antagonisten, N-acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline [5].

Antagonisten gegen die Orexinrezeptoren-1 und -2 wurden in den darauffolgenden Jahren von unterschiedlichen Arbeitsgruppen für Untersuchungen des Orexinsystems verwendet [6-8].

1.2 Expression von Orexinrezeptoren

1.2.1 Zentrales Nervensystem

Die Prepro-Orexin-positiven Neurone haben ihre dichteste Ansammlung im lateralen und dorsalen Hypothalamus und im perifornikalen Nukleus [9]. Diese Neurone projizieren in viele Bereiche des Gehirns. Die dichteste Projektion außerhalb des Hypothalamus befindet sich im Locus coeruleus [9].

Weitere Projektionsorte befinden sich im Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm, in den zirkumventrikulären Organen, in der Großhirnrinde, im Bulbus olfactorius und im limbischen System [10-11].

Die Untersuchungen der zentralen Expression von OXR1 und OXR2 zeigten, dass OXR1 im Hypothalamus vor allem im ventromedialen hypothalamischen Kern und OXR2 dagegen im paraventriculären Kern exprimiert werden [12].

In der Tenia tecta, im Hippocampus, im dorsalen Raphe-Kern und Locus coeruleus, präfrontalen und infralimbischen Cortex, paraventriculären thalamischen Nukleus konnten OXR1 ebenfalls detektiert werden [12-13].

OXR2 wurde im Cortex cerebri, Nukleus accumbens, Hippocampus, subthalamischen und thalamischen Kernen, septalen Nukleus, Raphe-Kern und im anterioren prätectalen Nukleus und in vielen hypothalamischen Kernen (tuberomammillären, dorsomedialen, paraventriculären und ventralen präammillären Nukleus) nachgewiesen [12-13].

1.2.2 Periphere Organe

Die OXA- und OXB-positiven Neurone projizieren peripher in alle Bereiche des Rückenmarks [14].

In der Peripherie werden OXR1 und OXR2 in der Hypophyse [15], in den Nieren, Nebennieren, Schilddrüsen, Hoden, Ovarien, in der Lunge [16], im olfaktorischen System [17], im enteralen Nervensystem, in den endokrinen Zellen des Darms und Pankreas [18] exprimiert. Die Expression von OXR1 ist in den Inselzellen des Pankreas höher als von OXR2 [19].

Im menschlichen Fettgewebe und in isolierten Adipozyten werden ebenfalls OXR1 und OXR2 exprimiert [20].

1.3 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Orexin A und B

Die verbreitete Expression von OXA, OXB und seinen Rezeptoren in vielen zentralen und peripheren Bereichen des Körpers legt die Vermutung nahe, dass OXA und OXB bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen von Bedeutung sein müssen.

1.3.1 Zentrales Nervensystem

Den beiden Orexin-Isoformen wurde ursprünglich eine Rolle als Regulator der Nahrungsaufnahme zugeschrieben, da sie im lateralen Hypothalamus des ZNS entdeckt wurden, einer Region, die für die Regulation der Nahrungsaufnahme zuständig ist [1,21]. Eine Injektion von OXA in den lateralen und perifornikalen Hypothalamus führte zur Erhöhung der Nahrungsaufnahme [22]. OXB stimulierte die Nahrungsaufnahme nur, wenn es in den lateralen cerebralen Ventrikel injiziert wurde [22].

Die chronische Gabe von OXA führte weder zu einer kontinuierlichen Nahrungsaufnahme noch zu Übergewicht bei Ratten [23]. Die Nahrungsaufnahme war tagsüber erhöht, nachts nahm sie allerdings ab, so dass man zu dem Schluss kam, dass auch die OXA-vermittelte Nahrungsaufnahme dem zirkadianen Rhythmus unterliegt [24].

Bei übergewichtigen Mäusen ist die Prepro-Orexin-Genexpression herunterreguliert, was darauf hindeutet, dass das Peptid möglicherweise für die gesteigerte Nahrungsaufnahme und/oder verminderten Energieumsatz bei diesen Tieren von Bedeutung ist [25].

Während des Fastens ist der Prepro-Orexin mRNA Gehalt in den Neuronen des lateralen und posterioren Hypothalamus erhöht [1]. Eine Insulin-induzierte Hypoglykämie zeigte ebenfalls eine Erhöhung des Prepro-Orexins im lateralen hypothalamischen Gebiet [26].

Die zentrale Injektion eines OXA Antikörpers in seit 24 Stunden hungernden Ratten zeigte eine Hemmung der Nahrungsaufnahme [27]. Die periphere Injektion zeigte diese Wirkung nicht, was dafür spricht, dass Orexin A zentral einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme hat und somit an der Regulierung der Energiehomöostase beteiligt ist [27].

Die Applikation von OXA bzw. OXB in den cerebralen Ventrikel von Ratten führte zur Erhöhung der Flüssigkeitsaufnahme, wobei die Wirkung von OXA potenter als die von OXB war [28]. Bekamen die Ratten 48 Stunden keine Flüssigkeit, nahm die Prepro-Orexin Expression im Hypothalamus zu [28].

Neben der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme spielt OXA auch eine wichtige Rolle in der Regulierung des Schlaf-Wach-Zustands.

Die direkte Injektion von OXA in den Locus coeruleus von Ratten zeigte eine Unterdrückung des REM-Schlafes und eine Erhöhung der Wachheit auf Kosten des NREM-Schlafes [29]. Diese Wirkungen konnten mit einem OXR1 Antagonisten wieder aufgehoben werden [29].

Das Krankheitsbild der Narkolepsie, das mit einer Störung des Schlaf-Wach-Zustands einhergeht, ist mit dem Fehlen bzw. mit einer Störung der Orexinrezeptoren assoziiert [30-31].

1.3.2 Peripheres Gewebe

Im peripheren System haben die Orexinrezeptoren verschiedene physiologische und pathophysiologische Bedeutungen, auf die im Folgenden eingegangen wird.

1.3.2.1 Fettgewebe

Adipozyten sind Fettzellen, die es in zwei Formen gibt, braun und weiß. Die physiologischen Bedeutungen der weißen Adipozyten sind besser untersucht als die der braunen. Das braune Fettgewebe schützt vor Kälte und Übergewicht, ist jedoch bei Menschen und anderen großen Säugetieren nur wenig vorhanden [32].

Adipozyten speichern Energie in Form von Lipiden [33]. Die Regulierung des Körpergewichts unterliegt dem Fettgewebe. Ein Übermaß an Adipozyten geht mit einem erhöhten BMI und Übergewicht einher. Übergewicht gilt als Risikofaktor für die Entwicklung einer Reihe von Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Koronarer Gefäßkrankungen, Dyslipidämien und Diabetes mellitus Typ 2 [33].

Die weißen Adipozyten gelten als endokrines Organ, da sie Proteine produzieren. Zu diesen Proteinen, auch Adipokine genannt, gehören Leptin, Angiotensinogen, Adipsin, Acylation-stimulierendes Protein, Adiponectin, Retinol-bindendes Protein, TNF-alpha, Interleukin 6, Plaminogen Aktivator Inhibitor-1, Tissue Faktor, Fasting-induzierender Adipose Faktor, Metallothionein und Resistin [34]. Durch die Freisetzung dieser Adipokine können die Adipozyten miteinander und mit anderen Organen des Körpers kommunizieren [33].

Die wichtigsten Adipokine, die im Zusammenhang dieser Arbeit stehen, sind Leptin, Resistin und Adiponectin. Leptin ist ein Adipokin, das bei Freisetzung die Nahrungsaufnahme reduziert, in dem es zentral die Neurone, die die Nahrungsaufnahme regulieren, hemmt [35]. Durch eine Erhöhung der Fettsäureoxidation und eine Abnahme des Fettgewebes bewirkt Leptin eine Abnahme des Körpergewichts [36]. Die Serumkonzentration von Leptin korreliert mit der Prozentzahl des Körperfetts, so dass in der Literatur davon ausgegangen wird, dass übergewichtige Personen auf Leptin nicht mehr reagieren, somit leptinresistent sind [36].

1. Einleitung

Das Resistin spielt im Zusammenhang mit der Glukoseintoleranz, dem Diabetes mellitus Typ 2 und dem Übergewicht eine wichtige Rolle. Der Blutplasmaspiegel von Resistin ist erniedrigt bei Patienten, die Rosiglitazone nehmen [37]. Rosiglitazone sind Anti-Diabetika, auch Thiazolidinedione genannt, die die Insulinsensitivität erhöhen, in dem sie als Agonisten am PPAR γ Rezeptor agieren [38]. Bei Übergewichtigen und an Diabetes erkrankten Individuen ist der Resistinspiegel erhöht. Die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme in die Zellen ist durch Neutralisation von Resistin gesteigert, so dass man das Resistin mit für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 verantwortlich macht [37].

Adiponectin ist ein Peptidhormon, das die Insulinresistenz senkt, in dem es die Glukoseutilization und Fettsäureoxidation stimuliert [39-40]. Die Höhe der Adiponectinexpression korreliert mit der Insulinsensitivität [39]. Der Blutplasmaspiegel des Adiponectins ist bei gesunden Personen höher als bei Übergewichtigen [41]. Die Plasmakonzentration von Adiponectin ist bei Menschen mit Diabetes mellitus ebenfalls niedrig [42]. Nach Gabe eines Insulinsensitizers Thiazolidinedion (PPAR γ Agonist) ist die Adiponectinexpression erhöht [43].

Adipozyten nehmen Glukose über bestimmte Proteine, sogenannte Glukosetransporter (GLUT) auf. Von den Glukosetransportern gibt es mehrere Isoformen [44], wobei GLUT1 und GLUT4 in den Adipozyten vertreten sind [45]. GLUT4 spielen in den Adipozyten eine größere regulatorische Rolle als GLUT1 [46]. Sie befinden sich in den Vesikeln neben der Plasmamembran und fusionieren in Anwesenheit von Insulin mit der Zellmembran der Adipozyten [47-48].

Die Verbindung von OXA und OXB zu den Adipozyten konnte im Jahr 2002 eine Arbeitsgruppe aufzeigen. Sie machte die Entdeckung, dass OXA und OXB an der Regulierung der Insulin- und Leptinkonzentration im Blut beteiligt sind [49]. Die subkutane Injektion von OXA bzw. OXB führte zu einem Anstieg der Insulin- und Leptinkonzentration im Blut [49].

Die Expression von OXR1 und OXR2 im menschlichen Fettgewebe konnte im Jahr 2006 von einer anderen Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [20]. Diese Arbeitsgruppe konnte zusätzlich zeigen, dass nach Gabe von OXA bzw. OXB die Expression von PPAR γ 2 mRNS im subkutanen Fettgewebe erhöht ist.

Die hormonsensitive Lipase und die Glycerolfreisetzung im viszeralen Fettgewebe waren nach OXA- und OXB-Gabe signifikant reduziert [20]. Die hormonsensitive Lipase ist ein Enzym, das an der Lipolyse beteiligt ist [50]. Glycerol wird während der Lipolyse freigesetzt [51]. Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass OXA und OXB in der Regulierung des Körpergewichts und des Energieumsatzes von Bedeutung sind. [20].

1. Einleitung

Eine weitere in der Literatur beschriebene Bedeutung von OXA und OXB in Bezug auf Adipozyten findet sich in der Proliferation von 3T3-L1 Zellkulturen. Die Gabe von OXA zu Zellkulturen von 3T3-L1 Präadipozyten, Vorläuferzellen der Adipozyten, führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zellproliferation. OXB inhibierte diesen Zustand [52]. Meine Arbeitsgruppe konnte vor kurzem zusätzlich nachweisen, dass OXA die Proliferation und das Überleben der 3T3-L1 Präadipozyten über die Kinasen ERK1/2 stimuliert und die Zellen vor der Apoptose schützt. Einen Einfluss durch OXA auf die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten konnte nicht nachgewiesen werden [53].

1.3.2.2 Hypophyse

In der Literatur werden OXA und OXB auch eine Bedeutung in der Regulierung des neuroendokrinen Systems beigemessen. Es zeigte sich, dass die intracerebroventrikuläre Injektion sowohl von OXA als auch von OXB die Hypothalamus-Hypophysen-Achse aktiviert. Nach Injektion kam es zu einem Anstieg der ACTH- und Corticosteron-Blutplasmakonzentration, wobei OXA einen stärkeren Anstieg hervorrief als OXB [54]. Die Vorbehandlung mit einem CRH Antagonisten hemmte diesen Anstieg [54].

Eine andere Arbeitsgruppe konnte nach intracerebroventrikulärer Injektion von OXA und OXB eine Stimulation der Freisetzung des luteinisierenden Hormons (LH) beobachten [55].

Die intracerebroventrikuläre Injektion von OXA zeigte auch, dass die Plasmakonzentration von Prolaktin abnahm [56]. Bezüglich der Wachstumshormonfreisetzung aus der Hypophyse gibt es gegensätzliche Meinungen. In der Literatur wird sowohl die Stimulation als auch die Hemmung des Wachstumshormons nach intracerebroventrikulärer Injektion von OXA beschrieben [56-57]. Die intravenöse Applikation von OXA führte zu einem Absinken des TSH-Spiegels im Blut [58].

1.3.2.3 Endokrines Pankreas

OXA und OXR1 werden sowohl in den insulinproduzierenden beta-Zellen [18], als auch in den glukagonproduzierenden alpha-Zellen der Inselzellen des Pankreas exprimiert [18,59].

Auf RNS-Ebene konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sowohl OXR1 als auch OXR2 in isolierten pankreatischen Inselzellen exprimiert werden [19].

Es gibt allerdings in der Literatur verschiedene Meinungen, was den Einfluss von OXA und OXB auf die Insulin- und Glukagonsekretion betrifft. So gibt es Arbeitsgruppen, die zeigten, dass OXA die Insulinsekretion inhibierte und die Glukagonsekretion stimulierte [59-60]. Andere Arbeitsgruppen zeigten aber auch, dass die subkutane Injektion von OXA bzw. OXB bei Ratten

zu einer Erhöhung der Insulin- und Glukosekonzentration im Blut führte [61]. Die Zugabe von OXA bzw. OXB führte bei den pankreatischen Inselzellen zu einer Stimulierung der Insulinsekretion [19] und zu einer Verringerung der Glukagonsekretion [62], wobei OXA die Insulinsekretion stärker stimulierte als OXB [19].

Die OXA-Freisetzung aus den pankreatischen Inselzellen wird durch niedrige Blutzuckerspiegel stimuliert und durch hohe Blutzuckerspiegel gehemmt [59].

Die intracerebroventrikuläre Applikation von OXA stimuliert die Freisetzung von Somatostatin, das ebenfalls vom Pankreas gebildet wird [63]. Somatostatin ist ein Peptid, das die Sekretion von Insulin und Glukagon inhibieren kann [64].

1.3.2.4 Adrenerges System

Mäuse, die das Orexin-Gen nicht besitzen, hatten einen niedrigeren Blutdruck als ihre Vergleichsgruppe und zeigten in Stresssituationen eine geringere Erhöhung des Blutdrucks, der Herz- und Atemfrequenz [65], so dass man vermutet, dass OXA und OXB auch im adrenergen System eine Rolle spielt.

Die intracerebroventrikuläre Injektion von OXA erhöhte die Aktivität des renalen sympathischen Nervensystems [66]. Eine Erhöhung der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdrucks konnte sowohl nach OXA- als auch nach OXB-Injektion in den intracerebroventrikulären Ventrikel beobachtet werden, wobei OXA bei der Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks effektiver als OXB war [66-67]. Die intravenöse Injektion von OXA zeigte diese genannten Effekte nicht [68]. Die Noradrenalinplasmakonzentration stieg nach OXA- bzw. OXB-intracerebroventrikulärer Injektion an, die Adrenalinplasmakonzentration erhöhte sich nur nach OXA-, nicht aber nach OXB-Injektion [66].

Eine Arbeitsgruppe konnte mithilfe von adrenocortikalen Zellen zeigen, dass OXA den Aldosteron- und Corticosteron-Plasmaspiegel stimuliert [69]. Der ACTH-Plasmaspiegel blieb allerdings unverändert, so dass man davon ausgeht, dass OXA peripher über OXR1 und OXR2 die Corticosteron- bzw. Aldosteronsekretion ohne über den Weg der Hypothalamus-Hypophysen-Achse stimuliert [69].

1.3.3 Klinische Bedeutung von Orexin A und B (Narkolepsie und Übergewicht)

OXA und OXB spielen in der Pathophysiologie von menschlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Die am besten untersuchte Erkrankung in Verbindung mit OXA und OXB ist die Narkolepsie.

1. Einleitung

Narkolepsie ist ein Krankheitsbild, das durch übermäßige Tagesschläfrigkeit, Kataplexie, Schlaflähmung, hypnagogen Halluzinationen und abnormaler Regulierung des REM-Schlafes charakterisiert ist [70].

Mausmodelle, bei denen das Orexin-Gen fehlt, zeigen einen Phänotyp, der dem eines narkoleptischen Patienten ähnelt [30]. Hunde, die eine Störung des Orexinrezeptor-2-Gens aufwiesen, zeigten ebenfalls eine Klinik des narkoleptischen Krankheitsbildes [31].

Narkoleptiker besitzen einen signifikant niedrigeren OXA-Spiegel im Liquor [71] und 85-95 % weniger Prepro-Orexin-haltige Neuronen als ihre Kontrollgruppe [72]. Desweiteren haben narkoleptische Patienten häufiger einen nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus [73] und einen höheren Body Mass Index [74].

So liegt die Vermutung nahe, dass die Energiehomöostase und der Glukosestoffwechsel durch Orexin und seinen Rezeptoren beeinflusst werden könnten.

Allerdings sind die Mechanismen, wie es durch Orexin zu einer verminderten Glukosetoleranz oder Übergewicht kommt, noch unklar.

1.4 Wirkungen von Orexin A auf den Stoffwechsel

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass OXA bei der Beteiligung des Stoffwechsels eine größere Rolle spielt als bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme.

So haben übergewichtige Individuen einen niedrigeren OXA-Plasmaspiegel als Normalgewichtige [75].

Nach intraventrikulärer Injektion von OXA zeigte sich bei Mäusen eine Erhöhung des Energiestoffwechsels [76]. Allerdings zeigte sich bei Individuen, die 7 Tage lang OXA erhielten, einen signifikanten Anstieg des Körpergewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe [49], so dass es Unterschiede im Kurzzeit- und Langzeiteffekt von OXA geben muss.

Bei Mäusen, die eine Überexpression von OXR2 vorwiesen, bewirkte OXA nach einem diätisch-induzierten Übergewicht eine Verbesserung der Insulinresistenz [77]. Die Insulinsensitivität wurde mithilfe von Leptin gewährleistet, da die Mäuse, denen das Leptin fehlte, auf OXA nicht reagierten [77]. Eine andere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Insulin- und Leptinkonzentration im Blut nach subkutaner Injektion von OXA anstieg [49]. Zusätzlich wird in der Literatur beschrieben, dass Orexin-Knockout-Mäuse, d.h. Mäuse, die kein Orexin-Gen besitzen, insulinresistent sind [78].

1. Einleitung

An Ratten konnte nachgewiesen werden, dass die Blutglukosekonzentration mit der OXA-Plasmakonzentration korreliert. Die OXA-Plasmakonzentration war bei fastenden Ratten erhöht und im Zustand der Hyperglykämie erniedrigt [59].

In fastenden Mäusen und in Mäusen mit Diabetes mellitus konnte eine Senkung der Blutglukosekonzentration nach OXA-Applikation beobachtet werden [79].

Diese Beobachtungen führten zu dem Ergebnis, dass man davon ausgeht, dass OXA sowohl im Glukose- als auch im Lipidmetabolismus eine bedeutende Rolle einnimmt.

2. Aufgabenstellung

2.1 Regulation der Funktionen von Adipozyten durch Orexin A

Individuen, die weniger Prepro-Orexin-haltige Neuronen besitzen, erkranken häufiger an Diabetes mellitus Typ 2 und haben einen höheren Body Mass Index [72-74].

Übergewicht und ein erhöhter BMI gehen mit einem Übermaß an Adipozyten einher [33].

Die Expression von OXR1 und OXR2 in subkutanem und viszeralem Fettgewebe konnte von einer Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen werden [20].

Nach Injektion von OXA und OXB war die Expression von PPAR γ 2 mRNA im subkutanen Fettgewebe erhöht [20]. PPAR γ Agonisten werden in der Klinik als Antidiabetika angewendet, die über eine Steigerung der Insulinsensitivität zu einer höheren Glukoseaufnahme in die Zellen führen [38]. Daher wurde angenommen, dass OXA und OXB einen Einfluss auf die Insulinresistenz haben können.

In diesem Zusammenhang könnte Adiponectin auch eine bedeutende Rolle spielen, denn die Höhe der Adiponectinexpression korreliert mit der Insulinsensitivität [39]. Es zeigte sich bereits, dass nach Gabe eines PPAR γ Agonisten die Adiponectinexpression erhöht ist [43]. Es könnte sein, dass OXA und OXB an der Stimulierung der Adiponectinsekretion beteiligt sind und über diesen Weg die Insulinsensitivität erhöhen.

Desweiteren nimmt der Gehalt an hormonsensitiver Lipase und Glycerol nach OXA- und OXB-Gabe ab, so dass vermutet wird, dass OXA und OXB die Lipolyse hemmen. Die zugrundeliegenden Mechanismen der Wirkungen von OXA und OXB auf den Fettstoffwechsel sind bisher unklar.

Die subkutane Injektion von OXA und OXB für 7 Tage führte bei Ratten zu einer Gewichtszunahme [49], so dass vermutet wird, dass OXA und OXB über ihre Rezeptoren die Lipidakkumulation stimulieren könnten.

In pankreatischen Zellen führte OXA zu einer Stimulierung der Insulinsekretion [16]. Insulin bewirkt die Aufnahme von Glukose in die Zellen mit nachfolgendem Abfall der Plasmaglukosekonzentration und führt zu einer Gewichtszunahme [80]. Man könnte allerdings auch annehmen, dass OXA die Glukoseaufnahme in die Zellen, in dem Fall Adipozyten, ohne Beteiligung von Insulin bewirkt. Dies wird durch die Tatsache untermauert, dass OXA in insulindefizienten Mäusen mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus zu einer Reduktion der Plasmaglukosekonzentration führte [79]. Über welchen Mechanismus die Glukoseaufnahme in die Adipozyten erfolgt, wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

2. Aufgabenstellung

Angesichts der vielerlei Indizien, die dafür sprechen, dass OXA und OXB eine Rolle bei der Regulation der Adipozytenphysiologie spielen könnte, wurde die Rolle der Orexinrezeptoren auf die Regulation des Lipid- und Glukosemetabolismus in den 3T3-L1 Adipozyten untersucht.

3. Material, Reagenzien und Methoden

3.1 Geräte

Gerät	Firma
Axiophot Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Autoklav	Webeco, Selmsdorf
Blotting Gerät	Biometra, Göttingen
Brutschrank Water-Jacketed Incubator	Labortect Labor-Technik-Göttingen
Confocal Laser Scanning Mikroskop – FV500	Olympus, Hamburg
Digitalkamera AxioCam HRc	Zeiss, Oberkochen
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop FluoView Confocal Laser	Olympus, Hamburg
Flüssig-Scintillationszähler 1409	Wallack, Freiburg
Gammazähler 1470 WIZARD Automatic	Wallac (Perkin Elmer), Rodgau
Gefrierschrank (-20 °C) economic-super	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -85 °C Ultra Low Freeze	New Brunswick Scientific, Hamburg
Kühlschrank (4-8 °C) profi line	Liebherr, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge Cryofuge 5000	Heraeus, Hanau
Luminometer MicroLumat Plus LB 96V	Berthold Technologies, Bad Wildbad
LightCycler 2.0 Instrument	Roche, Mannheim
Magnetrührer Ikamag RCT	Ika, Staufen
Mikroskop Ck2	Olympus, Hamburg
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pH Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Cellmate II (akkubetrieben)	Matrix Technologies Corporation, Hudson, New Hampshire

3. Material, Reagenzien und Methoden

Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec Processor Compact 2	Siemens AG, Erlangen
Semi Dry Blotter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Schüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Schüttler 3013	GFL, Burgwedel
Spektrophometer SPECTRA max Plus	Molecular Devices, Ismaning
Standzentrifuge Sigma 6K10	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterilwerkbank/Bench Lamin Air HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermocycler TGradient	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Homogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic, Berlin
Vakuum-Pumpsystem BVC21	Vacuubrand
Vortexer Relax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserbad	Köttermann, Burladingen

3.2 Materialien

Material

96-Wellplatte

Borosilikat- Reagenzgläser (12 x 75 mm)

Deckgläser Nr. 1 (unbeschichtet)

Deckglas Färbegestell

Filterpapiere

Falconröhrchen (15 ml, 50 ml)

Filterflaschen

Handschuhe Latex Examination Gloves

Kryoröhrchen

LightCycler Kapillarröhrchen 20 µl

Firma

Nalge Nunc International (Thermo Fisher Scientific), Dreieich

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Diamond Coatings, Halesowen, England

Agar Scientific Ltd, Stanted, England

Schleicher & Schuell, Dassel

Becton Dickinson, Heidelberg

Nunc, Langenselbold

Charité Universitätsmedizin Berlin

Sarstedt, Nümbrecht

Roche, Mannheim

3. Material, Reagenzien und Methoden

Mikroliterpipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Multiwellplatten (6, 12, 24, 96)	Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulosemembran "Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose Membrane"	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Objektträger	Carl Roth, Karlsruhe
PCR Mikrozentrifugenröhrchen 0,2 ml	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR Mikrozentrifugenröhrchen 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5, 10, 25 ml)	Becton Dickinsen, Heidelberg
Pipettenspitzen (steril) mit Filter (FT200, FT10E)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Präsentationsfolien	Corporate Express
Polystyrene Rundbodenröhrchen 5 ml	Becton Dickinsen, Heidelberg
Reagenzgläser (12 x 75 mm)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 2 ml, 1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Cronex 5	Agfa HealthCare GmbH, Köln
Scintillationsgefäße	Zinsser Analytic, Frankfurt
sterile Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²)	Becton Dickinsen, Heidelberg
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

3.3 Chemikalien

Chemikalie

10 x Tris/Glycine/SDS Buffer

2-Deoxy-D[2,6-³H]Glukose

2-Deoxy-D-Glukose

2-Mercaptoethanol

30 % Acrylamide / Bis Solution

4 % Paraformaldehyd

5 x siRNS (Verdünnungs-) Puffer

6-Aminohexansäure

Firma

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München

Amersham Pharmacia Biotech,
Little Chalfont, England

Sigma-Aldrich, Steinheim

Gibco Invitrogen, Darmstadt

Bio-Rad Laboratories GmbH,
München

Herbeta, Berlin

Dharmacon, Lafayette, CO, USA

Merck Chemicals, Darmstadt

3. Material, Reagenzien und Methoden

99,5 % Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin vom Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bisphenol A Diglycidylether (BADGE)	Fluka Chemicals, St. Louis, USA
Blotting Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Calciumchlorid (CaCl_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
D-(+)-Glucose Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Katalognummer 41965-039	Gibco Invitrogen, Darmstadt
EASYpack Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Fluoromount G	Electron Microscopy Science, Hatfield, USA
Foetal Bovine Serum (FBS)	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycerol Standard Solution G7793	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES 1M	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isobutylmethylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
LY294002 (PI3K-Inhibitor)	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim

3. Material, Reagenzien und Methoden

Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Oil Red O Stocklösung O-0625	Sigma-Aldrich, Steinheim
Optiphase Supermix	Wallac (Perkin Elmer), Rodgau
Orexin A	NeoMPS, Strasbourg
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Penicillin-Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche, Mannheim
Cocktail Tabletten	
Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
RIPA Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Somatic Cell ATP Releasing Reagent (FL-SAR)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris-EDTA Puffer	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan Blue Stain 0,4 %	Gibco Invitrogen, Darmstadt
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim

nTZD (2-(2-(4-Phenoxy-2-Propylphenoxy)Ethyl)Indole-5-Acetic Säure) wurde freundlicherweise von den Doktoren Derek Von Langen und Michael Kress (Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, USA) zur Verfügung gestellt.

