

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Substanzen

26 S - Inkubationspuffer (450 mM Tris HCl, pH 8,2; 90 mM KCl; 15 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ ; 15 mM MgCl ₂)	Sigma (Taufkirchen, D)
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer-Mannheim (Mannheim, D)
Agarose: Seakem LE Agarose	FMC Bio-Products (Hamburg, D)
Ang II	Sigma (Taufkirchen, D)
CBP 42112-A	Sigma (Taufkirchen, D)
Chloroform	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Coomassie-Lösung	Sigma (Taufkirchen, D)
Dimethylsulfoxid	Sigma (Taufkirchen, D)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Taufkirchen, D)
Eprosartan	Solvay (Hannover, D)
Ethanol 96 %	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Fluorogenes Substrat Suc-LLVY-MCA (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin- 4-Methyl-7-Coumarylamid, 2 mM)	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Formaldehyd	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Formalinlösung	Sigma (Taufkirchen, D)
GW9662	Alexis (Grünberg, D)
Irbesartan	Sanofi-Aventis (Berlin, D)
Isofluran	CuraMed (Karlsruhe, D)

Isopropanol	J.T. Baker (Phillipsburg, USA)
Methylcoumarylamid (MCA)	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Paraffin	Sigma (Taufkirchen, D)
PD123319	Sigma (Taufkirchen, D)
Phosphokreatin	Calbiochem (Merck, Darmstadt, D)
Phosphokreatinkinase	Sigma (Taufkirchen, D)
Pioglitazon	Takeda (Osaka, Japan)
Ponceau-S-Lösung	Sigma (Taufkirchen, D)
Proteasominhibitoren (MG 132, MG 262, Lactacystin)	Calbiochem (Merck, Darmstadt, D)
Telmisartan	Boehringer-Ingelheim (Ingelheim, D)
Ultra-Pure Water	Sigma (Taufkirchen, D)

2.1.2. Kits

Absolutely RNA RT-PCR Miniprep Kit	Stratagene (La Jolla, USA)
BCA Protein Assay Reagent Kit	PerBio Science (Pierce Biotechnology Inc.; Bonn, D)
Mouse/ Rat Insulin ELISA Kit	Linco Research (St. Charles, USA)
Mouse/ Rat Adiponektin ELISA Kit	B-Bridge (Sunnyvale, USA)
Enzymatic-colorimetric Glucose-test	Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien)
Enzymatic-colorimetric Triglyzerid-test	Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien)

2.1.3. Nukleotide und Primer

Nukleotide.

dNTPs

Promega (Mannheim, D)

Primer.

Alle Primer wurden mit dem Programm *Primer Express 2.0* der Firma Applied Biosystems entworfen, welches optimierte Algorithmen für die Benutzung mit dem *TaqMan Realtime-PCR* - System hat. Beide Primer wurden jeweils gegen das gesamte Organismusgenom geblastet (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) und auf die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten hin überprüft.

Bei Realtime-PCRs wurden Systeme ohne Sonden für die Benutzung mit dem Sybrgreen® Mastermix, oder mit Sonden benutzt (siehe Tabelle 2.1.). Alle Sonden wurden mit 5'-FAM als Farbstoff und 3'-TAMRA als Quencher markiert (XT als Verbindungsbase).

Alle Primer wurden bei Tib-MolBiol (Berlin, D) synthetisiert. Für die semiquantitative RT-PCR ist in der nachfolgenden Tabelle der entsprechende Forward- und Reverse-Primer, und für die quantitative Realtime-PCR noch zusätzlich die dafür nötige SONDENSEQUENZ angegeben.

Tabelle 2.1. : Verzeichnis der verwendeten Primer .

(m=Maus, r=Ratte, semi=semiquantitative RT-PCR, real=quantitative realtime-PCR)

Gen	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Sonde 5'- 3'	Annealing-Temp.(°C)
mAdiponektin (semi)	TCTgACgACACC AAAaggC	TgAgCgATACACA TAAgCggC		60
Rβ-Actin (semi)	gAgggAAACgTgC gTgACAT	ACATCTgCTggAA ggTggACA		57
mAT1R (semi)	CACCTATgTAAg ATCgCTTC	gCACAATCgCCAT AATTATC		54
mAT2R (semi)	CTggCACCAATg AgTCCgCC	gCAgCTgCCATCT TCaggAC		58
mHPRT (semi)	CTGGTGAAAAG GACCTCT	CACAggACTAgAA CACCTg		60
mAdiponektin (real)	TCCTggAgAgAAg ggAgAgAAAg	CCCTTCAgCTCCT gTCATTCC	TgCAggTCTTCTT ggTCCTAAgggTg A gA	60
rAdiponektin (real)	gATACCgggCCg TgATgg	TCCAgCCCTACgC TgAATg	AAgggAgACgCAg gTgTTCTTggTCC	60
maP2 (real)	TgggTgAAACTCT gggAgATTC	AATCCCCATTTAC gCTgATgATC	TgCCACAaggAA AgTggCAggCA	60
M18s (real)	ACCTggTTgATC CTgCCAgTAg	TTAATgAgCCAT TCgCAgTTTC	TgCATgTCTAAg TACgCACggCCg T	60
rβ-Actin (real)	ATCgCTgACAagg ATgCAgAAg	CgCTCT ggAggAgCAATgAT	AgATTACTgCCCT ggCTCCTAgCAC CA	60

2.1.4. Molekulargewichtsmarker

Semiquantitative RT-PCR.

GeneRuler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas (St Leon-Roth, D)
GeneRuler 1 kbp DNA Ladder	MBI Fermentas (St Leon-Roth, D)

Western Blotting.

Prestained SDS-PAGE Standard (Broad Range)	BioRad (München, D)
---	---------------------

2.1.5. Enzyme

DNase	Promega (Mannheim, D)
M-MLV RT RNase H Minus	Promega (Mannheim, D)
RNasin	Promega (Mannheim, D)
Taq-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.1.6. Antikörper

Anti-Maus-Adiponektin (Maus monoklonal)	Chemicon (Temecula, USA)
Anti-Maus-GAPDH (Kaninchen, polyklonal)	Abcam (Cambridge, UK)
Anti-Maus-IgG (Horseradish Peroxidase Linked)	Amersham-Pharmacia (Freiburg, D)
Anti-Kaninchen-IgG (Horseradish Peroxidase Linked)	Amersham-Pharmacia (Freiburg, D)

2.1.7. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Bovines Serum Albumin	Sigma (Taufkirchen, D)
Dexamethason (2 mM)	Sigma (Taufkirchen, D)
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM; (High Gluc.; mit L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
DMEM/ F12 (incl. HEPES und L-Glutamin)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Foetales Rinderserum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Insulin	Sigma (Taufkirchen, D)
Isobutylmethylxanthin (IBMX, 50 mM)	Sigma (Taufkirchen, D)
Oil-Red-O Lösung	Sigma (Taufkirchen, D)
Penicillin(10000 U/ ml)/	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Streptomycin(10000 µg/ ml)	
Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Trypsin/ EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ponceau-S-Lösung	Sigma (Taufkirchen, D)

2.1.8. Versuchstiere und Zelllinien

3T3-L1 Zellen	ATCC (Mannassas; USA)
männliche, adipöse	
Zucker <i>fa/ fa</i> Ratten	Harlan-Winkelmann (Borchen)

2.1.9. Ausgewählte Zusatzmaterialien

Filmmaterial.

