

Aus der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie

(Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Ramadori)

im Zentrum Innere Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchung zur Existenz des Melanocortin-4-Rezeptors im
Lebergewebe von Wistarratten und die Veränderung der
Genexpression auf RNA- und Proteinebene unter Induktion einer
Akut-Phase-Reaktion mittels Terpentinöl**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

*der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen*

vorgelegt von

Jessica Posselt

aus Suhl

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. G. Ramadori

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. L. Walter

III. Berichterstatter: Prof. Dr. biol. hum. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 13. August 2012

Verzeichnis des Inhalts

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	5
1.1	ÜBERBLICK ZUR FRAGESTELLUNG	5
1.2	FUNKTIONEN DER LEBER	5
1.2.1	<i>Zelltypen der Leber und ihre spezifischen Funktionen</i>	<i>6</i>
1.3	DIE AKUT-PHASE-ANTWORT DER LEBER.....	9
1.4	AKUT-PHASE-PROTEINE UND INFLAMMATORISCHE ZYTOKINE.....	12
1.4.1	<i>Inflammatorische Zytokine der APR</i>	<i>12</i>
1.4.2	<i>Akut-Phase-Proteine der Leber.....</i>	<i>13</i>
1.4.3	<i>Interleukin-6 und die IL-6-Signalkette</i>	<i>14</i>
1.5	AKUT-PHASE-MODELLE.....	16
1.5.1	<i>Tiermodelle der APR</i>	<i>16</i>
1.5.2	<i>Hochregulation von Hämoxxygenase-1 induziert durch Terpentinöl.....</i>	<i>16</i>
1.6	DAS MELANOCORTINSYSTEM	17
1.6.1	<i>Komponenten des Melanocortinsystems</i>	<i>17</i>
1.6.2	<i>Die Melanocortinrezeptoren</i>	<i>19</i>
1.6.2.1	<i>Die Melanocortinrezeptorfamilie</i>	<i>19</i>
1.6.2.2	<i>Der Melanocortin-4-Rezeptor</i>	<i>20</i>
1.7	MELANOCORTINSYSTEM UND DIE KONTROLLE DER INFLAMMATIONSREAKTION	22
1.7.1	<i>Melanocortin-4-Rezeptor vermittelt antiinflammatorische Antwort von α-MSH</i>	<i>23</i>
1.7.2	<i>MC4R-vermittelte cAMP-Erhöhung führt zur Downregulation von NF-κB</i>	<i>24</i>
1.7.3	<i>Funktionelle Verbindung zwischen MCR-Aktivierung und HO-1-Induktion</i>	<i>25</i>
1.7.4	<i>Fazit.....</i>	<i>26</i>
1.8	HAUSHALTSGENE.....	26
2	MATERIAL UND METHODEN	27
2.1	VERZEICHNIS DER VERWENDETEN MATERIALIEN.....	27
2.2	TIERE UND TIERHALTUNG	31
2.2.1	<i>Studiendesign</i>	<i>31</i>
2.2.2	<i>Tiere.....</i>	<i>32</i>
2.3	INDUKTION DER AKUT-PHASE-REAKTION.....	32
2.3.1	<i>Ablauf der Terpentinöl-Injektion und Sektion der Tiere.....</i>	<i>32</i>
2.3.2	<i>Gewinnung von Blutproben und Serum-Isolation.....</i>	<i>32</i>
2.4	ISOLIERUNG DER RNA	33
2.4.1	<i>Experimenteller Ablauf der RNA-Isolierung.....</i>	<i>33</i>
2.4.2	<i>Weiterer Umgang mit der gewonnenen RNA.....</i>	<i>34</i>
2.5	MESSUNG DER RNA-KONZENTRATION	34
2.5.1	<i>Photometrische Vormessung.....</i>	<i>34</i>
2.5.2	<i>RNA-Quantifizierung und Bestimmung von Reinheit und Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese</i>	<i>35</i>
2.6	REVERSE TRANSKRIPTION DER RNA	36
2.6.1	<i>Allgemeines zur Technik</i>	<i>36</i>
2.6.2	<i>Experimenteller Ablauf.....</i>	<i>36</i>
2.7	DIE POLYMERASEKETTENREAKTION	37
2.7.1	<i>Das Verfahren der PCR und deren Ablauf.....</i>	<i>38</i>
2.7.2	<i>Die real-time-PCR</i>	<i>39</i>
2.7.3	<i>Auswertung des Amplifikationsdiagramms.....</i>	<i>39</i>
2.7.4	<i>Praktische Durchführung der PCR</i>	<i>41</i>
2.7.5	<i>Gelelektrophorese</i>	<i>43</i>
2.8	PROTEINUNTERSUCHUNGEN UND DIE TECHNIK DES WESTERN-BLOTS.....	43
2.8.1	<i>Proteinisolierung aus dem Lebergewebe</i>	<i>43</i>
2.8.2	<i>Proteinblot auf Nitrozellulose- Membranen und Antikörperfärbungen</i>	<i>44</i>
2.8.3	<i>Antigennachweis</i>	<i>45</i>
2.8.4	<i>Isolierung von Nucleusextrakt aus Lebergewebe</i>	<i>46</i>
2.8.5	<i>Isolierung von Hepatozyten.....</i>	<i>47</i>
2.9	ZELLISOLATION UND ZELLKULTUR.....	48
2.9.1	<i>Kultur von Rattenleberhepatozyten</i>	<i>48</i>

Verzeichnis des Inhalts

2.9.2	Isolation von Kupfferzellen	48
2.10	IMMUNPRÄZIPITATION.....	49
2.11	VERSUCHE ZUR BLOCKUNG DES SIGNALS MIT SPEZIFISCHEM IMMUNISIERENDEM PEPTID.....	49
2.12	VORBEREITUNG DER GEWEBESCHNITTE UND ANALYSE MITTELS IMMUNHISTOCHEMIE UND IMMUNFLUORESCENZ	50
2.12.1	<i>Peroxidase-Färbung</i>	50
2.12.2	<i>Lokalisierung und Nachweis zellulärer Antigene des MC4R mittels indirekter Immunfluoreszenz</i> 51	
2.12.2.1	Indirekte Immunfluoreszenz.....	51
2.13	ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) ZUM NACHWEIS VON IL-6 UND A-MSH AUS DEM SERUM DES PORTALVENENBLUTS	52
2.14	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	52
3	ERGEBNISSE	53
3.1	GLIEDERUNG DER ERGEBNISSE.....	53
3.2	DETEKTION DES MC4R IM RATTENLEBERGEWEBE	53
3.2.1	<i>Konventionelle PCR mit Gelelektrophorese</i>	53
3.2.2	<i>Proteinanalysen zum Nachweis der Existenz des MC4R in verschiedenen Zellkompartimenten der Rattenleber</i>	54
3.2.3	<i>Oberflächenplot und Nachweis einer Rezeptordimerisation</i>	56
3.2.4	<i>Immunhistochemischer Nachweis der Existenz des MC4R in der Rattenleber</i>	57
3.2.5	<i>Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis des MC4R in der Rattenleber</i>	59
3.2.6	<i>Immunhistochemische Detektion des MC4R in Kupfferzellen- und Hepatozytenkulturen</i>	61
3.3	DYNAMIK DES MELANOCORTIN-4-REZEPTORS WÄHREND DER AKUT-PHASE-REAKTION IN DER LEBER	61
3.3.1	<i>Dynamik der Proteinexpression im Lebergewebe der Ratte</i>	61
3.3.2	<i>Vergleich der MC4R-Proteinexpression im Lebergewebe und des gemessenen IL-6 Spiegels im Serum der Ratte unter APR</i>	63
3.3.3	<i>Immunodetektion des MC4R in Rattenleberkryostatschnitten unter APR</i>	64
3.3.4	<i>Untersuchungen zur Dynamik des MC4Rs in Zytosol und Nucleusextrakt der Rattenleber</i>	65
3.3.5	<i>Serumanalyse des wichtigsten Agonisten α-MSH im Portalvenenblut von TO-behandelten Ratten</i>	67
3.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIFITÄT UND KONTROLLE DER ERGEBNISSE	67
3.4.1	<i>Analyse MC4R mittels Immunpräzipitation und Immunizing peptides</i>	67
3.4.2	<i>Vergleichsstudie mit Gehirngewebe der Ratte unter Induktion der APR</i>	69
3.4.3	<i>Immunodetektion des MC4R im Rattengehirn</i>	70
4	DISKUSSION	71
4.1	DER MC4R IN DER LEBER UND DIE REGULATION UNTER APR.....	71
4.2	EXPRESSION DES MC4R IN DER RATTENLEBER	71
4.2.1	<i>Existenz des MC4R im Rattenlebergewebe</i>	71
4.2.2	<i>Expression des MC4R in Hepatozyten und Kupfferzellen</i>	72
4.3	VERGLEICH DES MC4R IM LEBER- UND HIRNGEWEBE DER RATTE	73
4.4	DYNAMIK DES MC4R WÄHREND DER APR	74
4.4.1	<i>Einfluss der α-MSH-Konzentration im Portalvenenblut</i>	75
4.5	LOKALISATION UND DISTRIBUTION DES MC4R IM RATTENGEHIRN UND RATTENLEBER WÄHREND DER APR	75
4.6	WISSENSCHAFTLICHER BEZUG DER DURCHFÜHRTEN UNTERSUCHUNG AUF ANDERE EINFLUSSFAKTOREN DER ANTIINFLAMMATION	76
4.7	HEPATOPROTEKTIVE EFFEKTE VON A-MSH	77
4.8	MC4R UND APPETITREGULATION	78
5	ZUSAMMENFASSUNG	79
6	ANHANG	81
6.1	VERZEICHNIS DER TABELLEN.....	81
6.2	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	81
6.3	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	82
7	VERZEICHNIS DER LITERATUR	84

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Überblick zur Fragestellung

Die Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Expression des Melanocortin-4-Rezeptors (MC4R) im Lebergewebe von Wistar-Ratten. Bisher war der MC4R einzig in der Leber von Flundern und Zackenbarschen nachgewiesen worden (Kobayashi et al. 2008, Sanchez et al. 2009). Des Weiteren wurde die Frage nach der Dynamik des MC4R in der Leber während einer Akut-Phase-Reaktion (APR) mittels Western-Blot-Analysen, Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR), Immunhistochemie und Immunfluoreszenz untersucht. Von Interesse war der Einfluss der durch Terpentinöl (TO) induzierten APR auf die Expression und Regulation sowie Änderungen in der Syntheserate des MC4R zu verschiedenen Zeitpunkten der inflammatorischen Reaktion. Das grundlegende Verständnis der Regulation des MC4R während der APR sowie der Nachweis dieses Rezeptors in der Leber sind in Wissenschaft und Forschung von großer Relevanz. Obwohl die antiinflammatorische Rolle des α -MSH in der Leber von Mäusen beschrieben ist (Blagaic et al. 2010, Chiao et al. 1996, Lee et al. 2006), wurde der MC4R in der Ratten- und Mäuseleber bisher nicht detektiert. Dies war Gegenstand der vorliegenden Studie. Untersuchungen, die das TO-induzierte Akut-Phase-Modell benutzt haben, basieren auf der Annahme, dass die Effekte in Nagetieren denen im Menschen gleichen (Basso et al. 2005, Halter et al. 2005, Kim et al. 2002). Die Daten der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die intramuskuläre Injektion von Terpentinöl eine Veränderung der Expression des MC4R-messenger-RNA (Ribonucleic acid) und Proteinlevel in der Leber induzieren kann.

1.2 Funktionen der Leber

Die Leber übernimmt als eines der zentralen Organe des menschlichen Körpers vielfältige Aufgaben. Sie stellt das Energiestoffwechselzentrum des Organismus dar, indem sie maßgeblich die Glukosehomöostase und den Aminosäurehaushalt reguliert, Lipide prozessiert und einen Großteil der Cholesterinsynthese übernimmt.

Einleitung und Zielsetzung

In der Leber können Ketonkörper bei einer anhaltenden Nahrungskarenz synthetisiert werden. Sie bildet und sezerniert Gallensäuren, welche für die Lipidverdauung unerlässlich sind, da über die Bildung von Mizellen die Resorption lipophiler Substanzen ermöglicht wird. Des Weiteren spielt die Leber eine wichtige Rolle im Hormonhaushalt des Organismus, da sie (Pro-)Hormone und verschiedene Mediatoren synthetisiert und abbaut. Die Leber ist, neben der Milz, ein wichtiger Blutspeicher und an der Entsorgung stickstoffhaltiger Produkte durch die Harnstoffbildung beteiligt. Über Mechanismen der Biotransformation kommt der Leber eine zentrale Bedeutung in der Entgiftung von endogenen und exogenen toxischen Substanzen zu. Die Leber ist darüber hinaus der Hauptsyntheseort von Plasmaproteinen, die ihre Aufgaben außerhalb der Leber erfüllen und v.a. in der Resorptionsphase synthetisiert werden. In der Leber werden zelluläre und extrazelluläre Biomatrixbestandteile für die Bildung und Aufrechterhaltung der eigenen Organstruktur produziert (Jungermann und Kietzmann 1996). Schließlich nimmt die Leber auch Aufgaben bei der chemischen Abwehr und der Immunabwehr wahr. Bei Entzündungen der Leber oder anderer Organe werden leberspezifische Funktionen im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion aktiviert: Die Freisetzung von Glukose wird verstärkt und die Synthese von Plasmaproteinen in ihrem Profil umgestellt; so werden z.B. positive und negative Akut-Phase-Proteine synthetisiert (Moshage 1997). Die Vielzahl wichtiger Aufgaben wird von den verschiedenen hepatischen Zelltypen übernommen. Eine der Hauptaufgaben ist es, die portale Zirkulation von Erregern und von pathogenen Produkten von geschädigtem Gewebe, die die Leber über die systemische Zirkulation erreichen, zu reinigen. Hierdurch wird die Aufgabe als zentrales Filterorgan deutlich; Substanzen, die potenziell die Gefahr eines Zellschadens bedeuten, werden eliminiert und abgebaut. Dieser sehr effektive Abwehrmechanismus ist von großer Bedeutung.

1.2.1 Zelltypen der Leber und ihre spezifischen Funktionen

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, das Lebergewebe nach seinem Bauplan einzuteilen. Neben der Untergliederung in das klassische Leberläppchen gibt es zwei weitere Einteilungen: in die Leberazini und die Portalvenenläppchen. Diese Gliederungsmöglichkeiten ergänzen sich v.a. unter funktionellen Gesichtspunkten.

Einleitung und Zielsetzung

Das Leberparenchym besteht aus radiär angeordneten Leberepithelzellen, den Hepatozyten, die die spezifischen Aufgaben der Leber erfüllen. Zu den restlichen Zelltypen der Leber, die 10 % der Zellmasse und 40 % der Zellzahl der Leber ausmachen, gehören vier weitere Zelltypen. 20 % dieser Zellmasse bilden die von-Kupffer-Sternzellen (kurz: Kupfferzellen), die im Jahr 1876 erstmals von dem berühmten Neuroanatomen und Embryologen Karl Wilhelm Kupffer erwähnt wurden (von Kupffer 1876, von Kupffer 1899). „Karl Kupffer öffnete die große Tür in das fantastische, aber komplexe Universum der Lebersinusoide“, laudierte Kenjiro Wake auf dem 11th International Symposium on the Cells of hepatic Sinusoids and their Relation to Other Cells zum 100. Todestag von Karl Kupffer (Von Kupffer 1903, Wake 2004).

Wie bereits Singer et al. 1979 belegten, sind Kupfferzellen mit über 80 % das größte Reservoir an Makrophagen im Körper. Kupfferzellen sitzen an der endothelialen Wand des Sinusoids, dort vor allem in der periportalen Region (Bouwens et al. 1992, Singer et al. 1979). Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten belegen, dass die Kupfferzellen zum primären Ziel toxischer und inflammatorischer Signale gehören. Sie sind ein wichtiger Teil einer Abwehrreaktion der Leber und unterstützen die Funktionen von Hepatozyten (Kresse et al. 2005, Schumann et al. 2000a, Schumann et al. 2000b). Durch die Synthese und Freisetzung von Prostanoiden, Sauerstoffradikalen und Zytokinen sowie die Antigenpräsentation und Phagozytose unterstützen sie die lokale Abwehr (Bhatnagar et al. 1981, Busam et al. 1990, Grewe et al. 1992).

Außerdem finden sich unter den Nichtparenchymzellen 10 % Itozellen (Perisinusoidalzellen, perisinusoidale Fettspeicherzellen, Sternzellen), 70 % sinusoidale Endothelzellen und weniger als 1% Pitzellen (die leberspezifischen Natural Killer Cells) (Knook und Sleyster 1980, Wisse et al. 1976) (Abb. 2.).

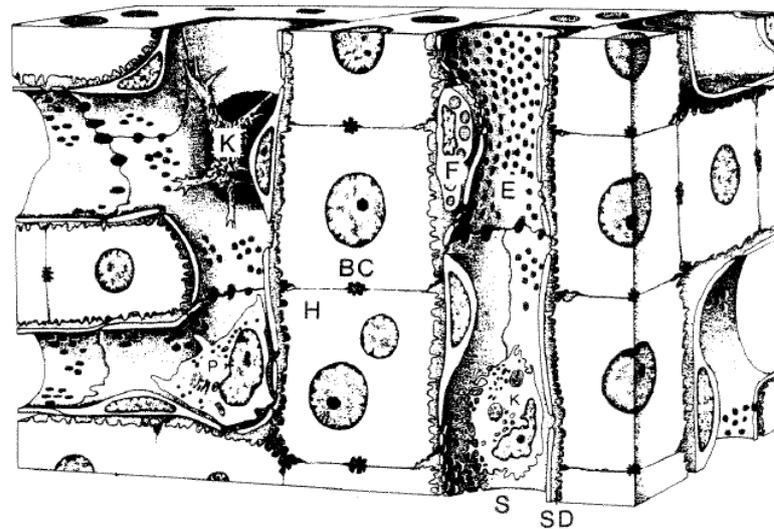


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lebergewebes

Das Parenchym besteht aus Leberzellplatten, die aus benachbarten Hepatozyten (H) gebildet werden. Das Blut fließt durch die Sinusoide (S), die von den fenestrierten Endothelzellen (E) gebildet werden, die ihrerseits von Perisinusoidalzellen (F) umgeben sind. Kupferzellen (K) und Pitzellen (P) ragen in das sinusoidale Lumen hinein. Zwischen der endothelialen Zellauskleidung und den Hepatozyten befindet sich der Disse'sche Raum (SD), in dem extrazelluläre Matrix lokalisiert ist. Mit ihrer apikalen Membran bilden die Hepatozyten die Gallenkanalikuli (BC) (Sasse et al. 1992, Seite 19).

Die sinusoidalen Endothelzellen und Kupferzellen bilden zusammen das sogenannte retikuloendotheliale System der Leber. Die sinusoidalen Endothelzellen sind antigenpräsentierende Zellen, die sich durch Phagozytose am Abbau von Mikroorganismen und Toxinen sowie an der Transmigration und Adhäsion von Immunzellen beteiligen (Burt et al. 1993, Dini et al. 1995, Knolle und Gerken 2000). Die Itozellen speichern in intrazellulären Lipidtröpfchen Vitamin A oder Retinol (Hendriks et al. 1985). Sie synthetisieren und sezernieren außerdem extrazelluläre Matrixkomponenten (Bouwens et al. 1992) und spielen in der Pathogenese von Leberzirrhose und Leberfibrose eine wichtige Rolle (Gressner 1991, Rieder et al. 1993). Die Pitzellen sind morphologisch große granuläre Lymphozyten und gehören funktionell zu den natürlichen Killerzellen (Natural Killer Cells), sie sind an der luminalen Oberfläche des Sinusoids, den Kupfer- oder sinusoidalen Endothelzellen angeheftet (Burt et al. 1993, Nakatani et al. 2004). Ihre Hauptfunktion ist die Abtötung bestimmter Tumorzellen des Darms (Wisse et al. 1997, Wisse et al. 1976). Die Hepatozyten machen ca. 90 % der Zellmasse der Leber aus, jedoch nur 60 % der eigentlichen Zellzahl (Blouin et al. 1977, Sasse et al. 1992). Die wichtigsten Funktionen der Hepatozyten sind neben dem Kohlenhydratmetabolismus der Fettsäure- und Alkoholmetabolismus (Misra et al. 1992), der Metabolismus von

Aminosäuren und Ammoniak (Jungermann 1995), die Biotransformation von Xenobiotika (Anundi et al. 1993, Jungermann und Kietzmann 1996) und die Synthese von Plasmaproteinen im Rahmen der Akut-Phase-Antwort. Obwohl Hepatozyten nur einen geringen turnover haben, kann die Mitoserate durch partielle Resektion der Leber stimuliert werden (Rabes et al. 1975). Außerdem besitzt jeder Zelltyp der Leber, eingeschlossen die Hepatozyten, seine eigene Verteidigungsausrüstung. So führt hepatozellulärer Stress, der durch Hepatotoxine oder ein Virus induziert wird, zur Aktivierung von residenten Makrophagen und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Diese Zytokine induzieren die Bildung von Akut-Phase-Proteinen in den Hepatozyten, können aber auch zum Untergang der vorgeschädigten Hepatozyten führen.