3.4 Lösungen und Puffer

Krebs Ringer Hepes Puffer (pH 7,4)

NaCl	136 mM
KCl	4,7 mM
CaCl ₂	1 mM
MgSO ₄	1,2 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM
NaHCO ₃	2 mM
HEPES	10 mM

10 x PBS

2000 ml destilliertes Wasser
+ 4,2 g KH₂PO₄
+ 7,7 g Na₂HPO₄
+ 180,0 g NaCl

PBS-Tween

900 ml destilliertes Wasser
+ 98 ml 10x PBS
+ 2 ml Tween

Milchblockierlösung

PBS-Tween
+ 5 % Blotting Grade Blocker

AI-Puffer

36,34 g TRIS
+ 200 ml Methanol (MeOH)
+ Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)

3. Material, Reagenzien und Methoden

AII-Puffer

- 3,02 g TRIS
- + 200 ml Methanol (MeOH)
- + Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)

K-Puffer

- 5,24 g 6-Aminohexansäure
- + 200 ml Methanol (MeOH)
- + Wasser (Gesamtvolumen 1 Liter)

Stripping-Puffer (pH 6,7)

- 3,79 g TRIS (M=121,13 g/mol) 62,5 mM in 500 ml Wasser
- + 50 ml 10 % SDS Stammlösung
- + 3,9 ml β -Mercaptoethanol 100 mM (M=78,13 g/mol)
- + 400 ml destilliertes Wasser

3.5 Kit-Systeme

Kit-System

- Mouse Adiponectin RIA Kit
- Amersham ECLTM Western Blotting
- Colorimetric Triglyceride Kit
- Deliver XTM Plus siRNA Transfection Kit
- Enhanced Avian HS RT-PCR Kit
- Free Glycerol Determination Kit
- LightCycler® FastStart DNA Master
SYBR® Green I
- LightCycler® TaqMan® Master
- Molecular ProbesTM ATP Determination Kit
- Pierce BCATM Protein Assay Kit
- ProteoJETTM Membrane Protein Extraction Kit

- RNeasy® Mini Kit
- RNase-Free DNase Set

Firma

- Linco Research, St. Charles, USA
- GE Healthcare, Freiburg
- Cypress Diagnostics, Langdorp, Belgien
- Panomics, Santa Clara, USA
- Sigma-Aldrich, Steinheim
- Sigma-Aldrich, Steinheim
- Roche, Mannheim

- Roche, Mannheim
- Invitrogen, Darmstadt
- Thermo Scientific, Dreieich
- Fermentas Life Science,
St. Leon-Rot
- Qiagen, Hilden
- Qiagen, Hilden

3.6 Antikörper

Antikörper	Herkunft	Firma	Verdünnung
Adiponectin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	1:1000
β-Aktin	Maus	Sigma Aldrich, Steinheim	1:5000
GLUT4	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	1:2500, 1:100
OXR1, OXR2	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:500
PPAR γ 2	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England	1:1000
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:5000
Anti-Mouse IgG, HRP-linked	Pferd	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	1:5000
Anti-Rabbit Cy3	Ziege	Dianova, Hamburg	1:150
Anti-Goat IgG, HRP-linked	Esel	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:5000

3.7 Primersequenzen und Sonden für die quantitative PCR

Alle Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL aus Berlin und alle Taqman-Sonden von der Firma Roche aus Mannheim bezogen.

Die Zielgene waren von der Spezies *Mus musculus* (Maus).

Primer, die mit LightCycler® TaqMan® Master verwendet wurden:

Zielgene mit Referenz-ID	Primersequenz	Roche-Sondennummer
OXR1 (nm_198959.2)	Sense: 5' cttcatcgtggctctgga 3' Antisense: 5' atggaagggtccccactac 3'	#109
OXR2 (nm_198962.3)	Sense: 5' tctggtctttgcaatttgctatc 3' Antisense: 5' tgtgtgtgaacatcccaaatact 3'	#89
Gapdh (ENSMUST00000073605)	Sense: 5' atggtgaaggtcgggtgta 3' Antisense: 5' aatccactttgccactgc 3'	Standard

3. Material, Reagenzien und Methoden

Primer, die mit LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I verwendet wurden:

Zielgene mit Referenz-ID	Primersequenz
Pparg2 (nm_011146)	Sense: 5' tttatgctgttatgggtga 3' Antisense: 5' ctgattccgaagttgggtg 3'
HPRT (nm_013556.2)	Sense: 5' cgttgggcttacctcact 3' Antisense: 5' ggtcataacctgggtcatc 3'
Fabp4 (nm_024406.2)	Sense: 5' tggaagacagctcctcctcg 3' Antisense: 5' aatccccattacgctgatgatc 3'

3.8 siRNS Sequenzen für die transienten Transfektionen

siRNS	Firma
PPARG ON-TARGETplus™ SMART (Maus)	Dharmacon, Lafayette, CO, USA
On-TARGETplus™ Non-targeting siRNA	Dharmacon, Lafayette, CO, USA

3.9 Software

Software	Firma
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
LightCycler® Software Version 4.5	Roche, Mannheim
MultiCalc® Version 3.6	Wallac (Perkin Elmer), Rodgau
Quantity One® 1-D Analysis Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.10 Zellen

Für die in vitro Experimente wurden 3T3-L1 Zelllinien der Firma ATCC (Manassas, VA, USA) verwendet.

3T3-L1 Zelllinien sind adhärenente Fibroblasten von embryonalen Swiss Albino Mäusen, die sich zu Adipozyten differenzieren lassen.

3.11 Methoden

3.11.1 Kultivieren der 3T3-L1 Zellen

Im gefrorenen Zustand wurden die 3T3-L1 Zellen bei - 80 °C in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 5 % DMSO aufbewahrt.

Für die Durchführung der Experimente wurden die Zellen bei Zimmertemperatur aufgetaut. 5 % DMSO wurde den Zellen zugegeben und das Zell-Medium-Gemisch in ein neues Falconröhrchen mit 5 ml Standardmedium (DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin) hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch bei 800 U/min, 25 °C, für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das zurückgebliebene Zellpellet wurde mit 5 ml neuem Standardmedium gemischt und in eine 275 ml Falconflasche überführt. Es wurden zusätzlich 7 ml Standardmedium der Flasche hinzugefügt und mit vorhandenem Zell-Medium-Gemisch mit einer 13 ml Pipette gemischt.

Im aufgetauten Zustand wurden die Zellen im Brutschrank (5 % CO₂, 95 % O₂, 37 °C) inkubiert. Die Zellen durften zu keinem Zeitpunkt konfluent wachsen. Bei 50-60 % Konfluenz wurden die Zellen 1:6 geteilt, so lange bis die Zellen in die finalen Versuchsgefäßen (Wellplatten) kamen.

Alle Zellkulturarbeiten mit den 3T3-L1 Zellen wurden ohne Ausnahme unter der Sterilwerkbank ausgeführt.

Alle Medien, die mit den Zellen in Berührung kamen, wurden vorher filtriert und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Für die Kultivierung der 3T3-L1 Zellen wurde ebenfalls das Standardmedium verwendet. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 2 Tage. Die Zellen wurden während des Mediumwechsels mit PBS-Dulbecco gewaschen.

Um die Zellen auszuplattieren, wurde das Medium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin und einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37 °C von der Kulturflasche gelöst, indem nach der Inkubation mit Trypsin, DMEM-Medium in die Kulturflasche pipettiert wurde. Die Zellsuspension wurde in eine 50 ml Falcon-Tube überführt und bei 800 U/min, 25 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen mit 50 ml DMEM resuspendiert und auf die gewünschte Anzahl von 6-, 12-, oder 24-Wellplatten ausplattiert. Bei 6-Wellplatten wurden jeweils pro Well 2 ml, bei 12-Wellplatten jeweils 1 ml und bei 24-Wellplatten jeweils 0,5 ml Zellsuspension plattiert.

3.11.2 Differenzierung von 3T3-L1 Zellen zu Adipozyten

3T3-L1 Fibroblasten wurden nach dem Standardprotokoll zu Adipozyten differenziert [81]. Dazu ließ man die Zellen in den 6-, 12-, oder 24-Wellplatten zu 100 % konfluent wachsen, bevor mit der Differenzierung begonnen werden konnte. Es wurde das Standardmedium für die Differenzierung der 3T3-L1 Zellen verwendet (siehe 3.11.1).

Das Differenzierungsmedium bestand aus:

- Isobutylmethylxanthin (IBMX; 50 mM, in 0,1 N KOH gelöst)
- Dexamethason (25 mg in 31,8 ml 96 % Ethanol gelöst) und
- Insulin 10 mg/ml (gelöst in 0,01 N HCL)

	Pro 10 ml Medium	Pro 50 ml Medium
IBMX (50 mM)	100 µl	500 µl
Dexamethason (2 mM)	1,25 µl	6,25 µl
Insulin (10 mg/ml)	5 µl	25 µl

Wenn die Zellen 100 % konfluent gewachsen waren (Tag - 2), erfolgte ein Mediumwechsel (Standardmedium für die Kultivierung). 2 Tage später (Tag 0) wurde die Differenzierung begonnen, indem das Standardmedium mit dem Differenzierungsmedium versetzt wurde. Nach 2 Tagen (Tag 2) wurden die Zellen wieder einem Mediumwechsel unterzogen. Dieses Medium bestand aus dem Standardmedium mit Insulin in der Konzentration 1 µg/ml. Anschließend erfolgte alle 2 Tage wieder ein Wechsel des Mediums mit dem Standardmedium. Die differenzierten Adipozyten konnten ab Tag 6 bis Tag 10 für Experimente verwendet werden.

3.11.3 Inkubationsexperimente mit Testpeptiden

Bevor die Zellen mit OXA oder anderen Testpeptiden inkubiert wurden, wurden sie über Nacht mit serumfreiem DMEM-Medium inkubiert.

Orexin A Pulver wurde in Wasser gelöst, so dass eine Stammlösung von 1 mM entstand. Das gelöste OXA wurde in Eppendorfröhrchen aliquotiert und bei -20 °C tiefgefroren.

Da in den Versuchen mit einer anderen Orexinkonzentration als die der Stammlösung gearbeitet wurde, wurde die Stammlösung unmittelbar vor dem Gebrauch mit serumfreiem DMEM-Medium verdünnt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bis 48 Stunden mit OXA (1, 10, 100 nM) oder den Testpeptiden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Aspiration von Medium gestoppt und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen.

Das aspirierte Medium wurde in Eppendorfröhrchen überführt und konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

3.11.4 Proteinisolation

3.11.4.1 Zytoplasmatischer Proteinextrakt und Membranproteinfraktion

Die Isolierung der Proteine wurde mithilfe des ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit von der Firma Fermentas durchgeführt. Die Proteinisolation wurde auf Eis durchgeführt und alle Puffer und Reagenzien waren eiskalt.

Der Cell Permeabilization Puffer und der Membrane Protein Extraction Puffer wurden mit jeweils einer Tablette Proteaseinhibitor der Firma Roche zugesetzt.

Nachdem die Zellen mit KRB Puffer inkubiert wurden, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Zellschaber von den Wells gelöst und in Falconröhrchen überführt. Das Zellgemisch wurde für 5 Minuten bei 4 °C 250 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die übrig gebliebene Zellsuspension wurde mit 3 ml Cell Wash Solution gewaschen und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wurde verworfen. Der letzte Waschschrift wurde mit 1,5 ml Cell Wash Solution wiederholt und die Zellen wurden in 2 ml Zentrifugenröhrchen überführt und wieder für 5 Minuten bei 4 °C 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls entfernt. Jeweils 1,5 ml Cell Permeabilization Puffer wurden hinzugefügt, kurz und kräftig durchgemischt und für 10 Minuten bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4 °C 16000 x g zentrifugiert und der Überstand (zytoplasmatischer Proteinextrakt) vorsichtig in neue Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend bei -20 °C weggefroren, falls die Proben nicht sofort weiter verwendet wurden. Um die Membranproteine (für die Bestimmung von Glukosetransportern in der Plasmamembran) zu extrahieren, wurde 1 ml Membrane Protein Extraction Puffer ins übrig gebliebene Zellpellet hinzugegeben und die Zellsuspension mit einer Pipette gemischt, um das Zellpellet aufzulösen. Die Zellsuspension wurde 30 Minuten bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 4 °C 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand (Membranproteinfraktion) wurde in neue Zentrifugenröhrchen überführt und bei -20 °C weggefroren.

3.11.4.2 Gesamtproteinisolation

Um die Gesamtproteine der Adipozyten zu gewinnen, wurden auf Eis Zelllysate hergestellt. Dazu wurde zunächst dem RIPA-Puffer, der Zellen auflöst und Proteine löslich macht, jeweils eine Tablette Protease- und Phosphatase-Inhibitor der Firma Roche hinzugefügt. Das Medium in den Wells wurde entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 100 µl (6-Well-Platte) bzw. 50 µl (24-Well-Platte) RIPA-Puffer pro Well hineinpipettiert. Die Platte

3. Material, Reagenzien und Methoden

wurde 5 Minuten bei 2-8 °C inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zelllysate in den Wells mithilfe eines Zellschabers in Falconröhrchen, die sich auf Eis befinden, überführt und 10 Minuten bei 4 °C 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde vorsichtig in neue Eppendorfröhrchen überführt.

3.11.5 Messung der Proteinkonzentration

Da die Adipozyten differenziert werden, wenn sie 100 % konfluent gewachsen sind und das Vorabzählen der Zellen keine genaue Aussage über die tatsächliche Anzahl der differenzierten Adipozyten in den Wells hergibt, wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Wells bestimmt, um sowohl Untersuchungen besser miteinander vergleichen zu können als auch die Ergebnisse anhand der Proteinkonzentration korrigieren zu können.

Die Proteinkonzentration in den differenzierten Adipozyten wurde mithilfe des Pierce BCA® Protein Assay Kits der Firma Thermo Scientific bestimmt.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf die Reduktion von Cu^{+2} (Kupfer-II-Ionen) zu Cu^{+1} (Kupfer-I-Ionen) durch Proteine in einer alkalischen Lösung (Biuret Reaktion). Die Bicinchoninsäure bildet mit den entstandenen Cu^{+1} (Kupfer-I-Ionen) farbige Komplexe, die bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden können.

Die Standards und die Arbeitslösung wurden nach Herstellerangaben hergestellt.

Für die Proteinbestimmung mit dem BCA® Protein Assay Kit wurden jeweils 5 µl einer Probe bzw. 5 µl des Standards in eine 96-Well-Platte pipettiert. Jedem Well wurden 95 µl vom BCA Arbeitsreagenz hinzugefügt. Die Platte wurde 30 Sekunden mit dem Schüttler des Spektrophometers geschüttelt und anschließend 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde die Wellplatte auf Raumtemperatur abgekühlt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem Spektrophometer gemessen.

Anhand der Standards konnte eine Standardkurve generiert werden, mit der man den Proteingehalt in den Proben bestimmen konnte.

3.11.6 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine auf einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Die auf der Membran befindlichen Proteine können mit Antikörpern markiert werden, welche wiederum von Antikörpern gebunden werden, die ein

3. Material, Reagenzien und Methoden

Enzym koppeln, welches die Entstehung einer Lumineszenz katalysiert, die anschließend detektiert werden kann.

Die Western Blot Methode wurde mithilfe des Mini-Protean® Tetra Electrophoresis System von Bio-Rad Laboratories GmbH durchgeführt.

Das Trenngel, bestehend aus 2600 µl Wasser, 670 µl Glycerin, 4000 µl 30 % Acrylamide Mix, 2500 µl 1,5 M Tris Puffer (pH 8,8), 100 µl 10 % SDS, 100 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 4 µl Temed, und das Sammelgel, bestehend aus 3400 µl Wasser, 830 µl 30 % Acrylamide Mix, 630 µl 1,0 M Tris (pH 6,8) Puffer, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 5 µl Temed, wurden hergestellt und gegossen.

Die zu bestimmenden Proteine wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf 95 °C für 5 Minuten bei 500 U/min erhitzt. Für die Bestimmung der GLUT4 Proteine wurden die Proben laut Herstellerangaben nicht erhitzt.

Nachdem das Gel fest war, wurde es in die Elektrophoresekammer überführt. Die Kammer wurde bis zur Hälfte mit Laufpuffer (900 ml destilliertes Wasser, 100 ml 10 x Tris/Glycine/SDS Buffer) befüllt. Jeweils 10 µl der Proteinproben wurden auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde die Kammer vollständig mit Laufpuffer befüllt und bei 80 V für ca. 10 Minuten wurden die Proteine gesammelt, bis sie eine Linie bilden.

Die Elektrophorese fand anschließend bei 160 V für 40-50 Minuten statt.

Um die Proteine auf eine Membran (Trans-Blot® Transfer Medium Nitrocellulose Membrane von Bio-Rad Laboratories) zu transferieren, wurden 2 Nitrocellulosemembrane mit AI-Puffer, 1 Nitrocellulosemembran mit AII-Puffer, die Membran mit AII-Puffer, das Gel kurz mit K-Puffer und 2 Nitrocellulosemembrane mit K-Puffer befeuchtet und auf den Semi Dry Blotter aufeinandergelegt. Die Proteine auf dem Gel wurden bei 300 Watt 1 Stunde lang auf die Membran übertragen.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit PBS-Tween gewaschen. Zur qualitativen Visualisierung der Übertragung wurden die Proteine mit Ponceau S gefärbt und mit PBS-Tween wieder entfärbt.

Die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine auf der Membran wurden nun 30-60 Minuten in 5 % Milchblockierlösung auf dem Schwenker bei Raumtemperatur geblockt.

Der primäre Antikörper wurde mit 5 % Milchblockierlösung verdünnt und jede Membran wurde mit 10 ml der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C auf einem Schwenker inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die primäre Antikörperlösung entfernt und die Blotmembran wurde 3 x 10 Minuten mit PBS-Tween auf dem Schwenker gewaschen. Anschließend wurde der mit

3. Material, Reagenzien und Methoden

5 % Milchblockierlösung verdünnte sekundäre Antikörper der Membran hinzugefügt und für 1 Stunde auf dem Schwenker bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Entfernen des sekundären Antikörpers wurde die Membran 10 Minuten mit PBS-Tween auf dem Schwenker gewaschen.

Jeweils 1,5 ml vom ECLTM Western Blotting Detection Reagent 1 und 2 wurden zusammen kräftig durchmischt, auf die Blotmembran gegeben und für 3-5 Minuten inkubiert.

Die Blotmembran wurde zwischen 2 Folien in einer Röntgenkassette befestigt und es wurde im Dunkeln ein Röntgenfilm darauf gelegt. Nach 10 Sekunden bis 10 Minuten konnte der Film mithilfe der Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine Protec der Firma Siemens AG entwickelt werden.

Die Signalintensität konnte mit der Quantity One® 1-D Analysis Software bestimmt werden.

3.11.7 RNS-Isolation

Für die RNS-Isolation aus den differenzierten Adipozyten wurde das RNeasy® Mini Kit und das RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen nach Herstellerangaben verwendet.

Das RNeasy® Mini Kit funktioniert mithilfe der Bindung von RNS an eine Silica-Membran, die eine selektive Bindungseigenschaft gegenüber RNS hat. In Anwesenheit von einem Guanidinthiocyanat-Puffer werden die Adipozyten lysiert und die RNasen denaturiert. Ethanol gewährleistet angemessene Voraussetzungen für die Bindung der RNS an die Silica-Membran. Nach Bindung der RNS an die Silica-Membran erfolgt eine Zentrifugation. Das übrig gebliebene Zellmaterial wird über mehrere Waschstufen entfernt. Die an der Silica-Membran befindlichen RNS werden eluiert und in RNase-freiem Wasser aufbewahrt.

Mithilfe des RNase-Free DNase Set werden RNasen, DNasen sowie übrig gebliebene DNS entfernt.

Die für die RNS-Isolation benötigten differenzierten Adipozyten wurden, wie unter 3.11.3 (Inkubationsexperimente mit Testpeptiden) beschrieben, vorbereitet.

Nach Inkubation mit den Testpeptiden in 6-Well-Platten wurde das komplette Medium entfernt und sofort 350 µl RLT-Puffer (beinhaltet Guanidinthiocyanat) pro Well hineinpipettiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Boden gelöst und mit einer Pipette in Zentrifugenröhrchen überführt. 350 µl 70 % Ethanol wurden in jedes Zentrifugenröhrchen pipettiert und der Inhalt mit der Pipette vermischt.

Jeweils 700 µl des Gemisches wurden in eine RNeasy® Zentrifugensäule (beinhaltet Silica-Membran), welche in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen platziert wurde, überführt und für

3. Material, Reagenzien und Methoden

15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Die durch die Zentrifugensäule in das Zentrifugenröhrchen getretene Flüssigkeit (Durchfluss) wurde entfernt.

Jeweils 350 µl RW1-Puffer (beinhaltet Ethanol) wurden in die Zentrifugensäule pipettiert und der Inhalt für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Jeweils 10 µl DNase Stammlösung und jeweils 70 µl RDD-Puffer (RNase-freies Puffer) wurden miteinander vermischt und kurz zentrifugiert. Das Gemisch wurde auf die Silica-Membran pipettiert und bei 20-30 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach Inkubation wurden 350 µl RW1-Puffer in die Zentrifugensäule pipettiert, der Inhalt für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Um die Silica-Membran zu waschen, wurden 500 µl RPE-Puffer (Waschpuffer) in die Zentrifugensäule pipettiert, der Inhalt für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde zum Trocknen der Membran erneut 500 µl RPE-Puffer in die Zentrifugensäule pipettiert und diesmal für 2 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Zentrifugensäule vorsichtig aus dem Zentrifugenröhrchen entfernt und in ein neues 1,5 ml großes Zentrifugenröhrchen platziert. Um die RNS zu eluieren, wurden 35 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silica-Membran pipettiert und der Inhalt für 1 Minute bei 10000 U/min zentrifugiert.

Die RNS wurde quantitativ mit dem Spektrophometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 260 nm entsprach 40 µg/ml.

Die Konzentration der RNS berechnete sich wie folgt:

Konzentration RNS [µg/ml] = $OD_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnung}$.

Qualitativ wurde die RNS bestimmt, indem die Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt wurde. Wenn der Quotient von OD_{260}/OD_{280} größer als 2 war, konnte man sicher sein, dass sich in der Probe RNS befand und keine Kontamination mit genomischen RNS, DNS oder Proteinen stattfand.

3.11.8 Quantitative real-time PCR

Die quantitative real-time PCR ist eine Methode, mit der man in Echtzeit DNS quantitativ bestimmen kann. Das Prinzip der quantitativen real-time PCR beruht auf die Vervielfältigung vorhandener DNS in Zyklen mithilfe der DNS-Polymerase. Die Produkte vorheriger Zyklen werden als Vorlage für die darauffolgenden Zyklen verwendet, so dass es zu einer exponentiellen Vervielfältigung kommt (Polymerase-Kettenreaktion). Mit dieser Methode

3. Material, Reagenzien und Methoden

können geringe Mengen an DNS nachgewiesen werden. Startpunkt der Synthese ist ein Primer, ein Oligonukleotid, der an die DNS bindet.

Die PCR verläuft in wiederkehrenden Zyklen, bestehend aus drei Schritten: Denaturierung (der DNS), Annealing/Hybridisierung (Primer bindet an DNS) und Elongation (DNS-Polymerase bildet komplementären DNS-Strang).