Hyperfilm	Amersham-Pharmacia (Freiburg, D)
Fotochemikalien (Entwickler, Fixierer)	AGFA (Köln, D)

Membranen und Filter.

Hybond-P PVDF Membran	Amersham-Pharmacia (Freiburg, D)
Hybond-C extra Nitrocellulose Membran	Amersham-Pharmacia (Freiburg, D)
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher&Schüll (Nürnberg, D)

Operationszubehör.

Diverse Scheren und Pinzetten	Becton-Dickenson (Sparks, USA)
Hämatokritröhrchen	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, D)

Zellkulturzubehör.

Zellkulturplatten + -flaschen in diversen Größen	Nunc (Wiesbaden, D); BD Bioscience (Heidelberg, D)
Einmalküvetten # 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)

2.1.10. Puffer und Lösungen

Für gebräuchliche molekularbiologische Techniken wurden, sofern nicht extra erwähnt, Puffer und Lösungen nach Standardprotokollen [124] hergestellt. Hierfür wurde nur gereinigtes Wasser (Millipore) verwendet. Nachfolgend sind einige ausgewählte Puffer aufgelistet, die hauptsächlich für die Western-Blot-Methode gebraucht wurden.

Proteinlysepuffer:	20 mM Tris-Base (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2,5 mM Triton-X, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 Tablette Proteasominhibitoren Complete-Mini auf 1,5 ml
TBS-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl
TBS-T-Puffer:	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20 (v/v)
Towbinpuffer:	25 mM Tris, 1,92 M Glycin, 20 % Methanol und 0,07 % SDS
Trenn-/ Sammelgelpuffer:	ddH ₂ O; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 10 % SDS-Stammlösung; 30 % Bis-Acrylamid; 10 % Ammoniumpersulfat; TEMED
Probenpuffer:	ddH ₂ O; 0,25 M Tris-HCl pH 6,8; 8,5 SDS; 40 % Glycerol; 20 % 2-Mercaptoethanol; 0,01 % Bromphenolblau
Elektrodenpuffer:	ddH ₂ O; 0,25 M Tris-HCl pH 8,3; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (10 x)
Blotpuffer:	ddH ₂ O; 48 mM Tris-HCl; 39 mM Glycin; 0,375 % SDS; 20 % Methanol

2.1.11. Material und Geräte

Bestimmung der Proteasomaktivität.

Fluoreszenzmessgerät FL _x 800	Bio-Tek Instruments (Vermont, USA)
96 well Platten (schwarz)	E & K scientific (Campbell, USA)

Zellkultur.

Neubauerzählkammer	Marienfeld GmbH (Lauda-Königshofen, D)
Mikroskop: Olympus CK 40	Olympus (Hamburg, D)
Laminar-Flow-Arbeitsbank: LaminAir 1.2.	Heto-Holten (Allerød, DK)
CO ₂ -Inkubator: HeraCell 150	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge: Universal 32 R	Hettich (Bäch, CH)

RNA-Expressionsbestimmung.

UV-Meter: DU 530	Beckman (Krefeld, D)
RT-PCR-Cycler: iCycler	Biorad (München, D)
Realtime-PCR-Cycler: Abi Prism 7000	Applied Biosystems (Darmstadt, D)

Western Blotting.

Semi DryBlotter: Transblot SD Transfer Cell	BioRad (Hercules, USA)
Spektrophotometer: SmartSpec	BioRad (Hercules, USA)

Tierversuche.

Käfige: Makrolonkäfig Typ 4	Indulab (Gams, CH)
Waage: PK 2000	Mettler (Giessen, D)
2-Fr Millar Mikro-Tip Katheter-Transducer	Millar Instruments (Houston, USA)

ELISAs.

Spektrophotometer: Benchmark Plus	BioRad (Hercules, USA)
-----------------------------------	------------------------

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Kultivierung. Die 3T3-L1 Zellen, welche von der American Type Culture Collection (ATCC) gekauft wurden, wurden standardmäßig bei 37 °C und 5 % CO₂ in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), welches 10 % foetales Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/ Streptomycin enthielt, kultiviert (siehe 2.1.7.; [125]). Falls die Bedingungen während eines Versuchs davon abwichen, wurde dies direkt im Text angegeben und erläutert.

Zellzählung. Die Zählung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop in der Neubauerzählkammer, die in 16 Quadrate unterteilt ist, wobei jedes Quadrat einem Volumen von 0,1 µl entspricht. Nach Bildung des Mittelwertes der Zellzählung aus vier Quadraten multipliziert mit dem Faktor 10000 konnte die Zellanzahl pro Milliliter angegeben werden [126].

Passagierung. Für die Stammerhaltung und für die Selektion wurden die Zellen bis zu einer maximalen Konfluenz von 50 % kultiviert und anschließend passagiert, wobei jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel erfolgte. Nach Entfernen des Nährmediums wurden die Zellen dazu einmal mit 1x PBS-Lösung gewaschen und mit einer Trypsinlösung behandelt. Die Trypsinisierung erfolgte für 2 min bei 37 °C und den Zellen entsprechenden CO₂-Gehalt. Das vollständige Lösen der Zellen wurde durch Klopfen der Schalen erreicht. Nach Aufnehmen der Zellen in frischem, 37 °C warmem Zellkulturmedium wurden sie mit einer zehnpromzentigen Konfluenz ausgesät.

Differenzierung. Für die Differenzierung der 3T3-L1 Präadipozyten zu Adipozyten wurden die Zellen bis zur Konfluenz in Kulturmedium (DMEM mit Rinderserum und Antibiotika) kultiviert und dabei jeden zweiten Tag das Medium erneuert. Nach Erreichen der Konfluenz wurde frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen in diesem Medium für zwei weitere Tage kultiviert. Zur Induktion der Differenzierung in den zwei Tage postkonfluenten Zellen (Tag 0 der Differenzierung) wurden die Zellen für 3 Tage in einem Differenzierungsmix, welcher zusätzlich zu dem o.g. Kulturmedium noch Dexamethason (0,5 µM), Insulin (1 µg/ml) und Isobutylmethylxanthin (IBMX, 500 µM) enthielt, inkubiert. An Tag 3 wurde das Medium erneuert, diesmal jedoch nur mit Insulin (1 µg/ml) als Zusatz. An Tag 5 und 7 erfolgten dann zwei weitere Medienwechsel, bevor die Differenzierung vollständig abgeschlossen war (Tag 7; [127]). Der Grad der Zelldifferenzierung wurde durch Lipidfärbung mit Oil Red O [125] bzw. durch Mikroskopie kontrolliert (siehe Kapitel 2.2.1.). Für die Experimente wurden nur Zellkolonien verwendet, die zu mindestens 90 % differenziert waren.