1.3 Die Akut-Phase-Antwort der Leber

Der Organismus von Mensch und Säugetieren reagiert auf eine Beeinträchtigung der physiologischen Homöostase, ausgelöst durch Traumata, Infektionen oder Malignome, mit einer komplexen Verteidigungsreaktion, die als Inflammation bezeichnet wird. Die ersten Schritte dieser Abwehrreaktion, die ausgelöst wird, um das gestörte Gleichgewicht des Körpers wiederherzustellen, werden aufgrund des raschen Auftretens als Akut-Phase-Reaktion (APR) bezeichnet (Kushner 1982).

Die Akut-Phase-Reaktion ist ein Bestandteil des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und stellt eine Kaskade zellulärer Reaktionen dar (Baumann und Gauldie 1994, Heinrich et al. 1990, Ramadori und Christ 1999). Die APR kann durch spezifische, biologisch vorprogrammierte Reize ausgelöst werden; vor allem das Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien (Fearon und Locksley 1996), löst die Synthese und Freisetzung von Mediatoren aus. Diese Mediatoren sind verantwortlich für die mehr oder weniger starken Symptome, die mit einer APR einhergehen, wie Fieber, Appetitverlust, Muskelschmerzen, Aktivierung von Komplement- und Gerinnungskaskade, Neutrophilie, Veränderungen im Fettstoffwechsel, Hypoferrämie und Hypozinkämie, verstärkte Gluconeogenese, Verstärkung von Proteinabbau und Aminosäure-Transfer zur Leber, hormonelle Veränderungen und die Induktion der Akut-Phase-Proteine (Moshage 1997,

Einleitung und Zielsetzung

Ramadori und Christ 1999). Durch diese zahlreichen Regelmechanismen wird die APR ihrer Aufgabe zur Unterstützung des Körpers bei der Abwehrreaktion und zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Homöostase gerecht.

Durch die lokale Beeinträchtigung des Organismus, die durch die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Fibroblasten und Endothelzellen charakterisiert ist, wird die Akut-Phase-Reaktion zunächst auf zellulärer Ebene direkt am Ort des Geschehens eingeleitet. Diese Reaktion kann im Tierexperiment durch die lokale Injektion von toxischen Substanzen wie Terpentinöl (TO) simuliert werden. Zuerst ist es die durch Zellschaden und Zelluntergang induzierte Freisetzung von Mediatoren, wie z.B. freien Radikalen, von Prostanoiden oder Nitric Oxide (NO) oder reaktiver Sauerstoffspezies, die ihre Wirkung lokal ausüben (Koj 1996). Als Reaktion auf diesen lokalen Reiz sezernieren lokal befindliche immunkompetente Zellen, insbesondere Gewebemakrophagen, Zytokine, die die eigentliche Akut-Phase-Reaktion in Gang setzen, indem sie über den Blutstrom zirkulieren und so eine systemische Reaktion des Körpers hervorrufen (Baumann und Gauldie 1994).

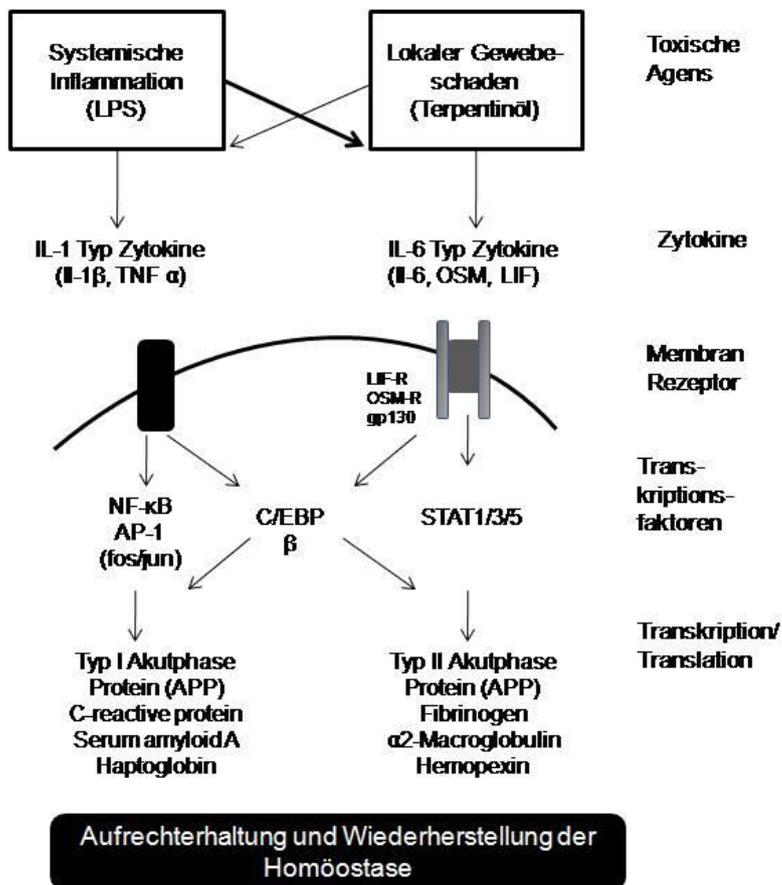


Abbildung 2: Induktion der Akut-Phase-Reaktion

Abkürzungen: LPS: Lipopolysaccharid; IL: Interleukine; OSM: Oncostatin M; LIF: leukemia inhibitory factor; gp: Glykoproteinrezeptor; NF κ B: nuclear factor kappa B; APP: Akut-Phase-Proteine C/EBP: CCAAT/Enhancer Binding Protein beta. STAT: signal transducer and activator of transcription-Elemente (Modifiziert nach Ramadori und Armbrust 2001).

Das toxische Agens löst eine lokale oder systemische Inflammation aus, woraufhin die Zytokin-Expression gesteigert wird. Die Bindung der Zytokine an spezifische Rezeptoren induziert die Signalverarbeitung über verschiedene Transkriptionsfaktoren, die in der Promotorregion des Akut-Phase-Gens binden. Es kommt zur Synthese und Sekretion spezifischer Akut-Phase-Proteine, die dazu beitragen, die physiologische Homöostase des Organismus aufrechtzuerhalten.

Klinisch ist die APR durch Fieber, Abgeschlagenheit, Adynamie, Schläfrigkeit und Appetitverlust charakterisiert.

1.4 Akut-Phase-Proteine und inflammatorische Zytokine

1.4.1 Inflammatorische Zytokine der APR

Die Akut-Phase-Reaktion wird durch Zytokine ausgelöst (Trautwein et al. 1994). Zytokine sind hormonähnliche Moleküle, hierzu zählen die Interleukine (IL), Interferone (IF) und hämatopoetische Wachstumsfaktoren. Sie bilden zusammen eine komplexe Struktur interaktiver Signale und sind verantwortlich für die Regulation der Hämatopoese und vieler weiterer Immunreaktionen (Trautwein et al. 1994). Es können zwei Gruppen von Zytokinen unterschieden werden, Zytokine vom Interleukin-1-Typ und Zytokine vom Interleukin-6-Typ (Tabelle 1). Zu Beginn einer Akut-Phase-Reaktion werden vor allem Zytokine vom Interleukin-1-Typ ausgeschüttet, hierbei vor allem das Interleukin-1 β (IL-1 β) und der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Koj 1996, Perlmutter et al. 1986, Ramadori und Meyer zum Buschenfelde 1990). Zunächst können diese Zytokine nur lokal nachgewiesen werden, führen aber in der Folge zu einem systemischen Anstieg von Interleukin-6 (IL-6) und anderen Zytokinen vom Interleukin-6-Typ, wie Interleukin-11 (IL-11) und Cardiotrophin-1 (Ramadori und Meyer zum Buschenfelde 1990). Akut-Phase-Mediatoren, wie TNF α , IL-6 und IL1 β werden am Ort der Schädigung von den entzündeten Zellen gebildet und haben einen signifikanten Einfluss auf die Induktion der APP-Synthese in den Hepatozyten. Sie vermitteln die Initialphase der APR (Ramadori und Christ 1999).

Zytokine vom Interleukin-1-Typ	Zytokine vom Interleukin-6-Typ
Interleukin-1 α	Interleukin-6
Interleukin-1 β	Interleukin-11
Tumor-Nekrose-Faktor α	Leukemia Inhibitory Factor
Tumor-Nekrose-Faktor β	Ciliary Neurotrophic Factor
	Cardiotropin-1
	Oncostatin M

Tabelle 1: Übersicht über Zytokine vom Interleukin-1- und Interleukin-6-Typ

(Nach: Baumann und Gaudie 1994, Koj 1996, Moshage 1997, Ramadori und Christ 1999, Trey und Kushner 1995).

1.4.2 Akut-Phase-Proteine der Leber

Die Akut-Phase-Proteine (APP) werden ausschließlich durch die Hepatozyten in der Leber gebildet. Die oben genannten Zytokine können auf der einen Seite die Synthese von APP induzieren, auf der anderen Seite können sie zu einem Zellschaden von gestressten Hepatozyten führen. Bisher gilt es allerdings als noch ungeklärt, ob es eine funktionelle Heterogenität und spezifische Unterschiede in der metabolischen Kapazität der periportal (afferent) und perivenösen (efferent) Zonen des Leberparenchyms gibt (Feldmann et al. 1992). Klar ist hingegen, dass im Gegensatz zum gesunden Organismus die Anzahl der Akut-Phase-Proteine produzierenden Hepatozyten während der APR steigt (Jungermann und Katz 1989). Die APP spielen eine wichtige Rolle als Regulatoren von proteolytischen Prozessen (z.B. α 1-Antitrypsin), Fibrinolyse (z.B. Fibrinogen) und der Komplement-Aktivierung (z.B. Komplement C3), wodurch das Ausmaß der Gewebsschädigung minimiert wird. Es werden während der APR verschiedene Transportproteine wie Haptoglobin oder Transferrin und andere Proteine wie z.B. CRP, Serum Amyloid A gebildet (Gabay und Kushner 1999, Pannen und Robotham 1995). Die Akut-Phase-Proteine können aufgrund ihrer Induktion durch verschiedene Zytokine ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt werden (Tabelle 2). Typ-I- Akut-Phase-Proteine werden durch die Zytokine vom IL-1-Typ, IL-6 und Kombinationen beider Zytokine induziert (Baumann und Gaudie 1994, Moshage 1997). Typ-II-Akut-Phase-Proteine werden durch Zytokine vom IL-6-Typ und durch Glukokortikoide induziert (Moshage 1997, Ramadori und Armbrust 2001, Ramadori und Christ 1999).

Typ 1 Akut-Phase-Proteine	Typ 2 Akut-Phase-Proteine	Negative Akut-Phase-Proteine
C-reaktives Protein (CRP)	Haptoglobin	Transferrin
Serum Amyloid A	α 1-Antitrypsin	Präalbumin
Serum Amyloid P	α 2-Macroglobulin	Albumin
α 1-saures Glykoprotein	Ferritin	α 1-Lipoprotein
Komplement B	Fibrinogen α , β , γ	Faktor XII
Komplement C3	α 1-Antichymotrypsin	Transthyretin
Ceruloplasmin	Hämopexin	α -Fetoprotein
Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1	Cystein-Proteinase- Inhibitor	Thyroxin-bindendes Globulin

Tabelle 2: **Übersicht ausgewählter Akut-Phase-Proteine** (Baumann und Gaudie 1994, Ebersole und Cappelli 2000, Gabay und Kushner 1999, Pannen und Robotham 1995, Ramadori und Christ 1999).

Die Änderungen im Ausmaß und in der Geschwindigkeit der Plasmakonzentrationen dieser verschiedenen Proteine unterscheiden sich im Verlauf der Akut-Phase-Reaktion deutlich. Diese Konzentrationsänderungen der APP im Plasma werden als Maß für die Inflammation verwendet (Baumann und Gauldie 1994). Während sich die Plasmakonzentration einiger Proteine nur verdoppelt, erreichen andere deutlich mehr als das Hundertfache des ursprünglichen Wertes (Ebersole und Cappelli 2000). Die gemeinsame Wirkung der drei Gruppen führt zum typischen Erscheinungsbild einer Akut-Phase-Reaktion.

1.4.3 Interleukin-6 und die IL-6-Signalkette

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotrop wirkendes Zytokin, das aus 212 Aminosäuren besteht und ein spezifisches Molekulargewicht von 26 kDa besitzt (Barton 1997, Heinrich et al. 1998, Papanicolaou et al. 1998, Van Snick 1990). Es hat große Bedeutung bei der Regulation der Differenzierung und Proliferation sowie der Apoptose von Hepatozyten. Interleukin-6 reguliert maßgeblich die Induktion der Akut-Phase-Antwort der Leber im Rahmen von Entzündungsprozessen und ist ein potentes Pyrogen (Heinrich et al. 2003, Oberholzer et al. 2000). IL-6 stimuliert als einziger bekannter Mediator das gesamte Spektrum an hepatischen Akut-Phase-Proteinen wie z.B. das C-reaktive Protein, α 2-Makroglobulin, Fibrinogen, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1) und das α 1-Antichymotrypsin (Ridker et al. 2000). IL-6 wird gemeinsam mit dem Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und dem Interleukin-1 (IL-1) maßgeblich durch inflammatorische Prozesse induziert und galt durch den raschen Serumkonzentrationsanstieg ursprünglich als rein proinflammatorisches Zytokin (Barton 1997, Heinrich et al. 1998, Papanicolaou et al. 1998, Romano et al. 1997, Taga 1997). Weiterhin sind neben den proinflammatorischen Eigenschaften und der Einleitung einer schnellen Immunantwort die konsekutive Rekrutierung des spezifischen Immunsystems und die verstärkte Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen zu nennen (Oberholzer et al. 2000, Romano et al. 1997). Neuere Forschungen konnten auch antiinflammatorische Effekte des Interleukin-6 nachweisen, es induziert unter anderem das entzündungshemmende IL-10 oder verschiedene Proteaseinhibitoren (Gatsios et al. 1996, Oh et al. 1998). Ferner

Einleitung und Zielsetzung

konnten auch eine inhibierende Wirkung auf proinflammatorische Zytokine, wie IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , und die Expression von Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden (Aderka et al. 1989, La Flamme et al. 2000).

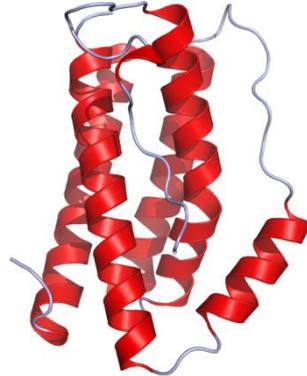


Abbildung 3: **Darstellung der Kristallstruktur von IL-6. Dargestellt sind die 4 Haupthelices**
Die Querverbindungen sind als blaue Linien dargestellt. Die Abbildung stammt aus der Proteindatenbank (PDB: 1ALU). (Nach Somers et al. 1997, Seite 991).

IL-6 bindet in der Zelle an einen Rezeptorkomplex, der aus dem IL-6-spezifischen Glykoprotein (gp)-Rezeptor gp80 und der IL-6 signalweiterleitenden Untereinheit gp130 besteht (Heinrich et al. 1998). Der gp130-Rezeptor wird von allen Körperzellen exprimiert und vermittelt ebenfalls die Signalweiterleitung von anderen IL-6-Typ-Zytokinen wie IL-11, leukemia inhibitory factor (LIF), oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1), ciliary neurotrophic factor (CNTF), cardiotrophin-like Zytokine (CLC), novel neurotrophin-1/B cell stimulating factor-3 (NNT-1/BCF3) und IL-27. Gp80 wird hingegen vor allem in Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen sowie anderen Leukozyten-Populationen exprimiert. Somit sprechen Zellen, die gp80 nicht exprimieren, nicht auf IL-6 an. Durch die Bindung von IL-6 kommt es zur Aggregation des IL6-IL6-6R-Komplexes mit gp130. Intrazellulär sind wiederum Tyrosin-Kinasen der Janus-Kinasen-Familie (Jak1/2) an gp130 assoziiert (Heinrich et al. 2003). Durch die Bildung dieses hexameren Komplexes kommen die gp130-assoziierten Janus-Kinasen (Jak1/2) in nächster Nähe zueinander, sodass sie durch inter- oder intramolekulare Phosphorylierung aktiviert werden (Duhe und Farrar 1998, Pellegrini und Dusanter-Fourt 1997). Die aktivierten Janus-Kinasen phosphorylieren spezifische Tyrosinreste des gp130-Rezeptors und sind so für die Rekrutierung der signal-transducer-and-activator-of-transcription (STAT)-Elemente an gp130 verantwortlich. Die STAT-Elemente werden ihrerseits ebenfalls von den Janus-Kinasen phosphoryliert. Diese aktivierten Homodimere translozieren in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktoren an

Promotorelemente von Zielgenen zu binden. Zu diesen Zielgenen gehören auch die Gene von Akut-Phase-Proteinen, wie z. B. das α 2-Makroglobulin-Gen (Wegenka et al. 1993). Im Verlauf des inflammatorischen Geschehens korrelieren die IL-6-Serumspiegel klar mit dem Schweregrad des septischen Krankheitsgeschehens (Cavaillon et al. 2003, Oberholzer et al. 2000). Sehr hohe Spiegel gehen nachweislich mit einer schlechten Prognose und häufig letalem Ausgang einher, zudem werden dem IL-6 kardiodepressive Eigenschaften zugeschrieben (Pathan et al. 2004).

1.5 Akut-Phase-Modelle

1.5.1 Tiermodelle der APR

Um die Akut-Phase-Reaktion *in-vivo* zu untersuchen, werden 2 Modelle genutzt (Ramadori und Christ 1999). Das erste Modell beschreibt die Induktion der Akut-Phase mittels einer intraperitonealen oder intravenösen bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS)-Applikation. Dieses Modell ist charakterisiert durch einen schnellen Anstieg der Serumkonzentration der drei wichtigsten proinflammatorischen Zytokine: IL-6, IL-1 β und TNF- α (Ulich et al. 1990, Ulich et al. 1991). Ein zweites Modell beschreibt die Induktion eines sterilen Abszesses nach subkutaner oder intramuskulärer Injektion von Terpentinöl (TO). In den Forschungen von Boelen et al. wird beschrieben, dass die Terpentinölinjektion in Mäusen einen ausgeprägteren IL-6-Anstieg im Plasma als die Gabe von LPS bewirkt (Boelen et al. 1996). TO zieht eine lokale Inflammation mit einer folgenden systemischen APR nach sich (Fey und Fuller 1987). Dieses Modell zeichnet sich durch den lokalen Anstieg von IL-1 β , TNF- α und den zirkulierenden Anstieg von IL-6 aus (Luheshi et al. 1997).

1.5.2 Hochregulation von Hämoxxygenase-1 induziert durch Terpentinöl

Hämoxxygenase-1 (HO-1) ist ein mikrosomales Enzym, welches im Hämstoffwechsel die Generation von Biliverdin (weiter zu Bilirubin), carbon monoxide und freien Ionen (Fe²⁺) katalysiert, wobei jedes dieser Produkte einen Einfluss auf den protektiven Effekt des HO-1 hat (Bach 2005). Es wurden drei Isoformen identifiziert, eine davon ist HO-1, die ein zytoprotektives, antiinflammatorisches und stressresponsives

Enzym ist (Maines et al. 1986, Wagener et al. 2003). Tron et al. konnten 2005 an einem TO-Modell zeigen, dass eine lokale Inflammation mit einer schnellen und starken HO-1-Expression in Hepatozyten einhergeht. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass der starke Anstieg der IL-6-Zirkulation für die HO-1-Induktion in der Leber verantwortlich ist (Tron et al. 2005).