Die quantitative Bestimmung der DNS erfolgt in der exponentiellen Phase eines Zyklus, in der sich die DNS nahezu verdoppelt hat, durch Detektion eines Fluoreszenzfarbstoffes. Der Fluoreszenzfarbstoff wird entweder in die neugebildete DNS eingebaut (SYBR® Green) oder entsteht durch eine Sonde (TaqMan®), die mit der DNS-Vorlage (Template) hybridisiert und nur Fluoreszenzsignale freisetzt, wenn sie von der DNS-Polymerase abgebaut wurde.

Da mit der real-time PCR DNS vervielfältigt wird, muss die vorhandene RNS vorher in DNS umgewandelt werden. Dazu wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus einer RNS die dazu gehörende cDNS (komplementäre DNS) synthetisiert. Startpunkt der Synthese ist ebenfalls ein Primer, der an die RNS bindet.

Zur Herstellung der Erststrang-cDNS wurde das Enhanced Avian HS RT-PCR Kit von Sigma nach Herstellerangaben verwendet.

Alle Reagenzien wurden auf Eis gestellt. In ein PCR Mikrozentrifugenröhrchen wurden 2 µl RNS Template, 1 µl Deoxynukleotidmix, 1 µl Anchored Oligo (dT)₂₃ Primer und 6 µl PCR Wasser (Gesamtvolumen 10 µl) pipettiert und vorsichtig mit einer Pipette miteinander vermischt. Der Inhalt wurde kurz zentrifugiert und im Thermocycler bei 70 °C für 10 Minuten inkubiert. Nach Inkubation wurden die Mikrozentrifugenröhrchen zur Abkühlung 1 Minute auf Eis gelegt und anschließend zentrifugiert. Jeweils 6 µl PCR Wasser, 2 µl 10 x Puffer für AMV-RT, 1 µl RNase Inhibitor und 1 µl Enhanced Avian RT wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert, so dass am Ende ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand.

Bei der Negativkontrolle wurde keine Reverse Transkriptase (Enhanced Avian RT) in die Röhrchen pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug ebenfalls 20 µl.

Die Röhrchen wurden bei 50 °C für 50 Minuten inkubiert. Die entstandenen Einzelstrang-cDNS konnten nun für die real-time PCR verwendet werden oder wurden bei -20 °C gelagert, falls sie nicht sofort verwendet wurden.

Für die Durchführung der real-time PCR wurden je nach Primer das LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR® Green I Kit oder das Light Cycler® TaqMan® Master Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet. Die Durchführung fand auf Eis statt.

Die Primer wurden mithilfe der Software Primer-BLAST

3. Material, Reagenzien und Methoden

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> entworfen und von TIB MOLBIOL bezogen. Beim Entwurf wurde darauf geachtet, dass die Primer Intron-überspannend waren, um die Möglichkeit einer Amplifikation genomischer DNS auszuschließen.

Die Sonden wurden mithilfe des Assay Design Centers der Firma Roche <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000> gewählt und bei derselben Firma bestellt.

Die Primer wurden im zweifach destilliertem Wasser gelöst und die cDNS-Vorlagen 10-fach verdünnt. Für jede cDNS-Vorlage wurde ein Mastermix (SYBR® Green oder TaqMan®), welche 5 µl der 10-fach verdünnten cDNS-Vorlage beinhaltet, hergestellt. Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 20 µl und wurden in einem Zweifach-Ansatz durchgeführt.

Der Ansatz mit dem LightCycler® Fast Start DNA Master SYBR® Green I Kit sah wie folgt aus:

Bestandteile	Endkonzentration
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I, 10 x konzentriert	1 x *
MgCl ₂ 25 mM	2 mM
Primer vorwärts	50 pmol
Primer rückwärts	50 pmol
cDNS-Vorlage	5 µl
Nuclease-freies PCR Wasser	ad 20 µl

Der Ansatz mit dem Light Cycler TaqMan Master Kit sah wie folgt aus:

Bestandteile	Endkonzentration
LightCycler® TaqMan® Master Mix, 5 x konzentriert	1 x *
TaqMan Sonde	0,1 µM
Primer vorwärts	50 pmol
Primer rückwärts	50 pmol
cDNA-Vorlage	5 µl
Nuclease-freies PCR Wasser	ad 20 µl

3. Material, Reagenzien und Methoden

*genaue Konzentration vom Hersteller nicht angegeben

Für die Negativkontrolle wurde anstatt der cDNS-Vorlage Nuklease-freies PCR Wasser verwendet.

Vor der Durchführung der PCR im LightCycler® 2.0 Instrument der Firma Roche wurden die Kapillarröhrchen mit dem „Mastermix“ bei 3000 U/min für 5 Sekunden zentrifugiert.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur - Zeit
1. Preinkubation	95°C – 10 min
2. Denaturation	95°C – 10 sek
3. Annealing	62 °C – 3 sek
4. Extension	72°C – 6 sek
5. Abkühlen	40°C – 30 sek
Zyklenanzahl Schritt 2-4	40

Die Sonden-Annealingzeit betrug 25 Sekunden und die -Extensionzeit 10 Sekunden.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde auf Basis der Schmelzkurvenanalyse überwacht. Die Schmelzkurvenanalyse erlaubt die Unterscheidung zwischen einem spezifischen PCR-Produkt und Primer-Dimeren, da das PCR-Produkt einen höheren Schmelzpunkt hat.

Um die Schmelzkurve zu generieren, werden am Ende der PCR die Proben bei 95 °C für 5 Sekunden denaturiert und anschließend kontinuierlich von 65 °C bis 95 °C mit einer Anstiegsrate von 0,1 °C pro Sekunde aufgeschmolzen.

Die relative Quantifikation wurde mit der LightCycler® Software Version 4.5 berechnet. Als Referenz-Gen wurde entweder GAPDH oder HPRT gewählt.

3.11.9 Bestimmung des Fettgehalts der Zellen

Um eine Aussage über die Lipolyse treffen zu können, wurde die ins Medium freigesetzten Konzentrationen von freiem Glycerol bestimmt.

Triglyceride werden bei der Lipolyse in einen Molekül Glycerol/Glycerin und 3 Fettsäuren aufgespalten.

3. Material, Reagenzien und Methoden

Für die Glycerolbestimmung wurde das „Free Glycerol Determination Kit“ der Firma Sigma verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Herstellerangaben.

Das Prinzip der Glycerolbestimmung beruht darauf, dass Glycerol über mehrere Zwischenschritte zu einem Chinonimin-Farbstoff und Wasser umgewandelt wird. Dieser Farbstoff gehört zur Gruppe der Cyanin-Farbstoffe und hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die Wellenlänge wurde mit einem Spectrophometer gemessen und ist direkt proportional zur freien Glycerolkonzentration im Medium.

Zur Vorbereitung für die Glycerolbestimmung wurden die Adipozyten über Nacht mit serumfreiem DMEM-Medium inkubiert und anschließend 24 Stunden in serumfreiem DMEM-Medium mit 0,1 % BSA und den Testpeptiden inkubiert. Das Medium wurde entnommen und für 10 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die freie Glycerolbestimmung verwendet.

Jeweils 10 µl der Standardlösung, 10 µl des Überstands (Probe) bzw. 10 µl Wasser (Blank) wurden in je 2 Wells (Doppelbestimmung) einer 96-Well-Platte pipettiert, gefolgt von 90 µl Free Glycerol Reagenz, das vorher mit 40 ml zweifach destilliertem Wasser gemischt und auf Raumtemperatur gebracht wurde.

Die 96-Well-Platte wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zwischendurch gemixt. Die Absorption der Proben wurde mit dem Spektrophometer bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen.

Anschließend wurde die Glycerolkonzentration folgendermaßen berechnet:

$$\frac{A \text{ Probe} - A \text{ Blank}}{A \text{ Standard} - A \text{ Blank}} \times \text{Standardkonzentration}$$

Bevor die Triglyceride in den Adipozyten bestimmt werden konnten, wurden die in 12-Well-Platten differenzierten Adipozyten vorher mit serumfreiem DMEM-Medium über Nacht und anschließend mit den Testpeptiden in serumfreiem DMEM-Medium 24 Stunden inkubiert.

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Jeweils 100 µl Triglyceride Assay Puffer, bestehend aus 50 mM Tris HCl (pH 7,4) und 1 mM EDTA, wurden pro Well hinzugegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Adipozyten vom Boden der Wells gelöst und in Falconröhrchen überführt. Der Inhalt der Falconröhrchen wurde mit dem Ultraschall 10 Sekunden mit 50 %iger Amplitude bei 70 Watt behandelt.

Jeweils 10 µl des sonifizierten Zellgemisches wurden in ein Well einer 96-Well-Platte hinzugegeben.

3. Material, Reagenzien und Methoden

Der Triglyceridgehalt des Zellgemisches wurde mit dem Colorimetric Triglyceride Kit bestimmt. Mithilfe des Kits werden Triglyceride durch die Lipoproteinlipase in Glycerol und freie Fettsäuren gespalten. Das entstandene freie Glycerol reagiert mit der Glycerolkinase zu Glycerol-3-Phosphat, welches anschließend durch die Glycerol-3-Phosphat Oxidase zu Wasserstoffperoxid oxidiert wird. Durch die Trinder Reaktion (Wasserstoffperoxid + 4-Aminoantipyrin + P-Chlorophenol) entsteht ein roter Farbstoff, dessen Intensität proportional zum Triglyceridgehalt des Zellgemisches ist.

Jeweils 10 µl der Standardlösung bzw. des Zellgemisches wurden in ein Well hinzugegeben, gefolgt von 90 µl der Arbeitslösung in jedes Well. Der Inhalt der Well-Platte wurde gemischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dem Spektrophometer bei einer Wellenlänge von 505 nm gemessen.

Der Triglyceridgehalt (mg/dl) wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Absorption Zellgemisch}}{\text{Absorption Standardlösung}} \times \text{Standardkonzentration}$$

Das übrig gebliebene sonifizierte Zellgemisch wurde für die Proteinbestimmung weiterverwendet. Die Ergebnisse der Triglyceridbestimmung wurden der Proteinkonzentration angepasst.

Eine Methode, um den Fettgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten zu bestimmen und die intrazelluläre Fettverteilung sichtbar machen zu können, ist das Oil Red O.

Für die Morphologiebestimmung mit Oil Red O wurden die Adipozyten wie für die Triglyceridbestimmung (siehe oben) vorbereitet. Die Zellen wurden 48 Stunden mit den Testpeptiden inkubiert. Alle Lösungen, die verwendet wurden, wurden mit einem 0,2 µm Filter filtriert.

Für die Färbung wurde zunächst das Inkubationsmedium in den 12-Well-Platten entfernt und pro Well 1 ml 10 % Formalin (in PBS gelöst) hinzugefügt, wieder entfernt und neues 10 % Formalin pro Well hinzugegeben. Die Platte wurde ca. 1 Stunde inkubiert.

Mit einer kleinen Transferpipette wurde das 10 % Formalin entfernt und die Zellen wurden mit 60 % Isopropanol (1 ml pro Well) gewaschen und anschließend vollständig an der Luft getrocknet.

Nach dem Trocknen wurde 400 µl Oil Red O Arbeitslösung, bestehend aus Oil Red O Stammlösung (0,7 g Oil Red O + 200 ml 100 % Isopropanol) und destilliertem Wasser im Verhältnis 6:4, pro Well für 30 Minuten hinzugegeben.

3. Material, Reagenzien und Methoden

Nach 30 Minuten wurde die Oil Red O Arbeitslösung entfernt und sofort destilliertes Wasser hinzugegeben. Die Zellen wurden 4 x mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend konnten von den Zellen Bilder gemacht werden. Das ganze destillierte Wasser wurde entfernt und die Zellen getrocknet.

Die Oil Red O Arbeitslösung wurde aus den Zellen ausgewaschen, indem 1,5 ml 100 % Isopropanol pro Well hinzugegeben wurden und die Zellen für 10 Minuten oder länger inkubiert wurden. Das 100 % Isopropanol und die Oil Red O Arbeitslösung wurden mit der Pipette mehrere Male gemischt, um sicher zu gehen, dass die ganze Arbeitslösung in der Lösung war. 1,5 ml von der entstandenen Lösung wurde jeweils in neue Eppendorfröhrchen überführt.

Die optische Dichte der Lösung wurde bei 500 nm, über 0,5 Sekunden gemessen. Als Leerwert wurde 100 % Isopropanol verwendet. Als Kontrolle wurde 100 % Isopropanol mit Oil Red O Arbeitslösung aus einem zellleeren Well verwendet.

3.11.10 Glukoseaufnahme in die Zellen

Die Glukoseaufnahme in den 3T3-L1 Adipozyten wurde anhand des Protokolls „Study of Glukose Uptake in Adipose Cells“ von Jun Shi und Konstantin V. Kandror mit einigen Modifikationen durchgeführt.

Das Prinzip beruht auf die Aufnahme der radioaktiven 2-Deoxy-³H-Glukose über den Glukosetransporter. Da die 2-Deoxy-³H-Glukose nicht an der Glykolyse teilnimmt, kann damit die Glukoseaufnahme der Zellen bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Glukoseaufnahme wurden 3T3-L1 Adipozyten aus 24-Well-Platten verwendet.

Alle Medien wurden vorher filtriert und auf 37 °C erwärmt.

Die Adipozyten wurden über Nacht in serumfreiem DMEM-Medium inkubiert, am nächsten Tag mit PBS gewaschen und in glukosefreiem KRBH mit 0,1 % BSA für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit PBS gewaschen und mit KRBH mit 0,1 % BSA und den Testpeptiden inkubiert.

In jedes Well wurden 250 µl radioaktives Glukosegemisch (0,5 µCi 2-Deoxy-D[2,6-³H]Glukose und 0,1 mM 2-Deoxy-Glukose in KRBH) pipettiert. Die Wellplatte mit dem Glukosegemisch wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach 5 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µmol/l Cytochalasin B gestoppt. Das Glukosegemisch wurde anschließend aspiriert und die Adipozyten dreimal mit eiskaltem KRBH gewaschen wurden. Nach Entfernen des KRBH wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und nach dem Waschen in 0,1 % SDS für 10

3. Material, Reagenzien und Methoden

Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das entstandene Zelllysats wurde resuspendiert, in Reaktionsgefäße überführt und kräftig durchmischt

Jeweils 350 µl des Zelllysats wurden in Scintillationsgefäße, welche jeweils 3,0 ml Optiphase SuperMix der Firma Wallac enthielten, überführt und die Radioaktivität der 2-Deoxy-³H-Glukose in einem Flüssig-Scintillationszähler für 1 Minute gemessen.

Jeweils 5 µl des Zelllysats wurde für die Proteinbestimmung mit dem Pierce BCA Protein Assay Kits der Firma Thermo Scientific verwendet.

Die Ergebnisse wurden anhand der Proteinbestimmung normalisiert.

3.11.11 ATP Bestimmung

Bevor ATP in den Adipozyten bestimmt wurde, wurden sie über Nacht im serumfreien DMEM-Medium mit 5 mM Glukose aufbewahrt.

Am nächsten Tag wurden die Adipozyten mit den Testpeptiden inkubiert.

Das Prinzip der ATP-Bestimmung beruht auf der Reaktion von Luciferin mit ATP und Sauerstoff in Anwesenheit des Enzyms Luciferase zu Oxyluciferin, AMP, Pyrophosphat, CO₂ und Licht. Das Enzym Luciferase ist notwendig, damit ATP in Licht umgewandelt werden kann. Die Lichtemission kann mithilfe eines Luminometers gemessen werden und ist proportional zum ATP-Gehalt in den Zellen, wenn ATP der limitierende Faktor ist.

Um die Zellen für die ATP-Messung mit dem „Molecular ProbesTM ATP Determination Kit“ der Firma Invitrogen vorzubereiten, wurde nach Entfernen des Mediums pro Well 500 µl „Somatic Cell ATP Releasing Reagent“ der Firma Sigma hinzugefügt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Wells gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Das Gemisch in den Reaktionsgefäßen wurde mit dem Ultraschall Homogenisator für 5 Sekunden mit 50 %iger Amplitude bei 70 Watt homogenisiert und konnte anschließend für die ATP- und Proteinbestimmung verwendet werden.

Nach Vorbereitung der Reagenzien und der Standardreaktionslösung laut „ATP Determination Kit“- Protokoll wurden jeweils 100 µl der Standardreaktionslösung pro Well einer 96-Wellplatte hinzugegeben. Anschließend wurden die Standardreaktionslösungen vom Luminometer gemessen und das Ergebnis der jeweiligen Standardreaktionslösungen in den Wells stellte die Hintergrund-Lumineszenz dar. Um die Standardkurve zu generieren wurden 10 µl der jeweils unterschiedlich verdünnten ATP Standardlösungen der Standardreaktionslösungen hinzugefügt. Der ATP-Gehalt der ATP Standardlösungen konnte ermittelt werden, indem der Wert der Hintergrund-Lumineszenz vom Endwert abgezogen wurde.

3. Material, Reagenzien und Methoden

Zur Probenbestimmung wurde zur Standardreaktionslösung anstatt der verdünnten ATP Standardlösungen jeweils 10 µl der homogenisierten Zellgemische pro Well hinzugefügt und die Wellenlänge mit dem Luminometer bestimmt. Hier musste ebenfalls die Hintergrund-Lumineszenz abgezogen werden, um die endgültige ATP-Konzentration der Proben zu ermitteln. Die ATP-Konzentration wurde anhand der Proteinbestimmung normalisiert.

3.11.12 Messung von Adiponectin

Radioimmunoassays dienen der quantitativen Bestimmung geringer Konzentrationen von Substanzen. Eine bekannte Menge radioaktiv markierter Antigene, gebunden an spezifische Antikörper werden der Lösung mit dem zu bestimmenden Antigen hinzugegeben. Die Antikörper binden kompetitiv an die markierten und an die zu bestimmenden, nicht markierten Antigene. Je mehr nicht markierte Antigene in der Lösung vorhanden sind, desto mehr radioaktiv markierte Antigene können gemessen werden.

Zur Bestimmung von Adiponectinsekretion im Medium wurde das Adiponectin Mouse/Rat RIA Kit von Linco Research verwendet.

Die Adipozyten wurden vorher in serumfreiem DMEM-Medium mit 0,1 % BSA über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Adipozyten gewaschen und in serumfreiem DMEM-Medium mit den Testpeptiden inkubiert. Das Medium wurde anschließend entnommen und für 10 Minuten bei 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und für die Bestimmung der Adiponectinsekretion verwendet.

Sowohl die Zubereitung der Reagenzien, der Standards und die Verdünnung der Proben (1:25) mit Assay Puffer als auch die Durchführung der Experimente richteten sich nach dem Protokoll des Herstellers. Jede Bestimmung wurde doppelt durchgeführt.

In die nicht-spezifisch-bindenden Röhren wurden je 300 µl, in die Referenzröhren je 200 µl und in die restlichen Röhren (für Standard, Kontrollen und Proben) je 100 µl Assay Puffer pipettiert. In die Standard-, Kontroll- und Probenröhren wurden anschließend je 100 µl des Standards, der Kontrollen oder der Proben pipettiert. In alle Röhren wurden je 100 µl ²⁵I-Adiponectin pipettiert. Von dem Adiponectin Antikörper wurden je 100 µl in die Referenz-, Standard- und Probenröhren pipettiert.

Der Inhalt der Glasröhren wurde gevortexet und über Nacht für 20 bis 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3. Material, Reagenzien und Methoden

Am nächsten Tag wurden je 10 µl „Rabbit Carrier“ und je 1 ml kaltes „Precipitating“-Puffer (beinhaltet anti-Kaninchen IgG Serum) in alle Röhren, außer der „Total Count“-Röhren pipettiert. Der Inhalt der Röhren wurde kräftig geschüttelt und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Röhren (außer „Total Count“-Röhren) mit einer Kühlzentrifuge bei 3000 x g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand aller Röhren (außer der „Total Count“ Röhren“) wurde vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt.

Die Radioaktivität in allen Röhren wurde in einem Gammazähler für 1 Minute gezählt.

Die Adiponectinkonzentration wurde mithilfe der Software Multicalc 2000 berechnet.

3.11.13 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die zu untersuchenden Antigene von primären Antikörpern (unmarkiert) gebunden. Die primären Antikörper werden wiederum von sekundären Antikörpern gebunden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Fluoreszenz lässt sich unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachten.

Pro Well einer 6-Wellplatte wurden jeweils 3 Deckgläser (Durchmesser 18 mm x 18 mm) hineingelegt und die undifferenzierten Adipozyten in diese Wells plattiert. Nach Differenzierung der Adipozyten, wurden sie, wie unter 3.11.3 (Inkubationsexperimente mit Testpeptiden) beschrieben, behandelt.

Das Medium mit den Testpeptiden wurde nach der Inkubation entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend wurden die Deckgläser mit einer Pinzette aus den Wells in einen speziellen Behälter für Deckgläser überführt. Die auf den Deckgläsern befindlichen Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert.

Nach Fixierung wurden die Zellen mit PBS 10 Minuten gewaschen und die unspezifischen Bindungen konnten anschließend mit 2 % BSA in PBS 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt werden. Nach dem Blocken wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach mit dem primären Antikörper anti-GLUT4 (Verdünnung 1:100) und 1 % BSA in PBS über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper anti-rabbit Cy3 (Verdünnung 1:150) mit 1 % BSA in PBS 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen 3 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen und für 2 Minuten in Ethanol inkubiert. Nach dem Lufttrocknen

3. Material, Reagenzien und Methoden

der Zellen wurden die Deckgläser jeweils mit 1 Tropfen Fluormount G auf einen Objektträger eingebettet.

Die Adipozyten wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Olympus FluoView Confocal Laser Scanning Microscope – FV500 bei 40-facher Vergrößerung ausgewertet.

3.11.14 Transiente Transfektionen mit siRNS

Die RNS Interferenz ist eine Methode, mit der man einzelne Gene ausschalten kann, um deren Funktion zu untersuchen.

Von außen eingeführte siRNS (small interfering-RNS) führt dazu, dass die mRNA (messenger RNS) mit derselben Nukleotid-Sequenz wie die der siRNS von der Zelle zerstört wird. Proteine, die durch die zerstörten mRNA kodiert werden, können nicht mehr produziert werden.

Für die siRNS Transfektion wurde das Deliver XTM Plus siRNA Transfection Kit der Firma Panomics nach Herstellerprotokoll verwendet.

Die Herstellung der Reagenzien wurde folgendermaßen durchgeführt:

siRNS PPAR γ bzw. non-targeting siRNS als Negativkontrolle wurden mit jeweils 50 μ l 1x siRNS (Verdünnungs-) Puffer vermischt. Jeweils 4,29 μ l des gemischten siRNS PPAR γ bzw. non-targeting siRNS wurden mit 8,71 μ l Tris-EDTA Puffer vermischt und das Produkt anschließend mit 37 μ l „Buffer-1“ gemischt (Produkt A).

8 μ l des „siRNA Transfection Reagent“ wurden mit 42 μ l „Buffer-2“ gemischt (Produkt B).

50 μ l Produkt A wurden mit 50 μ l Produkt B (Ergebnis Produkt C) und 500 μ l „Buffer-1“ mit 500 μ l „Buffer-2“ (Ergebnis Produkt D) vermischt.

Das Endprodukt (Produkt E) für die Transfektion wurde durch das Mischen von 100 μ l Produkt C mit 300 μ l Produkt D hergestellt.

Nachdem die Adipozyten über Nacht mit serumfreiem Medium inkubiert wurden und anschließend mit den Testpeptiden, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit jeweils 400 μ l PBS gewaschen. In jedes Well (24-Wellplatte) wurden jeweils 150 μ l „siRNA Transfection Reagent Complex“ (=Produkt E) pipettiert und die Adipozyten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Minuten wurden in jedes Well 150 μ l serumfreies Medium pipettiert und die Inkubation erfolgte im Inkubator für 4 Stunden. Anschließend wurden die Zellen mit zusätzlich jeweils 450 μ l DMEM-Medium (Standardmedium) für 24 Stunden im Inkubator inkubiert. Die Endkonzentration der siRNS im Medium war 200 nM.

Die Ausschaltung der Gene wurde mit der real-time PCR und dem Western Blot bestimmt. Eine signifikante Reduktion mittels spezifischen siRNS wurde definiert als Hemmung der

Genexpression oder Proteinsekretion von mindestens 60 % im Vergleich zu den Kontroll-siRNS-behandelten Zellen.

3.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisauswertung und die statistische Analyse wurden unter Verwendung des Programms Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software) durchgeführt. Für die graphische Darstellung wurde ebenfalls dieses Programm verwendet.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die Mittelwerte wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Doppel- oder Dreifachbestimmung ermittelt.

Zur Untersuchung des statistischen Signifikanzniveaus wurde der Student t-Test für unverbundene Stichproben (zweiseitige Verteilung) angewandt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

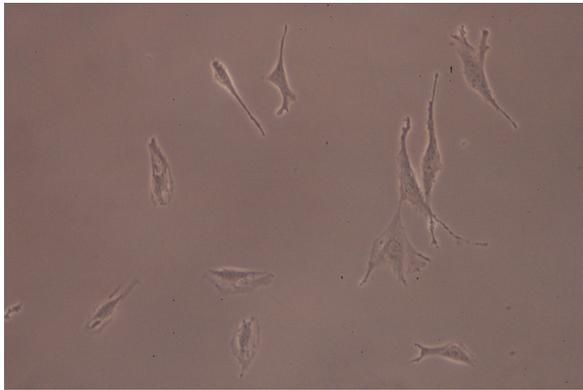
4. Ergebnisse

4.1 Differenzierung von 3T3-L1 Fibroblasten zu reifen Adipozyten

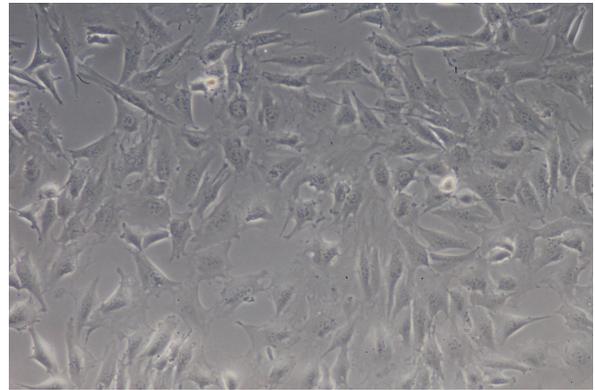
Nach Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten/Prädipozyten (Abb. 1A-C) zu reifen Adipozyten (Abb. 2A-B) wurde Fabp4 mittels real-time PCR bestimmt, um sicher zu gehen, dass es sich bei den differenzierten Zellen tatsächlich um Adipozyten handelt. Fabp4 kodiert das Fettsäurebindende Protein 4, welches sich in reifen Adipozyten befindet.