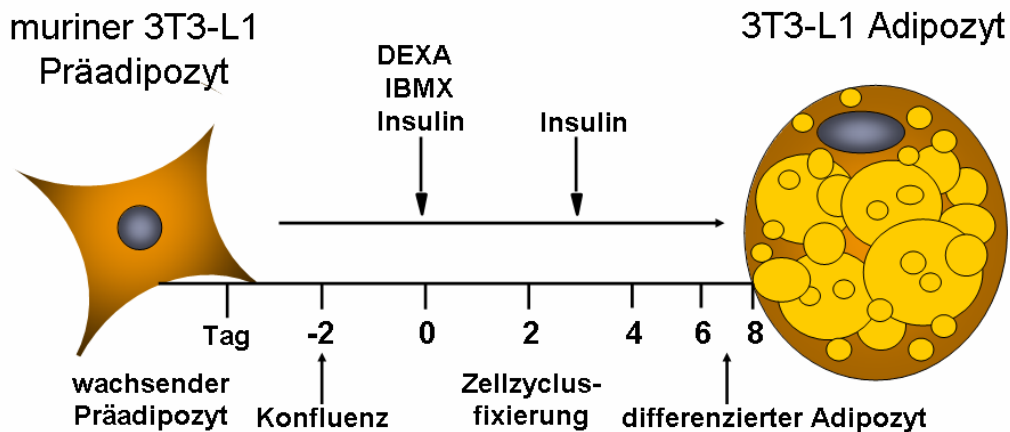


Abbildung 2.1.: 3T3-L1 Differenzierungsschema.

Öl-Rot-O Färbung. Der Nachweis differenzierter, lipidhaltiger Zellen erfolgte durch die Öl-Rot-O-Färbung. Dazu wurden die Zellen zunächst mit einer PBS-Lösung gewaschen und danach für eine Stunde in 3,7 %-igem Formaldehyd fixiert. Für die Lipidfärbung wurden die Zellen für eine Stunde mit der Öl-Rot-O-Färbelösung (0,3 % Öl-Rot-O, 60 ml Isopropanol, 40 ml Wasser) behandelt. Nach Entfernen der Lösung wurden die Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und konnten anschließend photographiert werden [125].

Mikroskopie. Der Grad der Konfluenz, die Qualität der Zellen in jedem Status der Zellkultur sowie der Grad der Differenzierung wurden mikroskopisch mit dem *Olympus CK 40* Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung überprüft.

Serumentzug und Behandlung von 3T3-L1 Adipozyten. Standardmäßig wurden die differenzierten 3T3-L1 Adipozyten am Tag 7 mit PBS gewaschen und mit dem DMEM-Nährmedium, welches 0,5 % FBS enthielt, für 16 h versetzt. Nach diesem Zeitraum wurde ohne erneutes Waschen mit PBS das Medium (ebenfalls mit 0,5 % FBS) erneuert, welches bereits die entsprechenden pharmakologischen Wirkstoffe enthielt. Abweichungen von dieser Prozedur sind direkt im Text des Ergebnisteils erleutert.

2.2.2. Analyse der mRNA-Expression

Zellyse aus 3T3-L1 Zellkulturen. Die Zellyse erfolgte nach der Guanidiniumthiocyanat-Methode [128]. Für diese wurde das Medium aus den Zellkulturschalen entfernt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem Entfernen der PBS-Lösung wurde pro 100.000 Zellen 100 µl einer Mischung aus Zellysepuffer und β-Mercaptoethanol (143:1) auf die Zellen gegeben und diese mit einem sterilen Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellysemischung stammte aus dem RNA-Isolationskit, welches für die nachfolgende RNA-Isolation verwendet wurde. Sie enthielt Guanidiniumthiocyanat, das die Proteine denaturiert und die RNA-Degradation durch RNAsen verhindert [129]. Das so stabilisierte Zellgemisch wurde entweder direkt weiterverwendet oder für eine spätere RNA-Isolation bei 80 °C eingefroren.

Zellyse aus Rattenfettgewebe. Ein Stückchen des bei 80 °C gelagerten Rattenfettgewebes wurde auf Trockeneis gewogen und danach in einem Mörser zusammen mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen und dieses sofort in die o.g. Zellysepuffer-/ β-Mercaptoethanol-Mischung (1ml pro 100 mg Gewebe) gegeben. Daraufhin wurde das stabilisierte Zellgemisch entweder direkt weiterverwendet oder für eine spätere RNA-Isolation bei 80 °C eingefroren.

RNA-Isolation. Zur RNA-Isolation wurde das *Absolutely RNA RT-PCR* Miniprep Kit von Stratagene verwendet. Nach der Zellyse wurde die Probe zunächst in einem Zentrifugenröhrchen gefiltert, um grobe Partikel und ein Teil der DNA zu entfernen. Das Filtrat wurde dann in ein weiteres Zentrifugenröhrchen transferiert, welches eine silziumbasierte Fasermatrix enthielt, an der die RNA binden konnte. Durch Behandlung mit einem Niedrig-Salz Puffer und DNase-Verdau wurde die restliche DNA entfernt. Eine weitere Waschserie mit Hoch- und Niedrigsalz Puffer entfernte die DNase und andere Proteine. Zum Schluss

wurde die reine RNA mit einer geringen Menge (30 μ l) Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl [pH 7,5] und 0,1 mM EDTA) bei etwa 50 °C von der Matrix gelöst und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80 °C eingefroren.

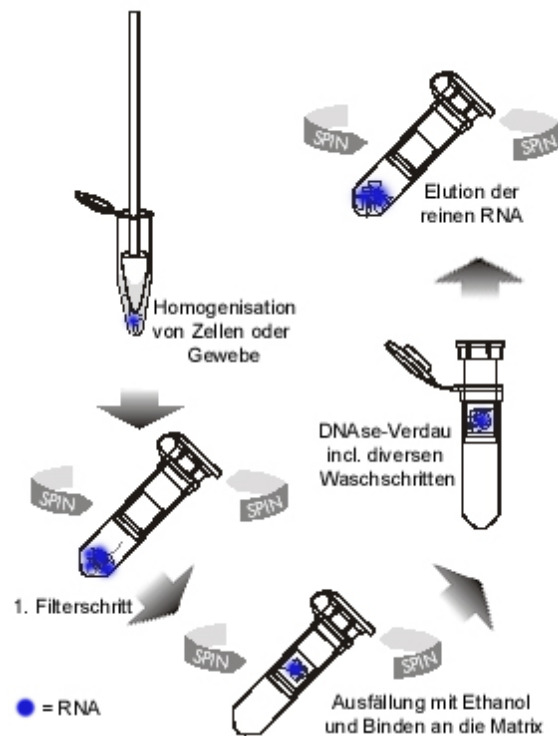


Abbildung 2.2.: RNA-Isolationsmethode.