Die Aktivierung von HO-1 zieht u.a. die Inhibition von Apoptose und oxidativem Gewebeuntergang nach sich, wobei signifikante Unterschiede bei der Leukozyten-adhäsion und -migration und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden konnten (Alcaraz et al. 2003). Diese förderlichen Effekte werden v.a. dem Mediatoreffekt auf andere Moleküle zugeschrieben, so z.B. dem Interleukin-10 (IL-10) und verschiedenen Prostaglandinen (Otterbein et al. 2003). Seit diesen initialen Studien hat die Forschungsgruppe um Lam et al. gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen den Melanocortinrezeptoren und dem antiinflammatorischen Enzym HO-1 bei der Begrenzung einer Inflammation besteht (Lam et al. 2005).

1.6 Das Melanocortinsystem

Das Melanocortinsystem besteht aus mehreren Agonisten und zwei Antagonisten sowie fünf Rezeptoren. Die Agonisten α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), β -MSH, γ -MSH und das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) sind alle durch posttranslationales processing von einem Pre-Hormon abgeleitet, dem Proopiomelanocortin (POMC).

1.6.1 Komponenten des Melanocortinsystems

Melanocortine sind eine Gruppe von Peptidhormonen, die wichtige Funktionen bei den verschiedenen physiologischen Prozessen übernehmen. Hierzu zählen neben der Gewichtsregulation die Nervenregeneration, die Pigmentierung, adrenale Steroidhormon-Synthese, aber auch wichtige Prozesse in der Inflammation.

Bereits seit den 20er Jahren ist bekannt, dass in der Hypophyse gebildete Hormone sowohl Einfluss auf die Pigmentierung als auch auf die Glukokortikoidsynthese in der Nebennierenrinde haben, deshalb wurde seitdem der Name Melanocortin geprägt

Einleitung und Zielsetzung

(Tatro 1996). Als im Nachhinein die Sequenzen des ACTH und zweier melanotrophischer Faktoren, des α -melanocyte α -MSH und des β -MSH, identifiziert wurden, sah man, dass sich diese viele strukturelle Ähnlichkeiten teilten. So haben zum Beispiel α -MSH und ACTH die gleiche N-Terminus-Sequenz und die Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Sequenz dieser Peptide ist ebenfalls in β -MSH präsent (Harris 1959).

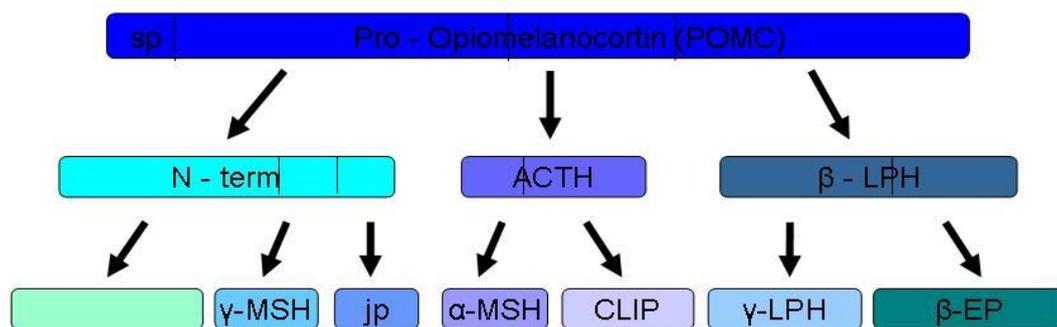


Abbildung 4: Schematischer Überblick über die wichtigsten Peptide, die durch limitierte Proteolyse aus dem Polypeptid POMC gewonnen werden können

Abkürzungen: sp: Signalpeptid; N-term: N-terminaler Teil des POMC; ACTH: adrenocorticotropes Hormon; LPH: Lipotrophes Hormon (beeinhaltet β -MSH); MSH: Melanotropin; jp: joining peptide; CLIP: Corticotropin-like intermediate lobe peptide; EP: Endorphin.

Spätere Studien konnten zeigen, dass ACTH, α -MSH und β -MSH, aber auch das β -Lipotropin und β -Endorphin aus demselben Vorläuferprotein, dem Proopiomelanocortin (POMC), durch limitierte Proteolyse entstehen (Mains et al. 1977). POMC konnte im Jahre 1979 erstmals geklont werden (Nakanishi et al. 1979). Das POMC wird in verschiedenen Geweben des Körpers, u.a. in der Haut, der Hypophyse, dem Gastrointestinaltrakt (Larsson 1981) und dem Hoden, exprimiert, sodass je nach Gewebe verschiedene posttranslationale Fragmente gespalten werden. Das POMC ist ein uraltes Gen, das sich wahrscheinlich seit über 700 Millionen Jahren kaum verändert hat. Das Neunauge (Petromyzontidae), ein fischähnlicher, stammesgeschichtlich sehr primitiver Vertreter der Wirbeltiere (Vertebrata), exprimiert beispielsweise dieses Gen (Heinig et al. 1995). α -MSH ist ein aus 19 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, das im Zusammenspiel der an der Gewichts- und Appetitregulation beteiligten Substanzen eine wichtige Rolle spielt (Cone 1999). Außerdem haben zahlreiche Studien zu entzündlichen und septischen

Erkrankungen gezeigt, dass α -MSH eine hochpotente und wichtige Funktion in der Antiinflammation besitzt (Catania und Lipton 1993, Lipton et al. 1999).

1.6.2 Die Melanocortinrezeptoren

1.6.2.1 Die Melanocortinrezeptorfamilie

Melanocortinrezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Bisher konnten fünf bekannte Subtypen identifiziert werden, welche alle den intrazellulären Cyclic-adenosine-monophosphate (cAMP)-Spiegel erhöhen können. Außerdem kann die Stimulierung der Melanocortinrezeptoren zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} (Kojima et al. 1985), einer Aktivierung der Mitogen-activated-protein (MAP)-Kinase (Englaro et al. 1995) sowie des Inositol-Triphosphates ($InsP_3$), aber auch zur Einleitung des Protein-Kinase-C (PKC)-Weges führen (Kapas et al. 1995), wodurch sich der große Einfluss auf die Signaltransduktion der Zelle verdeutlichen lässt. Das Melanocortinsystem ist einzigartig, weil zwei endogene Antagonisten existieren, Agouti und Agouti-related peptide (AGRP). Alle fünf Rezeptoren weisen eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Melanocortinen und endogenen Antagonisten auf (siehe Abb. 7). Der Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) ist der typische α -MSH-Rezeptor, der hauptsächlich in kutanen Melanozyten gebildet wird, aber auch in anderen Zelltypen der Haut nachweisbar ist (Luger et al. 1999). Der MC1R hat eine Schlüsselrolle bei der Haut- und Haarpigmentierung. Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) gehört zu den klassische ACTH-Rezeptoren, da sie v.a. in der Nebennierenrinde exprimiert werden und die ACTH-Effekte auf die Steroidsekretion beeinflussen. Der Melanocortin-3-Rezeptor (MC3R) wird in vielen Gebieten des zentralen Nervensystems (ZNS), aber auch in verschiedenen peripheren Geweben, wie dem Gastrointestinaltrakt oder der Plazenta, exprimiert (Chhajlani 1996). Am MC3R sind alle Melanocortine äquipotent. Dieser Rezeptor scheint eine große Rolle bei der Energiehomöostase des Organismus zu spielen. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R), welcher den eigentlichen Mittelpunkt dieser Arbeit darstellt, konnte bisher vor allem im ZNS nachgewiesen werden; er hat dort großen Einfluss auf Nahrungsaufnahme und Appetitregulation (Benoit et al. 2000), wird aber auch mit der antiinflammatorischen Wirkung von α -MSH in Zusammenhang gebracht (Sinha et al. 2004). Der Melanocortin-5-Rezeptor (MC5R) kann in vielen menschlichen peripheren Geweben nachgewiesen werden, hierzu zählen Organe wie Leber, Lunge, Magen,

Einleitung und Zielsetzung

Nebenniere, aber auch spezialisierte Zellen wie Leukozyten oder Adipozyten. Die einzige bisher nachgewiesene Funktion des MC5R ist das Mitwirken bei der Regulation von exokrinen Funktionen der Haut, bei Erkrankungen wie Akne oder Dermatitis (Chen et al. 1997).

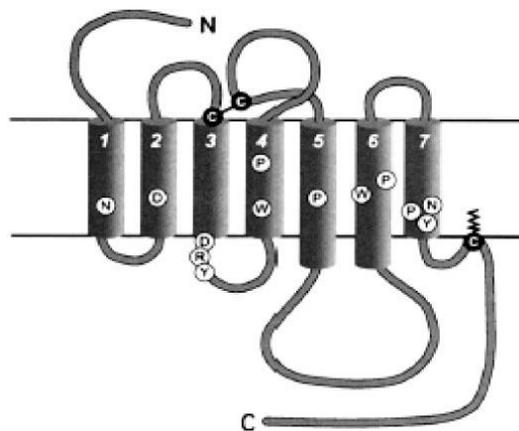


Abbildung 5: Schematische Darstellung des MC4R

Die Melanocortinrezeptoren (MCR) gehören zu einer Gruppe von Klasse-A-G-Protein-gekoppelten sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren, die durch abwechselnde extrazelluläre Schleifen (engl. extracellular loops) verbunden sind. Hierzu gehören z.B. auch Cannabinoid-, Melatonin- und Chemokinrezeptoren und viele andere. Die MCR haben viel gemeinsam mit anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren; sie alle besitzen ein N-glykosyliertes Ende, das extrazellulär lokalisiert ist, zur Bindung der Proteinkinase C oder/und A. Dies gilt als ein Indikator dafür, dass die MCR an vielen Regulationsmechanismen beteiligt sind (nach Catania et al. 2004, Seite 5).

	Potency of Ligands	Antagonists	Primary Functions
MC1R	α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH	Agouti	Pigmentation, inflammation
MC2R	ACTH	Agouti	Steroidogenesis
MC3R	α -MSH = β -MSH = γ -MSH = ACTH	Agouti, AGRP	Energy homeostasis
MC4R	α -MSH = ACTH > β -MSH > γ -MSH	Agouti, AGRP	Energy homeostasis, erectile function
MC5R	α -MSH > ACTH > β -MSH > γ -MSH		Sebaceous gland secretion

MC1R, melanocortin receptor-1; MSH, melanocyte-stimulating hormone; ACTH, adrenocorticotrophic hormone; AGRP, agouti-related protein.

Abbildung 6: Die Melanocortin-Rezeptorfamilie und ihre Eigenschaften

Aufgeführt sind für jeden Rezeptor die spezifischen Agonisten und Antagonisten sowie die ihm zugerechneten Funktionen und Aufgaben (nach Catania et al. 2004, Seite 6).

1.6.2.2 Der Melanocortin-4-Rezeptor

Der MC4R konnte bisher vor allem im Zentralnervensystem nachgewiesen werden (Gantz et al. 1993). Da seine Distribution dort sehr weitläufig ist, war er praktisch in allen Arealen des Gehirns zu detektieren, hierzu zählen u.a. Cortex, Thalamus, Hypothalamus, Hirnstamm und das Rückenmark (Mountjoy et al. 1994, van der Kraan et al. 1999). Der MC4R hat große Bedeutung bei der Gewichtsregulation, was

Einleitung und Zielsetzung

in verschiedenen Studien belegt werden konnte (Butler et al. 2001). Die messenger RNA (mRNA)-Level von POMC, aber auch von AGRP werden durch den Energiestatus des Organismus bestimmt. In einer Fastenzeit steigen die Level von AGRP, wohingegen die des POMC sinken, was in einer Situation mit negativer Energiebilanz angemessen erscheint (Mizuno et al. 1998, Mizuno und Mobbs 1999). Folglich führt dieser Regulationsmechanismus bei Überfütterung zu einer Erhöhung der POMC-mRNA-Level (Hagan et al. 1999). Diese Effekte scheinen durch Leptin vermittelt zu werden. Das Fettgewebshormon Leptin stimuliert bzw. inhibiert durch veränderte Leptinspiegel die Expression von POMC und AGRP im Nucleus arcuatus mit Projektion in den Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus (Cheung et al. 1997, Schwartz et al. 1997).

Das POMC-Spaltprodukt α -MSH ist in diesen Zentren der bedeutendste Agonist am MC4R-Rezeptor und führt somit zur gesteigerten Nahrungsaufnahme. Gegensätzliches gilt für den Antagonisten AGRP (siehe Abb. 7).

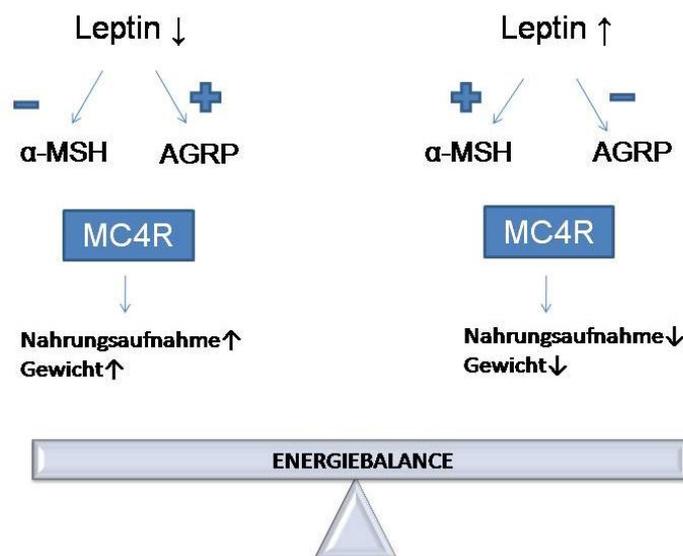


Abbildung 7: Die Regulation des Energiehaushalts durch das Melanocortinsystem

Abkürzungen: α -MSH: α -melanocyte stimulating hormone; AGRP: Agouti-related peptide; MC4R: Melanocortin-4-Rezeptor.

Als direkter In-vivo-Beweis für die Rolle des MC4R bei der Gewichtsregulation diente ein Tiermodell mit MC4R-knock-out-Mäusen (MC4R^{-/-}), die folglich alle eine Altersübergewichtigkeit, begleitet von Symptomen wie Hyperphagie, Hyperinsulinämie und Hyperglykämie, entwickelten (Huszar et al. 1997).

Zusammenfassend demonstriert eine Vielzahl von Studien, dass die Aktivierung des MC4R die Nahrungsaufnahme und den Energieverbrauch herunter reguliert und dass eine Unterbrechung oder Mutationen im MC4R-Signalweg zu Übergewicht führen.

Wie oben erwähnt, ist der Melanocortinrezeptor auch im Rückenmark vorhanden, von der Forschergruppe um Vrinten et al. wurde ein chronic-constriction-injury (CCI)-Modell des Nervus ischiadicus zur Untersuchung des Einflusses des MC4R auf neuropathische Schmerzen etabliert. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die intrathekale Injektion von Melanocortinrezeptoragonisten zu einem Anstieg der mechanischen Allodynie bei Ratten führte. Hingegen resultierte aus der Injektion eines MC3R/MC4R-Antagonisten ein Rückgang von Allodynie, was die naheliegende Schlussfolgerung zulässt, dass der MC4R einen bedeutenden Einfluss auf die Physiologie von neuropathischer Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung hat. Veränderungen im Melanocortinsystem und das daraus resultierende Empfinden des neuropathischen Schmerzes werden durch den Anstieg der [125I]-NDP-MSH-Bindung an Rezeptoren im dorsalen Horn übermittelt (Vrinten et al. 2000).

Die mRNA des MC4R konnten in der Leber der Flunder und des Zackenbarsches detektiert werden (Kobayashi et al. 2008, Sanchez et al. 2009). Eine Expression des MC4R in der Rattenleber ließ sich bisher noch nicht nachweisen (Chhajlani 1996, Gantz und Fong 2003, Tao 2010).

1.7 Melanocortinsystem und die Kontrolle der Inflammationsreaktion

Im Folgenden sollen der in der vorliegenden Arbeit untersuchte MC4R im Speziellen und dessen Wirksamkeit erläutert werden. Ein besonderes Augenmerk ist hierbei auf die klinische Anwendung im Rahmen der Antiinflammation gerichtet. Dies geschieht im Hinblick auf eine mögliche zukünftige Forschung in der Pathogenese von Sepsis und anderen Entzündungsmodellen.

1.7.1 Melanocortin-4-Rezeptor vermittelt antiinflammatorische Antwort von α -MSH

Durch die zentrale oder periphere Gabe von Melanocortinen konnte eine Unterdrückung der Inflammation in verschiedenen Modellen nachgewiesen werden. Hierzu wurde in experimentellen Studien eine Inflammation mittels verschiedener inflammatorischer Stimulanzen induziert, des Weiteren aber auch der Einfluss der Melanocortine auf Mediatoren (Zytokine) in einem experimentellen Arthritis-Modell untersucht (Lipton et al. 1999). Dafür wurde der antiinflammatorische Effekt der Melanocortine als sinnvolles Mittel bei der Behandlung verschiedener Erkrankungen, beispielsweise einer chronischen Inflammation oder Sepsis, geprüft (Lipton et al. 2000). Es wurden viele mögliche Wirkungsweisen der Melanocortine auf das Immunsystem eruiert, wie die direkte Interaktion mit peripheren Immunzellen, was die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und NO vermindert. α -MSH wird in der Literatur als eines der wichtigsten Hormone im Zusammenhang mit Antiinflammation benannt. Die Wirkung des α -MSH wird über die Aktivierung der Melanocortinrezeptorfamilie beschrieben (Wikberg et al. 2000). α -MSH ist der wichtigste Agonist am MC4R. Die C-terminus-Sequenz des α -MSH (α -MSH 11-13) inhibiert die Synthese oder Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF- α , INF γ , nitric oxid) und steigert die Produktion des immunsuppressiven IL-10 (Catania et al. 2000, Getting et al. 2003). In den meisten Studien werden diese Effekte durch den Einfluss des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa B (NF κ B) vermittelt (Ichiyama et al. 1999a). Die Melanocortinrezeptoren werden in vielen peripheren Immunzellen exprimiert, wie Lymphozyten oder Monozyten, was ihre Bedeutung in der Vermittlung der Antiinflammation unterstreicht (Bhardwaj et al. 1997, Buggy 1998). Auch die zentrale Applikation von Melanocortinen hat einen Einfluss auf den Ablauf einer peripheren Inflammation. α -MSH hemmt auch die Inflammation innerhalb des Gehirns. Intracerebroventrikulär (i.c.v.) appliziertes α -MSH hemmt die durch LPS induzierte zentrale Tumor-necrosis-factor-alpha (TNF- α)-Freisetzung (Rajora et al. 1997). TNF- α wird von Gliazellen produziert, welche wahrscheinlich das Ziel für die Melanocortine im Gehirn darstellen, in diesem Fall hemmt α -MSH die Aktivierung der Mikroglia (Delgado et al. 1998). Allerdings sind es auch die Zellen selbst, die in die Effekte der Melanocortine involviert sind und deren Wirkung vermitteln. Auf diese Weise hemmen die Melanocortine über verschiedene Mechanismen die

Inflammation, wobei immer noch das komplette Verständnis über den exakten Mechanismus für zukünftige Untersuchungen zu klären ist.