Zusätzlich wurden die 3T3-L1 Adipozyten nach ihrer Morphologie beurteilt, ob sie reif für die Experimente waren.

1A



1B



1C

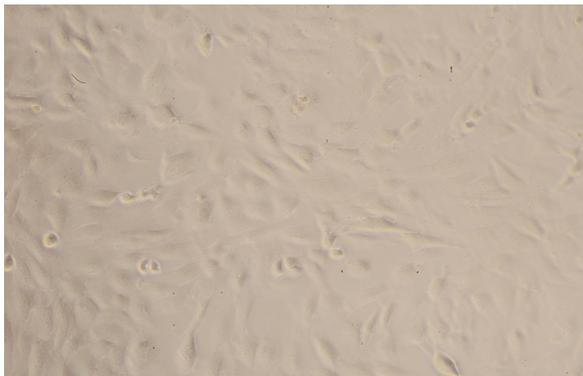


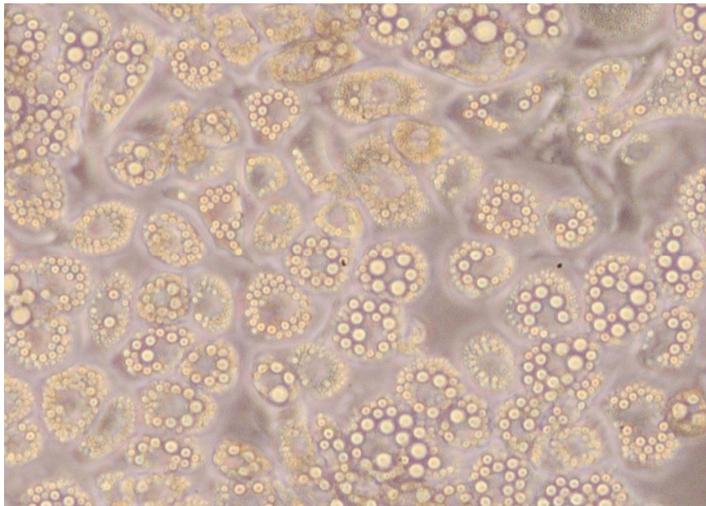
Abb. 1A-C Bilder von 3T3-L1 Fibroblasten in 10-facher Vergrößerung

A Fibroblasten

B beginnende Konfluenz der Fibroblasten

C Konfluente Fibroblasten. Ab diesem Zeitpunkt ist Beginn der Differenzierung möglich.

2A



2B

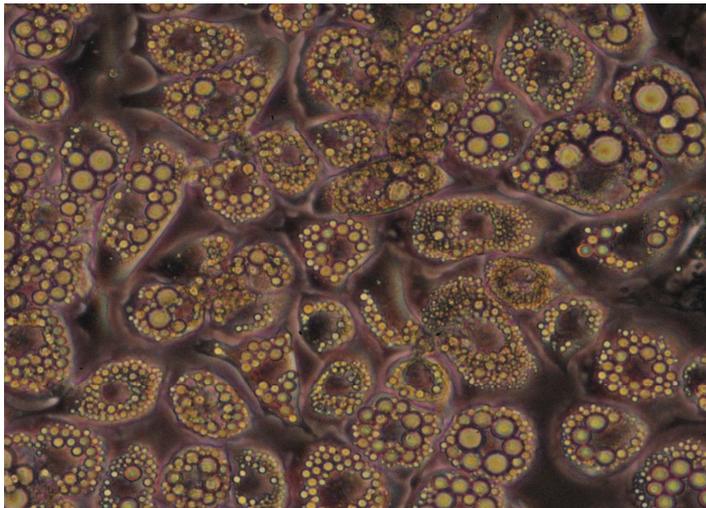


Abb. 2A - B Bilder von differenzierten 3T3-L1 Adipozyten

Die Aufnahmen wurden am 8. Tag nach Beginn der Differenzierung mit der Digitalkamera AxioCam Hrc (Zeiss, Oberkochen) angefertigt.

A 10-fache Vergrößerung

B 20-fache Vergrößerung

4.2 Expression von Orexinrezeptoren-1 und Orexinrezeptoren-2 in 3T3-L1 Fibroblasten und Adipozyten

Die Detektion von OXR1 und OXR2 auf RNS-Ebene in den 3T3-L1 Fibroblasten und 3T3-L1 differenzierten Adipozyten wurde mithilfe der quantitativen real-time PCR durchgeführt.

Aus vier unabhängigen Experimenten zeigte sich, dass OXR1 und OXR2 in den 3T3-L1 Fibroblasten und 3T3-L1 differenzierten Adipozyten exprimiert werden.

Die Expression von OXR1 RNS erhöhte sich während der Differenzierung signifikant. Die Erhöhung betrug am Tag 4 ($M = 1,13 \pm SEM = 0,03$) nach Beginn der Differenzierung 22,49 % ($p=0,0214$) und am Tag 7 ($M = 1,29 \pm SEM = 0,06$) 39,83 % gegenüber Tag 0 ($M = 0,92 \pm SEM = 0,06$) (Abb. 3).

Die Expression von OXR2 RNS blieb während der Differenzierung nahezu unverändert.

Zwischen Tag 0 ($M = 0,91 \pm SEM = 0,08$), Tag 4 ($M = 0,89 \pm SEM = 0,02$) und Tag 7 ($M = 0,92 \pm SEM = 0,03$) gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,78$ für Tag 0 und Tag 4, $p = 0,95$ für Tag 0 und Tag 7, $p = 0,47$ für Tag 4 und Tag 7) (Abb. 3).

Zwischen der Expression von OXR1 und OXR2 RNS am Tag 0 gab es keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,94$). Am Tag 4 und Tag 7 zeigten sich signifikante Unterschiede in der Expression beider Rezeptoren. Am Tag 4 wurden 26,61 % ($p = 0,0009$) und am Tag 7 40,21 % ($p = 0,001$) mehr OXR1 als OXR2 exprimiert (Abb. 3).

Die Expression von OXR1 und OXR2 in 3T3-L1 Adipozyten wurde auf Proteinebene mithilfe des Western Blots durchgeführt. Die Western Blot Membran wurde mit Antikörpern gegen OXR1 bzw. OXR2 in der Verdünnung 1:500 inkubiert. Es zeigte sich, dass die Proteine des OXR1 und OXR2 auf 3T3-L1 Adipozyten exprimiert werden. (Abb. 4).

Da in den differenzierten 3T3-L1 Adipozyten mehr OXR1 als OXR2 exprimiert werden und in den 3T3-L1 Fibroblasten die Anzahl von OXR1 und OXR2 nicht signifikant unterschiedlich war (Abb. 3), wurde im weiteren Verlauf OXA eingesetzt, da OXA an den OXR1 und OXR2 bindet. Darüber hinaus bindet OXA an den OXR1 mit einer höheren Affinität im Vergleich zu OXB.

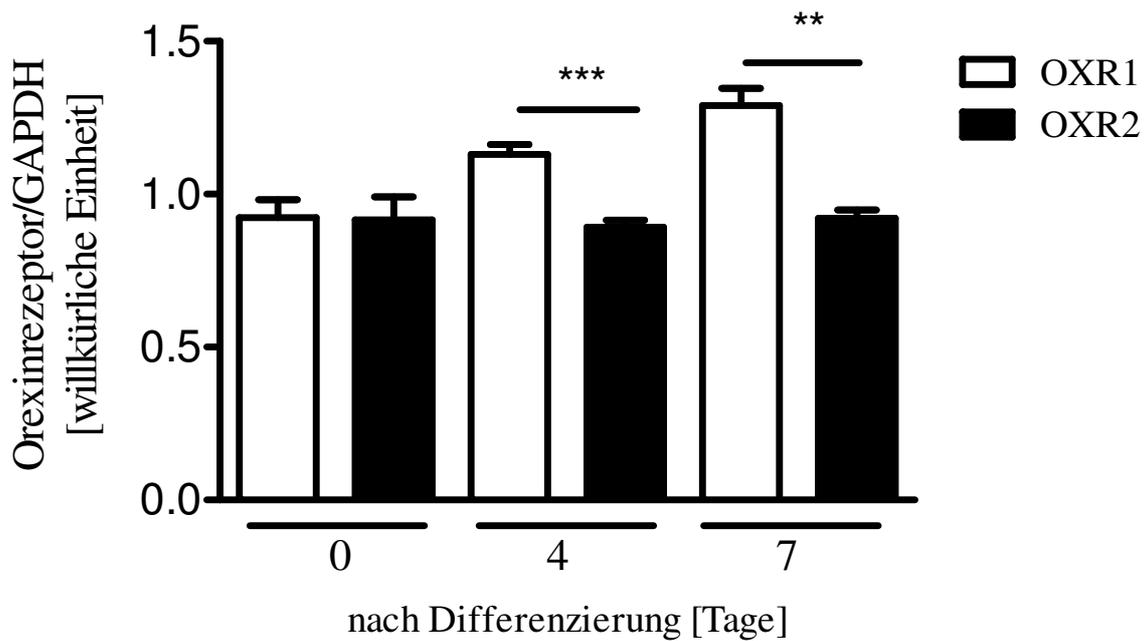


Abb. 3 Detektion von OXR1 und OXR2 in 3T3-L1 Adipozyten auf RNS-Ebene

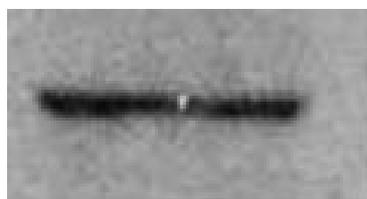
Detektion von OXR1 und OXR2 mithilfe der quantitativen real-time PCR, abhängig vom Differenzierungsstatus der Adipozyten.

Die Ergebnisse zeigen die relative Expression von OXR1 und OXR2, normalisiert gegenüber dem Referenzgen GAPDH.

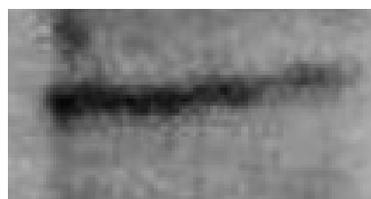
Tag 0 bedeutet, dass die Differenzierung der 3T3-L1 Fibroblasten zu Adipozyten noch nicht begonnen hat, Tag 4 und Tag 7 stehen für den 4. und 7. Tag nach Beginn der Differenzierung.

Weißer Balken: OXR1, schwarzer Balken: OXR2.

** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ zwischen den beiden Gruppen, berechnet mit dem Student t-Test.



OXR1 (55kDa)



OXR2 (38 kDa)

Abb. 4 Detektion von OXR1 und OXR2 auf Protein-Ebene

Qualitative Detektion von OXR1 und OXR2 in 3T3-L1 Adipozyten mithilfe des Western Blots.

Die 3T3-L1 Adipozyten befanden sich am 8. Tag nach Beginn der Differenzierung.

4.3 Effekte von Orexin A auf die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten

Da Glukose eine Rolle in der Lipogenese der Adipozyten spielt, wurde der Einfluss von OXA auf die Glukoseaufnahme der 3T3-L1 Adipozyten untersucht.

Zunächst wurde untersucht, ob die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten von der Zeit abhängt. Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten 30, 60 und 120 Minuten mit 100 nM OXA inkubiert und die Glukoseaufnahme der Adipozyten anschließend bestimmt, indem radioaktive 2-Deoxy-³H-Glukose ermittelt wurde (Abb. 5A).

Es zeigte sich zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe ($M = 4,62 \pm SEM = 0,09$) und der 30 Minuten mit OXA behandelten Adipozyten ($M = 7,05 \pm SEM = 0,61$) ein signifikanter Unterschied ($p = 0,02$). Zwischen der Kontrollgruppe und der 60 Minuten mit OXA behandelten Adipozyten ($M = 6,21 \pm SEM = 0,23$) zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,003$). Behandelte man die Adipozyten 120 Minuten mit OXA ($M = 4,74 \pm SEM = 0,50$), zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur nichtbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,84$) (Abb. 5A).

Die höchste Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten zeigte sich in der Gruppe, die 30 Minuten mit OXA inkubiert wurde. Dabei betrug die Erhöhung der Glukoseaufnahme in die Zellen 52,68 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. In der Gruppe, die 60 Minuten mit OXA behandelt wurde, betrug die Erhöhung 34,43 % (Abb. 5A).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten von der OXA-Konzentration abhängt. Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten 30 Minuten mit OXA in unterschiedlicher Konzentration (0, 1, 10 und 100 nM) inkubiert. Anschließend wurde die Glukoseaufnahme in die Zellen bestimmt (Abb. 5B).

Es zeigte sich, dass die die Glukoseaufnahme dosisabhängig ist. Je höher die OXA-Konzentration, desto größer ist die Glukoseaufnahme, welche ihr Maximum nach Inkubation mit 100 nM OXA erreichte. (Abb. 5B)

Bei der mit 1 nM OXA behandelten Gruppe ($M = 4,88 \pm SEM = 0,27$) nahm die Glukoseaufnahme um 13,43 % zu, wobei der Unterschied verglichen zu der unbehandelten Kontrollgruppe ($M = 4,30 \pm SEM = 0,33$) nicht signifikant war ($p = 0,23$) (Abb. 5B).

Die mit 10 nM OXA behandelten Adipozyten ($M = 5,73 \pm SEM = 0,35$) hatten einen Anstieg der Glukoseaufnahme um 33,28 % und die mit 100 nM OXA behandelten Adipozyten ($M = 6,81 \pm SEM = 0,18$) einen Anstieg von 58,28 %. Der Anstieg beider Gruppen war verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant ($p = 0,02$ für 10 nM OXA Adipozyten und Kontrollgruppe, $p = 0,0006$ für 100 nM OXA Adipozyten und Kontrollgruppe) (Abb. 5B).

4. Ergebnisse

Zwischen der mit 10 nM OXA und der mit 100 nM OXA behandelten Gruppe war der Unterschied ebenfalls signifikant. Hier betrug der p-Wert 0,04 (Abb. 5B).

Da die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten ein aktiver Vorgang ist, bei dem Glukose über das Transportprotein GLUT4 in die Zellen eingeschleust wird, wurde der ATP-Gehalt in den 3T3-L1 Adipozyten bestimmt. Dazu wurden die Adipozyten 15, 30, 60 bzw. 120 Minuten mit 100 nM OXA inkubiert und anschließend der ATP-Gehalt in den 3T3-L1 Adipozyten bestimmt (Abb. 6).

Es zeigte sich, dass der ATP-Gehalt von der Länge der Inkubation mit OXA abhängt. Je länger die Adipozyten mit OXA inkubiert wurden, desto höher war der ATP-Gehalt (Abb. 6).

Zwischen der unbehandelten Gruppe ($M = 5,87 \pm SEM = 0,34$) und der 15 Minuten mit OXA behandelten Gruppe ($M = 6,22 \pm SEM = 0,21$) konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,42$). Eine Signifikanz konnte zwischen der unbehandelten und der 30 ($M = 6,83 \pm SEM = 0,22$), 60 ($M = 7,07 \pm SEM = 0,13$) und 120 ($M = 7,39 \pm SEM = 0,37$) Minuten mit OXA behandelten Gruppe nachgewiesen werden. Der p-Wert betrug bei der mit 30 Minuten 0,04, bei der 60 Minuten 0,008 und bei der mit 120 Minuten OXA behandelten Gruppe 0,02, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 6).

Es ist bekannt, dass Insulin den Einbau von GLUT4, welcher die aktive Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten gewährleistet, stimuliert. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) regulieren den Einbau von GLUT4 in die Zellmembran. LY294002 ist ein Inhibitor der PI3K.

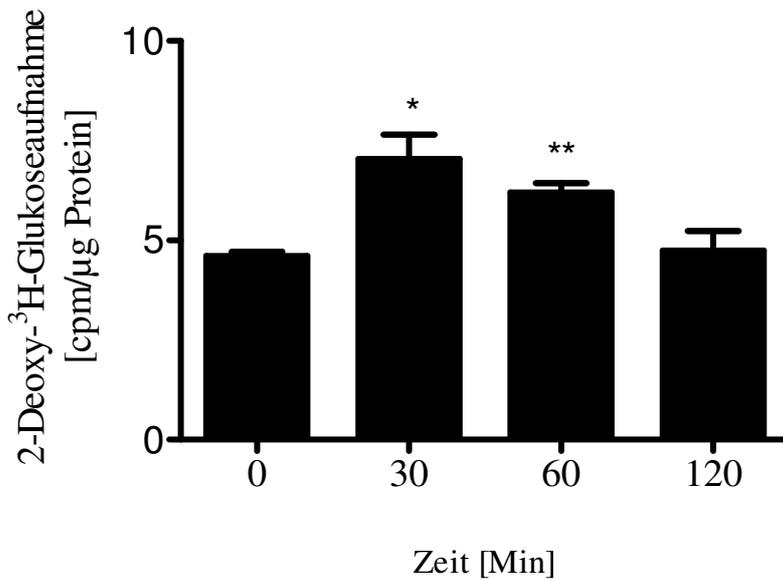
Um den Mechanismus der aktiven Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten besser verstehen zu können, wurden die 3T3-L1 Adipozyten 30 Minuten mit 100 nM OXA oder 10 nM Insulin und in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 inkubiert. Die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten wurde durch Messung der 2-Deoxy- ^3H -Glukose bestimmt (Abb. 7).

Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von LY294002 die Glukoseaufnahme in die Zellen nach Stimulation mit OXA oder Insulin gehemmt wurde (Abb. 7).

Zwischen den mit OXA ($M = 3,14 \pm SEM = 0,23$) und den mit OXA + LY294002 ($M = 1,77 \pm SEM = 0,24$) behandelten Adipozyten betrug die Hemmung 43,75 %. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist mit einem p-Wert von $p = 0,003$ signifikant (Abb. 7).

Zwischen den mit Insulin ($M = 9,76 \pm SEM = 1,55$) und Insulin + LY294002 ($M = 1,91 \pm SEM = 0,17$) behandelten Adipozyten betrug die Hemmung 80,43 %. Hier war der Unterschied zwischen beiden Gruppen ebenfalls signifikant ($p = 0,007$) (Abb. 7).

5A



5B

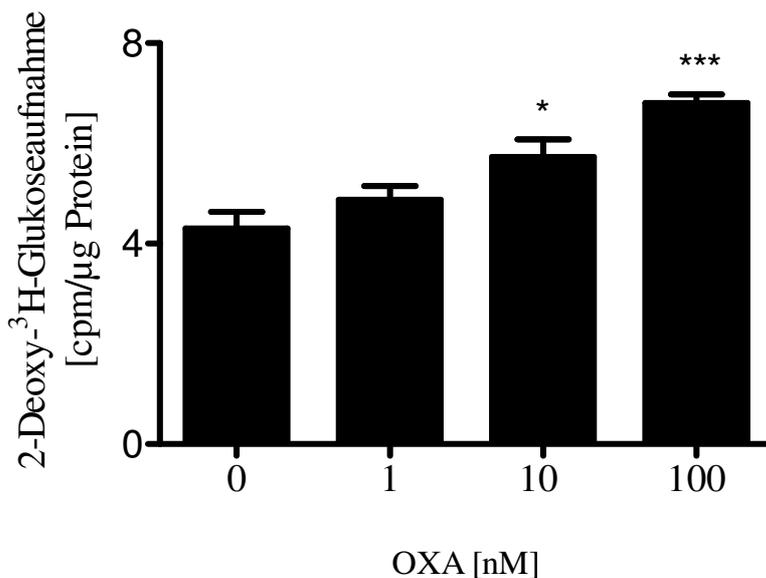


Abb. 5A + B Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildungen zeigen die (A) zeitabhängige und (B) dosisabhängige Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten. Die 3T3-L1 Adipozyten wurden mit (a) 100 nM OXA in unterschiedlicher Dauer bzw. (b) 30 Minuten mit OXA in unterschiedlicher Konzentration inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen die aufgenommene 2-Deoxy-³H-Glucose (normalisiert gegenüber dem Proteingehalt) in die 3T3-L1 Adipozyten, in Abhängigkeit von (A) der Zeit in Minuten bzw. (B) der OXA-Konzentration in nM. Cpm: Zerfälle pro Minute.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

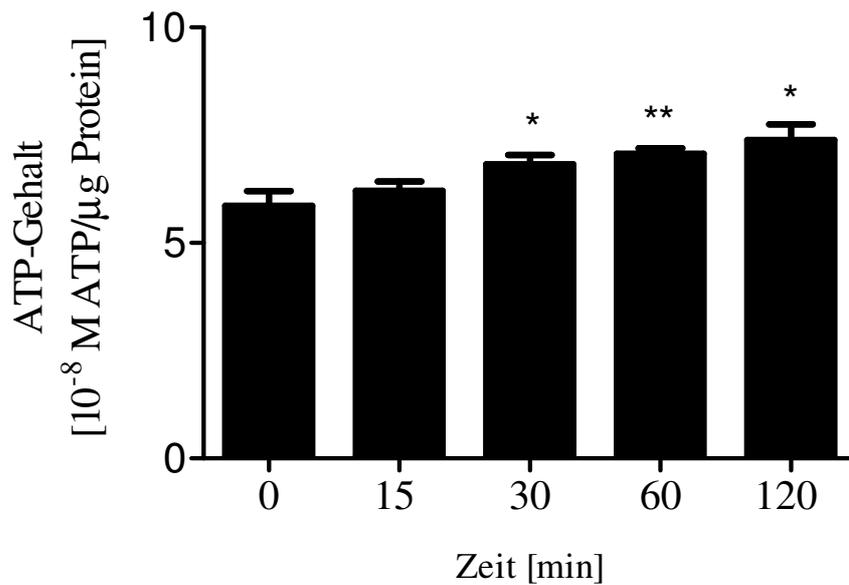


Abb. 6 ATP-Gehalt

Die Abbildung zeigt den intrazellulären ATP-Gehalt der 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit 100 nM OXA, in Abhängigkeit von der Zeit (in Minuten).

Der ATP-Gehalt wurde gegenüber dem Proteingehalt in den 3T3-L1 Adipozyten normalisiert und die Ergebnisse sind angegeben in 10^{-8} M ATP/ μ g Protein.

* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

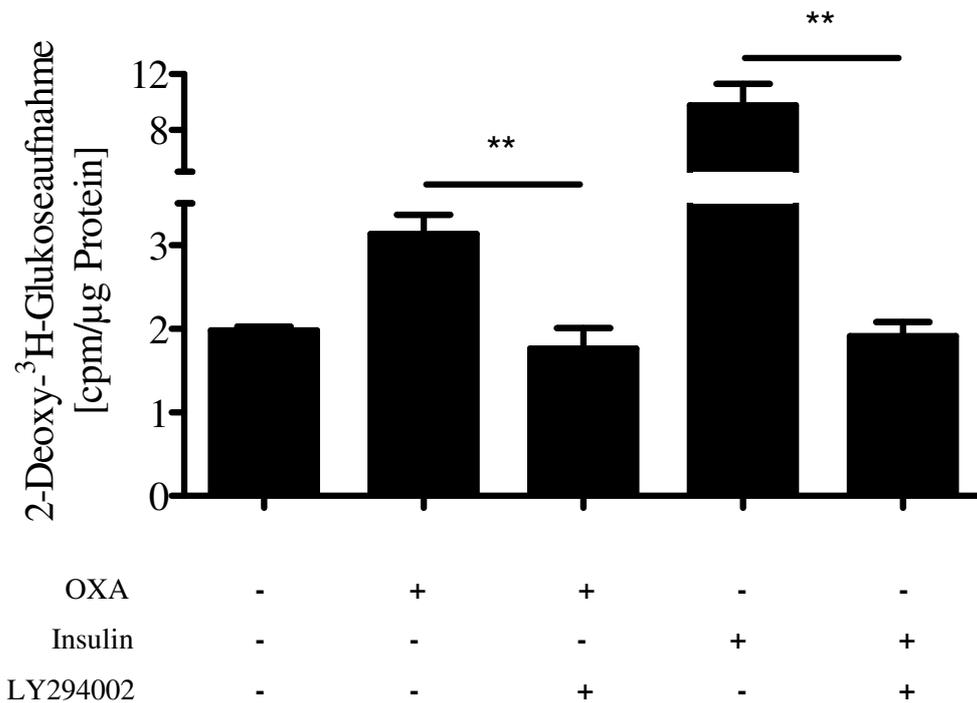


Abb. 7 Inhibition der Glukoseaufnahme durch LY294002 in den 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildung zeigt die 30-minütige Stimulation der Glukoseaufnahme durch 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin und deren Hemmung durch den PI3K Inhibitor LY294002 (10 µmol/l).

Die Ergebnisse zeigen die aufgenommene 2-Deoxy-³H-Glukose (normalisiert gegenüber dem Proteingehalt) in die 3T3-L1 Adipozyten, in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Inkubation der Adipozyten mit/ohne OXA bzw. Insulin und LY294002.

Cpm steht für Zerfälle pro Minute.