(nach dem *Absolutely RNA RT-PCR* Miniprep-Kit von Stratagene)

RNA-Qualitätskontrolle. Zur Sicherstellung der Qualität der isolierten mRNA wurde der Absorptionsquotient bestimmt. Das Verhältnis A_{260} zu A_{280} läßt auf die Reinheit der RNA schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. Ein kleineres Verhältnis weist auf Verunreinigungen mit Proteinen bzw. Salzurückständen hin, die dann beim Umschreiben in cDNA und bei Real-Time PCRs zu möglichen Ungenauigkeiten führen können. In dieser Arbeit wurden nur Proben mit einem Zahlenwert größer als 1,6 verwendet.

Als weitere Kontrolle diente ein TBE-Agarose Gel, auf das 1 μg mRNA aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wird. Die prominenten mitochondrialen Untereinheiten 18 und 28s sollen dann als Banden durch Ethidiumbromideinlagerung sichtbar sein wie in Abbildung 2.3. gezeigt wird. Degradation bzw. Rückstände von genomischer DNA-Verunreinigung in den Taschen können auf diese Weise visuell identifiziert werden.

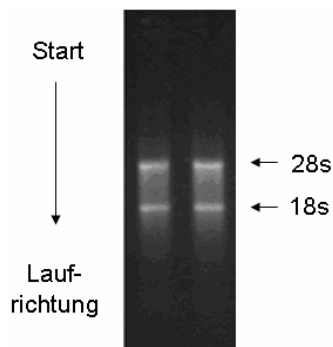


Abbildung 2.3.: mRNA-Qualitätskontrolle mittels eines TBE-Agarosegels.

RNA-Quantifizierung. UV-Licht führt zur Anregung zyklisch konjugierter π Elektronen der Pyrimidin- und Purinbasen. Nukleinsäuren besitzen bei Wellenlängen um 260 nm ein Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der wässrigen RNA-Lösung wurde deren Absorption in Quarzküvetten mit einem UV-Meter bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Der Wert der Absorption bei 260 nm (A_{260}) diene als Grundlage für die Errechnung der Konzentration unter der Voraussetzung einer Schichtdicke von 1 cm [124]. Dabei musste die Absorption mit der Verdünnung und der Gerätekonstante (40) multipliziert werden, um die Konzentration der RNA (in $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu erhalten. Das Verhältnis A_{260} zu A_{280} läßt auf die Reinheit der RNA schließen und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen.

RT-Reaktion für die cDNA-Synthese. Die RT-Reaktion wurde nach einer von Sambroock beschriebenen Methode mit Reagenzien von Promega durchgeführt [124]. Dazu wurde 1 μg mRNA mit 1 μg Random-Primern in einem Volumen von 13,5 μl versetzt und die Mischung 5 Minuten bei 70 °C denaturiert. Die Probe wurde sofort auf Eis überführt und nach Abkühlung mit den folgenden Reagenzien versetzt:

0,5 μl RNAsin (Promega)
4 μl 5x First strand buffer (250 mM Tris-HCl
pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂)
1 μl 10 mM dNTP-Mix
1 μl M-MLV RT RNase H Minus (Promega)
20 μl Gesamtvolumen


Dieser Reaktionsansatz wurde dann für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und danach entweder bei 20 °C eingefroren oder sofort auf Eis für die Analyse der cDNA weiter verarbeitet.

Semiquantitative PCR. Polymerase-Kettenreaktionen erfordern oft gänzlich unterschiedliche Reaktionsbedingungen. Die hier dargestellten Inkubationszeiten und Komponentenkonzentrationen sind Richtwerte, die je nach Optimierungsbedarf verändert wurden.

Standard-PCR-Reaktionsansatz:

~	50	ng	cDNA / ~ 500 ng genomische DNA
	5	µl	10 x Reaktionspuffer
	1	µl	10 mM dNTPs
	1	µl	50 mM MgCl ₂ ,
	0,5	µl	20 µM Forward-Primer
	0,5	µl	20 µM Reverse-Primer
	0.25	µl	Taq-Polymerase (2 Units)
ad	50	µl	dd H ₂ O (Gesamtvolumen)

PCR-Programm:

32 Zyklen		2	Minuten	94 °C
		1	Minute	94 °C
		30	Sek.	Annealingtemperatur
		1-2	Minuten	72 °C
		10	Minuten	72 °C

Die Elongationszeit wurde entsprechend den Amplikonlängen angepasst. Um quantitative Aussagen treffen zu können, wurde vor der eigentlichen Probenvermessung eine Zyklusreihe aus einem Pool aller Proben erstellt. Um sicherzugehen, dass die Amplifikation in einem linear verlaufenden Bereich liegt, wurde die Zyklusanzahl im Bereich der maximalen Amplifikation gewählt (siehe Abbildung 2.4). Diese Prozedur wurde für jedes semiquantitativ zu vermessende Gen erstellt. Alle in den Ergebnissen gezeigten semiquantitativen PCRs wurden mindestens in 3 unabhängigen Experimenten bestätigt.

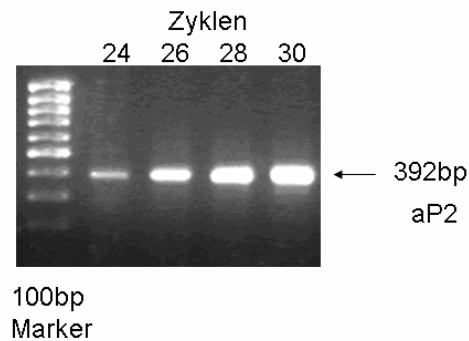


Abbildung 2.4.: Zyklusverlauf zur Ermittlung des linearen Bereiches der semiquantitativen RT-PCR.

Beispiel von aP2; zur Messung der Proben wurden später 25 Zyklen benutzt (Vorversuch zum Ergebnis 3.10.7.).

Quantitative PCR. Im Gegensatz zur semiquantitativen PCR kann bei der Real-Time PCR der gesamte Amplifikationsprozeß detektiert werden. Mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion, deren Intensität proportional zur Menge des Amplikons zunimmt, kann so direkt auf die enthaltene Menge einer Nukleotidsequenz geschlossen werden. Es wurden, wie oben bereits erwähnt, unspezifische Detektionssysteme (Sybrgreen®) wie auch spezifisch gelabelte Sonden eingesetzt. Die höhere Genauigkeit und Sensitivität dieser SONDENSYSTEME resultiert aus der sequenzspezifischen Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals. Sybrgreen wird zur Fluoreszenz durch Einlagerung in Doppelstränge befähigt. Die SONDENSYSTEME dagegen erhalten durch Hybridisierung an die Zielsequenz und Trennung der räumlichen Nähe des Quenchers vom Farbstoff durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der Polymerase die Fähigkeit zur Fluoreszenz.