1.7.2 MC4R-vermittelte cAMP-Erhöhung führt zur Downregulation von NF- κ B

Der MC4R ist der Melanocortinrezeptorsubtyp, der in der antiinflammatorischen Wirkung der Melanocortine die bedeutendste Rolle spielt. 2004 konnte die Forschergruppe um Sinha et al. nachweisen, dass der Melanocortin-4-Rezeptor die antiinflammatorischen und antipyretischen Effekte des α -MSH vermittelt (Sinha et al. 2004). Der transmembrane Signaltransduktionsweg des α -MSH führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase, ein Enzym, das den Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels nach sich zieht (Eberle et al. 1978). Der cAMP-Anstieg induziert die Aktivierung der Protein-Kinase A (PKA) und führt zur Proteinphosphorylierung. Die erste Studie, in der der Mediatoreffekt der Adenylatcyclase durch α -MSH nachgewiesen werden konnte, stammte von Bitensky and Burstein (Bitensky und Burstein 1965). Im Anschluss konnten die bemerkenswerten Effekte des α -MSH auf die verminderte Produktion von inflammatorischen Mediatoren durch die Entdeckung der Inhibition des NF- κ B erklärt werden (Manna und Aggarwal 1998). Diese Suppression des NF- κ B wird durch die bereits erwähnte cAMP-Generierung und die Aktivierung der PKA eingeleitet. NF κ B ist ein wichtiger nukleärer Faktor und reguliert hunderte von Genen, eingeschlossen die für Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren des hämatopoetischen Systems, sowie antiapoptische Faktoren und induziert die nitric oxide synthase (iNOS). Durch die Inhibition des nukleären Transkriptionsfaktors (NF- κ B), begleitet vom Abfall der iNOS, konnte gezeigt werden, dass α -MSH die Produktion von NO in immunkompetenten Zellen senken kann. α -MSH ist so zum Beispiel in der Lage, über eine durch LPS induzierte Aktivierung des MC4R die hypothalamische iNOS- und Cyclooxygenase (COX-2)-Expression zu inhibieren (Caruso et al. 2004). Auf diese Weise kann der MC4R im konkreten Krankheitsmodell eine gewisse neuroprotektive Wirkung bei einer cerebralen Ischämie erzielen (Caruso et al. 2007). NO ist in diesem Zusammenhang als eines der bedeutendsten inflammatorischen Moleküle identifiziert worden und wird z.B. von aktivierten Astrozyten produziert.

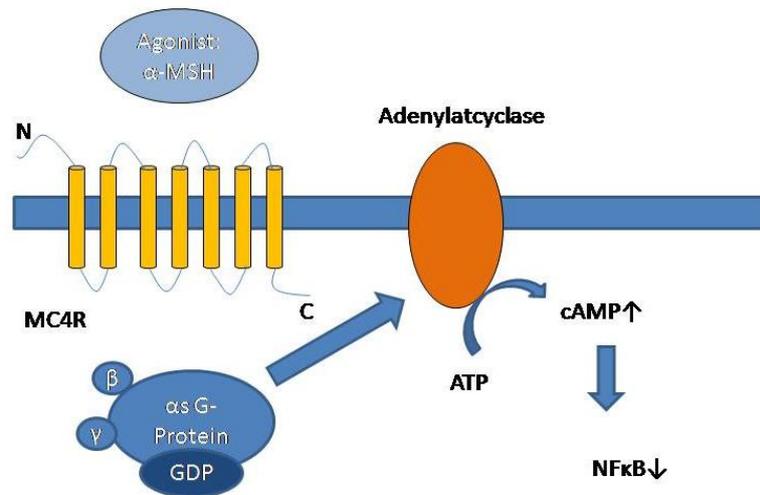


Abbildung 8: **Signaltransduktionsweg des MC4R**

Abkürzungen: MSH: Melanocortinrezeptor; N: extrazellulärer N-Terminus; MC4R: Melanocortin-4-Rezeptor; GDP: **G**uanosin**t**riphosphat; C: intracellulärer C-Terminus; ATP: Adenosin**t**riphosphat; cAMP: Cyclic-adenosine-3',5'-monophosphate; NFκB: nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B.

1.7.3 Funktionelle Verbindung zwischen MCR-Aktivierung und HO-1-Induktion

Nachfolgend soll das Wirkverständnis der Melanocortinrezeptoren auf die HO-1-Induktion erläutert werden. In einer Studie von Lam et al. wurde versucht, den funktionellen Link zwischen der MCR-abhängigen cAMP-Formation und der HO-1-Induktion im Makrophagen abzuschätzen (Lam et al. 2005). So konnte ein Hinweis dafür erbracht werden, dass die Melanocortinrezeptoraktivierung ihre antiinflammatorischen Effekte auch durch die HO-1-Induktion vermitteln kann. In Makrophagen ist die HO-1-Expression ein Teil der Reparaturprozesse der Zelle, die während der Inflammation zur Beschleunigung der Heilung und Geweberegeneration ablaufen (Willis et al. 1996). Außerdem ist der Katabolit Bilirubin ebenfalls in der Lage, mit antioxidanten und antiinflammatorischen Effekten beispielsweise die Leukozytenrekrutierung positiv zu beeinflussen (Vachharajani et al. 2000).

1.7.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich sagen: Das Melanocortinsystem als eines der phylogenetisch stark konservierten Systeme spielt mit seinen verschiedenen Rezeptoren eine zentrale Rolle in der Energiehomöostase, aber auch bei akuter und chronischer Antiinflammation (Hiltz et al. 1992). In zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre wurden die durch den MC4R vermittelten antiinflammatorischen Effekte insbesondere bei neurologischen Krankheitsbildern untersucht, dies begründet sich durch die Distribution des Rezeptors im ZNS. In der vorliegenden Arbeit konnte der MC4R im Lebergewebe von Ratten nachgewiesen werden. Daher wurden der MC4R und seine Kinetik in der Leber während der Akut-Phase-Reaktion untersucht und Rückschlüsse hinsichtlich einer Modulation der Interleukinproduktion erwogen.

1.8 Haushaltsgene

Als Housekeeping-Gene oder Haushaltsgene werden unabhängig vom Zellstadium und von äußeren Einflüssen exprimierte Gene bezeichnet. Nur bei schweren letalen Veränderungen der Zelle zeigt sich eine Modifikation ihrer Expression. Meist hängen diese Gene mit den lebenserhaltenden Funktionen der Zelle wie beispielsweise mit dem Grundstoffwechsel zusammen. Diese Gene können als Referenzgene verwendet werden, und die Expression der zu untersuchenden Gene kann mit ihnen ins Verhältnis gesetzt werden.

Beim Western-Blot im Rahmen der Proteinanalyse wurde β -Aktin als Referenz verwendet.

2 Material und Methoden

2.1 Verzeichnis der verwendeten Materialien

Chemikalien, biologische Substanzen, Antikörper und Primer	Hersteller
<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	<i>PAA /Linz, Österreich</i>
<i>Rainbow™ colored protein molecular weight markers</i>	<i>Amersham Pharmacia Biotech /Freiburg, Deutschland</i>
<i>Taq DNA polymerase</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Protease inhibitors PMSF</i>	<i>Sigma/München, Deutschland</i>
<i>dNTP master mix</i>	<i>Bioline/Luckenwalde, Deutschland</i>
<i>Tween 20</i>	<i>Bioline/Luckenwalde, Deutschland</i>
• <i>Ampuwa water</i>	<i>Fresenius/Bad Homburg, Deutschland</i>
<i>Guanidine isothiocyanate</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus,</i>	<i>MBI Fermentas/Vilnius, Litauen</i>
• <i>GeneRuler™ 1kb</i>	<i>MBI Fermentas/Vilnius, Litauen</i>
<i>6X loading dye solution,</i>	<i>MBI Fermentas/Vilnius, Litauen</i>
<i>DNA Ladder Plus</i>	<i>MBI Fermentas/Vilnius, Litauen</i>
<i>Essigsäure</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Aceton</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Bromophenol blue</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Methanol 100%</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>Dithiothreitol</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>PVDF Membran</i>	<i>GE Healthcare/München, Deutschland</i>
<i>Pentobarbital sodium (NarcorenR)</i>	<i>Merial/Hallbergmoos, Deutschland</i>
<i>Cäsiumchlorid</i>	<i>Paesel und Lorei/Frankfurt, Deutschland</i>
<i>Sodium dodecyl sulfate (SDS)</i>	<i>Roth/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Tris-HCl</i>	<i>Serva/Heidelberg, Deutschland</i>
<i>PMSF (Phenylmethanesulfonylfluoride)</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>NP- 40</i>	<i>Merck/Darmstadt, Deutschland</i>
<i>NaCl</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>proteases inhibitor cocktail</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie München, Deutschland</i>
<i>DMSO</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>Zitronensäure</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>EDTA</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>Ethidium bromide</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>

Material und Methoden

<i>Foetal Bovine Serum (FBS) "GOLD"</i>	<i>PAA Laboratories GmbH/Pasching, Österreich</i>
<i>Foetal calf serum (FCS)</i>	<i>PAA Laboratories GmbH/Cölbe, Deutschland</i>
<i>Insulin</i>	<i>Roche/Mannheim, Deutschland</i>
<i>Dexamethason</i>	<i>Sigma/München, Deutschland</i>
<i>MOPS</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>N-lauroylsarcosyl</i>	<i>Sigma-Aldrich Chemie/München, Deutschland</i>
<i>Terpentinöl</i>	<i>Universitätsapotheke/Göttingen, Deutschland</i>
<i>Stop Rnase-Inhibitor – 15000 U</i>	<i>S Prime/Hamburg, Deutschland</i>
<i>NuPAGE®-Transfer-Buffer (20X)</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Novex®-TBE-Running-Buffer (5X)</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Anti-MC4R rabbit-polyclonal-Antikörper</i>	<i>Abcam/Cambridge, USA</i>
<i>Anti-rabbit-Immunglobuline</i>	<i>Dako Cytomation/Glostrup, Dänemark</i>
<i>Anti-β-Aktin-mouse-monoklonal-Antikörper</i>	<i>Sigma/Saint Louis, USA</i>
<i>Anti-mouse-Immunglobuline</i>	<i>Dako Cytomation/Glostrup, Dänemark</i>
<i>Anti-Laminin</i>	<i>Sigma/Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Anti-GFAP</i>	<i>Sigma/Deisenhofen, Deutschland</i>
<i>Anti-ED1</i>	<i>geschenkt durch C. Dijkstra</i>
<i>Anti-ED2</i>	<i>geschenkt durch C. Dijkstra</i>
<i>THIQ</i>	<i>Sigma/München, Deutschland</i>
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>	<i>Biochrom/Berlin, Deutschland</i>
<i>MC4R immunizing peptide</i>	<i>Abcam/Cambridge, USA</i>
<i>Protein A- Agarose</i>	<i>Roche Diagnostics/Mannheim, Deutschland</i>

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, biologische Substanzen, Antikörper und Primer

Geräte	Hersteller
<i>Pipetten 10µl bis 200 µl</i>	<i>Eppendorf/Wesseling-Berzdorf, Deutschland</i>
<i>Pipetus®</i>	<i>Hirschmann Laborgeräte/Eberstadt, Deutschland</i>
<i>ABI Prism 7000 Thermal cycler</i>	<i>Applied Biosystem/USA</i>
<i>Eagle Eye™ system with built-in ultraviolet emitter, video camera und frame Integrator</i>	<i>Stratagene Europe/Amsterdam, Niederlande</i>
<i>Electro blotting apparatus, type Mini Trans-BlotR•</i>	<i>Bio-Rad/München, Deutschland</i>
<i>Electrophoresis apparatus, type Mini-Protean RIII</i>	<i>Bio-Rad/München, Deutschland</i>
<i>Hybridization oven</i>	<i>Biometra/Göttingen, Deutschland</i>
<i>Ice machine</i>	<i>Ziegra/Isernhagen, Deutschland</i>
<i>Magnetic mixer with warming, type M21/1</i>	<i>Framo-Gerätetechnik/Freiburg, Deutschland</i>
<i>Microscope Axioscop with photo camera MC 100</i>	<i>Zeiss/Oberkochen, Deutschland</i>
<i>Spot</i>	
<i>Microscope Axiovert 25</i>	<i>Zeiss/Oberkochen, Deutschland</i>
<i>Microwave oven,</i>	<i>Siemens/München, Deutschland</i>

Material und Methoden

<i>pH-Meter 761 Calimatic</i>	<i>Knick/Berlin, Deutschland</i>
<i>Power supply, Power Pac 300</i>	<i>Bio-Rad/München, Deutschland</i>
<i>Sterile bench, type Lamin Air, TL 2472</i>	<i>Heraeus/Hanau, Deutschland</i>
<i>Thermocycler, type MastercyclerR gradient</i>	<i>Eppendorf/Hamburg, Deutschland</i>
<i>Thermomixer 5436</i>	<i>Eppendorf/Hamburg, Deutschland</i>
<i>Thermostat, Heraeus /Hanau, Deutschland</i>	<i>Heraeus/Hanau, Deutschland</i>
<i>Ultra-Turrax TP 18/10 homogenizer</i>	<i>Janke & Kunkel/Staufen, Deutschland</i>
<i>Vortex, Genie 2™</i>	<i>Bender und Hobein/Zürich, Schweiz</i>
<i>Water bath 1083</i>	<i>GFL/Burgwedel, Deutschland</i>
<i>X-ray film cassettes 10x18</i>	<i>Siemens/München, Deutschland</i>
<i>X-ray film-developing machine SRX-101A</i>	<i>Konica Europe/Hohenbrunn, Deutschland</i>
<i>Beckman model J2-21 Zentrifuge</i>	<i>Beckman/München, Deutschland</i>
<i>Beckman rotor JE-6B</i>	<i>Beckman/München, Deutschland</i>
<i>XCell SureLock™ Mini-Cell</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>Mini-Vertical Electrophoresis System.</i>	
<i>Sigma 3K30 Zentrifuge</i>	<i>Sigma/Osterode, Deutschland</i>
<i>Rotor Nr 12156 – 16500 rpm</i>	
<i>Rotor Nr 12153 – 22000 rpm</i>	
<i>Centricon T-2070 ultracentrifuge</i>	<i>Kontron Instruments/Neufahrn,</i>
<i>Centricon rotor TST55.5 – 55000 rpm</i>	<i>Deutschland</i>
<i>Hettich Rotina 3850 Zentrifuge</i>	<i>Hettich/Tuttlingen, Deutschland</i>
<i>Hettich Rotina 48RS Zentrifuge</i>	<i>Hettich/Tuttlingen, Deutschland</i>
<i>Hettich Rotixa/RP Zentrifuge</i>	<i>Hettich/Tuttlingen, Deutschland</i>

Tabelle 4: **Verwendete Geräte**

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
<i>Pipettenspitzen 10 µl bis 1000 µl</i>	<i>Nunc/Wiesbaden Deutschland</i>
<i>Safe-Lock tubes (0.2, 0.5, 1.5 und 2 ml)</i>	<i>Eppendorf/Hamburg, Deutschland</i>
<i>Sterile filter pipette tips,</i>	<i>Biozym/Oldendorf, Deutschland</i>
<i>X-ray films HyperfilmTM</i>	<i>Amersham Biosciences/Freiburg, Deutschland</i>
<i>Braunules 2G14</i>	<i>Braun/Melsungen, Deutschland.</i>
<i>Sterile filter Nalgene, 0.2 µm</i>	<i>Sartorius/Göttingen, Deutschland</i>
<i>Eppendorf-Gefäße 1,5 ml</i>	<i>Eppendorf/Wesseling-Berzdorf, Deutschland</i>
<i>Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml), transfer</i>	<i>Sarstedt/Deutschland</i>
<i>Pipetten, Plastik-Gefäße (15 und 50 ml)</i>	
<i>Quarz-Küvetten</i>	<i>Hellma/Mühlheim, Deutschland</i>
<i>PVDF-Membran</i>	<i>Macherey & Nagel/Düren, Deutschland</i>
<i>Whatman GB003 filter</i>	<i>Schleicher & Schüll/Dassel, Deutschland</i>

Tabelle 5: **Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material und Methoden

Kits	Hersteller
<i>BCA Protein Assay reagent Kit</i>	<i>Pierce/Bonn, Deutschland</i>
<i>XCell SureLock_{TM} Mini-Cell Kit</i>	<i>Invitrogen/Karlsruhe, Deutschland</i>
<i>ECL-Plus Kit</i>	<i>GE Healthcare/Freiburg, Deutschland</i>
<i>ELISA Kit für α-MSH</i>	<i>Phoenix Pharmaceuticals/Burlingame, USA</i>
<i>ELISA Kit für IL-6</i>	<i>Pierce Biotechnology/Rockford, USA</i>

Tabelle 6: **Verwendete Kits**

Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt oder bei RNA-Experimenten mit RNAase-freiem Wasser. Der pH-Wert der Stammlösungen wurde bei 25°C eingestellt.

Stammlösung Endkonzentration:

Zitronensäure 0.25 M

Die Lösung wurde bei Raumtemperatur gelagert.

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 0.5 M

Zu 186,1 g Ethylendiamintetraessigsäure wurde 800 ml Aqua bidest zugegeben. Der pH wurde mit 5N NaOH auf 8.0 adjustiert und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Natriumazetat 2 M

Der pH wurde mit Essigsäure auf 85.4 justiert und die Lösung bei einer Temperatur von 4°C kühl gelagert.

PBS (Phosphate buffered saline, 10 x)

NaCl 1.4 M

KCl 27 mM

Na₂-HPO₄ 100 mM

KH₂PO₄ 18 mM

Der pH wurde mit HCl auf 7.3 justiert. Die Lösung wurde steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

Material und Methoden

SDS (Natriumlaurylsulfat) 20 %

Während der Präzipitation wurde die SDS-Lösung erwärmt, bis sie klar war.

Natriumcitrat 0.25 M

Der pH wurde mit 0.25 M Zitronensäure auf 7.0 justiert und die Lösung bei Raumtemperatur gelagert.

TBE (Tris-Borat) 5 x

54 g Tris Base wurde mit 27,5 g Borsäure und 20 ml 0,5 M EDTA auf einen pH von 8,0 justiert und anschließend mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Tris-HCl (Tris-Hydrochloride) 1 M

121,1 g Tris Base wurde in 800 ml in 2-fach destilliertem H₂O gelöst. Die unterschiedlichen pH-Werte wurden mit unterschiedlich konzentrierter HCl eingestellt: pH 7,4: 70 ml HCl, pH 7,6: 60 ml HCl und pH 8,0: 80 ml HCl. Das Volumen wurde mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

200 mM Stammlösung: 35,5 mg in 1 ml 100%igem Ethanol

NP-40 Lysispuffer

150 mM NaCl

1 % NP-40

50 mM Tris Base wurde mit 80 ml konzentrierter HCl auf pH 8.0 justiert. Die Lösungen wurden bei 4°C kühl gelagert.

2.2 Tiere und Tierhaltung

2.2.1 Studiendesign

Es wurden 2 Gruppen Ratten miteinander verglichen, eine Kontrollgruppe (untreated) ohne Entzündungsinduktion und eine Gruppe Ratten, die mit einer intramuskulären

Material und Methoden

TO-Injektion behandelt wurden, um sie einer subsequenten APR zu unterziehen. Die Studie untersucht die Dynamik des MC4R in Ratten, die zu verschiedenen Zeitpunkten, von 0,5 h bis 36 h, nach TO-Injektion untersucht wurden.

2.2.2 Tiere

Männliche Wistar-Ratten (200 bis 250 g) wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bestellt und unter standardisierten Bedingungen mit einem 12-Stunden-Tag/Nacht-Zyklus bei einer Raumtemperatur von 19 bis 23°C gehalten. Hierbei hatten sie freien Zugang zu frischem Wasser und Futterpellets (rat diet "ssniff", Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum. Die Tiere wurden frühestens 6 Stunden nach der Lieferung für den Versuch verwendet. Alle Tiere erhielten menschliche Fürsorge entsprechend den Richtlinien des Deutschen Tierschutzbundes e.V. und der National Institutes of Health (www.nih.gov/).

2.3 Induktion der Akut-Phase-Reaktion

2.3.1 Ablauf der Terpentingöl-Injektion und Sektion der Tiere

Die Ratten wurden durch die intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (400 mg/kg) betäubt. Um die Akut-Phase-Reaktion zu induzieren, wurden 5 ml/kg KG Terpentingöl in den rechten (50 %) und linken (50 %) Musculus gastrocnemius der anästhesierten Ratte injiziert. Kontrolltiere erhielten keine Injektion. Nach verschiedenen Zeitpunkten, von 30 Minuten bis 36 Stunden nach der TO-Injektion, wurden die Tiere unter einer Phenobarbital-Narkose getötet und die zu untersuchenden Organe wie Leber und Gehirn entnommen. Das Gewebe wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.2 Gewinnung von Blutproben und Serum-Isolation

Zu den verschiedenen Zeitpunkten von 0,5 – 36 h nach der TO-Injektion wurden Blutproben der Vena cava inferior in Heparinatmonovetten gewonnen. Diese wurden

für Serumanalysen der Enzymaktivität durch Standard-Routinediagnostik verwendet. Die Blutproben wurden über Nacht bei 4°C geronnen und am nächsten Tag 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Das Serum wurde mit der Pipette abgenommen und in extra Aliquotes bei -20°C gelagert.