** p < 0,01, verglichen mit den beiden Gruppen (mit und ohne LY294002), berechnet mit dem Student t-Test.

4.4 Regulation des Glukosetransporters GLUT4 in der Plasmamembran von Adipozyten durch Orexin A

Da die vorherigen Ergebnisse zeigten, dass nach Stimulation mit OXA und Insulin die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten steigt (Abb. 7), wurde als weiterer Schritt in der Charakterisierung der Orexinrezeptoren die Expression von GLUT4 in der Plasmamembran bestimmt.

GLUT4 befindet sich normalerweise im Zytoplasma und wird erst nach Aktivierung in die Zellmembran eingebaut, um die aktive Glukoseaufnahme in die Zellen zu gewährleisten.

Die 3T3-L1 Adipozyten wurden 30 Minuten mit 100 nM OXA oder 10 nM Insulin inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde mit DMEM-Medium, welches für die Kultivierung verwendet wird, inkubiert. Die quantitative und qualitative Bestimmung von GLUT4 in der Plasmamembran wurde mithilfe des Western Blots (Abb. 8), die Visualisierung der GLUT4 Translokation mithilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt (Abb. 9A-C).

Es zeigte sich, dass die GLUT4 Expression in der Zellmembran nach Inkubation mit OXA ($M = 427,4 \pm \text{SEM } 8,69$) um 327,39 % und nach Inkubation mit Insulin ($M = 1212 \pm \text{SEM } 79,76$) um 1111,65 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($M = 100 \pm \text{SEM } 13,3$) zunahm (Abb. 8).

Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der mit OXA behandelten Gruppe war signifikant ($p < 0,0001$). Einen signifikanten Unterschied zeigte auch der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der mit Insulin inkubierten Gruppe ($p = 0,0002$). (Abb. 8)

Nach Inkubation mit Insulin war der Unterschied verglichen zu der mit OXA behandelten Gruppe ebenfalls signifikant ($p = 0,0006$) (Abb. 8).

Die Visualisierung der GLUT4 Rezeptoren bestätigten die Ergebnisse der Western Blots. Nach Inkubation mit OXA sieht man eine Erhöhung der GLUT4 Rezeptoren in der Zellmembran verglichen zur Kontrollgruppe. Wurden die 3T3-L1 Adipozyten mit Insulin inkubiert, war die Anzahl der GLUT4 Rezeptoren höher als die der Kontrollgruppe und die mit OXA inkubierten Adipozyten (Abb. 9A-C).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Inkubation der 3T3-L1 Adipozyten mit dem PI3K Inhibitor LY294002 ebenfalls einen Einfluss auf die GLUT4 Translokation vom Zytoplasma in die Zellmembran der Adipozyten hat (Abb. 10).

Dazu wurden die Zellen 30 Minuten mit 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin und 10 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 inkubiert (Abb. 10).

4. Ergebnisse

Es zeigte sich, dass LY294002 die Translokation von GLUT4 Rezeptoren in die Zellmembran hemmt (Abb. 10).

Die relative GLUT4 Expression in der Plasmamembran der Gruppe, die mit LY294002 und Insulin ($M = 194,6 \pm SEM = 35,43$) inkubiert wurde, nahm verglichen zur Gruppe, die nur mit Insulin ($M = 393,6 \pm SEM = 30,77$) inkubiert wurde, um 50,57 % ab ($p = 0,005$). Verglichen zur Kontrollgruppe wurden in der Gruppe, die mit Insulin und LY294002 inkubiert wurde, 94,57 % mehr GLUT4 Rezeptoren exprimiert. Der p-Wert betrug 0,04, so dass der Unterschied signifikant war (Abb. 10).

Die Gruppe, die mit OXA und LY294002 ($M = 153,1 \pm SEM = 29,65$) inkubiert wurde, zeigte verglichen zur Gruppe, die nur mit OXA ($M = 297,8 \pm SEM = 42,70$) inkubiert wurde, eine Hemmung um 48,59 % in der GLUT4 Translokation ($p = 0,02$). Die Expression von GLUT4 in der Zellmembran der mit OXA und LY294002 inkubierten Gruppe war um 53,07 % höher als die der Kontrollgruppe ($p = 0,17$) (Abb. 10).

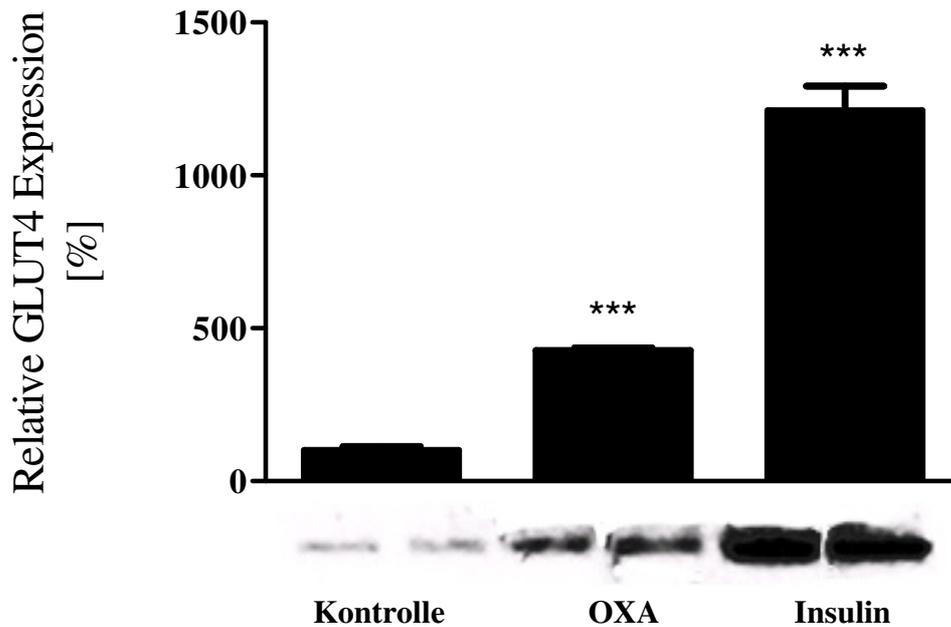


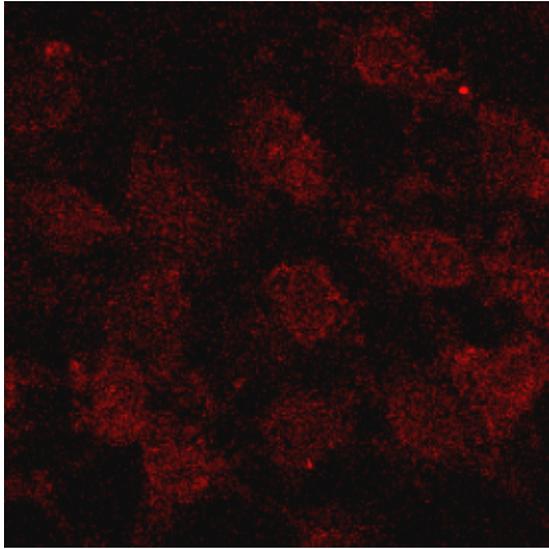
Abb. 8 Relative GLUT4 Expression in den 3T3-L1 Adipozyten

Die Balken zeigen die quantitative Bestimmung der GLUT4 Expression in Relation zum Ausgangswert (Kontrolle) in der Zellmembran der 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin für 30 Minuten. Die Kontrollgruppe wurde weder mit OXA noch mit Insulin inkubiert. Die GLUT4 Expression ist angegeben in %, wobei die Kontrollgruppe 100 % der GLUT4 Expression darstellt.

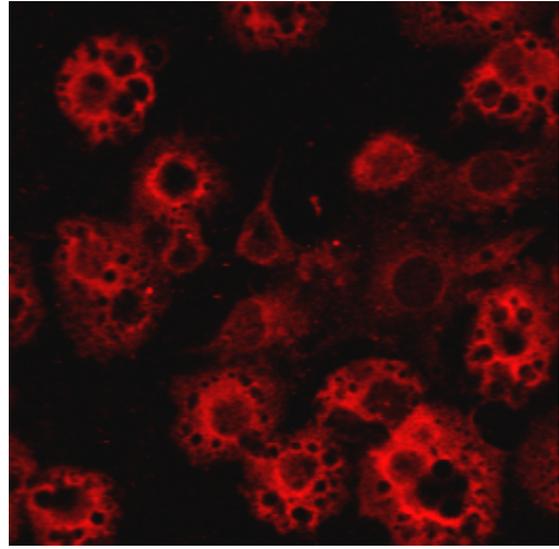
Die Abbildungen unter den Balken zeigen die qualitative Bestimmung der GLUT4 Expression in der Zellmembran der Adipozyten in Doppelbestimmung mithilfe des Western Blots.

*** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

A) Kontrollgruppe



B) OXA



C) Insulin

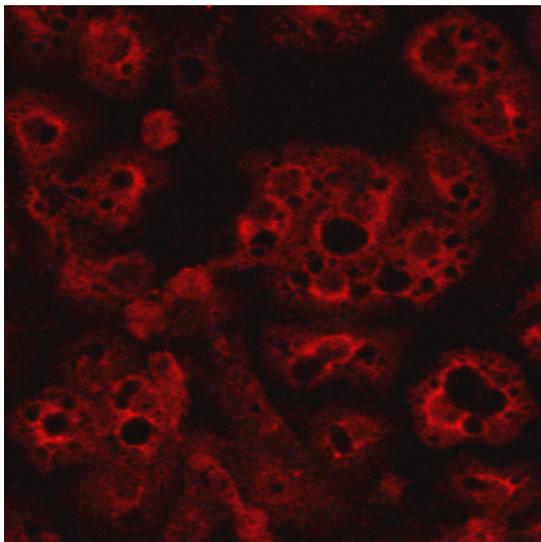


Abb. 9A-C Visualisierung von GLUT4 Rezeptoren in der Zellmembran von 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildungen zeigen die Translokation von GLUT4 Rezeptoren vom Zytoplasma in die Zellmembran der 3T3-L1 Adipozyten mithilfe der Immunfluoreszenz.

Die 3T3-L1 Adipozyten wurden 30 Minuten mit DMEM-Medium (A), 100 nM OXA (B) bzw. 10 nM Insulin (C) inkubiert. OXA und Insulin wurden im DMEM-Medium gelöst.

Die Bilder der GLUT4 Rezeptoren wurden mit dem Confocal Laser Scanning Mikroskop – FV500 in 40-facher Vergrößerung sichtbar gemacht.

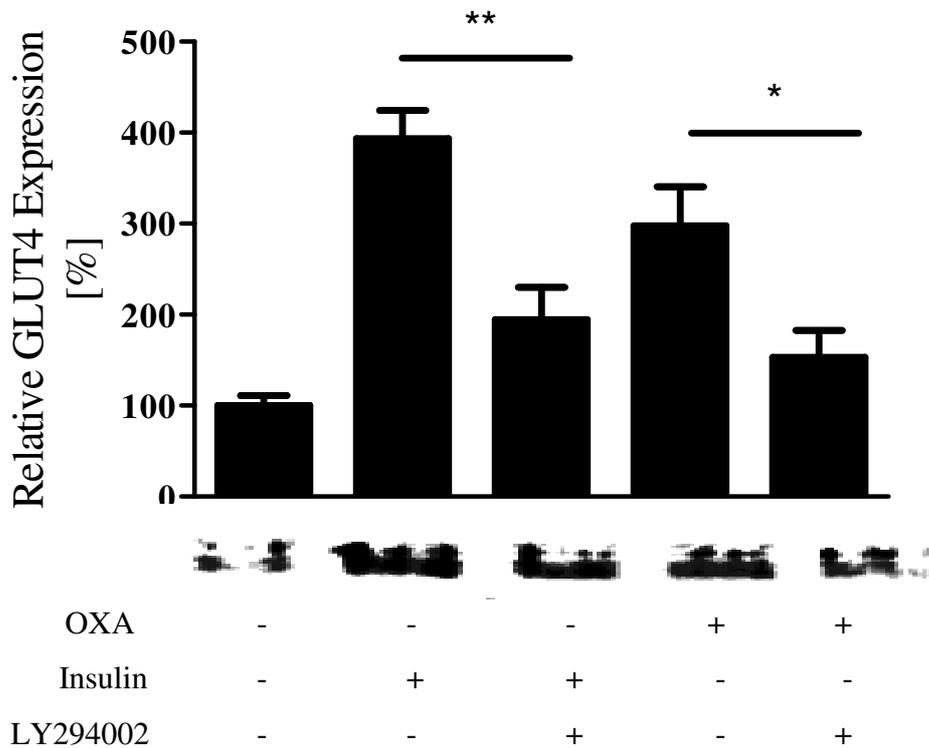


Abb. 10 Relative GLUT4 Expression nach Inhibition mit dem PI3K Inhibitor LY294002

Die Balken zeigen die quantitative Bestimmung der GLUT4 Expression in der Zellmembran der 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin und 10 μ mol/l LY294002 für 30 Minuten. Die Kontrollgruppe wurde weder mit OXA noch mit Insulin oder LY294002 inkubiert. Die GLUT4 Expression ist angegeben in %, wobei die Kontrollgruppe 100 % der GLUT4 Expression darstellt.

Die Abbildungen unter den Balken zeigen die qualitative Bestimmung der GLUT4 Expression in der Zellmembran der Adipozyten mithilfe des Western Blots.

* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, verglichen mit zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

4.5 Effekte von Orexin A auf die Triglyceridakkumulation

Da OXA die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten erhöht und Glukose ein Substrat der Lipogenese ist, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von OXA auf den Triglyceridgehalt in den Zellen untersucht.

Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten mit OXA in verschiedenen Konzentrationen (1, 10 und 100 nM) für 48 Stunden inkubiert. Die Adipozyten wurden mit Oil Red O gefärbt, die Färbung anschließend eluiert und mit dem Spektrophometer gemessen. Die Höhe der Optischen Dichte stellt den Triglyceridgehalt dar (Abb. 11).

OXA erhöht dosisabhängig den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten (Abb. 11).

Es zeigte sich in der mit 1 nM OXA inkubierten Gruppe ($M = 0,11 \pm \text{SEM} = 0,005$) eine Erhöhung des Triglyceridgehalts um 3,96 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ($M = 0,10 \pm \text{SEM} = 0,005$). Der Unterschied war nicht signifikant ($p = 0,54$) (Abb. 11).

Wurden die 3T3-L1 Adipozyten mit 10 nM OXA inkubiert ($M = 0,13 \pm \text{SEM} = 0,007$), betrug die Erhöhung des Triglyceridgehalts 28,32 %, mit 100 nM OXA ($M = 0,15 \pm \text{SEM} = 0,004$) 46,73 %, verglichen mit der Kontrollgruppe. In beiden Fällen war der Unterschied signifikant ($p = 0,007$ für 10 nM OXA Gruppe und Kontrollgruppe; $p < 0,0001$ für 100 nM OXA Gruppe und Kontrollgruppe) (Abb. 11).

Der Vergleich zwischen der mit 10 nM OXA und der mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied. Hier betrug der p-Wert 0,05 (Abb. 11).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob OXA, Insulin oder die Kombination aus beiden Peptiden einen Einfluss auf den Triglyceridgehalt hat. Dazu wurden die Adipozyten 48 Stunden mit 100 nM OXA oder 10 nM Insulin bzw. 100 nM OXA und 10 nM Insulin inkubiert und der Triglyceridgehalt mit der Oil Red O Methode morphologisch dargestellt und densitometrisch quantifiziert (Abb. 12-13).

Dieser Versuch bestätigt das Ergebnis vom vorherigen Versuch, dass 100 nM OXA den Triglyceridgehalt signifikant erhöht ($p = 0,003$). Nach Inkubation mit Insulin ($M = 0,38 \pm \text{SEM} = 0,01$) betrug die Erhöhung des Triglyceridgehalts 5,35 % im Vergleich zur Gruppe, die mit OXA ($M = 0,36 \pm \text{SEM} = 0,01$) inkubiert wurde. Der p-Wert betrug 0,23 und somit war der Unterschied statistisch nicht signifikant. Wurden die Adipozyten mit 10 nM Insulin und 100 nM OXA ($M = 0,43 \pm \text{SEM} = 0,01$) inkubiert, nahm der Triglyceridgehalt in den Zellen um 21,38 %, verglichen zur mit OXA behandelten Gruppe, und um 16,03 %, verglichen zur mit Insulin behandelten Gruppe, zu. Der Unterschied zwischen der mit Insulin behandelten Gruppe und der mit Insulin und OXA behandelten Gruppe war signifikant ($P = 0,0002$) (Abb. 13).

4. Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der PI3K Inhibitor LY294002 ebenfalls einen Einfluss auf den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Zellen hat. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden mit 100 nM OXA oder 10 nM Insulin in Anwesenheit oder Abwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ LY294002 inkubiert. Der Triglyceridgehalt in den Adipozyten wurde anschließend biochemisch bestimmt und zum Proteingehalt in den Adipozyten normalisiert (Abb. 14).

Es zeigte sich, dass LY294002 den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten reduziert.

Wurden die Adipozyten mit OXA und LY2945002 ($M = 0,66 \pm \text{SEM} = 0,12$) inkubiert, betrug die Reduzierung 57,22 % im Vergleich zur Gruppe, die nur mit OXA ($M = 1,54 \pm \text{SEM} = 0,11$) inkubiert wurde. Die Reduzierung war statistisch signifikant und der p-Wert betrug 0,0006 (Abb. 14).

Eine Reduzierung des Triglyceridgehalts zeigte sich auch nach Inkubation mit Insulin und LY294002 ($M = 0,94 \pm \text{SEM} = 0,11$) im Vergleich zur Gruppe, die nur mit Insulin ($M = 2,32 \pm \text{SEM} = 0,28$) inkubiert wurde. Dort betrug die Reduzierung 59,71 %. Der p-Wert betrug 0,005 und somit war die Abnahme des Triglyceridgehalts in den Zellen ebenfalls signifikant (Abb. 14).

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die mit OXA und LY294002 oder der Gruppe, die mit Insulin und LY294002 inkubiert wurde, konnte nicht gezeigt werden. Der p-Wert betrug 0,78 beim Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der mit OXA und LY294002 inkubierten Gruppe und 0,44 zwischen der Kontrollgruppe und der mit Insulin und LY294002 inkubierten Gruppe (Abb. 14).

Um den Einfluss von OXA auf die Lipolyse der 3T3-L1 Adipozyten untersuchen zu können, wurde das freigesetzte Glycerol im Inkubationsmedium bestimmt, da Triglyceride bei der Lipolyse in Glycerol und freie Fettsäuren gespalten werden. Das freie Glycerol kann als Index für die Lipolyse gesehen werden (Abb. 15).

Die Adipozyten wurden dafür 24 Stunden mit 100 nM OXA, 1 μM Isoprenalin oder 10 nM Insulin inkubiert. Isoprenalin ist für seinen lipolytischen und Insulin für seinen antilipolytischen Effekt bekannt, so dass Isoprenalin als Positivkontrolle und Insulin als Negativkontrolle fungieren (Abb. 15).

Nach Inkubation mit 100 nM OXA ($M = 0,07 \pm \text{SEM} = 0,02$) nahm die freie Glycerolkonzentration um 66,41 % gegenüber der mit Isoprenalin inkubierten Gruppe ($M = 0,22 \pm \text{SEM} = 0,01$) und um 50,32 % gegenüber der Kontrollgruppe ($M = 0,15 \pm \text{SEM} = 0,02$) ab. Beide Unterschiede waren statistisch signifikant. Der p-Wert betrug für die mit OXA inkubierte Gruppe und der Kontrollgruppe 0,02 und für die mit OXA inkubierte Gruppe und die mit Isoprenalin inkubierte Gruppe $<0,0001$ (Abb. 15).

4. Ergebnisse

Zwischen der mit OXA inkubierten Gruppe und der mit Insulin inkubierten Gruppe ($M = 0,07 \pm SEM = 0,01$) gab es keinen signifikanten Unterschied. Hier betrug der p-Wert 0,76.

Es konnte gezeigt werden, dass OXA einen ähnlichen Effekt wie Insulin aufweist und somit die Lipolyse in den 3T3-L1 Adipozyten hemmt (Abb. 14).

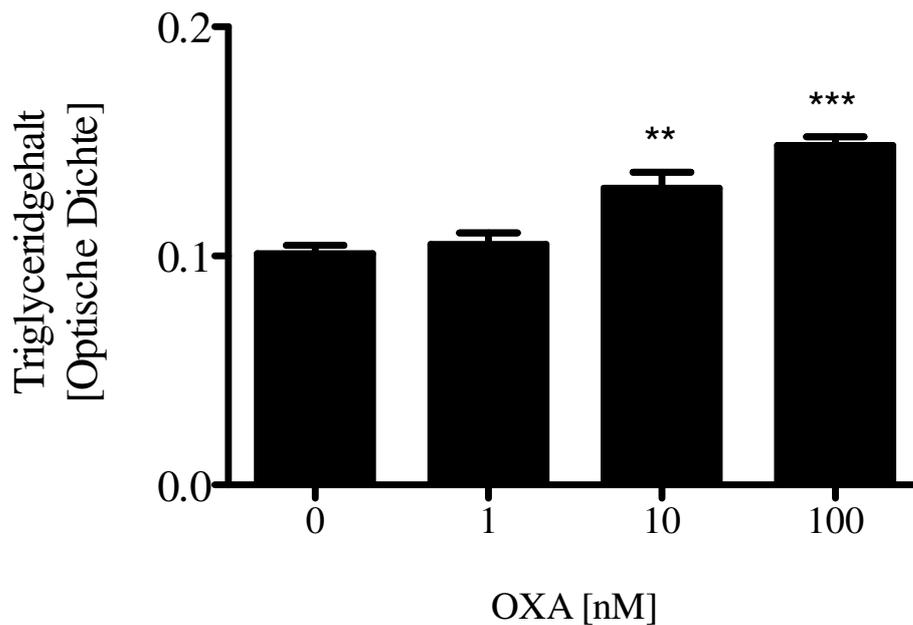
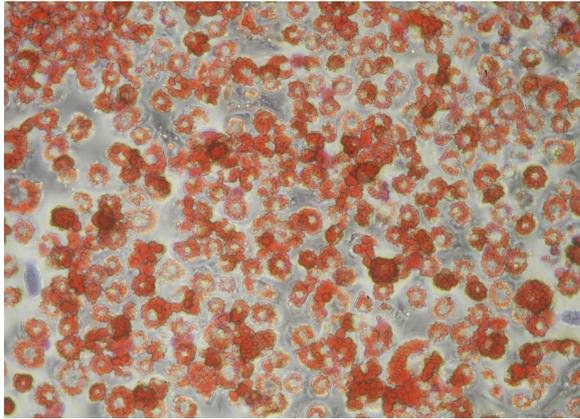


Abb. 11 Quantitative Bestimmung des Triglyceridgehalts nach Inkubation mit OXA

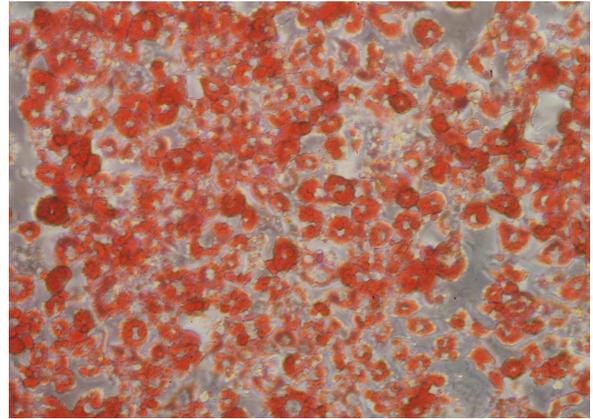
Die Abbildung zeigt den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit OXA in unterschiedlichen Konzentrationen für 48 Stunden. Die Zellen wurden mit Oil Red O gefärbt, die Färbung eluiert und bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Der Balken mit 0 nM stellt die unbehandelte Kontrollgruppe dar.

** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

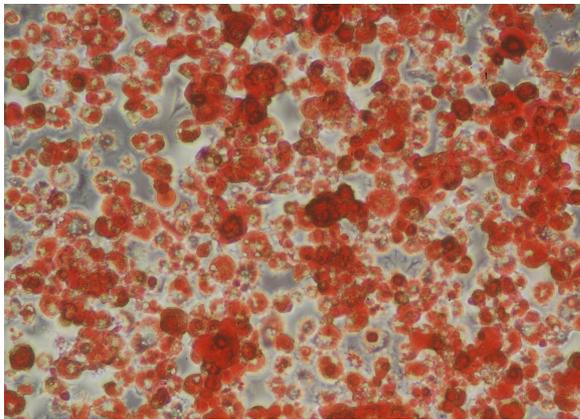
I Kontrollgruppe



II OXA



III Insulin



IV Insulin + OXA

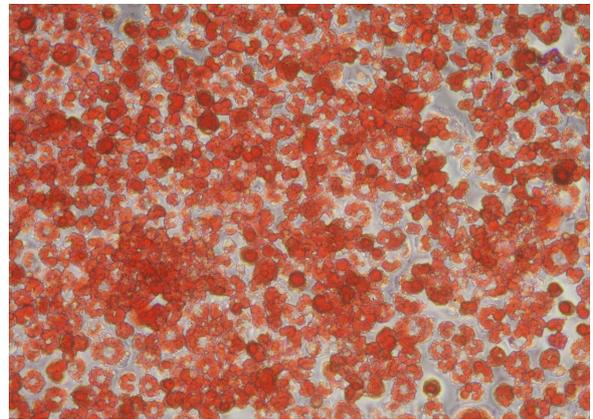


Abb. 12 Morphologische Darstellung der Triglyceridakkumulation

Die Abbildungen zeigen die Triglyceridakkumulation in den Adipozyten. Die Bilder wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen, bevor das Oil Red O eluiert wurde. Die Adipozyten wurden mit 100 nM OXA, 10 nM Insulin oder die Kombination aus 100 nM OXA und 10 nM Insulin inkubiert.