Zur Messung wurde ein ABI 7000 Sequence Detection System verwendet, ausgerüstet mit der firmeneigenen Software in der Version 2.0. Alle Gene wurden mit dem gleichen Temperaturprogramm gemessen (siehe Abbildung 2.5.), die Annealingtemperatur wurde entsprechend den Primereigenschaften angepasst.

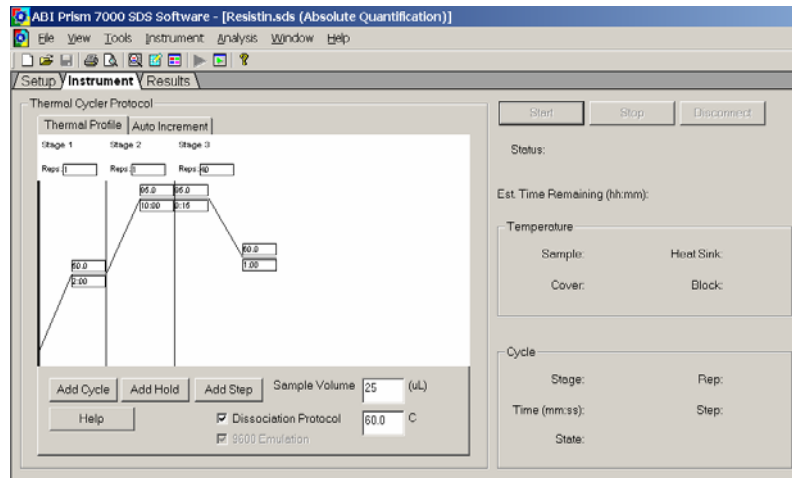


Abbildung 2.5.: Zyklusprogramm der Standard Realtime-PCR.

Zur quantitativen Auswertung der Ergebnisse wurde für jedes Gen eine Standardkurve erstellt, welche die Effizienz der Amplifikation widerspiegelt und zur Berechnung des Gehaltes notwendig ist. Abbildung 2.6. zeigt die Amplifikation eines Beispielgens, bestimmt mit einem Sybrgreen® Mastermix und entsprechenden Primern, von sich halbierenden Mengen eines cDNA-Pools aller Proben. Wie erwartet beträgt der Abstand zwischen den Amplifikationssignalen ca. einen Zyklus bei halber DNA-Menge. Die zwei untersten Kurven zeigen einen Ansatz ohne cDNA. Die durch den linear verlaufenden Bereich der Amplifikation gehende Linie wird als Schwellenwert bezeichnet, der zum Erhalt eines Zahlenwertes zum Vergleich der Proben herangezogen wird (ct-Wert). Links oben ist dann die mit der Tabellenkalkulationssoftware Excel erstellte Standardkurve zu sehen, bei welcher die ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen wird. Eine extrapolierte Gerade wird dann zur Berechnung der Proben verwendet, solange R^2 als Fehlerindikator größer als 0,99 ist.

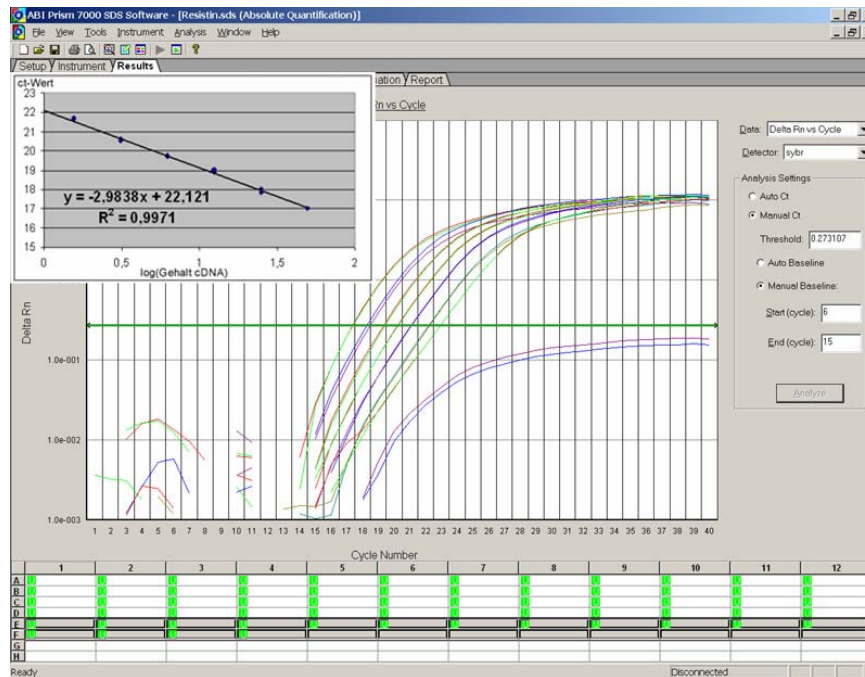


Abbildung 2.6.: Realtime-PCR Standardkurvenamplifikation und berechnete Kurve.

Diese Prozedur wurde für jedes gemessene Gen angewendet. Bei stark abweichenden Messwerten wurden die Proportionen der einzelnen Primer variiert bis sich reproduzierbare Standardkurven ergaben. Die Amplikons wurden jeweils mittels Agarosegelen auf die richtige Größe kontrolliert und zusätzlich bei Sybgreen-PCRs durch die Analyse der Schmelzkurve identifiziert.

Standard-Real-Time Reaktionsansatz:

~	10 ng	cDNA
	12,5 µl	2x Mastermix (mit oder ohne Sybgreen, von Applied Biosystem)
	0,25 µl	20 µM Forward-Primer
	0,25 µl	20 µM Reverse-Primer
	0,25 µl	20 µM Sonde (bei Sondensystemen ohne Sybgreen)
ad	<u>25 µl</u>	<u>dd H₂O (Gesamtvolumen)</u>

Jede Probe wurde mindestens dreifach vermessen und dann auf die Expression eines stabil exprimierten Genes (= *Houskeeping-Gen*), meist auf die mitochondriale Untereinheit 18 S, bezogen.

2.2.3. Analyse der Proteinexpression

Proteinisolation aus 3T3-L1 Zellen. Nach entsprechender Stimulation wurden die Fettzellen zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers oder mit Trypsin abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2000 g wurde der Überstand an PBS entfernt und das Pellet in Proteinlysepuffer aufgenommen. Nach Behandlung mit Ultraschall (6-10 Impulse mit einer Sekunde Länge bei mittlerer Frequenz) zur vollständigen Freisetzung der Proteine, wurde das Gemisch 30 min bei höchster g-Zahl zentrifugiert. Dabei setzten sich die Zellreste unten im Gefäß ab, während sich das freigesetzte Fett der Zellen an der Oberfläche anreicherte. Die proteinhaltige Lösung zwischen der Zellrest- und der Fettschicht wurde vorsichtig mit Hilfe einer dünnen Pipettenspitze abgesaugt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur Gehaltsbestimmung gelagert.