2.4 Isolierung der RNA

2.4.1 Experimenteller Ablauf der RNA-Isolierung

Die RNA wurde mittels Guanidin-Isothiocyanat extrahiert, gefolgt von einer Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und Ethanolpräzipitation entsprechend der Methodik von Chirgwin (Chirgwin et al. 1979). Dies ist eine sehr geschickte Methode, um intakte RNA aus fast allen Zellen und Zellkulturen zu gewinnen, selbst wenn das endogene Level der RNAase-Aktivität hoch ist.

Homogenisierung der Gewebeproben: 100 mg des bei -80°C gelagerten Gewebes wurden mit einem Ultra-Turrax TP 18/10-Homogenisator dreimal für jeweils 10 Sekunden in 3 ml eiskaltem GITC-Puffer und frisch zugefügtem Antifoam A (Sigma) homogenisiert. Die Homogenate wurden für 10 Minuten bei 4°C und 3500 rpm zentrifugiert, sodass sich ein Pellet mit Zelldetritus ablagerte.

CsCl-Gradient und Ultrazentrifugation: Um den Gradienten aufzubauen, wurden 2 ml CsCl (Cäsiumchlorid) in ein 5 ml fassendes Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (6 pro Durchlauf) vorgelegt. Die klaren, in Guanidin gelösten Proben wurden langsam und vorsichtig auf den CsCl-Puffer aufgeschichtet und die Proben anschließend in der Ultrazentrifuge 21 Stunden bei 35.000 rpm in einem Kontron-TST55-Rotor bei 20°C zentrifugiert. Nachdem die Überstände vorsichtig abgenommen worden waren, blieb ein gelatinöses RNA-Pellet übrig, das mit 200 µl 70%igem Ethanol zweimal gewaschen wurde. Das Pellet wurde in 200 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. An dieses Vorgehen schließt sich direkt die RNA-Präzipitation an.

RNA-Präzipitation: Die RNA wird in 450 µl 100%igem Ethanol und Natriumacetat über Nacht bei -20°C präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C für 30 Minuten bei 12.000 rpm entsteht das oben beschriebene RNA-Pellet.

Material und Methoden

Lösungen für die Ultrazentrifugation:

<u>Guanidin-Isothiocyanat (GITC)-Puffer</u>	<u>Gesamtkonzentration</u>
Guanidin-Isothiocyanat	4 M
0.25 M Natriumcitrat	25 mM
N-Lauroylsarkosin	0.5 %

Die Lösung wurde steril gefiltert und bei 4°C dunkel gelagert. Mercaptoethanol wurde direkt vor Benutzung in einem Verhältnis von 1 zu 100 µl zum GITC-Puffer hinzugefügt.

<u>Cäsiumchlorid (CsCl)-Puffer</u>	<u>Gesamtkonzentration</u>
Cäsiumchlorid	5.7 M
0.25 M Natriumcitrat	25 mM
0.5 M EDTA	100 mM

Der pH-Wert wurde mit 0.25 M Zitronensäure auf 7.5 eingestellt. Die Lösungen wurden in RNase-freiem Wasser gelöst, steril filtriert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.4.2 Weiterer Umgang mit der gewonnenen RNA

Die mittels Ultrazentrifugation gewonnene RNA ist gegenüber Ribonukleasen sehr gefährdet. RNasen werden von allen Organismen produziert und ausgeschieden (z.B. auch im Schweiß) und sind sehr stabile wie auch aktive Enzyme. Sie benötigen keine Kofaktoren für ihre Aktivität, sind schwer zu inaktivieren und schon Spuren genügen, um die Proben zu degradieren. Daher sollten nur RNase-freie Verbrauchsmaterialien zum Einsatz kommen. Es wurde darauf geachtet, dass während des Arbeitens mit den Proben keine Verunreinigung durch RNasen stattfand und die RNA stets auf Eis gelagert wurde.

2.5 Messung der RNA-Konzentration

2.5.1 Photometrische Vormessung

Bevor die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden konnte, wurde eine Konzentrationsbestimmung der RNA anhand photometrischer

Material und Methoden

Messung durchgeführt. Durch Absorptionsmessung bei 260 nm, was dem Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen der RNA entspricht, konnte nach Kalibration des Gerätes durch Leerwertbestimmung des Trägermediums der RNA-Gehalt der Probe bestimmt werden. Proteine hingegen zeigen im Absorptionsspektrum ein Maximum von 280 nm. Diese Tatsache basiert vornehmlich auf den aromatischen Aminosäuren Tryptophan (280 nm) und Tyrosin (276 nm). Der Quotient E_{260}/E_{280} aus der Extinktion gibt somit über mögliche Verunreinigungen durch Proteinreste Aufschluss. Dieser Quotient sollte optimalerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Proben wurden mit einer 1:100-Verdünnung in RNase-freiem Wasser in einem Spektrophotometer (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) bei 260 nm und 280 nm gemessen. Bei RNA-Werten über 400 ng/μl wurde vor der Messung eine Vorverdünnung der Messprobe durchgeführt.

2.5.2 RNA-Quantifizierung und Bestimmung von Reinheit und Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung und Qualitätskontrolle der exakten RNA-Präparation konnten durch eine denaturierende Gelelektrophorese die 18S und die 28S rRNA bei allen Proben nachgewiesen werden. In der Ethidiumbromidfärbung sollte das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA etwa 2:1 betragen. Entsprechende Agarosemengen wurden durch Erhitzen in 125 ml 1x TBE-Puffer gelöst, nach Abkühlung auf ca. 60°C mit Ethidiumbromid (0,75 μg/ml) versetzt und in eine horizontale Gelkammer gegossen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 Volt. Durch das interkalierte Ethidiumbromid wurden die Fragmente bei UV-Licht (312 nm) sichtbar und ggf. wurden die gewünschte Fragmentbanden fotografiert.

TBE-Puffer (10x):

108 g Tris-Base

55 g Borsäure

EDTA (pH 8.3)

Gesamtkonzentration:

890 mM

890 mM

40 ml, 0.5 M

2.6 Reverse Transkription der RNA

2.6.1 Allgemeines zur Technik

Einzelsträngige cDNA (complementary DNA)-Abschnitte dienen für die rtPCR als Matrize. Mittels reverser Transkriptase muss vor dem folgenden analytischen Schritt die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Erstmals konnte die reverse Transkriptase von Howard Temin und David Baltimore zwischen 1970 und 1975 in Tumoviren nachgewiesen werden. Dieser Virus nutzt das Enzym zur Umschreibung von RNA in DNA und erreicht die Integration der viralen Erbsubstanz in die des Wirtes (Coffin 1996). In unseren Versuchen kam zur Umschreibung der RNA in cDNA die im Gotaq® enthaltene reverse Transkriptase zum Einsatz. Als Primer wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Oligo-dt-Primer eingesetzt, welcher durch Basenpaarung mit dem poly(A)-Schwanz der mRNA ein kurzes RNA-DNA-Hybrid ausbildet. Die reverse Transkriptase kann nun das 3'-Ende des Primer verlängern. Rndom Primer hingegen können an jeder Stelle der mRNA binden und somit längere Transkripte bilden.

2.6.2 Experimenteller Ablauf

Die cDNA wurde mittels reverser Transkription von 1 µg RNA gewonnen. Die in Tabelle 7 angeführten Reagenzien wurden bezogen auf die gemessene RNA-Konzentration berechnet. Nach Zugabe des Mastermix erfolgte die cDNA-Synthese in einem Thermocycler der Firma GenTech (Platinum SYBR®).

Reagenzien	Konzentrationen
DTT	0.1 M
dNTPs	100 nM
moloney-murineleukemia virus reverse transcriptase(M-MLV RT)	200 U
RNase-Inhibitor	16 U
µl primer oligo (dT) ₁₅	50 pM

Material und Methoden

<i>total RNA (mit Ampuwa supplementiert)</i>	<i>1 µg</i>
<i>Kompletter Ansatz</i>	<i>20 µl</i>

Tabelle 7: Reagenzien zur Gewinnung von cDNA.

Der Ablauf der Umschreibung ergab sich nach folgendem Zeit- und Temperaturschema:

Temperatur	Dauer
<i>37°C</i>	<i>60 min</i>
<i>90°C</i>	<i>10 min</i>
<i>4°C</i>	<i>Halten</i>

2.7 Die Polymerasekettenreaktion

Während der Zellteilung ist für jede Art von Leben die Vervielfältigung des Erbguts in den Zellen eine grundlegende Voraussetzung. Diese Nutzbarmachung stellt für die Molekularbiologie einer der wichtigsten Schritte in der Erforschung der kleinsten Elemente und des organischen Lebens dar. Im Jahre 1971 gelang es einer Arbeitsgruppe um Khorana et al. zum ersten Mal, mit geeigneten Primern und Enzymen DNA-Abschnitte enzymatisch zu amplifizieren. Ihre Arbeiten zur Interpretation des genetischen Codes bezüglich der Proteinsynthese wurden 1968 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie geehrt. Kary Mullins entwickelte 1983 die exponentielle In-vitro-Vervielfältigung von DNA, was die Grundlage für die heutige PCR-Amplifikation darstellt; dafür bekam er 1993 den Nobelpreis für Chemie.

2.7.1 Das Verfahren der PCR und deren Ablauf

Vor jeder Zellteilung muss eine Replikation des gesamten Erbgutes stattfinden, dazu wird die DNA-Doppelhelix in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Die zu analysierenden Doppelstränge werden im In-vitro-System der Real-time-Polymerasekettenreaktion (rtPCR)-Denaturierung bei 94°C aufgetrennt. Am jeweiligen 3'-Ende des zu replizierenden Einzelstrangabschnittes können sich die beiden im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer anlagern (annealing). Die Annealing-Temperatur ist primerspezifisch und liegt meist wenige Grad (2 bis 3°C) unter dem Schmelzpunkt. Die Annealing-Temperatur ist primerspezifisch und liegt meist wenige Grad (2 bis 3°C) unter dem Schmelzpunkt.

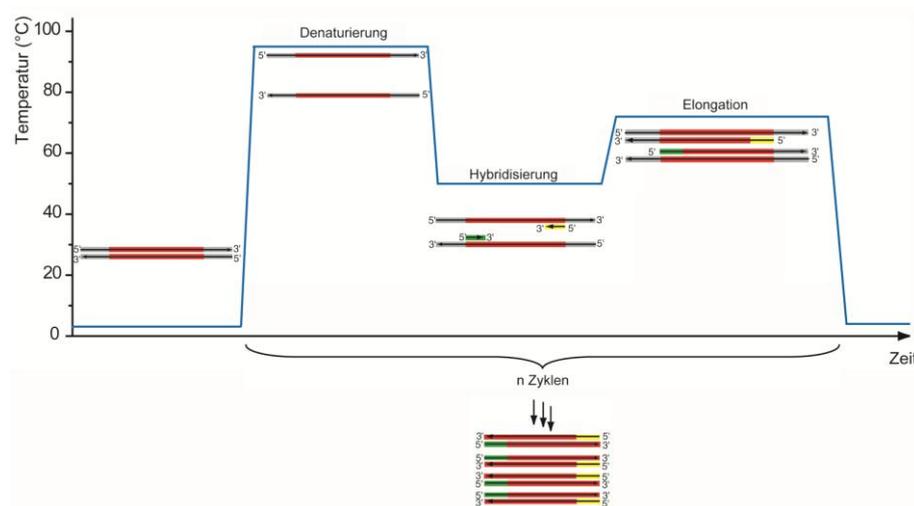


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs bei der rt-PCR

Quelle: Dr. Ilka Haase, Universität Hamburg, Institut für Lebensmittelchemie (nach Haase 2008).

Meist wird ein Primerpaar aus Forward (Sense)- und Reverse (Antisense)-Primer verwendet; diese beiden Primer grenzen so die zu vervielfältigende Sequenz auf dem DNA-Strang ein. Die hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert aus dem eingesetzten DNA-Nukleotid eine Kopie der Matrix-DNA vom 5'- zum 3'-Ende. Diesen Prozess bezeichnet man als Elongation. Einzelne Nukleotide werden dabei mit dem 3'-Ende des Primer verknüpft (Extension). Nach Verdopplung der zu vervielfältigenden DNA-Matrize (Template) verbleiben die Primer direkt in der Kopie des ursprünglichen Stranges und der Zyklus beginnt von Neuem. Es findet somit in den frühen Zyklen eine exponentielle Vervielfältigung der DNA statt (2^n). Zu einem späteren Zeitpunkt sinkt die Amplifikationsrate und die PCR wird nach ca. 40 Zyklen gestoppt. Die hohe Spezifität der Methodik beruht auf selektiven Primerpaaren. Mit

Material und Methoden

der Polymerasekettenreaktion kann außerdem eine sehr hohe Sensitivität erzielt werden, denn es sind sehr geringe Ausgangsmengen (template) ausreichend, um die PCR durchzuführen.

2.7.2 Die real-time-PCR

Die verwendete *rtPCR* ist eine Weiterentwicklung der von Mullin 1983 entwickelten Methode. Sie gehört in der heutigen Forschung zu einem der gängigsten und sichersten Verfahren zum quantitativen Nachweis von DNA oder RNA. Der quantitative Nachweis gelingt durch Kopplung an Fluoreszenzmarker. Alternativ zur *rtPCR* kommt die an die PCR angeschlossene immer noch gängige Gel-Elektrophorese mit einer Agarose- oder Polyacrylamid-Matrix in Frage.

Bei der in unseren Untersuchungen verwendeten *rtPCR* wurde gemäß den Protokollbeschreibungen der Arbeitsgruppe von Malik et al. gearbeitet (Malik et al.). Durch fluorimetrische Messung der gebildeten PCR-Produkte können Rückschlüsse auf die eingesetzte Kopienzahl der Matrix-DNA gezogen werden. Hierbei kam der Doppelstrang-DNA-interkalierende SYBR[®]-Green-Farbstoff zum Einsatz. Abhängig von der Menge der zu amplifizierenden DNA steigt auch die Fluoreszenz-Intensität dieses Farbstoffs.

2.7.3 Auswertung des Amplifikationsdiagramms

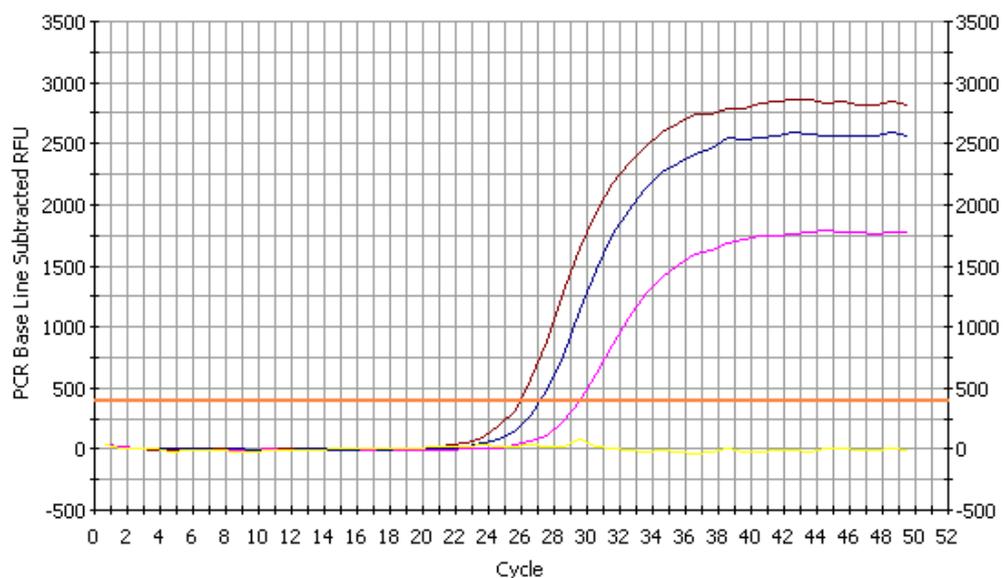


Abbildung 10: PCR-Kurve von drei cDNA-Proben mit eingezeichnetem Threshold

Material und Methoden

Mit der Formel $N = N_0 \times (E+1)^n$ lässt sich die vorliegende Reaktion beschreiben. So kann die Menge der vervielfältigten Moleküle (N) in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten DNA (N_0), der Anzahl der Zyklen (n) und der Effizienz der Reaktion (E) berechnet werden. Die Effizienz nimmt mit steigender Zyklenzahl ab, was durch die Abnahme der Reagenzienkonzentration, durch die Reassoziaton der PCR-Produkte, Polymerase-Instabilität oder Produktinhibition bedingt ist. Im Amplifikations-Diagramm stellt sich diese Phase als Plateau dar. Für eine quantitative Auswertung kann nur die sogenannte Log-Phase oder exponentielle Phase als die Phase mit konstanter Effizienz verwendet werden.

Nach Starten der PCR beginnt direkt die lineare Grundphase, die als Baseline bezeichnet wird. Sie beschreibt die Hintergrundfluoreszenz, also alle unspezifischen Fluoreszenzsignale. Der Schwellenwert (Threshold) wird als zehnfache Schwankung der Hintergrundfluoreszenz festgelegt. Der Zyklus, bei welchem die Amplifikationskurve genau den Threshold schneidet, wird als Schwellenwertzyklus (Threshold Cycle) bezeichnet. Dieser Schwellenwertzyklus befindet sich zu Beginn der Log-Phase und entspricht somit der Zyklenzahl, an der sich das zu messende Amplifikat zum ersten Mal über dem Grundrauschen zeigt. Für die Berechnung der eingesetzten DNA-Konzentration verwendet man diesen sog. Threshold Cycle (C_T -Wert), allerdings ist für diese Berechnung eine Standardisierung notwendig.

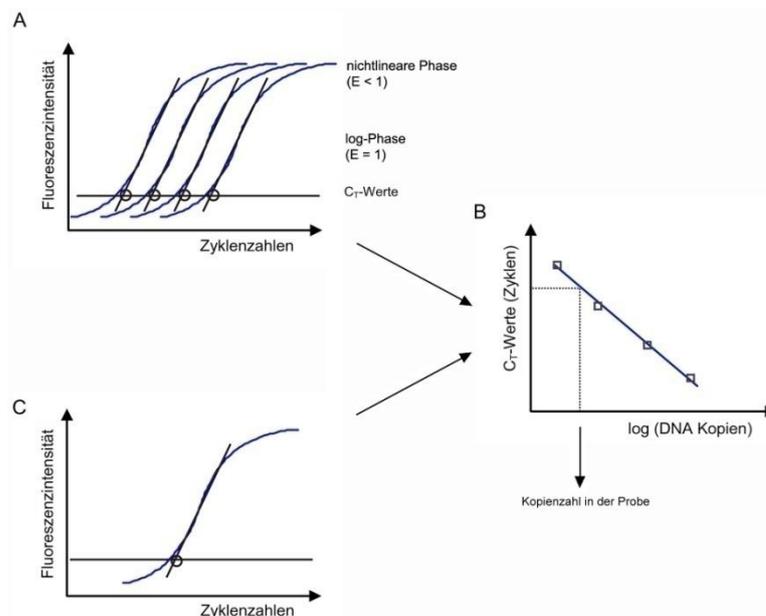


Abbildung 11: Amplifikationskurven

A: Amplifikationskurven mit Standardfragmenten, B: aus A resultierende Standardkurve, C: Amplifikationskurve der Probe mit unbekannter Konzentration, Quelle: Dr. Haase, Ilka, Universität Hamburg, Institut für Lebensmittelchemie (nach Haase 2008).

Material und Methoden

Für die Standardkurve wurde mit Fragmenten bekannter Konzentrationen eine PCR durchgeführt und ein Diagramm erstellt (Abbildung 15A). Anschließend konnten die C_T -Werte auf die Ordinatenachse und die DNA-Kopien in logarithmischer Weise auf die Abszisse aufgetragen werden (Abbildung 15B). Mit Hilfe der Standardkurve kann dem gemessenen C_T -Wert der zu messenden Probe (15C) nun die eingesetzte cDNA-Kopienzahl zugeordnet werden.

Zur weiteren Standardisierung wurde bei jedem Probenlauf die Expression eines Referenz-Gens gemessen. Hierbei kam das Housekeeping-Gen β -Actin zum Einsatz und dessen Expression wurde mit der des zu untersuchenden Gens ins Verhältnis gesetzt.