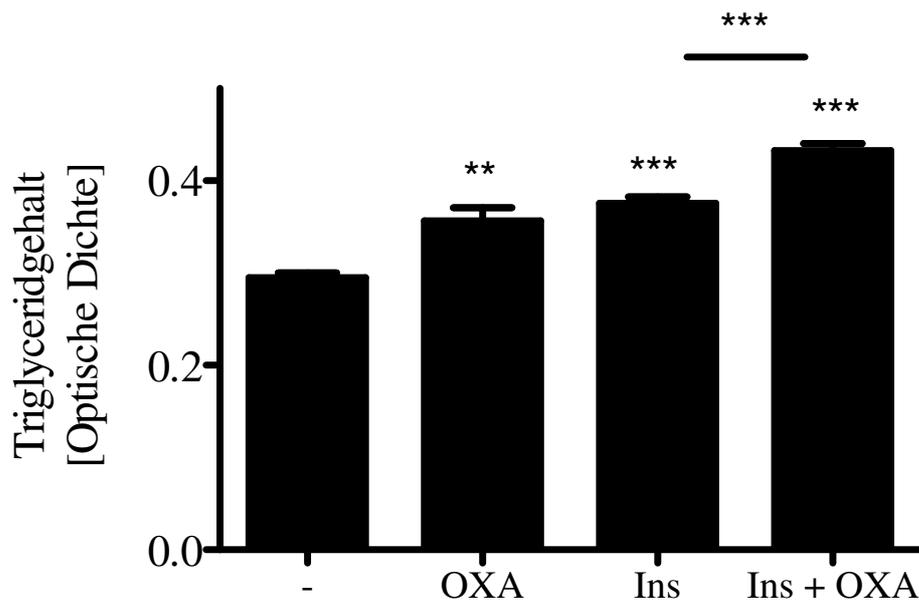


Abb. 13 Einfluss von verschiedenen Peptiden auf den Triglyceridgehalt der Adipozyten

Die Balken zeigen den quantitativen Einfluss von 100 nM OXA, 10 nM Insulin oder die Kombination aus 100 nM OXA und 10 nM Insulin auf den Triglyceridgehalt der 3T3-L1 Adipozyten.

Die Kontrollgruppe wurde weder mit OXA noch mit Insulin inkubiert.

Die Zellen wurden mit Oil Red O gefärbt, die Färbung eluiert und bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Die Höhe der optischen Dichte stellt den Triglyceridgehalt dar.

** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der unbehandelten Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

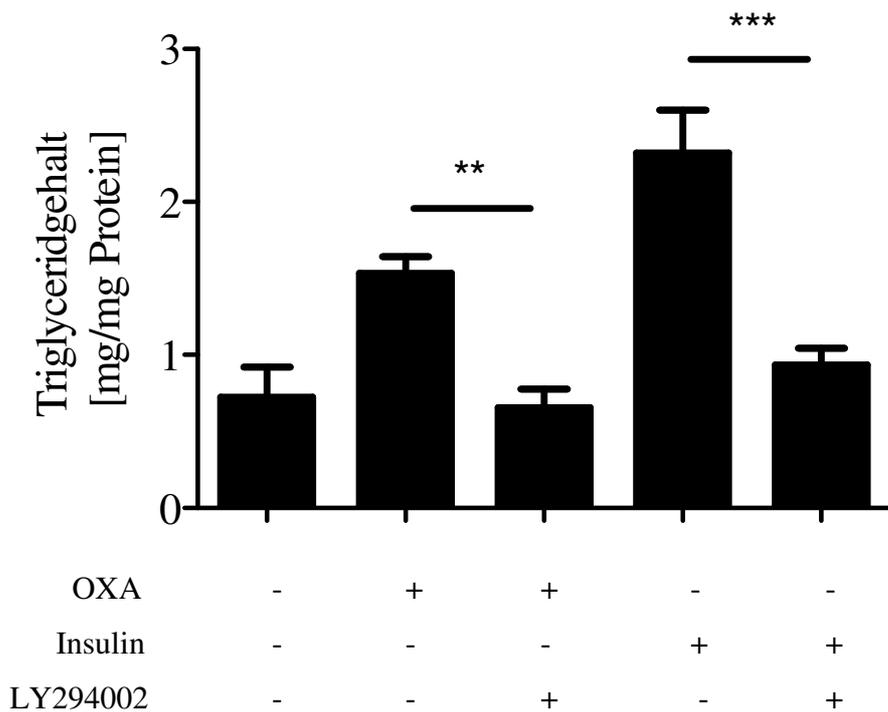


Abb. 14 Triglyceridgehalt nach Inhibition mit dem PI3K Inhibitor LY294002

Die Balken zeigen den Einfluss des PI3K Inhibitors LY294002 auf den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin +/- 10 µmol/l LY294002 für 24 Stunden. Die Kontrollgruppe wurde weder mit OXA noch mit Insulin oder LY294002 inkubiert.

Der Triglyceridgehalt wurde biochemisch bestimmt und zum Proteingehalt in den Zellen normalisiert und angegeben in mg/mg.

** p< 0,01 und *** p< 0,001, verglichen mit zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

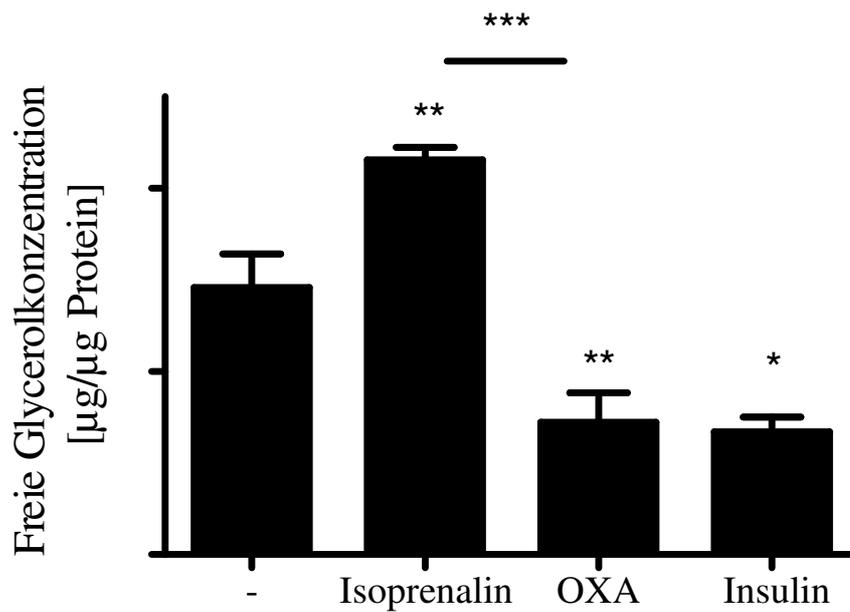


Abb. 15 Quantitative Bestimmung der freien Glycerolkonzentration (Index für Lipolyse)

Die Abbildung zeigt die quantitative Bestimmung der freien Glycerolkonzentration im Inkubationsmedium (mit/ohne Testpeptide) der 3T3-L1 Adipozyten. Die Adipozyten wurden 24 Stunden mit 1 μM Isoprenalin (Positivkontrolle = lipolytische Kontrolle), 10 nM Insulin (Negativkontrolle = antilipolytische Kontrolle) oder 100 nM OXA inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Inkubationsmedium (ohne Testpeptide) inkubiert. Die freie Glycerolkonzentration wurde zum Proteingehalt in den Zellen normalisiert und ist angegeben in $\mu\text{g}/\mu\text{g}$.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

4.5.1 Mechanismen der Orexin A-abhängigen Regulation der Lipidakkumulation

Da PPAR γ eine wichtige Rolle in der Regulierung des Stoffwechsels der Adipozyten spielt, wurde der Effekt von Orexin A auf die PPAR γ Expression in den 3T3-L1 Adipozyten untersucht.

Um zu sehen, ob der Effekt von OXA auf die PPAR γ Expression von der Dosis abhängt, wurden die 3T3-L1 Adipozyten 24 Stunden mit OXA in verschiedenen Konzentrationen (1, 10 und 100 nM) inkubiert. Anschließend wurde die RNS aus den Adipozyten isoliert und mithilfe der quantitativen real-time PCR der PPAR γ -Gehalt, welcher gegenüber dem HPRT-Gehalt (Referenzgen) normalisiert wurde, bestimmt (Abb. 16).

Es zeigte sich, dass die PPAR γ mRNA Expression mit der OXA-Dosis zunimmt. Je höher die Dosis, desto höher war die PPAR γ mRNA Expression in den 3T3-L1 Adipozyten.

Nach Inkubation mit 1 nM OXA nahm die PPAR γ mRNA Expression um 6,16 % ab, während sie nach Inkubation mit 10 nM OXA um 44,90 % und nach Inkubation mit 100 nM OXA um 81,41 % verglichen zur Kontrollgruppe zunahm (Abb. 16).

Zwischen der Kontrollgruppe ($M = 3,44 \pm SEM = 0,20$) und der mit 10 nM OXA inkubierten Gruppe ($M = 4,99 \pm SEM = 0,41$) bzw. der mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe ($M = 6,44 \pm SEM = 0,46$) zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Der p-Wert betrug bei der mit 10 nM OXA inkubierten Gruppe 0,01 und bei der mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe 0,001. Verglich man die Kontrollgruppe mit der mit 1 nM OXA inkubierten Gruppe ($M = 3,23 \pm SEM = 0,38$), konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 16).

Als nächstes wurde untersucht, ob OXA auf die Insulin-stimulierte PPAR γ mRNA Expression einen Einfluss hat. Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten 24 Stunden mit 100 nM OXA bzw. 10 nM Insulin oder der Kombination aus beiden inkubiert und die RNS aus den Zellen isoliert. Die PPAR γ mRNA Expression wurde mit der real-time PCR bestimmt und gegenüber HPRT normalisiert (Abb. 17).

Es konnte nachgewiesen werden, dass OXA die Insulin-stimulierende PPAR γ Expression in den 3T3-L1 Adipozyten erhöht (Abb. 17).

Sowohl die mit 100 nM OXA ($M = 0,62 \pm SEM = 0,08$), die mit 10 nM Insulin ($M = 0,60 \pm SEM = 0,04$) als auch die mit 100 nM OXA und 10 nM Insulin ($M = 0,77 \pm SEM = 0,05$) inkubierten Gruppen zeigten gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Unterschied (Abb. 16). Der p-Wert bei der mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe betrug 0,04, bei der mit 10 nM Insulin inkubierten Gruppe 0,006 und bei der mit 100 nM OXA und 10 nM Insulin inkubierten Gruppe 0,0009 (Abb. 17).

4. Ergebnisse

Nach Inkubation mit 100 nM OXA nahm die PPAR γ mRNA Expression um 68,95 %, nach Inkubation mit 10 nM Insulin um 62,56 % und nach Inkubation mit 100 nM OXA und 10 nM Insulin um 109,43 % verglichen zur Kontrollgruppe zu (Abb. 17).

Zwischen der mit 100 nM OXA und der mit 10 nM Insulin inkubierten Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen der mit 10 nM Insulin und der mit 100 nM OXA und 10 nM Insulin inkubierten Gruppe gezeigt werden. Hier betrug der p-Wert 0,03 (Abb. 17).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass OXA den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten erhöht (Abb. 11-14). Da OXA die Lipolyse hemmt, kann man davon ausgehen, dass die Erhöhung des Triglyceridgehalts auf eine Stimulation der Lipidakkumulation zurückzuführen ist. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der PPAR γ Antagonist BADGE einen Einfluss auf die OXA-induzierte Lipidakkumulation hat (Abb. 17).

Dazu wurden die 3T3-L1 Adipozyten 24 Stunden mit 100 nM OXA und / oder 50 μ M BADGE inkubiert. Anschließend wurde der Triglyceridgehalt biochemisch bestimmt und gegenüber dem Proteingehalt in den Zellen normalisiert (Abb. 18).

Es zeigte sich, dass BADGE die OXA-induzierte Lipidakkumulation hemmt (Abb. 18).

Wie zu erwarten, zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($M = 0,54 \pm SEM = 0,12$) und der mit OXA inkubierten Gruppe ($M = 1,05 \pm SEM = 0,17$). Der p-Wert betrug 0,04. Zwischen der Kontrollgruppe und der mit OXA und BADGE inkubierten Gruppe ($M = 0,55 \pm SEM = 0,11$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p = 0,97$). Ebenfalls gab es zwischen der mit OXA und BADGE und der nur mit BADGE inkubierten Gruppe ($M = 0,51 \pm SEM = 0,05$) keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,79$) (Abb. 18).

Verglich man die mit OXA inkubierten Adipozyten mit den mit OXA und BADGE inkubierten Adipozyten, zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Der p-Wert betrug 0,03.

Nach Inkubation mit OXA und BADGE nahm der Triglyceridgehalt um 47,79 % gegenüber der nur mit OXA inkubierten Gruppe ab (Abb. 18).

Um zu schauen, ob PPAR γ für die Lipidakkumulation in den 3T3-L1 Adipozyten notwendig ist, wurden die 3T3-L1 Adipozyten in einem anderen Experiment für 24 Stunden mit bzw. ohne 100 nM OXA inkubiert und die Zellen anschließend mit PPAR γ siRNA transfiziert, so dass es zu einer 70 %igen Reduzierung der PPAR γ Expression kam. Die Kontrollgruppe wurde mit non-targeting siRNA transfiziert. Anschließend wurde der Triglyceridgehalt in den Zellen biochemisch bestimmt und gegenüber dem Proteingehalt normalisiert (Abb. 19).

Es konnte nachgewiesen werden, dass zwischen der mit non-targeting siRNA und ohne OXA behandelten Kontrollgruppe ($M = 0,67 \pm SEM = 0,03$) und der mit PPAR γ siRNA und mit OXA

4. Ergebnisse

($M = 0,68 \pm SEM = 0,02$) bzw. ohne OXA ($M = 0,59 \pm SEM = 0,04$) behandelten Gruppen kein signifikanter Unterschied besteht ($p = 0,71$ für non-targeting siRNS Kontrollgruppe gegenüber siRNS Gruppe mit OXA; $p = 0,18$ für non-targeting siRNS Gruppe gegenüber siRNS Gruppe ohne OXA) (Abb. 19).

Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen der mit non-targeting siRNS und OXA behandelten Gruppe ($M = 1,00 \pm SEM = 0,08$) und der mit PPAR γ siRNS und OXA behandelten Gruppe. Der p-Wert betrug 0,005. Der Triglyceridgehalt in der mit PPAR γ siRNS und OXA behandelten Gruppe nahm um 31,80 % im Vergleich zur Gruppe, die mit non-targeting siRNS und OXA behandelt wurde, zu (Abb. 19).

Dasselbe Transfektionsexperiment wurde anstatt mit 100 nM OXA mit dem PPAR γ Agonisten nTZD (10 μ M) durchgeführt (Abb. 20).

Es zeigte sich, ähnlich dem Experiment mit OXA, zwischen der mit non-targeting siRNS (ohne nTZD) behandelten Kontrollgruppe ($M = 0,44 \pm SEM = 0,04$) und der mit PPAR γ siRNS in Anwesenheit von nTZD ($M = 0,42 \pm SEM = 0,04$) bzw. in Abwesenheit von nTZD ($M = 4,33 \pm SEM = 0,03$) behandelten Gruppen kein signifikanter Unterschied. Der p-Wert betrug 0,71 für die mit non-targeting siRNS behandelten Kontrollgruppe (ohne nTZD) verglichen mit der mit PPAR γ siRNS und nTZD behandelten Gruppe. Der Vergleich mit der non-targeting siRNS behandelten Kontrollgruppe (ohne nTZD) und der mit PPAR γ siRNS (ohne nTZD) behandelten Gruppe lieferte einen p-Wert von 0,87 (Abb. 20).

Der Triglyceridgehalt in der Gruppe, die mit PPAR γ siRNS und nTZD behandelt wurde, nahm verglichen zur Gruppe, die mit non-targeting siRNS und nTZD behandelt wurde, um 32,44 % ab. Der Vergleich beider Gruppen miteinander liefert einen p-Wert von 0,0007 (Abb. 20).

Mit diesen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die OXA-induzierte Lipidakkumulation über einen PPAR γ abhängigen Mechanismus stattfindet.

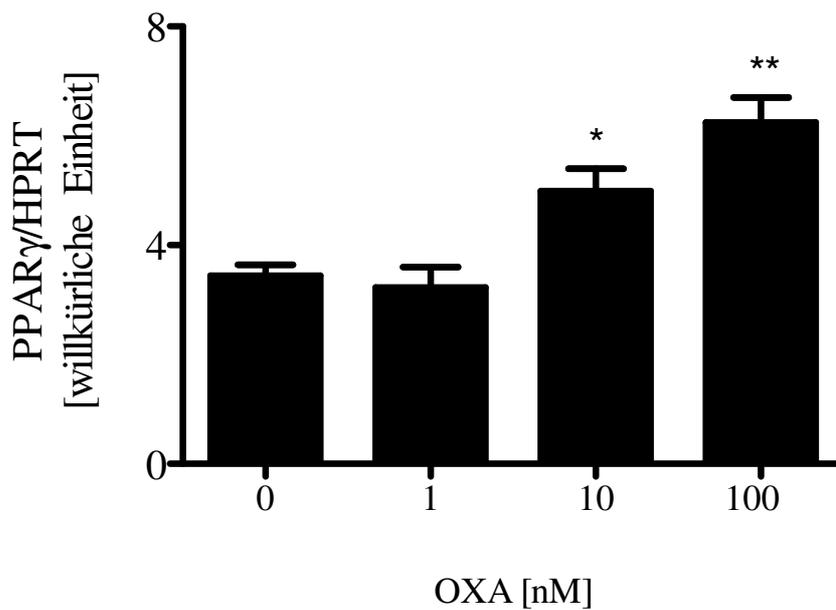


Abb. 16 Dosisabhängige Stimulation der PPAR γ mRNA Expression in 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildung zeigt die relative PPAR γ Expression nach dosisabhängiger Stimulation durch OXA in den 3T3-L1 Adipozyten. Die Adipozyten wurden 24 Stunden mit OXA in verschiedenen Konzentrationen inkubiert, anschließend wurde die RNS aus den Zellen isoliert. Mithilfe der real-time PCR wurde PPAR γ RNS quantitativ bestimmt und gegenüber HPRT normalisiert.

Die Kontrollgruppe wurde nur mit Inkubationsmedium ohne OXA inkubiert.

* $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$, verglichen mit der Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

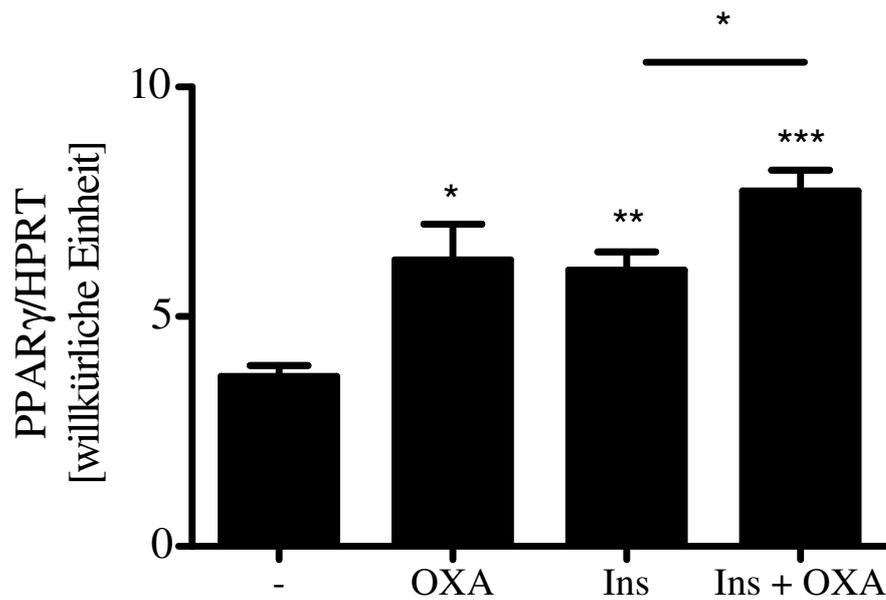


Abb. 17 Einfluss von Insulin und OXA auf die PPAR γ RNS Expression in 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildung zeigt den Effekt von OXA und Insulin auf die relative PPAR γ RNS Expression in den 3T3-L1 Adipozyten.

Die Adipozyten wurden 24 Stunden mit 100 nM OXA, 10 nM Insulin oder der Kombination aus beiden inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde nur mit Inkubationsmedium ohne Testpeptide inkubiert.

Anschließend wurde die RNS aus den Zellen isoliert und PPAR γ RNS mit der real-time PCR bestimmt.

Die Ergebnisse wurden gegenüber HPRT normalisiert.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

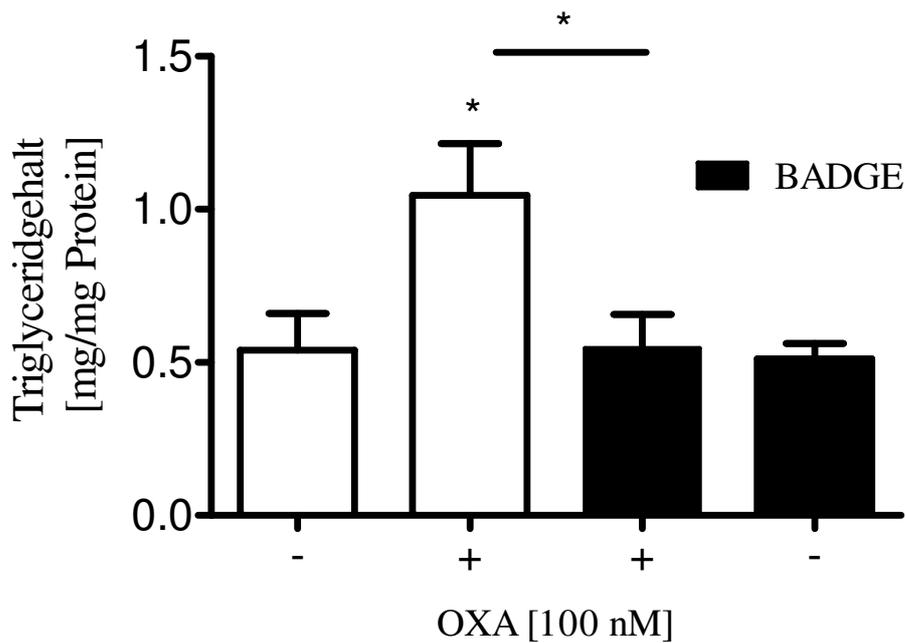


Abb. 18 Hemmung der OXA-induzierten Lipidakkumulation mit BADGE

Die Abbildung zeigt den Triglyceridgehalt in den 3T3-L1 Adipozyten nach Inkubation mit 100 nM OXA und/oder dem PPAR γ Inhibitor BADGE (50 μ M).

Die Zellen wurden 24 Stunden mit 100 nM OXA und/oder 50 μ M BADGE inkubiert und der Triglyceridgehalt anschließend biochemisch bestimmt.

Die Ergebnisse wurden gegenüber der Proteinkonzentration in den Zellen normalisiert.

Weißer Balken: Zellen wurden ohne BADGE inkubiert; schwarzer Balken: Zellen wurden mit BADGE inkubiert.

* $p < 0,05$, verglichen mit der Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

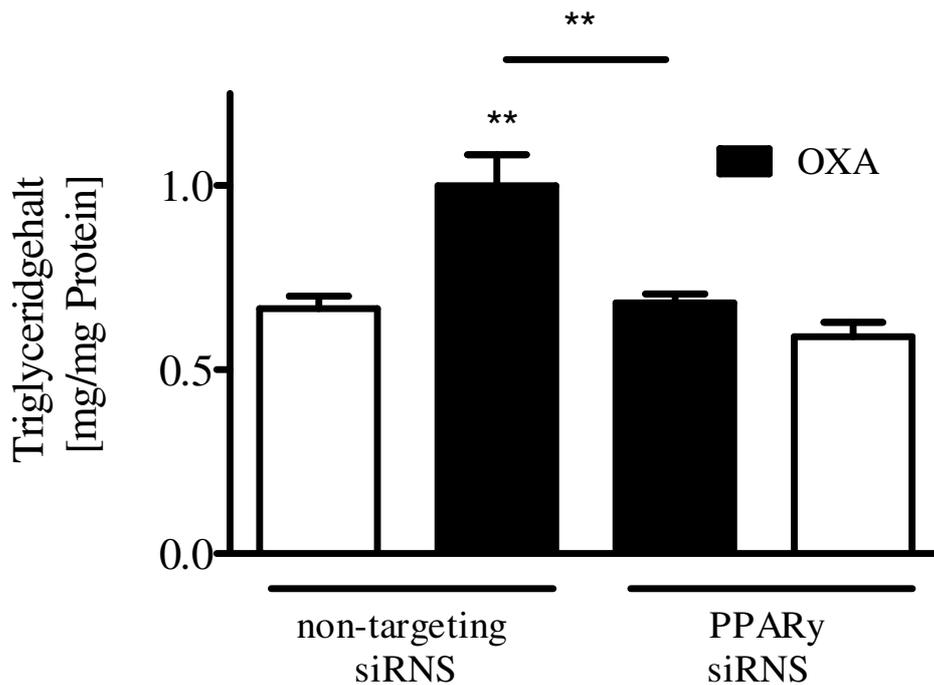


Abb. 19 Einfluss von OXA auf die Lipidakkumulation der Adipozyten nach PPARy siRNS Transfektion

Die Abbildung zeigt den Effekt von 100 nM OXA nach 24 Stunden auf die Lipidakkumulation in den 3T3-L1 Adipozyten nach PPARy siRNS Transfektion. Die Kontrollgruppe wurde mit non-targeting siRNS behandelt.

Der Triglyceridgehalt wurde biochemisch bestimmt und gegenüber der Proteinkonzentration in den Zellen normalisiert.