Proteinisolation aus Rattenfettgewebe. Ein Stückchen des bei -80 °C gelagerten Rattenfettgewebes wurde auf Trockeneis gewogen und danach in einem Mörser zusammen mit flüssigem Stickstoff zu Pulver zermahlen. Dieses wurde dann sofort in den o.g. Proteinlysepuffer gegeben und wie bei den 3T3-L1 Zellen weiter verarbeitet.

Proteinkonzentrationsbestimmung. Zur Gehaltsbestimmung von Proteinen wurde entweder das *BCA™ Protein Assay Reagent Kit* (Pierce, Bonn, D) oder das Bradford-Reagenz verwendet [130], je nach der Art des Puffers, indem die Proteine aufgenommen wurden. Bei beiden Methoden wurden durch Standardkurven lineare Bereiche zwischen Proteingehalt und Absorption des Farbkomplexes ermittelt und für die Berechnung der Proben herangezogen.

Western Blotting. Je nach Zielprotein wurden 10-50 µg Gesamtprotein mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und auf ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen, versehen mit einer 1 cm dicken Schicht eines niedrigprozentigem Sammelgels. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte nach Laemmli [131]. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine unter Verwendung einer *Semidry-Blotting* Apparatur (Biorad) oder einer Naßblottkammer (Biorad) auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Transferpuffer diente Towbinpuffer (25 mM Tris, 1,92 M Glycin, 20 % Methanol und 0,07 % SDS). Die Transferbedingungen des Blot-Apparaturherstellers wurden befolgt.

Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers der Proteine wurden die Membranen mit Ponceaufarbstoff und die Gele mit einer Coomassielösung gefärbt (siehe Abbildung 2.7.). Die Membran wurde sodann kurz in TBS-Puffer gewaschen und in TBS-Puffer mit 5 % Blockpuffer für 90 min geblockt. Der Erstantikörper wurde 1:10000 (Adiponektin) oder 1:1000 (β-Aktin) mit Blockpuffer (5 % Milchpulver) in TBS verdünnt und mit der Membran bei Raumtemperatur (1 h) oder bei 4 °C (über Nacht) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit TBS-T-Puffer entfernt. Der Zweitantikörper (aus dem Hasen gewonnener, Peroxidase-konjugierter Anti-Maus-Antikörper) wurde 1:10000 (Adiponektin) bzw. 1:1000 (β-Aktin) verdünnt und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Peroxidasereaktion mit ECL (Amersham Pharmacia) als Chemilumineszenz und die Auflage eines Filmes.

Nach entsprechender Expositionszeit (30 s bis 1 h) wurde der Film entwickelt und gescannt.

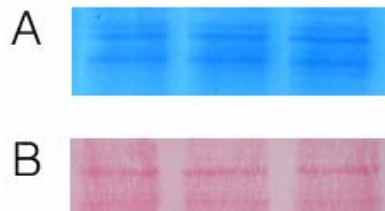


Abbildung 2.7.: **A:** Coomassie-Färbung. **B:** Ponceau-S-Färbung.

Nach dem Transfer auf die Membran wurden zur Erfolgskontrolle die auf dem Gel verbliebenden Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbung detektiert (**A**) und die auf die Membran übertragenen Proteine mit der Ponceau-S-Färbung nachgewiesen (**B**).

2.2.4. Bestimmung der Proteasomaktivität

Proteasomisolation. Zur Isolation der Proteasomen wurden die 3T3-L1-Adipozyten nach 24-stündiger Stimulation zweimal mit 2 ml PBS/ Well gewaschen. Nach vollständigem Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 80 μ l Aqua bidest. überschichtet und abgeschabt. Zur vorsichtigen Lyse wurde die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und wieder aufgetaut. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15.000 g (14.000 U/ min) und 4°C wurde der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.2.3.).

Proteasomaktivitätsassay. Das Prinzip der hier angewendeten Methode zur Bestimmung der Aktivität des Proteasoms beruht auf der Eigenschaft bestimmter Substrate des Proteasoms, erst nach Abbau durch Proteasomen zu fluoreszieren. Gibt man nun diese so genannten fluorogenen Substrate im

Überschuss zu isolierten Proteasomen bzw. Zellysaten, so ist die messbare Fluoreszenz proportional zur Aktivität der Proteasomen.

Zur Messung wurden pro Probe 10 µg Protein ad 20 µl Aqua bidest. verdünnt und in eine schwarze 96-well-Platte pipettiert (Dreifachwerte). Nun wurde der frisch angesetzte Reaktionsansatz hinzugefügt, die Platte in Aluminiumfolie eingewickelt und nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C die Fluoreszenz bestimmt. Als Standards diente reines MCA (0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM und 3 µM); die Leerwerte wurden mit Aqua bidest. gemessen.

Reaktionsansatz:

60	µl	3x 26S-Inkubationspuffer
0,22	µl	0,5 M Dithiothreitol (DTT)
6	µl	100 mM Adenosintriphosphat (ATP)
0,5	µl	1 M Phosphokreatin
0,2	µl	Phosphokreatinkinase (1 U/ µl)
10	µl	2 mM Suc-LLVY-MCA
23,3	µl	H ₂ O

2.2.5. Tierversuche

Rattenhaltung und Diät. Die Tiere wurden unter standartisierten Bedingungen entsprechend den Empfehlungen der FELASA (Federation of European Laboratory Animals Science Association) gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus war 12h/ 12h, die Fütterung erfolgte ad libitum (Haltungsdiät für Ratte und Maus V 1534-300 von Sniff) und die Tiere hatte freien Zugang zum Wasser, das täglich erneuert wurde. Sie wurden in Kleingruppen von 3 Tieren im Typ IV Standardkäfig gehalten.

Der Versuch wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt.

Bestimmung des Körpergewichts. Das Körpergewicht wurde alle 2 Tage mit Hilfe einer Tierwaage ermittelt.

Bestimmung des Blutdrucks. Die Tiere wurden mit einer Isoflurannarkose anaesthetisiert. Die rechte femorale Arterie wurde mit einem 2-Fr Millar Mikro-Tip Katheter-Transducer (Millar Instruments) katheterisiert. Piezoelektrische Kristalle (0,5 mm; Sonometrics) wurden in die abdominale Aorta platziert, um den arteriellen Blutdruck zu überwachen. Der systolische und diastolische Druck wurde ca. 10-15 min nach der Stabilisierung des mittleren Blutdrucks gemessen [132, 133].

Blutabnahme. Den Tieren wurde zur Bestimmung der metabolischen Parameter und des Adiponektins vor (Tag 0) und nach der Behandlung (Tag 21) durch Punktion des retrobulbären Venenplexus Blut entnommen. Dazu wurde zunächst ausreichend lege artis narkotisiert (Inhalationsnarkose mit Isofluran) und die Narkosetiefe durch eine Reflexkontrolle überprüft. Dann wurden die Halsgefäße mit Daumen und Zeigefinger gestaut, so dass die Augen deutlich hervortraten. Daraufhin wurde vorsichtig eine Kapillare drehend am nasalen Augenwinkel in Richtung auf das gegenüberliegende Kiefergelenk eingeführt bis ein elastischer Widerstand zu spüren war. So konnte ca. 1ml Blut gewonnen werden.