2.7.4 Praktische Durchführung der PCR

Die verschiedenen Reagenzien der PCR wurden bei dieser Methode direkt in einem Reaktionsgefäß zusammengefügt. Es wurde für die vorliegenden Versuche SYBR[®]-Green nach Herstelleranleitung verwendet. Bei jeder Messung wurde eine templatefreie Kontrolle mitgeführt und statt der cDNA 2.5 μ l H₂O als negative Kontrolle hinzugefügt. Der Probenansatz ergab sich wie folgt:

Substanz	Volumen
Green Master Mix Taq	
Polymerase	13,0 μ l
forward-Primer 5 mM	1,5 μ l
reverse-Primer 5 mM	1,5 μ l
H ₂ O(Ampuwa®)	6,5 μ l
cDNA	2,5 μ l

Bei den verwendeten forward- und reverse-Primer-Oligonukleotidmolekülen handelt es sich um kurze, einsträngige DNA-Abschnitte, die komplementär zum Anfang und zum Ende der zu replizierenden Sequenz sind.

Gen	Sequenz (forward)	Sequenz (reverse)
IL-6	5'-GTC AAC TCC ATC TGCC CTT CAG-3'	5'-GGC AGT GGC TGT CAA CAA CAT-3'
β -Aktin	5'-ACC ACC ATG TAC CCA GGC ATT -3'	5'- CCA CAC AGA GTA CTT GCG CTC A-3'
MC4R	5'-CAC AGT ATC GGG CGT TCT TT -3'	5'-GTA ATT GCG CCC TTC ATG TT -3'

Tabelle 8: Primersequenzen für die rt-PCR

Material und Methoden

Im Reaktionsansatz befinden sich Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dTTP, dGTP und dCTP) zur Erhöhung der Effektivität der PCR, Magnesiumchlorid, außerdem Puffer und Wasser. SYBR[®]-Green dient dem photometrischen Nachweis. Zur Durchführung der rtPCR wurde das ABI-prism-7000-sequence-detection-system verwendet und für die durchgeführten PCRs mit folgendem Programm betrieben:

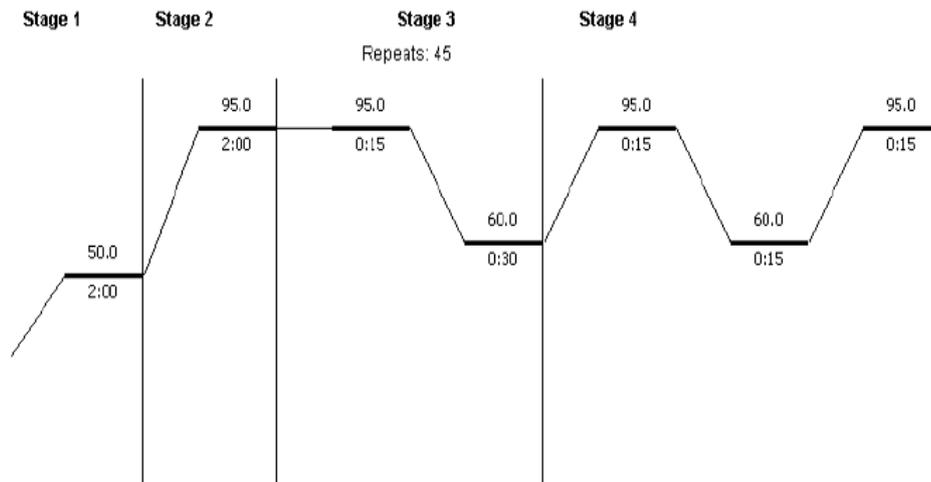


Abbildung 12: Amplifikations-Temperaturverlauf zur Durchführung der rt-PCR

Zyklus	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
1	50°C	2 min	1
2	95°C	10 min	1
3	95°C	15 s	45
	60°C	30 s	
4	alle 10 s Temperaturerhöhung um 0,5°C	je 10 s	80
5	50°C	halten	1

Tabelle 9: Amplifikations-Temperaturverlauf zur Durchführung der rtPCR

Alle Proben wurden in doppeltem Ansatz pipettiert. Es wurden primerspezifische Annealing-Temperaturen gewählt. Anschließend erfolgte die Erstellung der Amplifikationskurve. Zur Berechnung der Menge des eingesetzten Templates wurde eine mit Microsoft Excel erstellte Standardkurve verwendet. Die Ergebnisse wurden mit dem Housekeeping-Gen normalisiert und die Genexpression wurde anhand der Ct-Werte berechnet.

2.7.5 Gelelektrophorese

Zur Untersuchung des amplifizierten Genproduktes wurden die PCR-Produkte auf ihre korrekte Länge und Menge kontrolliert. Dazu wurden 1,25 g Agarose mit 125 ml 1x TBE-Puffer (1%iges Gel) versetzt, in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend bei Raumtemperatur auf ca. 60°C abgekühlt. Es wurden 6 µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gel wurde in eine entsprechende Kammer gegossen.

Nach Polymerisation und Abkühlung des Gels wurden in die Geltaschen jeweils 10 µl PCR-Amplifikat mit 5 µl Gene-Ruler überführt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 80 V in ca. 40 Minuten. Ein 1 kb-Marker wurde als DNA-Längen-Standard verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte auf einem UV-Strahler sichtbar gemacht und mit einer integrierten Kamera dokumentiert.

2.8 Proteinuntersuchungen und die Technik des Western-Blots

Um die Proteinsynthese zu untersuchen, wurde ein Western-Blot mittels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis) als Analyseverfahren durchgeführt. Hierbei lassen sich spezifische Proteine quantitativ darstellen und es kann eine Aussage über die Höhe und die Veränderung der Syntheseleistung von Zellverbänden getroffen werden.

Das Blotten an sich ist ein Versuch, etwas, das zuvor gelelektrophoretisch getrennt wurde, dauerhaft auf einer Membran zu fixieren und sichtbar zu machen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der spezifischen Proteine hängt von der unterschiedlichen Ladung, Masse und Gestalt sowie von den Eigenschaften der Trägersubstanz ab. Auch andere geladene Moleküle wie cDNA und RNA lassen sich elektrophoretisch auftrennen (Doenecke und Karlson 2005).

2.8.1 Proteinisolierung aus dem Lebergewebe

Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden alle auf Eis bei 4°C durchgeführt, um der proteolytischen Degradation der Proteine vorzubeugen. Es werden 100 µg des bei -80°C gefrorenen Gewebes mit dem Ultra-Turrax TP 18/10 drei Mal für jeweils 10 Sekunden im zehnfachen Volumen des Tris-HCl-Lysis-Puffers (pH 7,4)

Material und Methoden

homogenisiert. Um die Zellreste und nicht homogenisierbare Reste am Boden in einem Pellet zu binden, wurden die Homogenate für fünf Minuten bei 10000x g und 4°C zentrifugiert (Sheikh et al. 2006).

Anschließend wird die Proteinkonzentration der Überstände mittels der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode gemessen (Smith et al. 1985). Die vorbereiteten Homogenate werden in Aliquots verteilt und bei -20°C gelagert, bis sie für weitere Versuche verwendet werden.

Substanz	Konzentration
NaCl	150 mM
NP40	1 %
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
PMSF	200 mM
proteases inhibitor cocktail	

Tabelle 10: Zusammensetzung des Tris-HCl-Lysis-Puffers

2.8.2 Proteinblot auf Nitrozellulose-Membranen und Antikörperfärbungen

50 µg Proteinextrakt wurden zusammen mit dem NuPAGE-LDS-sample-Puffer und DTT im Verhältnis von 1:5 bei 70°C für 10 Minuten denaturiert. Die Proben wurden danach in ein SDS-PAGE 4-12%-Gradientengel in einem XCell SureLock™ Mini-Cell-Elektrophorese-System pipettiert und zur Auftrennung gebracht. Die Elektrophorese wurde bei 70 bis 150 V für eine Stunde durchgeführt (Towbin et al. 1992). Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes bei 30 V und einer Stunde Laufzeit auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurden passend geschnittene Nitrozellulosemembranen sowie zwei Whatman-GB003-Filter (Schleicher & Schüll) in 1-fachem NuPAGE®-Transfer-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) äquilibriert.

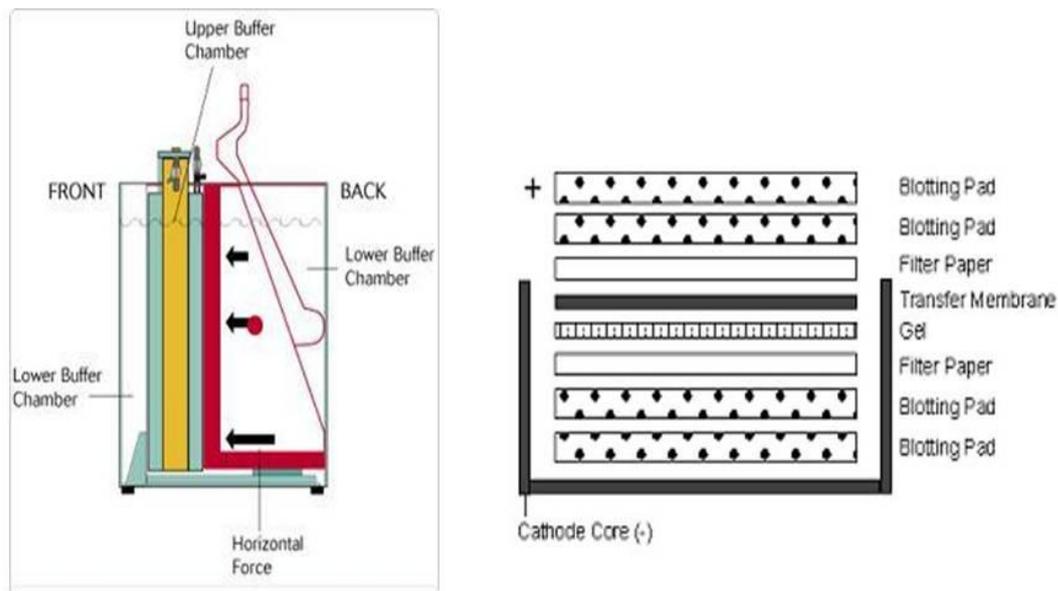


Abbildung 13: Elektrophoresekammer (in vitro)

2.8.3 Antigennachweis

Anschließend wurden die Membranen im TBST-Puffer (0,1 % Tween 20 enthalten) und 5%igem Magermilchpulver für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der MC4R-Antigennachweis wurde durch die Inkubation der Membran mit einem rabbit-polyklonal-Antikörper der Firma Abcam® Inc. erzielt. Dieser erste Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1:100 verwendet. Dies entsprach 4 mg/ml Antikörper in TBS-T und 2,5%igem Magermilchpulver, das über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Nach mehrmaligen anschließenden Waschschritten wurde ein Peroxidase-gebundener Sekundärantikörper in Form von Anti-rabbit-Immunglobuline (Dako) im Verhältnis von 1:2000 auf die Membran gebracht.

Antikörper	Konzentration
Anti-MC4R-rabbit-polyklonale Antikörper	1:100, 2,5 % Magermilch
Anti-rabbit-Immunglobuline	1:2000, 2,5 % Magermilch
Anti-β-Aktin-mouse-monoklonale Antikörper	1:3000, 2,5 % Magermilch

Material und Methoden

Darauf folgend wurden die Luminol/Enhancer-Lösungen aus dem ECL-Plus Kit (GE Healthcare) nach Herstellerangaben gemischt und 2 ml der fluoreszierenden Lösung für fünf Minuten mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde der Film in der Filmkammer entsprechend der Bandenintensität zwischen 30 s und 600 s unter Röntgenstrahlung belichtet. Um sicherzustellen, dass jede Probe mit der gleichen Menge an Proteinen beladen wurde, wurden die Blots anschließend gestriped und mit Anti- β -Aktin-mouse-monoklonal-Antikörper wurde ein erneuter Antigennachweis durchgeführt.

2.8.4 Isolierung von Nucleusextrakt aus Lebergewebe

Das Kernproteinextrakt der Rattenleber wurde wie oben beschrieben vorbereitet unter Anwendung einiger Modifikationen (Tron et al. 2006). Im Wesentlichen handelt es sich bei diesen Modifikationen darum, dass das frische Lebergewebe in kaltem PBS gewaschen und im vierfachen Volumen des Puffers A in einer Mörserschale zerstoßen wurde.

Substanz	Konzentration
Hepes-KOH (pH 7,9)	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
DTT	0,5 mM
PMSF	0,4 nM
NaVO ₃	1 mM
Pepstatin	2 μ g/ml
apoprotinin	2 μ g/ml

Tabelle 11: Zusammensetzung des Puffers A

Das Leberhomogenat wurde dann für 10 Minuten bei 10000 x g bei 4°C zentrifugiert und die Überstände und die Zytosolfraktion wurden separat bei -20°C bis zur weiteren Benutzung gelagert. Das Pellet hingegen, das sich am Boden des Eppis abgelagert hat, wurde im dreifachen Volumen des Puffers A resuspendiert und erneut bei 14500 RPM für 20 Minuten zentrifugiert.

Das Kernpellet, das sich nun gebildet hatte, wurde erneut in einem Puffer C resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C bei leichter Bewegung inkubiert.

Material und Methoden

Substanz	Konzentration
<i>Hepes-KOH (pH 7,9)</i>	20 mM
<i>MgCl₂</i>	1,5 mM
<i>NaCl</i>	0,42 mM
<i>EDTA</i>	0,2 mM
<i>Glycerol</i>	20 %
<i>DTT</i>	0,5 mM
<i>PMSF</i>	0,4 nM
<i>NaVO₃</i>	1 mM
<i>Pepstatin,</i>	2 µg/ml
<i>apoprotinin</i>	2 µg/ml

Tabelle 12: Zusammensetzung des Puffers C

Dieser Kernschutt wird durch die erneute Zentrifugation bei 10000 x g für 30 Minuten als Pellet am Boden des Eppis gesammelt. Die Überstände entsprechen dem reinen Zellkernextrakt und wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei –80°C gelagert.

2.8.5 Isolierung von Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden von männlichen unbehandelten Kontrollratten durch eine zirkulierende Perfusion der Rattenleber mit Kollagenase isoliert. Dabei wurde die gut etablierte Methode von Seglen angewandt (Seglen 1973, Seglen 1976) und nach kleiner Modifikation nach Knittel et al. durchgeführt (Knittel et al. 1997).

Zügig nach der Anästhesie der Ratten wurde die Leber über die Portalvene mit CO₂-angereichertem, kalziumhaltigem Krebs-Ringer Puffer, der mit 0,25 mM EDTA (pH 7,4), 0,05 % Kollagenase, 4 mM Kalziumchlorid und 15 mM HEPES angereichert wurde, für 7 bis 12 Minuten bei 37°C unter Rezirkulation gehalten.

Substanz	Konzentration
<i>NaCl</i>	120 mM
<i>MgSO₄</i>	1,2 mM
<i>KCl</i>	4,83 mM
<i>H₂O</i>	7 mM
<i>KH₂PO₄</i>	1,2 mM
<i>NaHCO₃</i>	24 mM
Hinzugefügt wurde:	
<i>EDTA (pH 7,4)</i>	0,25 mM

Material und Methoden

Kollagenase	0,05%
Kalziumchlorid	4 mM
HEPES	15 mM

Tabelle 13: Zusammensetzung des Krebs-Ringer-Puffers

Anschließend wurde die Leber entnommen, mechanisch zerkleinert und in einem Wasch-Puffer (pH 7,5), der aus Krebs-Ringer-Puffer (ohne die Zugabe von NaHCO₃), 20 mM HEPES und 0.4 % BSA bestand, gereinigt. Die Hepatozyten wurden resuspendiert und im Kulturmedium M199 in 60 mm Falcon-Kulturflaschen mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen pro Zellkulturschale bei 37°C sowie 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. 5%iges fetales Kalbserum wurde während der Phase des Anwachsens bis vier Stunden nach Inkubation verwendet und danach die Zellkultur unter serumfreien Bedingungen kultiviert.

2.9 Zellisolation und Zellkultur

2.9.1 Kultur von Rattenleberhepatozyten

Die Hepatozyten der Studientiere wurden entsprechend dem Protokoll von Ramadori und Kollegen isoliert (Ramadori und Meyer zum Buschenfelde 1990). Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde durch Phasenkontrastmikroskopie und immunzytochemische Färbung sichergestellt. Mit Antikörpern gegen Laminin oder Glia-Fibrillenprotein (GFAP) wurden Sternzellen identifiziert. ED1 (CD68) und ED2 (CD163) dienten als Makrophagenmarker. Die Zellen wurden bei 37°C unter 95 % Luft und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Dulbecco's-modified-eagle's-medium (DMEM) (Biochrom, Berlin, Deutschland) wurde mit 10 % fetal-calf-Serum (FCS) (PAA, Cölbe, Deutschland), 1 nM Insulin (Roche, Mannheim, Deutschland) und 100 nM Dexamethasone (Sigma, München, Deutschland) angereichert. Am ersten Tag nach der Isolation wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit einer Dichte von 2x10⁶ Zellen pro Schale kultiviert.

2.9.2 Isolation von Kupferzellen

Die Rattenlebermakrophagen (Kupferzellen) wurden gemäß der beschriebenen Methode von Tello et al. isoliert (Tello et al. 2008). Die Kupfer-Zellen wurden von

Material und Methoden

den anderen hepatischen Zellen durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit anschließender zentrifugaler Elutriation getrennt und die Zellen mit ca. 20000 Zellen pro ml Kulturmedium (M-199 mit 10 % FCS) ausplattiert. Die Reinheit der Zellkultur wurde mittels Antikörperfärbung mit ED1 und ED2 als Marker für Makrophagen-Subpopulationen durchgeführt. ED1 ist ein Marker für Ratten-Monozyten und Makrophagen (Dijkstra et al. 1985).

ED2 erkennt über ein Antigen an deren Zellmembran residente Makrophagen und Ratten-Kupfferzellen. Die Kultivierung erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.10 Immunpräzipitation

Es wurden 30 µl des homogenisierten Rattenleberlysats mit 400 µl PBS und Protease-Inhibitoren (Roche) und 50 µl Protein A-Agarose (Roche) für eine Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden mit 3800x g zentrifugiert. Dem Überstand wurden 3 µl des Anti-MC4R-Antikörpers (abcam) hinzugefügt.

Die Proben wurden für sechs Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert, im Anschluss mit 50 µl Protein A-Agarose versetzt und für weitere 16 Stunden unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Nun wurden die Proben fünf Minuten bei 3800 g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und dann in 25 µl deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend erfolgte die Western-Blot-Analyse wie in Kapitel 2.8 beschrieben.

2.11 Versuche zur Blockung des Signals mit spezifischem immunisierendem Peptid

Um festzustellen, ob die immunoreaktiven Banden in der Western-Blot-Analyse spezifisch sind, wurde ein Blockungsverfahren mit einem spezifischen immunisierenden Peptid durchgeführt. Für diesen Versuch wurde die Antikörperkonzentration des rabbit-polyklonalen Anti-MC4R-Antikörpers (ab 24233) auf 2 µg/µl in TBS-T und 2,5 % Magermilchpulver verdünnt und auf zwei Gefäße verteilt. In das erste Gefäß wurde 1 µg/ml des spezifischen MC4R-immunisierenden

Material und Methoden

Peptids (ab78212) zugegeben. Das zweite Gefäß wurde ohne immunisierendes Peptid belassen. Beide Gefäße wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter leichter Bewegung inkubiert. Eine Western-Blot-Membran, die in allen Taschen Lebergewebelysat enthielt, wurde in der Mitte geteilt. Ein Teil der Membran wurde mit der Lösung aus Anti-MC4R-Antikörper, der durch die Inkubation mit dem spezifischen immunisierenden Peptid neutralisiert wurde, in eine Folie eingeschweißt, der untere Teil der Membran mit dem unbehandelten Antikörper über Nacht inkubiert.

2.12 Vorbereitung der Gewebeschnitte und Analyse mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Alle Gewebeproben, die für Immunhistochemie und Histologie verwendet wurden, wurden nach der Sektion in 0,9%igem NaCl gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 5 µm dicke Kryostatschnitte wurden angefertigt und in Methanol und Aceton auf einem Objektträger fixiert.