Weißer Balken: ohne OXA behandelte Zellen; schwarzer Balken: mit OXA behandelte Zellen.

** $p < 0,01$, verglichen mit der Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

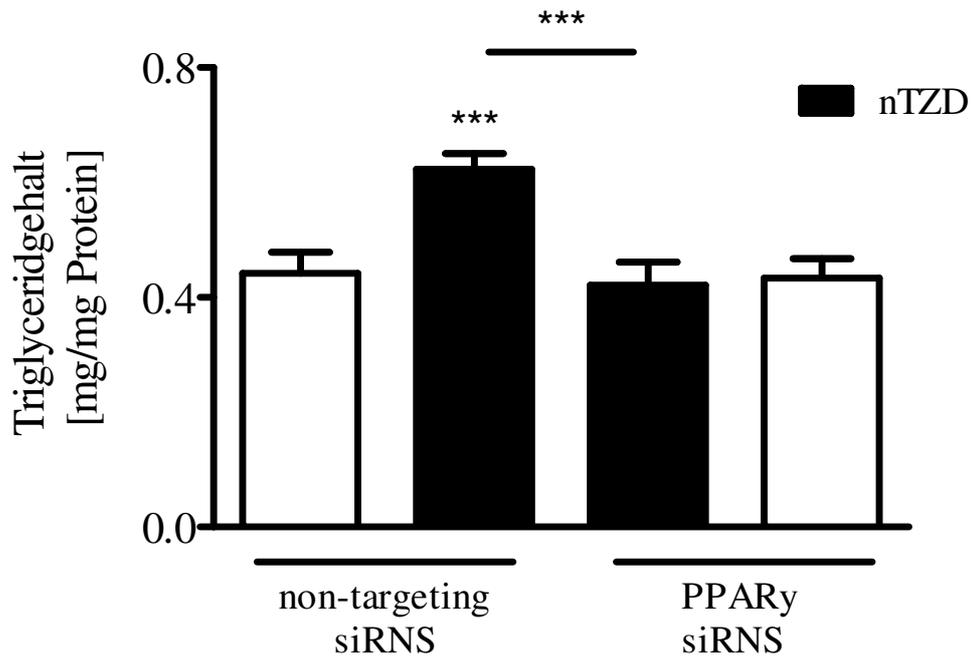


Abb. 20 Einfluss von nTZD auf die Lipidakkumulation der Adipozyten nach PPARy siRNS Transfektion

Die Abbildung zeigt den Effekt vom PPARy Agonisten nTZD (10 μ M) nach 24 Stunden auf die Lipidakkumulation in den 3T3-L1 Adipozyten nach PPARy siRNS Transfektion. Die Kontrollgruppe wurde mit non-targeting siRNS behandelt.

Der Triglyceridgehalt wurde biochemisch bestimmt und gegenüber der Proteinkonzentration in den Zellen normalisiert.

Weißer Balken: ohne nTZD behandelte Zellen; schwarzer Balken: mit nTZD behandelte Zellen.

*** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrollgruppe oder zwischen zwei Gruppen und berechnet mit dem Student t-Test.

4.6 Effekte von Orexin A auf die Adiponectinsekretion und -expression

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass OXA die PPAR γ Expression in den 3T3-L1 Adipozyten erhöht (Abb. 16).

Da PPAR γ Agonisten die Expression und Sekretion von Adiponectin stimulieren, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von OXA auf die Expression und Sekretion von Adiponectin untersucht.

Zur Bestimmung der Adiponectinsekretion in den Inkubationsmedien wurden die 3T3-L1 Adipozyten 24 Stunden mit oder ohne OXA (1, 10, 100 nM) und in Anwesenheit oder Abwesenheit des PPAR γ Agonisten nTZD (10 μ M) inkubiert (Abb. 21).

Um die Adiponectinexpression zu bestimmen, wurden die Zellen vorher 24 Stunden mit bzw. ohne 100 nM OXA und in An- bzw. Abwesenheit von 50 μ M BADGE inkubiert. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und mit dem Western Blot detektiert (Abb. 22A) und quantitativ mit der Quantity One® 1-D Analysis Software bestimmt (Abb. 22B). Die Ergebnisse der Adiponectinexpression wurden gegenüber dem *housekeeping* Gen β -Aktin normalisiert. (Abb. 22B).

Die Adiponectinsekretion nahm verglichen zur Kontrollgruppe ($M = 144,9 \pm SEM = 15,02$) nach Inkubation mit 1 nM OXA ($M = 186,5 \pm SEM = 18,96$) um 28,70 %, mit 10 nM OXA ($M = 210,1 \pm SEM = 16,58$) um 45,03 % und mit 100 nM OXA ($M = 196,0 \pm SEM = 4,02$) um 35,30 % zu (Abb. 21). Die Erhöhung der Adiponectinsekretion war nach Inkubation mit 10 nM und 100 nM OXA verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant. Der p-Wert betrug 0,03 für die mit 10 nM OXA inkubierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und 0,02 für die mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 21).

Inkubierte man die Adipozyten mit 10 μ M nTZD und ohne OXA ($M = 250,10 \pm SEM = 19,33$), nahm die Adiponectinsekretion verglichen zur Kontrollgruppe um 72,62 % zu. Der Unterschied war signifikant und der p-Wert betrug 0,005 (Abb. 21).

Nach Inkubation mit dem PPAR γ Agonisten nTZD (10 μ M) und 10 nM OXA ($M = 278,7 \pm SEM = 6,23$), nahm die Adiponectinsekretion im Vergleich zur Gruppe, die nur mit 10 nM OXA inkubiert wurde, um 32,64 % zu ($p = 0,008$). Verglichen zur Kontrollgruppe betrug die Zunahme der Adiponectinsekretion nach Inkubation mit 10 μ M nTZD und 10 nM OXA 92,36 %. Der p-Wert betrug 0,0002 (Abb. 21).

Vergleicht man die Gruppe, die nur mit dem PPAR γ Agonisten nTZD (10 μ M) inkubiert wurde, mit der Gruppe, die sowohl mit dem PPAR γ Agonisten nTZD (10 μ M) als auch mit 10 nM OXA inkubiert wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der p-Wert betrug 0,2088 (Abb. 21).

4. Ergebnisse

Bei der Bestimmung der Adiponectinexpression zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ($M = 0,82 \pm SEM = 0,03$) und der mit 100 nM OXA inkubierten Gruppe ($M = 1,04 \pm SEM = 0,04$). Die Erhöhung der Adiponectinexpression betrug 27,66 % zugunsten der mit OXA inkubierten Gruppe. Der p-Wert betrug 0,004 (Abb. 22B).

Inkubierte man die Zellen mit dem PPAR γ Antagonisten BADGE (50 μ M) und in An- ($M = 0,92 \pm SEM = 0,07$) bzw. Abwesenheit ($M = 0,90 \pm SEM = 0,07$) von 100 nM OXA, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. Der p-Wert betrug 0,33 für die mit OXA und BADGE inkubierten Gruppe und 0,32 für die mit BADGE und ohne OXA inkubierten Gruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 22B).

Der Vergleich zwischen der Gruppe, die mit BADGE in Anwesenheit von OXA und der Gruppe, die mit BADGE in Abwesenheit von OXA inkubiert wurde, zeigte keinen signifikanten Unterschied. Der p-Wert betrug 0,89 (Abb. 22B).

OXA erhöht die Adiponectinexpression und -sekretion (Abb. 21, 22A-B). Die Wirkung von OXA auf die Adiponectinexpression geht allerdings in Anwesenheit vom PPAR γ Antagonisten BADGE verloren (Abb. 22A-B). OXA steigert die mit dem PPAR γ Agonisten nTZD-induzierte Adiponectinsekretion (Abb. 21).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Adiponectinsekretion als auch -expression über einen PPAR γ -abhängigen Mechanismus läuft.

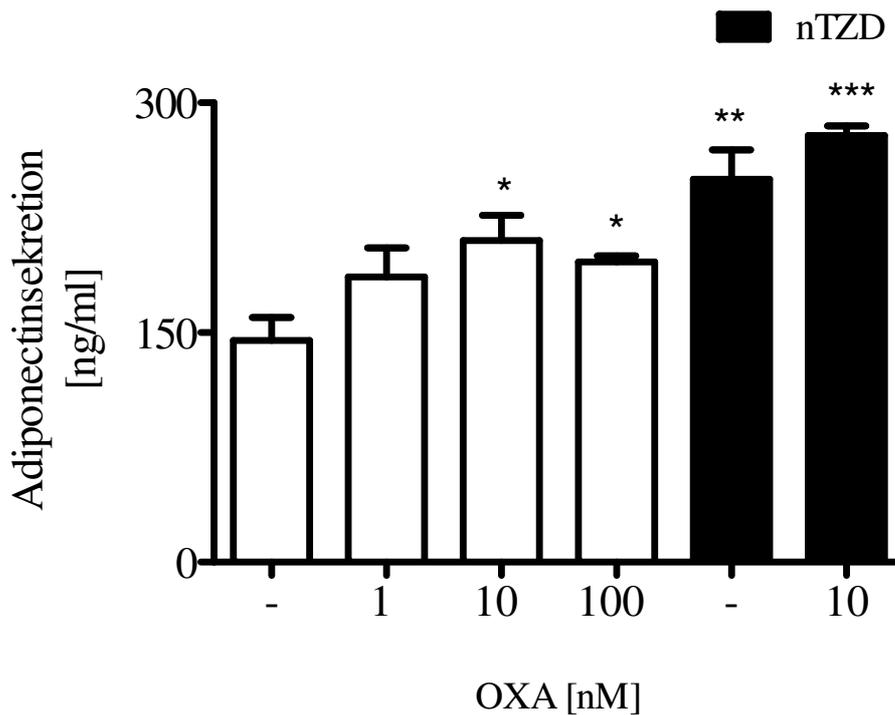


Abb. 21 Einfluss von Orexin A auf die Adiponectinsekretion in An- bzw. Abwesenheit von nTZD

Die Abbildung zeigt den Effekt von OXA in verschiedenen Konzentrationen auf die Adiponectinsekretion in An- bzw. Abwesenheit vom PPAR γ Agonisten nTZD.

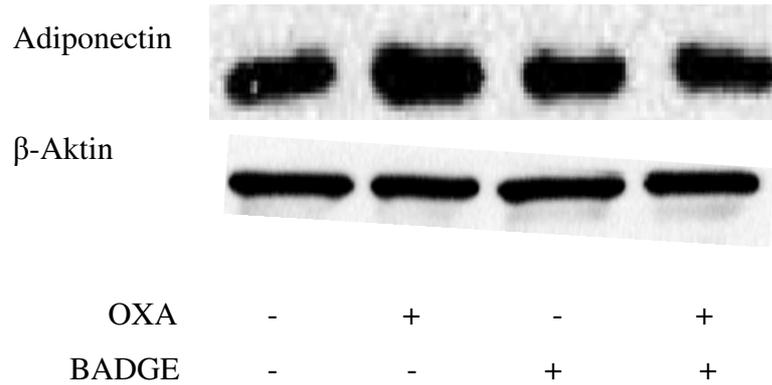
Die Adipozyten wurden 24 Stunden mit OXA (1, 10, 100 nM) oder in Kombination mit 10 μ M nTZD inkubiert. Anschließend wurde die Adiponectinsekretion im Inkubationsmedium bestimmt und ist angegeben in [ng/ml].

Die Kontrollgruppe wurde nur mit Inkubationsmedium und ohne OXA inkubiert.

Weißer Balken: ohne nTZD behandelte Zellen; schwarzer Balken: mit nTZD behandelte Zellen.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$, verglichen mit der Kontrollgruppe und berechnet mit dem Student t-Test.

22A



22B

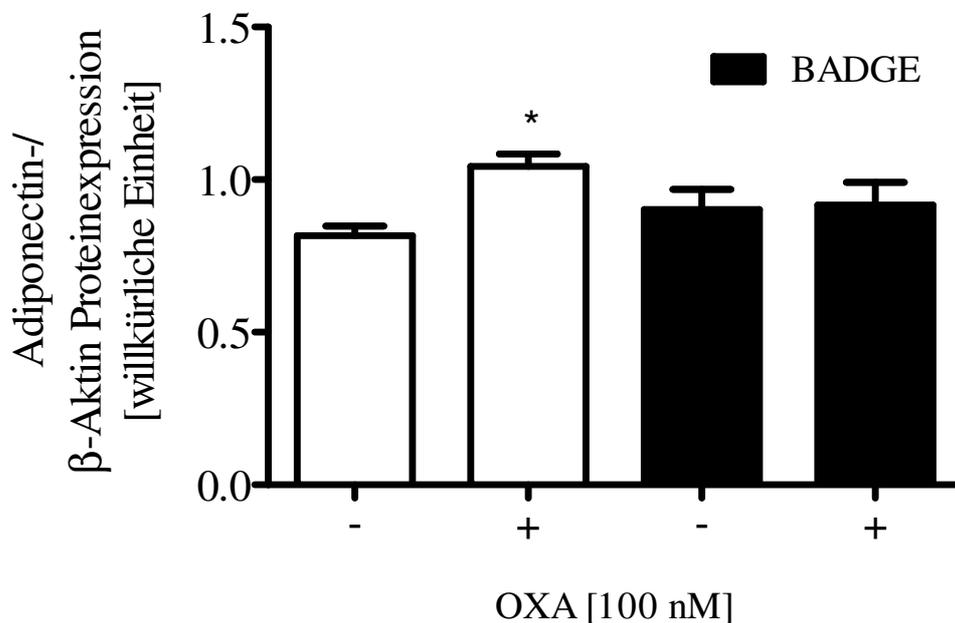


Abb. 22A-B Einfluss von OXA auf die Adiponectinexpression in 3T3-L1 Adipozyten

Die Abbildungen zeigen die Effekte von OXA auf die Adiponectinexpression in den 3T3-L1 Adipozyten. Die Zellen wurden 24 Stunden mit 100 nM OXA in An- bzw. Abwesenheit vom PPAR γ Inhibitor BADGE (50 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Proteine aus den Zellen isoliert und die Adiponectinexpression quantitativ mithilfe des Western Blots bestimmt.

A: Die Western Blot Banden zeigen die qualitative Detektion von Adiponectin und β -Aktin Banden.

B: Die Ergebnisse zeigen die relative Proteineexpression von Adiponectin im Verhältnis zur β -Aktin (*housekeeping* Gen) Signalintensität, bestimmt mithilfe des Western Blots.

Weißer Balken: ohne BADGE behandelte Zellen; schwarzer Balken: mit BADGE behandelte Zellen.

5. Diskussion

5.1 Expression von Orexinrezeptoren in 3T3-L1 Fibroblasten und Adipozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass OXR1 und OXR2 sowohl in den unreifen 3T3-L1 Fibroblasten (Prädipozyten) als auch in den reifen 3T3-L1 Adipozyten exprimiert werden.

Dieses konnte sowohl auf RNS- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Je reifer die 3T3-L1 Adipozyten waren, desto höher war die OXR1 Expression. Die OXR2 Expression blieb sowohl bei den unreifen 3T3-L1 Fibroblasten als auch bei den reifen 3T3-L1 Adipozyten nahezu gleich.

Digby et al. konnten bereits nachweisen, dass OXR1 und OXR2 im menschlichen Fettgewebe und in Adipozyten exprimiert werden [20]. Diese vorliegende Arbeit konnte zusätzlich zeigen, dass beide Rezeptoren in unreifen und reifen 3T3-L1 Adipozyten exprimiert werden und dass die OXR1 Expression in reifen 3T3-L1 Adipozyten während der Differenzierung zunimmt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei reifen 3T3-L1 Adipozyten vor allem OXA eine große Rolle spielt, da der OXR1 eine stärkere Bindungsaffinität für OXA hat [1]. Nakabayashi et al. konnten zeigen, dass OXA in verschiedenen peripheren Geweben produziert bzw. exprimiert wird [82]. Eine OXA-Produktion von Adipozyten konnten diese Arbeit und Nakabayashi et al. nicht zeigen. Dieses ist bisher auch keiner anderen Arbeitsgruppe gelungen.

5.2 Orexin A steigert die Glukoseaufnahme und GLUT4 Translokation

Die Experimente konnten zeigen, dass die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten durch OXA dosis- und zeitabhängig geschieht, die ihr Maximum bei 100 nM OXA und nach 30-minütiger Inkubation hatte. Nach Inkubation mit OXA zeigte sich auch eine signifikante Erhöhung der GLUT4 Translokation in der Zellmembran der Adipozyten.

Der PI3K Inhibitor LY294002 inhibierte die durch OXA- oder Insulin-stimulierte Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten. Auch die durch OXA-stimulierte GLUT4 Translokation in die Zellmembran der 3T3-L1 Adipozyten wurde durch LY294002 inhibiert.

PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen), sind Enzyme, die Phosphatidylinositole und Phosphoinositide phosphorylieren. Diese Reaktion führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die an der Regulierung von Zellfunktionen beteiligt sind [83].

Aus den Ergebnissen kann man schließen, dass sowohl die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten als auch die GLUT4 Translokation vom Zytoplasma in die Zellmembran der 3T3-L1 Adipozyten über einen PI3K-abhängigen Mechanismus laufen müssen.

Sikder et al. fanden heraus, dass transfizierte HEK293 Zellen, die den Orexinrezeptor-1 exprimierten, nach Inkubation mit 100 nM OXA, über HIF-1 α -abhängigen Mechanismus die Expression von GLUT1 stimulieren und es somit zu einer Erhöhung der Glukoseaufnahme in die HEK293 Zellen kommt [84]. Die Arbeit von Sikder et al. unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, dass OXA die Glukoseaufnahme in die Zellen erhöht. Diese Arbeit konnte zeigen, dass OXA die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten steigert, was bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Allerdings besitzen Adipozyten vorwiegend GLUT4 und diese Arbeit konnte somit auch zeigen, dass die durch OXA-stimulierte Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten über die GLUT4 Translokation erfolgt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auch, dass die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten und die GLUT4 Expression in der Zellmembran nach Inkubation mit Insulin höher waren als nach Inkubation mit OXA. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass OXA die Insulinsekretion aus den pankreatischen Inselzellen stimuliert [19], so dass Adipozyten und OXA eine bedeutende Rolle in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 spielen könnten, indem OXA die Insulinsekretion aus dem Pankreas steigert und es somit zu einer erhöhten Glukoseaufnahme in die Adipozyten kommt. Da Übergewicht ein Risikofaktor für Diabetes ist, wäre OXA ein guter Therapieansatz für übergewichtige Typ 2 Diabetiker, weil diese Patienten viele Fettzellen besitzen.

Tsuneki et al. konnten zeigen, dass die Blutglukosekonzentration in nicht-diabetischen und diabetischen Tieren nach Inkubation mit OXA erniedrigt war, ohne dass sich die Insulinkonzentration in diesen Tieren geändert hatte [79]. Diese Arbeit unterstützt die Ergebnisse von Tsuneki et al., da nachgewiesen werden konnte, dass OXA allein, d.h. unabhängig von Insulin, die Glukoseaufnahme in die 3T3-Zellen stimulieren kann, was den Zustand erklären könnte, weshalb sich die Insulinkonzentration in den diabetischen und nicht-diabetischen Tiere nicht geändert hatte [79]. Allerdings würde man einen reaktiven Abfall des Insulingehalts im Blut erwarten, nachdem OXA die Blutglukosekonzentration gesenkt hat. Dieses wurde in der Studie von Tsuneki et al. nicht beschrieben [79]. Es geht aus der Studie auch nicht hervor, wie OXA die Blutglukosekonzentration senkt. Der Weg könnte indirekt über die pankreatischen Inselzellen laufen, durch Hemmung der Glukagonsekretion [60,62], oder direkt über die Glukoseaufnahme in die Adipozyten [85].

Je länger mit OXA inkubiert wurde, desto höher war der ATP-Gehalt in den 3T3-L1 Zellen, was sich mit den Ergebnissen der Glukoseaufnahme deckt, weil die Glykolyse in den Adipozyten ATP-Moleküle liefert. Der Einfluss von OXA auf den ATP-Gehalt in den 3T3-L1 Adipozyten wurde vorher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Ebenfalls ist die Erkenntnis, dass OXA die GLUT4 Translokation über einen PI3K-abhängigen Mechanismus erhöht, neu. Dieses wurde bisher weder in Adipozyten noch in anderen Zellen nachgewiesen.

5.3 Orexin A steigert die Lipidakkumulation und hemmt die Lipolyse

Es konnte nachgewiesen werden, dass OXA den Triglyceridgehalt, welcher als Index für die Lipidakkumulation angesehen wird, in den 3T3-L1 Adipozyten erhöht. Desweiteren erhöht OXA die Insulin-stimulierte Lipidakkumulation. Eine alleinige Inkubation mit OXA bzw. Insulin konnte den Gehalt an Triglyceriden nicht in dem Maße steigern wie die Kombination aus beiden. Der PI3K Inhibitor LY294002 reduziert den Triglyceridgehalt in den Adipozyten bzw. hemmt die Lipidakkumulation in den 3T3-L1 Adipozyten. Daraus folgt, dass die OXA-induzierte Lipidakkumulation über einen PI3K-abhängigen Mechanismus läuft. Zudem nachgewiesen werden, dass OXA, ähnlich wie Insulin, die Lipolyse in den 3T3-L1 Adipozyten hemmt.

Im Jahr 2003 konnten Wortley et al. nachweisen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem im Blut zirkulierendem Triglyceridgehalt bei Ratten und der Orexin-Genexpression im perifornikalen Hypothalamus gibt, denn erhöhte Triglyceridwerte führten zu einer Stimulierung der Orexin-Genexpression im perifornikalen Hypothalamus von Ratten [86].

In dieser vorliegenden Arbeit ging es um den peripheren Einfluss von OXA auf den Triglyceridgehalt in Adipozyten und es wurde ebenfalls herausgefunden, dass es einen Zusammenhang zwischen Orexin und dem Triglyceridgehalt gibt. Die Ergebnisse aus 2003 zeigten, dass Hypertriglyceridämie die Orexin-Genexpression stimuliert. Diese Arbeit kommt aber zu dem Schluss, dass Orexin den Triglyceridgehalt erhöht und nicht umgekehrt. Bei der Arbeit aus 2003 handelte es sich um in vivo Studien, bei denen OXA zentral appliziert wurde. Die Ergebnisse dieser Arbeit stammen aus in vitro Untersuchungen und das OXA wurde peripher appliziert, so dass man davon ausgehen kann, dass OXA peripher und zentral unterschiedlich wirkt [86].

Andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass eine Überexpression von Orexin oder dessen Rezeptor Mäuse vor Übergewicht schützt [77] und dass sowohl die einzelne als auch chronische Gabe von OXA in den intracerebralen Ventrikel zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme führen.

Das Gewicht der Tiere nahm aber nicht zu [23-24]. Diese *in vitro* Arbeit zeigt allerdings, dass OXA die Triglyceridakkumulation in den 3T3-L1 Adipozyten erhöht und die Lipolyse hemmt. Diese Ergebnisse stimmen mit zwei anderen in der Literatur beschriebenen *in vitro*-Studien überein. Digby et al. fanden heraus, dass nach Behandlung mit OXA die Glycerolfreisetzung (Index für die Lipolyse) in isolierten menschlichen Adipozyten signifikant reduziert wurde [20]. Die Expression der hormonsensitiven Lipase wurde durch OXA gehemmt und scheint der Weg zu sein, über den OXA die Lipolyse hemmt [20]. Die Arbeitsgruppe von Xia et al. konnte zeigen, dass die Aktivierung von PI3K zur Erhöhung der Lipidakkumulation in 3T3-L1 Adipozyten führt [87]. Die vorliegende Arbeit konnte zusätzlich zeigen, dass die Inaktivierung von PI3K in 3T3-L1 Adipozyten die OXA-induzierte Erhöhung des Triglyceridgehalts hemmt.

Da das autonome Nervensystem eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipidmetabolismus spielt, untersuchte eine andere Arbeitsgruppe den Einfluss von OXA auf die Lipolyse vom Sympathikus innervierten Fettgewebe und kam zu dem Schluss, dass hohe Dosen (1 µg/Ratte) von OXA die lipolytischen Prozesse in Fettgeweben steigern, während niedrige Dosen (10 ng/Ratte) die Lipolyse vermindern [88]. In unserer Arbeit wurde OXA in der Dosis 100 nM verwendet und die Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der niedrigen Dosen OXA überein. Dass OXA die Lipolyse steigert, konnte nicht gezeigt werden. Unterschiede zwischen beiden Arbeiten liegen in der quantitativen Dosierung des OXA. Desweiteren handelt es sich bei der anderen Arbeit um *in vivo* Studien, was den Unterschied vielleicht erklären könnte [88].

In vivo könnten noch andere Faktoren Einfluss auf die Lipolyse haben. So weiß man, dass OXA die Freisetzung von Adrenalin stimuliert [66], so dass man vermuten könnte, dass OXA *in vivo* über die Adrenalinfreisetzung lipolytisch wirkt und es somit zu einer Gewichtsreduktion kommt. Allerdings wurde dieses bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Arbeitsgruppen Haynes et al. und Yamanaka et al. konnten zeigen, dass das Gewicht nach OXA-Gabe unverändert blieb, eine Gewichtsreduktion wurde nicht beschrieben [23-24]. Es könnte sein, dass die Dosierungen des OXA zu niedrig waren und eine höhere Dosierung tatsächlich zu einer Gewichtsreduktion führen könnte, so dass OXA ein potenzielles therapeutisches Mittel gegen Übergewicht wäre. Es gibt eine *in vivo* Studie, die eine mögliche Gewichtsreduktion erklären könnte. Shiuchi et al. injizierten OXA in den medialen Hypothalamus von Mäusen/Ratten und es zeigte sich eine über das sympathische Nervensystem erhöhte Glukoseaufnahme im Skelettmuskel, aber nicht in weißen Fettzellen [89]. Da die Glykolyse Pyruvat liefert, das als Ausgangsstoff für die Fettsäuresynthese dient, könnte man vermuten, dass es zu einer Abnahme des Gewichts kommt, weil durch die reduzierte Glukoseaufnahme die Glykolyse abnimmt. Die Folge wäre, dass die Adipozyten weniger Fettsäure synthetisieren und somit die

Lipidakkumulation gehemmt wird. Da der Körper aber Energie braucht, könnten die Lipide zur Energiegewinnung herangezogen werden. Somit könnte es zu einer verstärkten Lipolyse kommen, mit der Folge einer Gewichtsreduktion.