Tötung der Tiere. Bei den Tieren wurde zur Tötung eine finale Narkose mit Pentobarbital angewendet.

Gewebsentnahme. Zur Gewebsentnahme wurde die getötete Ratte lege artis präpariert und die benötigten Gewebestücke bzw. Organe mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Gewebestücke wurden dann sofort in einem Eppendorfgefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren.

***Ex vivo* Gewebsentnahme und Behandlung.** Für die *ex vivo* Gewebestimulation wurden die Ratten zunächst nach der oben beschriebenen Methode getötet und das Fettgewebe entsprechend entnommen. Die Gewebe wurden danach jedoch nicht eingefroren, sondern sofort in *HANKS' Balanced Salt Solution* (HBSS) kleingeschnitten. Daraufhin wurde bei ca. 500 Umdrehungen/ min zentrifugiert, das alte HBSS entfernt und die Gewebestückchen in neuem Puffer resuspendiert. Diese Waschschrte wurden noch zweimal wiederholt und ca. 500 mg große Fettgewebstückchen anschliessend in 2 ml Inkubationspufferenthaltende Falconflaschen (DMEM/ F12 incl. 1% Penicillin/ Streptomycin und 0,1 % bovines Serum-Albumin) überführt. Zum Schluss wurden die entsprechenden Wirkstoffe in die Flaschen pipettiert und die Proben unter ständigem Schwenken für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.6. Insulin- und Adiponektin-ELISA

Insulin-ELISA. Zur Bestimmung der Insulinspiegel wurde ein *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* (ELISA) der Firma Linco Research herangezogen. Die ELISA-Methode basiert im Wesentlichen auf folgenden Schritten:

Zunächst werden die sich in der Probe befindenden Insulinmoleküle durch monoklonale Anti-Ratten Insulinantikörper, die auf einer Mikrotiterplatte arretiert sind, gebunden. Auf die gebundenen Insulinmoleküle können biotinylierte, polyklonale Antikörper binden, so dass das Insulin, ähnlich wie bei einem *Sandwich*, von beiden Seiten von Antikörpern umschlossen ist. Dann wird in mehreren Schritten das nicht gebundene Material von der Platte gewaschen.

Auf dieses *Sandwich* wird in einer weiteren Reaktion die Probe mit einem dritten Antikörper inkubiert, an dem das Enzym *Horseradish-Peroxidase* konjugiert ist. Der Antikörper erkennt die schon gebundenen, biotinylierten Antikörper und wird durch diese festgehalten. Daraufhin werden in weiteren Waschschritten die überschüssigen Antikörper entfernt und alle Proben mit gleichen Mengen eines Enzymsubstrats (Tetramethylbenzidin) versetzt. Die nun stattfindende Farbreaktion kann spektrophotometrisch quantifiziert werden und fällt umso intensiver aus, je mehr Enzym, und damit je mehr Insulin ursprünglich gebunden wurde (siehe auch Abbildung 2.8.).

Für die Bestimmung wurden die Instruktionen des Herstellers eingehalten und die Farbreaktion mit einem Spektrophotometer (Benchmark Plus; BioRad) quantifiziert.

Adiponektin-ELISA. Zur Bestimmung der Adiponektinspiegel wurde ebenfalls ein ELISA herangezogen. Dafür wurde ein Kit der Firma B-Bridge verwendet. Das Prinzip der Methode gleicht auch hier dem unter 2.2.6. beschriebenen Abläufen, die zur besseren Veranschaulichung in Abbildung 2.8. dargestellt sind.

Im Detail wurden zur Durchführung des Experiments die Anweisungen des Herstellers eingehalten und die Farbreaktion ebenfalls mit einem Spektrophotometer (Benchmark Plus, BioRad) quantifiziert.

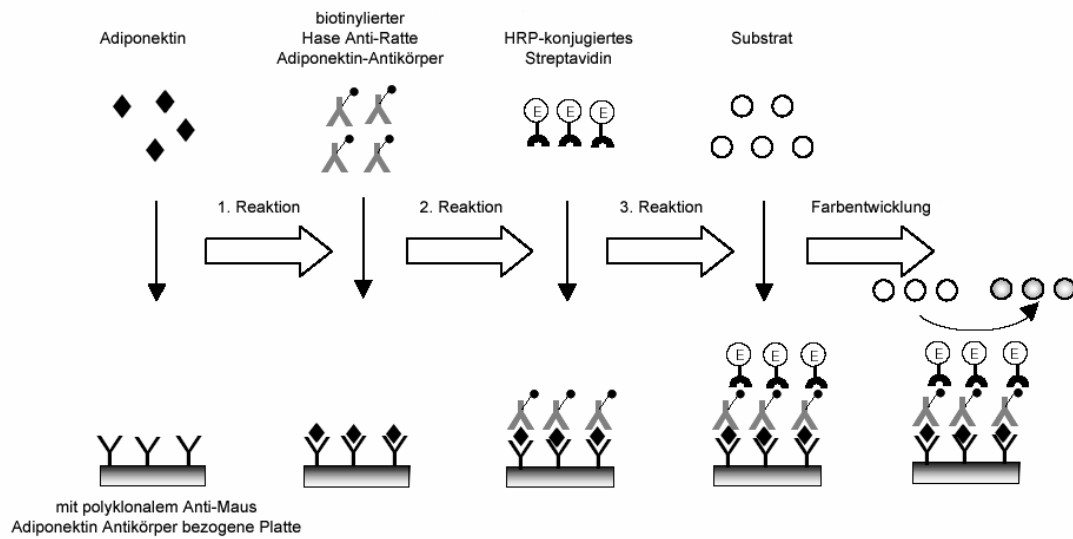


Abbildung 2.8.: Prinzip des Adiponektin-ELISAs (nach dem Protokoll des Herstellers B-Bridge).

2.2.7. Bestimmung der Glucose- und Triglyzeridspiegel

Bestimmung der Glucosespiegel. Für die Bestimmung der Glucosespiegel wurde in dieser Arbeit ein Kit der Firma Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien) verwendet. Dabei wurde das aus der Glucoseoxidation mit dem Enzym Glucoseoxidase (GOD) entstehende Wasserstoffperoxid benutzt, um mit Hilfe eines weiteren Enzyms (Peroxidase; POD) das Substrat 4-Aminophenazon zum Quinonimin zu oxidieren, welches dann spektrophotometrisch bei 505 nm vermessen wurde (Trinders-Reaktion).