2.12.1 Peroxidase-Färbung

Für die Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger mit PBS sowie Glukose, Glukoseoxidase und Natriumazid inkubiert. Durch die Behandlung der Schnitte mit Foetal Bovine Serum (FBS) „Gold“ (PAA Laboratories) konnte eine Reduzierung unspezifischer Färbung erzielt werden.

Die Schnitte wurden mit dem ersten Antikörper gegen MC4R, der im Verhältnis von 1:100 in PBS verdünnt wurde, inkubiert. Die Negativkontrollen hingegen wurden mit unspezifischem rabbit-Immunglobulin anstatt des ersten Antikörpers inkubiert. Nach einigen Waschsritten wurden die Schnitte mit Peroxidase-gebundenen Anti-Mouse-Immunglobulinen inkubiert, die mit normalem Rattenserum präabsorbiert sind, um Kreuzreaktivität zu vermeiden. Die Schnitte wurden anschließend mit in PSB enthaltenem 3,30-Diaminobenzidin (DAB) und H₂O₂ (0,01 %) inkubiert, um die Immunkomplexe sichtbar zu machen. Die Kerne wurden mit Mayer`s Hämatoxylinlösung (Merck) sichtbar gemacht und zur Analyse der Proteinfärbung die Schnitte mit Eindeckmedium benetzt und Deckgläser aufgelegt.

2.12.2 Lokalisierung und Nachweis zellulärer Antigene des MC4R mittels indirekter Immunfluoreszenz

Zum Nachweis spezifischer Antigene gegen MC4R mittels Immunfluoreszenz (IF) sind zwei Schritte notwendig. Zuerst erfolgen eine Bindung und Erkennung des MC4R durch einen spezifischen Antikörper (Primärantikörper). Danach schließen sich die Detektion und Markierung dieses Erstantikörpers mittels eines Sekundärantikörpers an. Man nennt diesen Sekundärantikörper auch Detektionsantikörper, da er an ein Rezeptorenzym gekoppelt ist, welches ein Substrat in ein fluoreszierendes Produkt spalten kann oder direkt mit Fluorophor gekoppelt ist. In Abhängigkeit von der Lokalisation und Häufigkeit des zu detektierenden Antigens sind Detektionssysteme mit unterschiedlicher Sensitivität von Bedeutung, um eine ausreichende Signalstärke zu erlangen. Eine Steigerung der Sensitivität kann zum Beispiel durch den Einsatz von Biotin-Konjugaten, welche mit Antikörpern oder dem Rezeptorenzym gekoppelt sind, erreicht werden.

2.12.2.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle der folgenden Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Herstellung und Fixierung der Schnitte erfolgt wie in Kapitel 2.11 beschrieben. Die Schnitte auf Objektträgern werden mit einem Fettstift (Dako) eng umrundet. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wird dreimal mit PBS gewaschen. Nachdem die Schnitte zur Absättigung mit 1x TBS pH 7,5 + 1% BSA für eine Stunde behandelt wurden, erfolgte die Inkubation mit dem rabbit-polyklonal-Erstantikörper gegen MC4R (abcam, ab 24233) für zwei Stunden in der feuchten Kammer. Danach wird der rabbit-polyklonal-Zweitantikörper hinzugegeben und für weitere 90 Minuten inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wird der Schnitt in ein Eindeckmedium gebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Objektträger werden bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

2.13 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von IL-6 und α -MSH aus dem Serum des Portalvenenbluts

Die Serumlevel von α -MSH und IL-6 im Portalvenenblut wurden mit speziell für diesen Zweck geordneten ELISA Analyse-Kits (ELISA für α -MSH: Phoenix Pharmaceuticals; ELISA für IL-6: Pierce Biotechnology) gemessen und dabei die Anleitung und Vorgaben des Herstellers genau befolgt.

2.14 Statistische Auswertung

Die Messdaten, die im Ergebnisteil dargestellt werden, basieren auf einer Vielzahl von Einzelergebnissen (n), dabei wurde jeder untersuchte Zeitpunkt mindestens an fünf Tieren ($n = 5$) gemessen und analysiert. Die optische Densitometrie der Western-Blot-Bilder des MC4R im Rattenlebergewebe wurde mit Hilfe der Software Image J®, Version 1.41 (National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Für den Nachweis eines signifikanten Anstiegs der MC4R-Expression wurden die verschiedenen Zeitpunkte (4 h, 6 h, 12 h) separat mit der Kontrollgruppe verglichen. Um diese Daten anschaulich darzustellen, werden sie als Boxplot mit Standardabweichung in einem Balkendiagramm gezeigt. Die direkt gemessene optische Dichte (OD) wurde als relativer Prozentwert angegeben. Die Signifikanz der Übereinstimmung zweier unabhängiger Verteilungen derselben Grundgesamtheit wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Abweichungen von den entsprechenden Kontrollen oder Referenzversuchen wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Das Konfidenzintervall lag bei 95 %. Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen MC4R und IL-6 Spiegel wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient ermittelt. Die statistische Analyse der PCR-Daten erfolgte durch das Programm-Graph-Pad-Prism® 4.0.

3 Ergebnisse

3.1 Gliederung der Ergebnisse

Im Folgenden sind die experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dargestellt. Die Reihenfolge dieser Darstellung entspricht nicht der methodischen Durchführungsreihenfolge, sondern die Ergebnisse werden in der logischen Anordnung und nach unterschiedlicher Aussagekraft geordnet vorgestellt.

So wird zunächst über die Nativexpression der MC4R-Expression in der Leber berichtet.

Im Anschluss daran geht es um die Auswirkungen der APR auf die Dynamik und Expression des MC4R. Mit dem Schwerpunkt auf der Antiinflammation folgen Vergleichsanalysen mit IL-6 und dem wichtigsten Agonisten α -MSH.

Durch die dargestellten Analysen des MC4R sollten dessen Existenz und die Einflüsse der APR auf dessen Regulation und Funktion untersucht werden. Schließlich wurde der Nachweis der Spezifität des Rezeptorsignals in der Leber durch Immunpräzipitationsversuche geführt. Es wird weiterhin von einer Vergleichsstudie mit Gehirnproben der Ratte berichtet.

3.2 Detektion des MC4R im Rattenlebergewebe

Der MC4R konnte im Rattenlebergewebe in bisherigen Untersuchungen noch nicht detektiert werden (Chhajlani 1996, Gantz und Fong 2003, Tao 2010). Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse beziehen sich auf den Nachweis des MC4R im Lebergewebe in einem In-vivo-Modell mit männlichen Wistar-Ratten.

Der MC4R wurde in Lebergewebehomogenat via polymerase chain reaction (PCR), Western-Blot (WB), immunohistology (IH) und indirekter Immunfluoreszenzfärbung (IF) nachgewiesen.

3.2.1 Konventionelle PCR mit Gelelektrophorese

Konventionelle Gelelektrophorese der Lebergewebelysate mit einem spezifischen Primer für den MC4R der Ratte hat eine Bande bei 300 Basenpaaren (bp) gezeigt

Ergebnisse

(Abbildung 15), diese ist übereinstimmend mit der erwarteten Größe des Applikons von 300 bp.

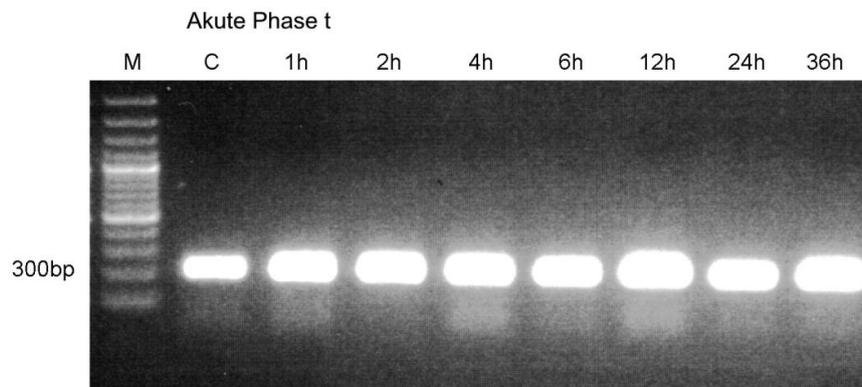


Abbildung 14: MC4R-mRNA in der Rattenleber

Konventionelle PCR mit Gelelektrophorese unter Verwendung eines spezifischen Primer für den MC4R. Es zeigte sich eine Bande bei 300 Basenpaaren (bp), welche mit der erwarteten Größe des amplifizierten Abschnitts übereinstimmt. Spalte 1 ist der Marker (M), Spalte 2 ist die Probe eines Kontrolltieres, ohne Induktion der APR, Spalten 3 bis 9 entsprechen den Akute-Phase-Zeitpunkten nach der Injektion des Terpentins (TO).

Ein früher Anstieg der MC4R-Genexpression, beginnend nach 1 h, erreicht sein Maximum 6 h ($6,3 \pm 2,3$ fach) nach Beginn der APR. Das Ausgangslevel der MC4R-Genexpression ist nach 36 h wieder erreicht.

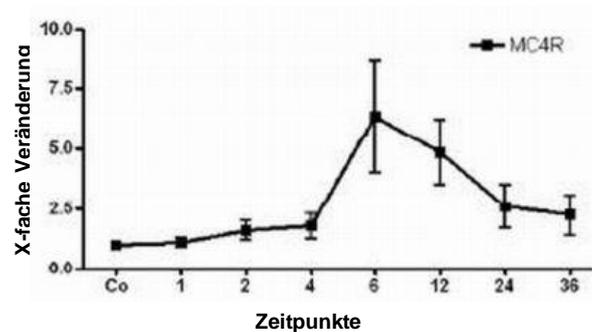


Abbildung 15: qRT-PCR-Analyse von Total-RNA der Rattenleber während der APR.

Dargestellt wird der x-fache Anstieg der Genexpression des MC4R zu verschiedenen Zeitpunkten der APR (1 bis 36 h) im Vergleich zu einer Gruppe von Kontrolltieren.

3.2.2 Proteinanalysen zum Nachweis der Existenz des MC4R in verschiedenen Zellkompartimenten der Rattenleber

Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte wie in Kapitel 2.8 beschrieben. Unter Verwendung des rabbit-polyklonal-Antikörpers (ab 24233), der spezifisch für MC4R ist, wurde eine Western-Blot-Analyse der Lebergewebelysate durchgeführt. Es

Ergebnisse

zeigte sich eine immunoreaktive Bande bei 37 kDa, dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des Rezeptors, sodass der MC4R identifiziert und dargestellt werden konnte (Abbildung 16A).

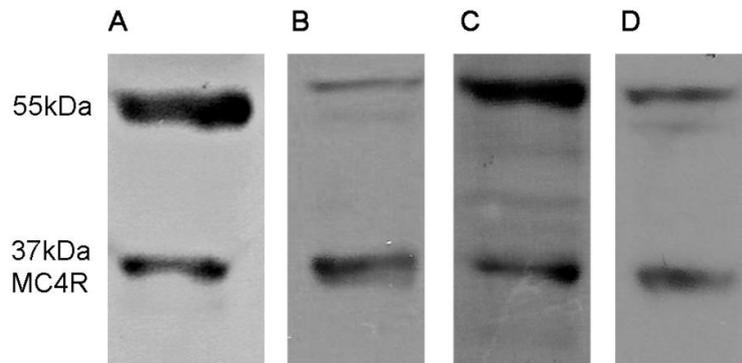


Abbildung 16: MC4R-Analyse des Rattenerlebergewebes

Es zeigen sich zwei immunoreaktive Banden bei einem Molekulargewicht von 37kDa, das den MC4R repräsentiert, und 55 kDa, die möglicherweise eine glykosylierte Form des Rezeptors darstellt **A** Rattenerleberlysat, **B** Rattenerleberzytosol, **C** Rattenerleberkernextrakt **D** Hepatozyten der Ratte aus einer Zellkultur, ohne Behandlung.

In Übereinstimmung mit den angebotenen Herstellerangaben der Firma abcam® (Abbildung 17) des Antikörpers ab 24233 wurde eine zusätzliche immunoreaktive Bande bei einem Molekulargewicht von 55 kDa detektiert (Abbildung 16 A).

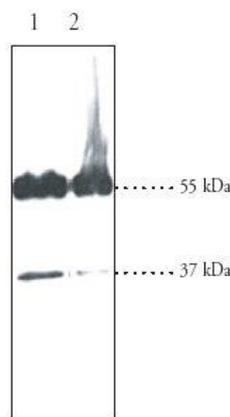


Abbildung 17: Western-Blot-Bild der Firma abcam des MC4-Rezeptor-Antikörpers (ab 24233)

Humaner Kleinhirnkortex; Proteine: 30 µg pro Bande; erwartete Bandengröße: 37 kDa; zusätzliche Bande: 55 kDa (möglicherweise die g-lykolytierte Form laut Hersteller).

Die gemeinsame Beurteilung auf Basis einer Western-Blot-Analyse des Rattenerleberzytosols und Kernextraktes mit demselben Antikörper konnte dieselbe immunoreaktive Bande bei 37 kDa zeigen, die der Existenz des MC4R zuzuschreiben ist (Abbildungen 16B und 16C). Sowohl die Western-Blot-Bilder des

Ergebnisse

Lebergewebezytosols als auch die des Kernextraktes zeigen die zusätzliche 55kDa-immunoreaktive Bande, die auch im Lebergewebelysat detektiert wurde.

Erkennbar ist in diesem Versuch auch, dass die Proteinexpression des MC4R im Kernextrakt des Lebergewebes höher ist als im untersuchten Zytosol (Abbildungen 16B und 16C), wobei jeweils gleiche Mengen an Proteinextrakten untersucht wurden. In den untersuchten nicht behandelten Hepatozyten sind ebenfalls beide Banden nachweisbar.

3.2.3 Oberflächenplot und Nachweis einer Rezeptordimerisation

Auf manchen Western-Blot-Bildern stellte sich eine schwache Bande mit ähnlichem Aussehen knapp über der eigentlichen 37kDa-Bande des MC4R dar (Abbildung 18A).

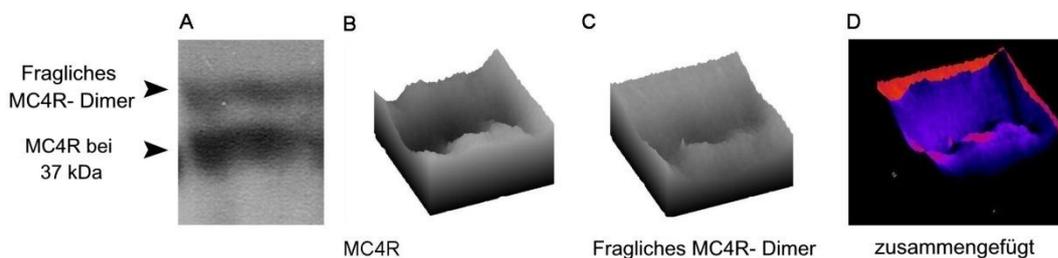


Abbildung 18: Oberflächenplot eines suspekten MC4R-Dimer in der Western-Blot-Analyse

A) Suspekte Bande bei der Western-Blot-Analyse des Rattenlebergewebes, eine zweite immunoreaktive Bande ist sichtbar, die möglicherweise eine MC4R-Dimer darstellt. B) Oberflächenanalyse (Surface plot) der MC4R-Bande. C) Surface plot der suspekten Dimer-Bande. D) Die Analyse aus den übereinander gelegten Surface-plots zeigt ein beinahe identisches Signalmuster.

Durch eine Fusion der beiden Banden in einer Oberflächenanalyse (Surface plot) konnte grafisch demonstriert werden, dass beide dieser Verschmelzungsbanden eine beinahe identische Morphologie und ein ähnliches Signalmuster aufweisen (Abbildung 18D).

3.2.4 Immunhistochemischer Nachweis der Existenz des MC4R in der Rattenleber

Es wurden immunhistochemische Färbungen von Rattenleberkryostatschnitten eines Kontrolltieres und eines 6h-Tieres mit dem rabbit-polyklonal-Antikörper (ab 24233) angefertigt, dieser Antikörper ist spezifisch für MC4R und für diese Art von Färbung geeignet. Nachfolgend wurde eine Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper durchgeführt und es konnte ein positives Signal, das der Präsenz von MC4R zuzuordnen ist, detektiert werden (Abbildung 19, A-C; MC4R-positive Zellen wurden mit einem roten Pfeil markiert). Braune, Peroxidase-positive Signale sind vor allem nahe den Zellkernen der Hepatozyten lokalisiert, aber auch im gesamten Lebergewebe verteilt zu finden (Abbildung 19A). Das positive MC4R-Signal erscheint im Bereich der Zellkerne deutlich stärker als im umgebenden Zytoplasma. Die Abbildung 19A zeigt MC4R-positive Zellen nahe einem Lebersinusoid bei 200-facher Originalvergrößerung einer Rattenleber eines Kontrolltieres ohne die Induktion einer Akut-Phase-Reaktion. Die 400-fache Originalvergrößerung (Abbildung 19B, Tier bei 6h-Akut-Phase-Induktion; und 19C, links, Kontrolltier) und die 1000-fache Ölimmersion (Abbildung 19C, rechts, Kontrolltier ohne Akut-Phase-Induktion) bestätigen das positive MC4R-Signal von Zellen im Leberparenchym. Mutmaßlich scheint es rein makroskopisch zu einem Anstieg der Proteinexpression des MC4R mit einem Maximum bei sechs Stunden gekommen zu sein. Die positiven Signale können außerdem rund um die Gefäßwände sowie die Portalfelder detektiert werden (Abbildung 19A-C). Die Negativkontrollen der Peroxidasefärbung, die mit unspezifischen Immunglobulinen anstatt des spezifischen Antikörpers inkubiert wurden, zeigten kein spezifisches Signal.