5.4 Rolle von PPAR γ für die Regulation der Lipidakkumulation

PPAR γ 2 ist ein nuklearer Hormonrezeptor [90], der im Vergleich zu anderen Geweben in Fettgeweben stark exprimiert wird [91-92]. Er fungiert als Adipozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor [93] und gilt als wichtiger Regulator in der Genexpression von Adipozyten [90].

Es konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass die Expression von PPAR γ 2 die Differenzierung von Fibroblasten zu Adipozyten stimuliert und den Triglyceridgehalt in diesen Zellen erhöht [94]. Insulin erhöht in vivo und in vitro die PPAR γ mRNA Expression in humanen Adipozyten [95]. Tiere, die den PPAR γ 2 Rezeptor nicht exprimierten, zeigten eine Reduktion des weißen Fettgehalts und eine Herabsetzung der Insulinsensitivität [96].

Digby et al. konnten zeigen, dass OXA die Expression des PPAR γ 2 Rezeptors im subkutanen Fettgewebe erhöht [20]. Sie fanden heraus, dass menschliche Fettzellen nach Behandlung mit OXA eine Erhöhung der PPAR γ Expression zeigten [20]. Da wie bereits erwähnt, ein Fehlen des PPAR γ 2 Rezeptors zu einer Reduktion des weißen Fettgehalts führt [96], lässt sich daraus schließen, dass OXA über einen PPAR γ -Weg eine Rolle im Fettstoffwechsel spielt. Da OXA die PPAR γ Expression in den Adipozyten stimuliert [20] und PPAR γ in Adipozyten den Triglyceridgehalt erhöht [94], liegt die Vermutung nahe, dass die OXA-induzierte Lipidakkumulation in Adipozyten über einen PPAR γ -abhängigen Weg läuft.

Dieses konnte mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In dieser Arbeit zeigte sich, dass OXA die PPAR γ Expression dosisabhängig erhöht. Je höher die Dosierung des OXA, desto höher war die PPAR γ Expression. Die Kombination aus Insulin und OXA erhöht die PPAR γ Expression stärker im Vergleich zu den Gruppen, die lediglich mit OXA oder Insulin inkubiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass OXA die Insulin-induzierte Triglyceridakkumulation potenziert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ Antagonist BADGE die OXA-induzierte Lipidakkumulation hemmt. Bei den mit PPAR γ siRNA behandelten 3T3-L1 Adipozyten zeigte sich ebenfalls eine Hemmung der OXA-induzierten Lipidakkumulation. Diese Hemmung konnte auch nicht mit einem PPAR γ Agonisten nTZD aufgehoben werden. Somit muss die OXA-induzierte Lipidakkumulation über einen PPAR γ -Weg laufen.

5.5 Orexin A steigert die Adiponectinsekretion und -expression über PPAR γ

Diese Arbeit konnte zusätzlich zeigen, dass OXA die Adiponectinsekretion und -expression ebenfalls über einen PPAR γ -abhängigen Weg stimuliert, denn die durch OXA-induzierte Erhöhung der Adiponectinexpression konnte mithilfe eines PPAR γ Antagonisten verhindert werden. Diese Erkenntnisse bestätigen die von Combs et al. publizierten Ergebnissen [43]. Combs et al. fanden heraus, dass die Adiponectinsekretion von Fettgeweben durch PPAR γ Agonisten stimuliert wird [43].

Da die Höhe der Adiponectinexpression mit der Insulinsensitivität korreliert [39] und in der Literatur bereits nachgewiesen werden konnte, dass Adiponectin die periphere Insulinresistenz in Diabetes mellitus Typ 2 Tiermodellen reduzieren kann [97], wäre OXA ein potenzielles Therapeutikum beim Diabetes mellitus Typ 2.

5.6 Klinische Relevanz des Themas

OXA wirkt ähnlich wie Insulin und hat das Potenzial, die Wirkung von Insulin zu steigern. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass OXA die Glukoseaufnahme in die 3T3-L1 Adipozyten erhöht und die Lipidakkumulation über einen PPAR γ -abhängigen Weg stimuliert. In der Literatur gibt es Publikationen, die zeigen, dass OXA die Insulinsekretion aus den pankreatischen Inselzellen erhöht [19,61]. Mit dieser Arbeit konnte ein Neuropeptid identifiziert werden, das aus pathophysiologischer und therapeutischer Sicht ein interessanter Ansatz als mögliches Therapeutikum des Diabetes mellitus Typ 2 darstellt. Das ist insofern von großer Bedeutung, weil OXA die Adiponectinsekretion steigert. Adiponectin wirkt antientzündlich und wurde bereits in Tiermodellen erfolgreich eingesetzt, um den Diabetes mellitus Typ 2 zu verhindern [97].

In der Klinik werden schon seit langem in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 Glitazone (Thiazolidinedione), auch unter dem Namen „Insulinsensitizer“, erfolgreich eingesetzt. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind Rosiglitazone und Pioglitazone. Diese Medikamente wirken als PPAR γ Agonisten und erhöhen die Insulinsensitivität [38]. Es ist bereits bekannt, dass die Insulinsensitizer bzw. PPAR γ Agonisten die Adiponectinexpression erhöhen [43], welche mit der Insulinsensitivität korreliert [39]. OXA hat Ähnlichkeit mit der Wirkung der Insulinsensitizer, denn OXA erhöht ebenfalls die Adiponectinexpression über einen PPAR γ -abhängigen Weg.

Dass Orexin in der Pathophysiologie der Insulinresistenz eine bedeutende Rolle spielt, konnte auch eine andere Arbeitsgruppe zeigen. Tsuneki et al. konnten nachweisen, dass Mäuse, die kein Orexin exprimieren konnten, eine Insulinresistenz entwickelten, obwohl sie nicht übergewichtig waren [78].

Aufgrund dieser aufgeführten Gründe wäre OXA ein potenzielles Therapeutikum, um die Wirkung von Insulin zu verstärken und die Insulinsensitivität ähnlich der Glitazone in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zu erhöhen.

Es konnte in dieser Arbeit *in vitro* ebenfalls gezeigt werden, dass OXA die Lipidakkumulation über einen PPAR γ -abhängigen Weg stimuliert. Es ist aber auch bekannt, dass OXA *in vivo* die Adrenalinplasmakonzentration erhöht [66]. Insulin und Insulinsensitizer zeigen in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 als Nebeneffekt eine Gewichtszunahme [80]. Bei OXA könnte es *in vivo* durch die Adrenalinausschüttung des sympathischen Nervensystems zu einer Gewichtsreduktion kommen [66]. Da Übergewicht ein Risikofaktor für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 darstellt und mit der Insulinresistenz assoziiert ist [33,98], wäre OXA eine sehr gute Alternative bzw. gute Ergänzung zu den Insulinsensitizern.

5.7 Stärken und Schwächen der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnten die Mechanismen der Wirkung von OXA auf die 3T3-L1 Adipozyten *in vitro* ohne Störfaktoren, die es bei *in vivo* Untersuchungen gegeben hätte, gezeigt werden.

Die Untersuchungen fanden an etablierten Zellreihen, den 3T3-L1-Zellen, statt, so dass die Ergebnisse auch international anerkannt werden können.

Es wurde der Einfluss von OXA auf die reifen 3T3-L1 Adipozyten untersucht, weil OXA an beide Orexinrezeptoren bindet [1]. Da OXR1 in reifen 3T3-L1 Adipozyten stärker als OXR2 exprimiert wird, wurde der Einfluss von OXB auf die reifen Adipozyten nicht untersucht. Es kann somit auch keine Aussage darüber gemacht werden, inwiefern OXB den Metabolismus der 3T3-L1 Adipozyten beeinflusst.

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde OXA in pharmakologischen Dosierungen verwendet. Die Plasmadosierung von OXA ist *in vivo* niedriger [75], so dass es sich bei diesen Untersuchungen bereits um die therapeutische Dosierung handeln könnte. Eine Aussage, ob OXA in der Plasmadosierung ebenfalls die Wirkungen hervorruft, kann nicht gemacht werden.

Die Untersuchungen wurden an 3T3-L1 Zellen durchgeführt, die aus Mäusen isoliert wurden. Experimente an humanen Zellen wurden nicht gemacht, so dass die Aussagekraft dieser Arbeit nicht auf andere Spezies übertragbar ist.

5.8 Ausblick (Forschungsbedarf)

Um OXA als mögliches Therapeutikum verwenden zu können, sind in vivo Untersuchungen notwendig.

Da die Experimente dieser Arbeit nur an einer einzigen Zellreihe stattfanden, sind weitere Evaluationen an anderen Zellreihen, vor allem an humanen Adipozyten, wünschenswert, um die Aussage dieser Arbeit zu stärken.

Es konnte nachgewiesen werden, dass OXA über PPAR γ Einfluss auf die metabolischen und endokrinen Funktionen von 3T3-L1 Adipozyten hat. Allerdings ist der genaue Mechanismus, wie der PPAR γ Rezeptor durch OXA aktiviert wird, bis jetzt noch unbekannt. Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet sind wünschenswert.

6. Literaturverzeichnis

1. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585 (1998).
2. de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., *et al.* The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 322-327 (1998).
3. Shibahara, M., Sakurai, T., Nambu, T., *et al.* Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of Xenopus orexins. *Peptides* 20, 1169-1176 (1999).
4. Haynes, A.C., Jackson, B., Chapman, H., *et al.* A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul Pept* 96, 45-51 (2000).
5. Hirose, M., Egashira, S., Goto, Y., *et al.* N-acyl 6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline: the first orexin-2 receptor selective non-peptidic antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 13, 4497-4499 (2003).
6. Yamada, H., Takahashi, N., Tanno, S., *et al.* A selective orexin-1 receptor antagonist, SB334867, blocks 2-DG-induced gastric acid secretion in rats. *Neurosci Lett* 376, 137-142 (2005).
7. Chang, H., Saito, T., Ohiwa, N., *et al.* Inhibitory effects of an orexin-2 receptor antagonist on orexin A- and stress-induced ACTH responses in conscious rats. *Neurosci Res* 57, 462-466 (2007).
8. Dugovic, C., Shelton, J.E., Aluisio, L.E., *et al.* Blockade of orexin-1 receptors attenuates orexin-2 receptor antagonism-induced sleep promotion in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 330, 142-151 (2009).
9. Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., *et al.* Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J Neurosci* 18, 9996-10015 (1998).
10. Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., *et al.* Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 748-753 (1999).
11. Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., *et al.* Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 243-260 (1999).
12. Trivedi, P., Yu, H., MacNeil, D.J., *et al.* Distribution of orexin receptor mRNA in the rat brain. *FEBS Lett* 438, 71-75 (1998).
13. Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., *et al.* Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol* 435, 6-25 (2001).
14. van den Pol, A.N. Hypothalamic hypocretin (orexin): robust innervation of the spinal cord. *J Neurosci* 19, 3171-3182 (1999).
15. Blanco, M., Lopez, M., Garcia-Caballero, T., *et al.* Cellular localization of orexin receptors in human pituitary. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1616-1619 (2001).
16. Johren, O., Neidert, S.J., Kummer, M., *et al.* Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology* 142, 3324-3331 (2001).
17. Caillol, M., Aioun, J., Baly, C., *et al.* Localization of orexins and their receptors in the rat olfactory system: possible modulation of olfactory perception by a neuropeptide synthesized centrally or locally. *Brain Res* 960, 48-61 (2003).
18. Kirchgessner, A.L. & Liu, M. Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron* 24, 941-951 (1999).
19. Nowak, K.W., Strowski, M.Z., Switonska, M.M., *et al.* Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes. *Int J Mol Med* 15, 969-972 (2005).

20. Digby, J.E., Chen, J., Tang, J.Y., *et al.* Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects of orexin-A and orexin-B. *J Endocrinol* 191, 129-136 (2006).
21. Delgado, J.M. & Anand, B.K. Increase of food intake induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Am J Physiol* 172, 162-168 (1953).
22. Sweet, D.C., Levine, A.S., Billington, C.J., *et al.* Feeding response to central orexins. *Brain Res* 821, 535-538 (1999).
23. Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., *et al.* Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight. *Brain Res* 849, 248-252 (1999).
24. Haynes, A.C., Jackson, B., Overend, P., *et al.* Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides* 20, 1099-1105 (1999).
25. Yamamoto, Y., Ueta, Y., Date, Y., *et al.* Down regulation of the prepro-orexin gene expression in genetically obese mice. *Brain Res Mol Brain Res* 65, 14-22 (1999).
26. Griffond, B., Risold, P.Y., Jacquemard, C., *et al.* Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area. *Neurosci Lett* 262, 77-80 (1999).
27. Yamada, H., Okumura, T., Motomura, W., *et al.* Inhibition of food intake by central injection of anti-orexin antibody in fasted rats. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 527-531 (2000).
28. Kunii, K., Yamanaka, A., Nambu, T., *et al.* Orexins/hypocretins regulate drinking behaviour. *Brain Res* 842, 256-261 (1999).
29. Bourgin, P., Huitron-Resendiz, S., Spier, A.D., *et al.* Hypocretin-1 modulates rapid eye movement sleep through activation of locus coeruleus neurons. *J Neurosci* 20, 7760-7765 (2000).
30. Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., *et al.* Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* 98, 437-451 (1999).
31. Lin, L., Faraco, J., Li, R., *et al.* The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* 98, 365-376 (1999).
32. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 145-171 (2000).
33. Rajala, M.W. & Scherer, P.E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765-3773 (2003).
34. Trayhurn, P. & Beattie, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329-339 (2001).
35. Waki, H. & Tontonoz, P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2, 31-56 (2007).
36. Friedman, J.M. & Halaas, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395, 763-770 (1998).
37. Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312 (2001).
38. Yki-Jarvinen, H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 351, 1106-1118 (2004).
39. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946 (2001).
40. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295 (2002).
41. Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257, 79-83 (1999).

42. Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1595-1599 (2000).
43. Combs, T.P., Wagner, J.A., Berger, J., *et al.* Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 143, 998-1007 (2002).
44. Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219, 713-725 (1994).
45. Wood, I.S. & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9 (2003).
46. Hainault, I., Guerre-Millo, M., Guichard, C., *et al.* Differential regulation of adipose tissue glucose transporters in genetic obesity (fatty rat). Selective increase in the adipose cell/muscle glucose transporter (GLUT 4) expression. *J Clin Invest* 87, 1127-1131 (1991).
47. Foster, L.J. & Klip, A. Mechanism and regulation of GLUT-4 vesicle fusion in muscle and fat cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C877-890 (2000).
48. Bryant, N.J., Govers, R. & James, D.E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 267-277 (2002).
49. Switonska, M.M., Kaczmarek, P., Malendowicz, L.K., *et al.* Orexins and adipoinular axis function in the rat. *Regul Pept* 104, 69-73 (2002).
50. Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386 (2004).
51. Arner, P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 471-482 (2005).
52. Zwirska-Korczala, K., Adamczyk-Sowa, M., Sowa, P., *et al.* Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 1, 53-64 (2007).
53. Skrzypski, M., Kaczmarek, P., Le, T.T., *et al.* Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Lett* 586, 4157-4164 (2012).
54. Kuru, M., Ueta, Y., Serino, R., *et al.* Centrally administered orexin/hypocretin activates HPA axis in rats. *Neuroreport* 11, 1977-1980 (2000).
55. Pu, S., Jain, M.R., Kalra, P.S., *et al.* Orexins, a novel family of hypothalamic neuropeptides, modulate pituitary luteinizing hormone secretion in an ovarian steroid-dependent manner. *Regul Pept* 78, 133-136 (1998).
56. Hagan, J.J., Leslie, R.A., Patel, S., *et al.* Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10911-10916 (1999).
57. Seoane, L.M., Tovar, S.A., Perez, D., *et al.* Orexin A suppresses in vivo GH secretion. *Eur J Endocrinol* 150, 731-736 (2004).
58. Mitsuma, T., Hirooka, Y., Mori, Y., *et al.* Effects of orexin A on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin secretion in rats. *Horm Metab Res* 31, 606-609 (1999).
59. Ouedraogo, R., Naslund, E. & Kirchgessner, A.L. Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas. *Diabetes* 52, 111-117 (2003).
60. Ehrstrom, M., Naslund, E., Levin, F., *et al.* Pharmacokinetic profile of orexin A and effects on plasma insulin and glucagon in the rat. *Regul Pept* 119, 209-212 (2004).
61. Nowak, K.W., Mackowiak, P., Switonska, M.M., *et al.* Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci* 66, 449-454 (2000).
62. Goncz, E., Strowski, M.Z., Grotzinger, C., *et al.* Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway. *Endocrinology* 149, 1618-1626 (2008).

63. Russell, S.H., Kim, M.S., Small, C.J., *et al.* Central administration of orexin A suppresses basal and domperidone stimulated plasma prolactin. *J Neuroendocrinol* 12, 1213-1218 (2000).
64. Strowski, M.Z., Parmar, R.M., Blake, A.D., *et al.* Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology* 141, 111-117 (2000).
65. Kayaba, Y., Nakamura, A., Kasuya, Y., *et al.* Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R581-593 (2003).
66. Shirasaka, T., Nakazato, M., Matsukura, S., *et al.* Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *Am J Physiol* 277, R1780-1785 (1999).
67. Chen, C.T., Hwang, L.L., Chang, J.K., *et al.* Pressor effects of orexins injected intracisternally and to rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R692-697 (2000).
68. Matsumura, K., Tsuchihashi, T. & Abe, I. Central orexin-A augments sympathoadrenal outflow in conscious rabbits. *Hypertension* 37, 1382-1387 (2001).
69. Malendowicz, L.K., Hochol, A., Ziolkowska, A., *et al.* Prolonged orexin administration stimulates steroid-hormone secretion, acting directly on the rat adrenal gland. *Int J Mol Med* 7, 401-404 (2001).
70. Krahn, L.E., Black, J.L. & Silber, M.H. Narcolepsy: new understanding of irresistible sleep. *Mayo Clin Proc* 76, 185-194 (2001).
71. Nishino, S., Ripley, B., Overeem, S., *et al.* Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet* 355, 39-40 (2000).
72. Thannickal, T.C., Moore, R.Y., Nienhuis, R., *et al.* Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* 27, 469-474 (2000).
73. Honda, Y., Doi, Y., Ninomiya, R. *et al.* Increased frequency of non-insulin-dependent diabetes mellitus among narcoleptic patients. *Sleep* 9, 254-259 (1986).
74. Schuld, A., Hebebrand, J., Geller, F. *et al.* Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *Lancet* 355, 1274-1275 (2000).
75. Adam, J.A., Menheere, P.P., van Dielen, F.M., *et al.* Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 274-276 (2002).
76. Lubkin, M. & Stricker-Krongrad, A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 241-245 (1998).
77. Funato, H., Tsai, A.L., Willie, J.T., *et al.* Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. *Cell Metab* 9, 64-76 (2009).
78. Tsuneki, H., Murata, S., Anzawa, Y., *et al.* Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice. *Diabetologia* 51, 657-667 (2008).
79. Tsuneki, H., Sugihara, Y., Honda, R., *et al.* Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice. *Eur J Pharmacol* 448, 245-252 (2002).
80. Hermansen, K. & Mortensen, L.S. Bodyweight changes associated with antihyperglycaemic agents in type 2 diabetes mellitus. *Drug Saf* 30, 1127-1142 (2007).
81. Nugent, C., Prins, J.B., Whitehead, J.P., *et al.* Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR gamma agonists is maintained in cells expressing a PPAR gamma dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR gamma activation. *Mol Endocrinol* 15, 1729-1738 (2001).
82. Nakabayashi, M., Suzuki, T., Takahashi, K., *et al.* Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol Cell Endocrinol* 205, 43-50 (2003).

83. Engelman, J.A., Luo, J. & Cantley, L.C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619 (2006).
84. Sikder, D. & Kodadek, T. The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity. *Genes Dev* 21, 2995-3005 (2007).
85. Skrzypski, M., T, T.L., Kaczmarek, P., *et al.* Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia* 54, 1841-1852 (2011).
86. Wortley, K.E., Chang, G.Q., Davydova, Z., *et al.* Peptides that regulate food intake: orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284, R1454-1465 (2003).
87. Xia, X. & Serrero, G. Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *J Cell Physiol* 178, 9-16 (1999).
88. Shen, J., Tanida, M., Yao, J.F., *et al.* Biphasic effects of orexin-A on autonomic nerve activity and lipolysis. *Neurosci Lett* 444, 166-171 (2008).
89. Shiuchi, T., Haque, M.S., Okamoto, S., *et al.* Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab* 10, 466-480 (2009).
90. Tontonoz, P., Graves, R.A., Budavari, A.I., *et al.* Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 22, 5628-5634 (1994).
91. Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 135, 798-800 (1994).
92. Giusti, V., Verdumo, C., Suter, M., *et al.* Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women. *Diabetes* 52, 1673-1676 (2003).
93. Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., *et al.* mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8, 1224-1234 (1994).
94. Tontonoz, P., Hu, E. & Spiegelman, B.M. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156 (1994).
95. Rieusset, J., Andreelli, F., Auboeuf, D., *et al.* Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes* 48, 699-705 (1999).
96. Zhang, J., Fu, M., Cui, T., *et al.* Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10703-10708 (2004).
97. Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 116, 1784-1792 (2006).
98. Fonseca, V. Effect of thiazolidinediones on body weight in patients with diabetes mellitus. *Am J Med* 115 Suppl 8A, 42S-48S (2003).

7. Anhang

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Thao Thu Le, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung von Orexinrezeptoren in 3T3-L1 Adipozyten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Thao Thu Le hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: M. Skrzypski, **T. T. Le**, P. Kaczmarek, E. Pruszynska-Oszmalek, P. Pietrzak, D. Szczepankiewicz, P. A. Kolodziejcki, M. Sassek, A. Arafat, B. Wiedenmann, K. W. Nowak, M. Z. Strowski: Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia* 54, 1841-1852 (2011)

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung bei der Erhebung der Primärdaten (Vorbereitung und Durchführung der Versuche mit den 3T3-L1 Zellen), Statistische Auswertung der erhobenen Messwerte, Kritische Revision des gesamten Manuskripts

Publikation 2: M. Skrzypski, P. Kaczmarek, **T.T. Le**, T. Wojciechowicz, E. Pruszyńska-Oszmalek, D. Szczepankiewicz, M. Sassek, A. Arafat, B. Wiedenmann, K.W. Nowak, M.Z. Strowski: Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Lett* 586, 4157-4164 (2012)

Beitrag im Einzelnen:

Mitwirkung bei der Erhebung der Primärdaten (Vorbereitung und Durchführung der Versuche), Kritische Revision des gesamten Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten

M. Skrzypski, **T.T. Le**, P. Kaczmarek, E. Pruszyńska-Oszmalek, P. Pietrzak, D. Szczepankiewicz, P. A. Kolodziejcki, M. Sassek, A. Arafat, B. Wiedenmann, K. W. Nowak, M. Z. Strowski: Orexin A stimulates glucose uptake, lipid accumulation and adiponectin secretion from 3T3-L1 adipocytes and isolated primary rat adipocytes. *Diabetologia* 54, 1841-1852 (2011).

M. Skrzypski, P. Kaczmarek, **T.T. Le**, T. Wojciechowicz, E. Pruszyńska-Oszmalek, D. Szczepankiewicz, M. Sassek, A. Arafat, B. Wiedenmann, K.W. Nowak, M.Z. Strowski: Effects of orexin A on proliferation, survival, apoptosis and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes into mature adipocytes. *FEBS Lett* 586, 4157-4164 (2012).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Mathias Strowski für die Überlassung des Themas meiner Dissertation und für die erstklassige Betreuung. Er stand jederzeit für Rücksprachen und Fragen zur Verfügung. Seine kompetente Anleitung und die hilfreichen Ideen waren für mich sehr wertvoll. Ich bin ihm auch sehr dankbar dafür, dass er mich entscheiden ließ, wann ich diese Arbeit vollende. Zusätzlich möchte ich ihm dafür danken, dass er mich in der Zeit motiviert hat, in der ich an die erfolgreiche Beendigung des Promotionsverfahrens nicht mehr geglaubt hatte.

Ich möchte Marek Skrzypski meinen herzlichen Dank aussprechen. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen. Er hat mir Zusammenhänge sehr gut erklären können, stand ebenfalls jederzeit für Fragen und Diskussionen zur Verfügung und ich bin sehr dankbar dafür, dass ich mit ihm arbeiten durfte. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mir sehr viel Spaß bereitet.

Dank verdienen ebenfalls Franzi Hofmann, Dr. med. Eva Göncz, Dr. rer. nat. Carsten Grötzinger, Yvonne Giesecke und Ines Eichhorn der AG Strowski und AG Grötzinger für die hilfreichen Tipps im Laboralltag, die Beantwortung der vielen Fragen, die angenehme Zusammenarbeit im Labor und für die konstruktive Kritik.

Auf diesem Wege möchte ich auch meinen Eltern zutiefst danken, denen ich diese Dissertation gewidmet habe. Ohne sie wäre ich an diesem Punkt, an dem ich mich derzeit befinde, nie angelangt.

Ich danke meinem Sohn, Duy Chase, für die Kraft und Freude, die er mir allein durch seine Anwesenheit gibt.

Ich möchte allen Freunden und meinen Geschwistern danken, die immer an mich geglaubt haben und mich motiviert haben. Meinen Freundinnen, Sora Jung und Juliane Wegener, danke ich fürs Korrekturlesen.