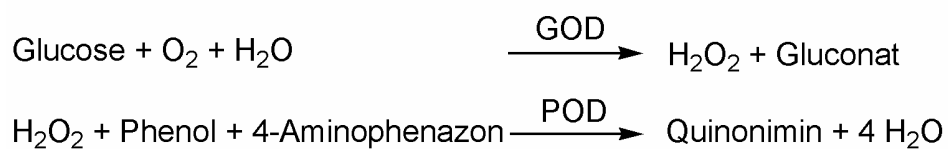


Abbildung 2.9.: Prinzip der Glucosebestimmung mit dem Kit von Cypress Diagnostics.

Für die Messung wurden die Hinweise des Herstellers befolgt und die Absorptionen an Hand einer Standardkurve miteinander verglichen und daraus die Glucosekonzentration ermittelt.

Bestimmung der Triglyzeridspiegel. Für die Bestimmung der Triglyzeridspiegel wurde in dieser Arbeit ein Kit der Firma Cypress Diagnostics (Langdorp, Belgien) verwendet. Dabei wurden die Triglyzeride enzymatisch durch die Lipoproteinlipase (LPL) zu Glycerol und freien Fettsäuren hydrolysiert. Das freigewordene Glycerol reagierte mit den Enzymen Glycerolkinase (GK) und Glycerol-3-Phosphat-Oxidase (GPO) weiter und die Konzentration des dabei entstandenen Wasserstoffperoxids wurde dann durch die schon bei der Glucosebestimmung beschriebene Trinders-Reaktion spektrophotometrisch bei 505 nm bestimmt.

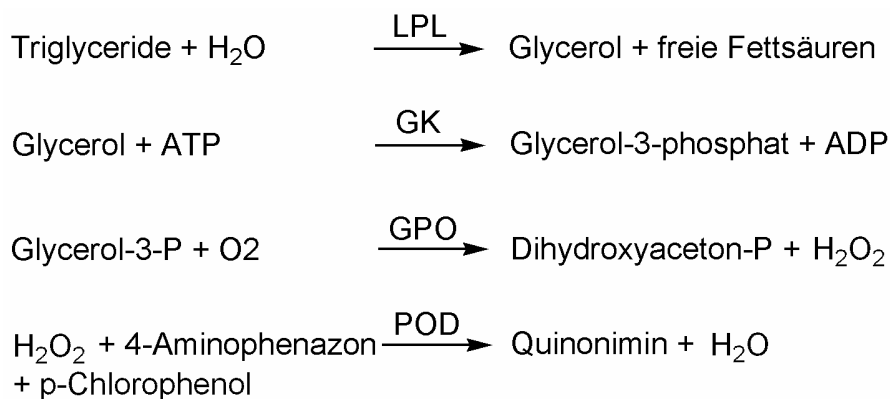


Abbildung 2.10.: Prinzip der Triglyzeridbestimmung mit dem Kit von Cypress Diagnostics.

Für die Messung wurden die Hinweise des Herstellers befolgt und die Absorptionen an Hand einer Standardkurve miteinander verglichen und daraus in die Glucosekonzentration ermittelt.

2.2.8. Immunohistochemie

Anfertigung von Gewebeschnitten. Zunächst mussten die Gewebestücke für den Schnitt in Paraffin eingebettet werden. Dazu wurde das Gewebe nacheinander in verschiedene Lösungen getaucht. Alle Schritte erfolgten im Brutschrank bei 60 °C. Die Lösungen waren auf 60 °C vorgewärmt.

1. 30 min 4% gepuffertes Formalin
2. 15 min 70% ETOH
3. 15 min 100% ETOH
4. 15 min 100% ETOH
5. 15 min Aceton
6. 15 min Paraffin
7. 20 min Paraffin

Danach wurde an einem Schlittenmikrotom (Fa. Reichert-Jung, Heidelberg) mit einem C-Messer von den Paraffinblöckchen Schnitte mit einer Dicke von 4 µm hergestellt und in einem ca. 50 - 52 °C warmen Wasserbad gestreckt. Zur Vermeidung eines Abschwimmens der Schnitte bei der weiteren Bearbeitung wurden diese auf, mit 3-Aminopropyltriethoxy-Silan beschichtete, Objektträger aufgezogen und über Nacht in einem Brutschrank bei 54 °C angetrocknet. Jeder Objektträger wurde mit drei bis vier Schnitten bestückt. Die Objektträger wurden bis zur Weiterverarbeitung bei Raumtemperatur staubfrei gelagert.

Immunohistochemische Färbung. Die immunohistochemische Färbung wurde mittels der Avidin-Biotin-Komplexmethode [134, 135] nach den Anweisungen des Herstellers und mit den dazu erforderlichen Reagenzien (Vectastain ABC, Vector Laboratories) unternommen. Dazu wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte (4µm) mit dem Adiponektin-Antikörper (1:500; Chemicon, Temecula, USA) inkubiert und anschliessend mit einem biotinylierten Anti-Maus-

IgG inkubiert (1:2000, Vector Laboratories). Die Peroxidaseaktivität wurde durch eine mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC, Vector Laboratories) hervorgerufene, rote Färbung visualisiert. Nachfolgend sind die einzelnen Schritte in Kurzfassung noch einmal aufgelistet:

1. Entparaffinisieren der Schnitte
2. Aktivierung in Citratpuffer in der Mikrowelle bei 600W
3. Demaskierung in Methanol+Wasserstoffperoxide
4. Blocken mit Serum
5. Inkubation mit 1. Antikörper (Adiponektin) über Nacht bei 4 °C 1:500 (Verdünnungen erfolgten im Blockierungsserum)
6. Inkubation mit 2. Antikörper (biotinyliertes AntiMaus- IgG; 1:2000)
7. Inkubation mit ABC-Lösung (siehe Kit; bindet an das Biotin)
8. Inkubation mit AEC-Lösung (Substrat siehe Kit; bindet an das ABC- = Farbreaktion)
9. Gegenfärbung mit Hämalaun
10. Eindecken der Schnitte mit Hydromount

2.2.9. Statistik

Varianzanalysen. Für die Analyse der densitometrischen Daten wurden ungepaarte t-Tests durchgeführt. In den Experimenten, die verschiedene AT1-Antagonisten miteinander verglichen, wurden Einweg-ANOVA-Tests mit anschliessendem, multiplen Bonferroni-Vergleich verwendet. Für die Tierversuche wurden für die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ebenfalls ungepaarte und für die Unterschiede innerhalb einer Gruppe (Tag 0 vs. Tag 21) gepaarte t-Tests herangezogen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Software-Programms Excel (Office 2000, Microsoft, Redmond, USA). Es wurden jeweils der arithmetische Mittelwert sowie der Standardfehler des

Mittelwertes (S.E.M. = *Standard Error of the Mean*) angegeben. Als minimales Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Regressionsanalysen. Die im Rahmen der Linearitätsbestimmung für die realtime-PCR-Messungen durchgeführten Regressionsanalysen erfolgten mit dem Programm Excel (Office 2000, Microsoft, Redmond, USA).