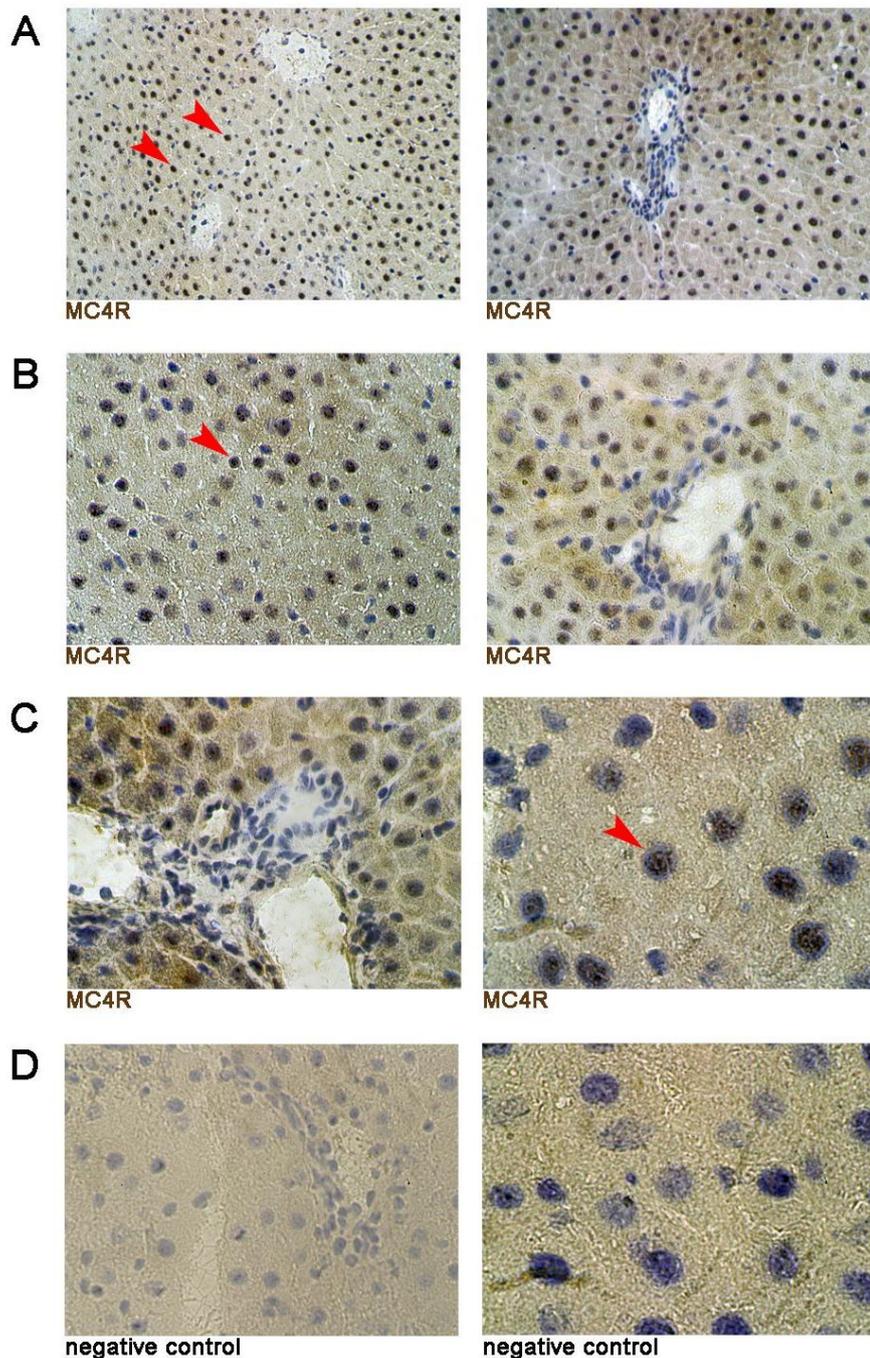


Abbildung 19: MC4R-Peroxidase-Färbung von Rattenleber-Kryostatschnitten

Die Färbungen wurden unter Verwendung des rabbit-polyklonal-anti-MC4R-Antikörpers angefertigt. A) Rattenleberschnitt eines Kontrolltieres ohne Induktion der APR bei 200-facher Vergrößerung. Links: Rote Pfeile markieren MC4R-positive Zellen nahe einem Lebersinusoid. Rechts: MC4R-positive Zellen und ein Portalfeld. B) Rattenleberschnitt 6 h nach Induktion der APR mittels Terpentinöl (TO) bei 400-facher Originalvergrößerung. Die roten Pfeile markieren die MC4R-positiven Zellen. C) Rattenleberschnitte bei einem Kontrolltier. Links: 400-fache Originalvergrößerung. MC4R-positive Zellen sind primär im Leberparenchym lokalisiert. Rechts: 1000-fache Originalvergrößerung mit Ölimmersion. Die roten Pfeile markieren die MC4R-positiven Zellen. D) Rattenleberschnitte von Kontrolltieren, ohne Induktion einer APR. Negative Kontrolle, erzielt durch die Inkubation mit unspezifischem IgG-Serum bei 400-facher und 1000-facher Originalvergrößerung und Ölimmersion.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis des MC4R in der Rattenleber

Neben der POD-Färbung wurde eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierbei wurden die Rattenleberschnitte von Kontrolltieren mit dem identischen Antikörper, der auch für die Western-Blot-Analysen verwendet wurde, inkubiert (rabbit-polyclonal-antibody ab 24233). Es zeigt sich ein rotes Fluoreszenzsignal in den Zellkernen der Leberzellen, dieses Signal kann der Präsenz des MC4R in diesen Zellen zugeschrieben werden und ist deutlich stärker als im umgebenden Zytoplasma. Ausgewählte repräsentative Bilder in Abbildung 20A und Abbildung 20B demonstrieren MC4R-positive Leberzellen bei 200-facher und 400-facher Originalvergrößerung. Der Hintergrund dieser beiden Abbildungen zeigt die histologische Struktur einer Lebervene und das umgebende Lebergewebe. Die MC4R-positiven Leberzellen sind in der Abbildung 20A und 20B mit roten Pfeilen markiert. Die Abbildung 20C zeigt außerdem die Existenz von MC4R-positiven Zellen in dem Gebiet eines Portalfeldes. Die dazugehörigen Regionen der MC4R-Färbung sind in Abbildung 20C mit weißen Pfeilen markiert. Außerdem ist die Negativkontrolle des darauf folgenden Kryostatschnittes mit einem weißen Pfeil markiert. Die Negativkontrollen der indirekten Immunfluoreszenz wurden mit unspezifischen Immunglobulinen anstatt des spezifischen MC4R-Antikörpers inkubiert. Es zeigte sich, dass einzig die Zellkerne und das umgebende Gewebe darstellbar sind, aber kein rotes Fluoreszenzsignal zu detektieren ist (Abbildung 20 A rechts). Die visuelle Beurteilung der Schnitte, die durch den anti-MC4R-spezifischen Antikörper gefärbt wurden, erfolgte durch den blauen und grünen Kanal des Mikroskops. Hierbei zeigten sich nur die Zellkerne und ein schwaches unspezifisches Signal im umgebenden Gewebe. Es waren hierbei aber weder blaue noch grüne Fluoreszenzsignale im Sinne einer Übereinstimmung mit dem positiven MC4R-Signal, das im roten Kanal zu erkennen war, zu eruieren. Damit kann das rote Signal eindeutig von einem Autofluoreszenzartefakt abgegrenzt werden (Abbildung 20D).

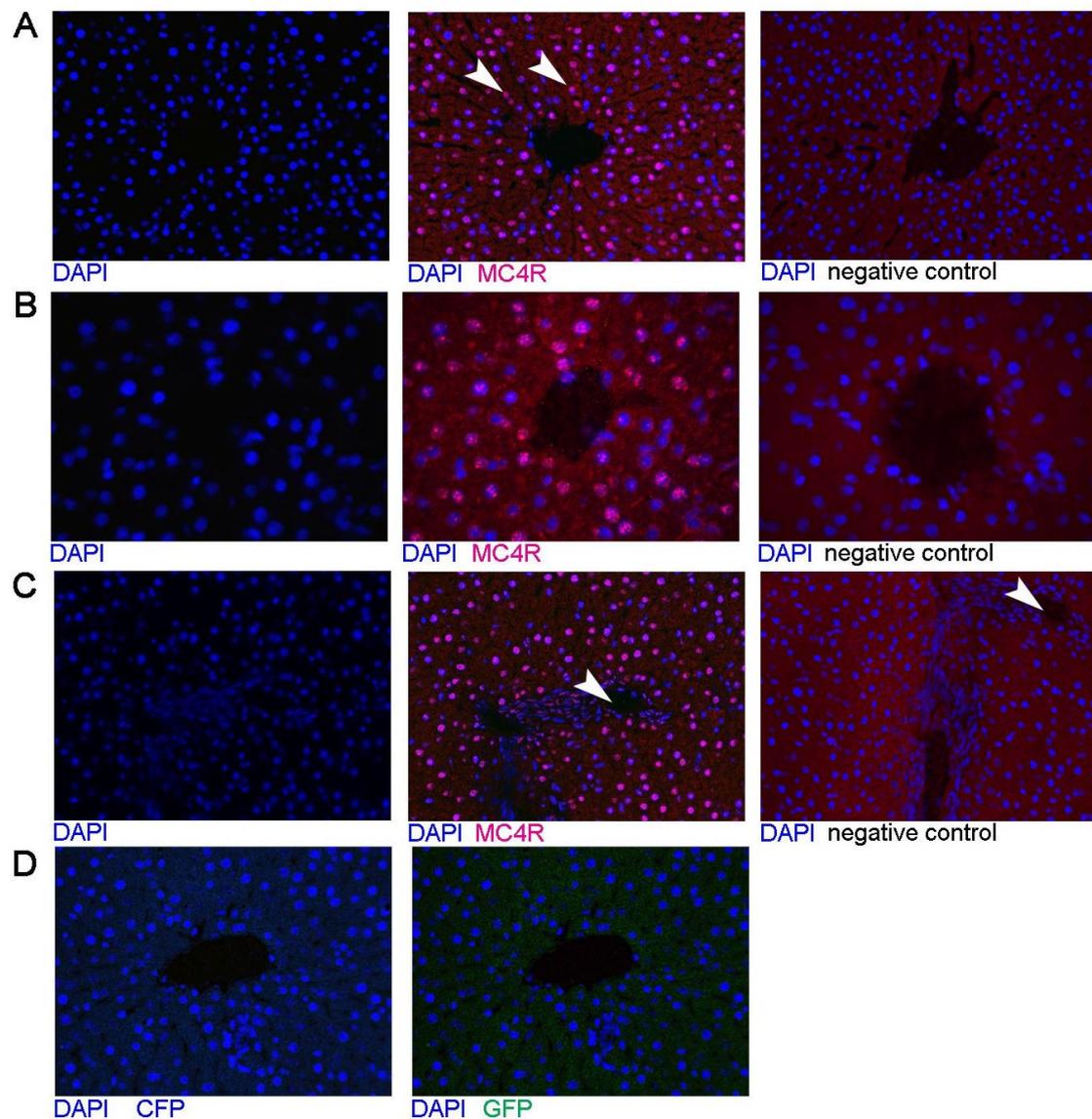
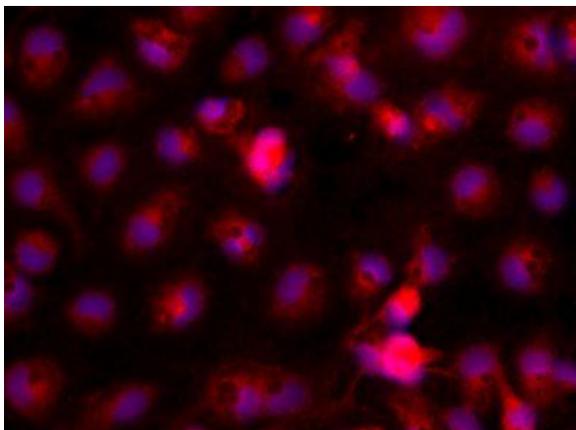


Abbildung 20: Indirekte Immunfluoreszenz des MC4R in der Rattenleber

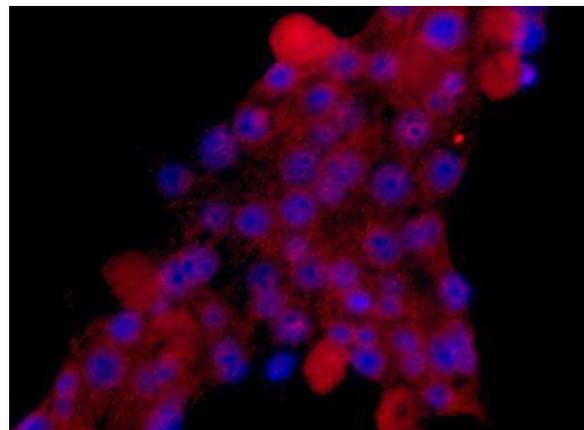
Repräsentative Bilder des MC4R in der Rattenleber von Kontrolltieren. Der MC4R wurde mittels rabbit-polyklonal-Antikörper (ab 24233, abcam) angefärbt und als rot fluoreszierendes Signal dargestellt. A) Rattenleberschnitt mit 200-facher Vergrößerung. Der Hintergrund zeigt die histologische Struktur einer Zentralvene und umgebendes Lebergewebe. Die weißen Pfeile zeigen auf MC4R-positive Zellkerne, das Zytoplasma ist in geringerem Ausmaß anfärbbar. Die Negativkontrolle (negative control) zeigt in einem direkt darauf folgenden Kryostatschnitt, der mit unspezifischen rabbit-Immunglobulinen anstatt des Anti-MC4R-Antikörpers inkubiert wurde, keine rot fluoreszierenden Signale. B) Darstellung des MC4R bei 400-facher Vergrößerung. C) Portalfeld mit MC4R-positiven Zellen. In der Negativkontrolle wurden zum Vergleich die korrespondierenden Regionen mit einem Pfeil markiert. D) Selektive Begutachtung des CFP- und GFP-Kanals, in dem sich keinerlei Fluoreszenzsignal im Sinne einer Autofluoreszenz detektieren lässt.

3.2.6 Immunhistochemische Detektion des MC4R in Kupferzellen- und Hepatozytenkulturen

Der Melanocortin-4-Rezeptor konnte auch in Zellkulturen mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert werden. Unter Verwendung des spezifischen Antikörpers gegen MC4R konnten vor allem starke Signale nahe dem Zellkern und schwache Signale im Zytoplasma gemessen werden. Hierbei bestätigte sich dieses Phänomen sowohl in Hepatozyten als auch in Kupferzellen wie auch in den Daten der im Folgenden beschriebenen In-vivo-Versuche.



Kupferzellen



Hepatozyten

Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis des MC4R in primär kultivierten Kupferzellen (links) und Hepatozyten (rechts)

Der MC4R wurde mittels rabbit-polyklonal-Antikörper (ab 24233, abcam) angefärbt und als rot fluoreszierendes Signal dargestellt. Darstellung des MC4R bei 400-facher Vergrößerung.

3.3 Dynamik des Melanocortin-4-Rezeptors während der Akut-Phase-Reaktion in der Leber

3.3.1 Dynamik der Proteinexpression im Lebergewebe der Ratte

Die statistische Analyse der densitometrischen Messdaten basiert auf der Auswertung der Western-Blot-Bilder der Proben, die während des Verlaufs der APR gemessen wurden, im Vergleich zu den Proben der Kontrolltiere. Hierfür wurden alle Kontrolltiere in eine Gruppe ($n=5$) zusammengefasst und mit den jeweiligen Gruppen 4 h, 6 h und 12 h nach Induktion der APR verglichen. Die dafür verwendeten Western-Blot-Bilder sind in Abbildung 21 dargestellt, wobei eine Zeile auch immer einer Membran desselben Western-Blots entspricht. Aus Gründen der

Ergebnisse

Übersichtlich sind die anderen Zeitpunkte hier nicht dargestellt, um einzig die maximalen Expressionsunterschiede zu verdeutlichen. Diese Proben wurden nach densitometrischer Quantifizierung ebenfalls zur statistischen Analyse herangezogen. Die erste Spalte in den Zeilen A bis E zeigt die unbehandelten Kontrolltiere. In den nachfolgenden Spalten folgen die verschiedenen Akut-Phase-Zeitpunkte. Zur Analyse wurde die 37 kDa herangezogen und mit einer β -Aktin-Kontrolle verglichen. Es zeigt sich ein Anstieg der MC4R-Proteinexpression während der APR.

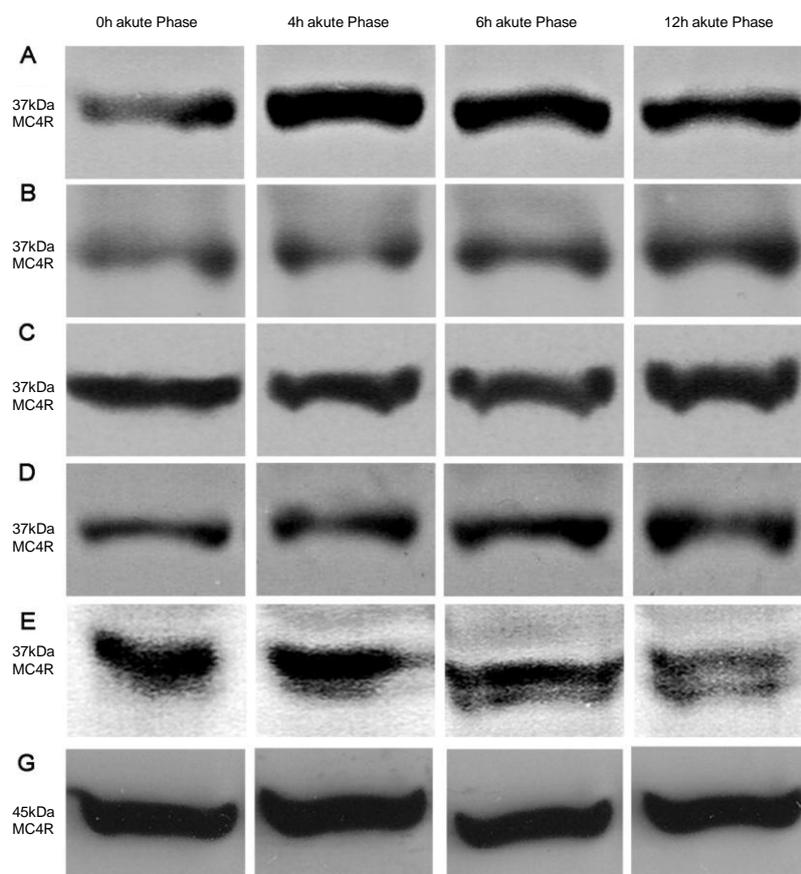


Abbildung 22: Western-Blot-Analyse des MC4R in der Rattenleber während der APR

Zeilen A bis E repräsentieren fünf Western-Blot-Analysen von unbehandelten Ratten (0 h) und Tieren, bei denen die APR mittels Terpentinöl 4 h, 6 h und 12 h zuvor induziert wurde. Der MC4R wurde als immunreaktive Bande bei 37 kDa detektiert. Zeile G zeigt die β -Aktin-Kontrolle.

Nach statistischer Auswertung der Daten kann ein signifikanter Anstieg der MC4R-Proteinexpression während der Akut-Phase-Reaktion gezeigt werden. Im Vergleich mit der Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere ist der signifikante Anstieg der

Ergebnisse

MC4R-Proteinexpression sowohl bei der 4h-Gruppe ($p = 0,0159$), der 6h-Gruppe ($p = 0,0079$) als auch bei der 12h-Gruppe ($p = 0,0159$) nachweisbar (Abbildung 22).

Die mittlere optische Dichte (OD) des MC4R in der Western-Blot-Analyse der Lebergewebeproben konnte bei den Kontrolltieren mit 19.66 ± 3.47 OD bestimmt werden. Die mittleren optischen Dichten für die 4h-, 6h- und 12h-Gruppe betragen 24.52 ± 1.89 , 30.21 ± 2.29 und 25.61 ± 1.86 .

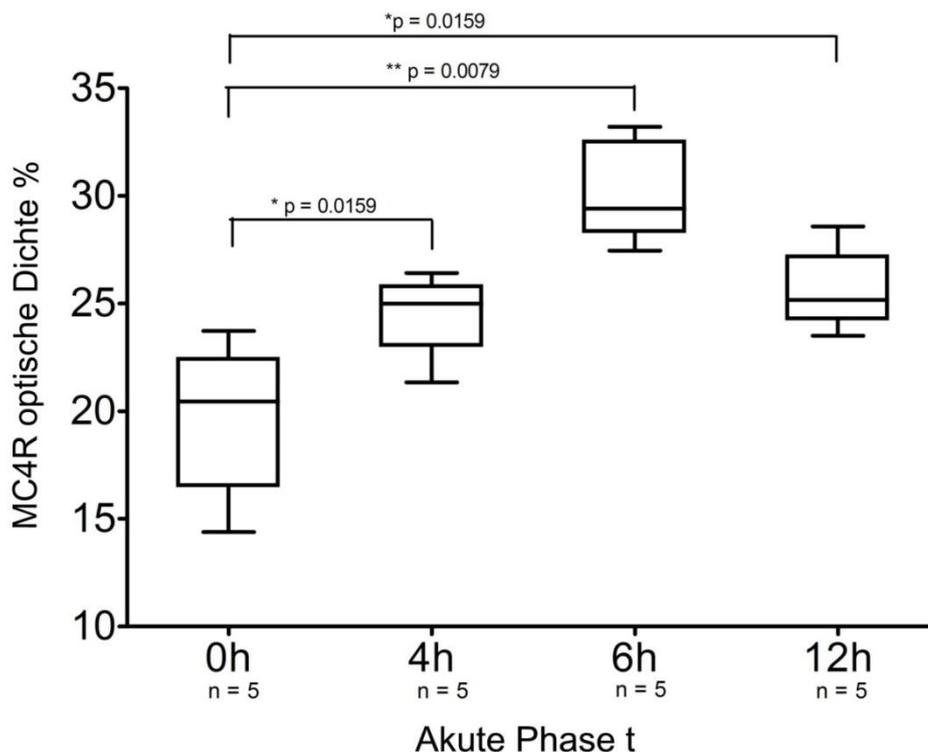


Abbildung 23: MC4R-Proteinexpression während der APR in der Leber der Ratte

Statistische Analyse der Western-Blot-Bilder im Vergleich zwischen der Expression des Mc4R vor und während der APR. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Proteinexpression des MC4R 4 h, 6 h und 12 h nach der Induktion der APR im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.3.2 Vergleich der MC4R-Proteinexpression im Lebergewebe und der gemessenen IL-6 Spiegel im Serum der Ratte unter APR

Der Anstieg der MC4R-Expression zeigt einen starken Zusammenhang mit dem Anstieg der IL-6-Expression zu den Zeitpunkten 4 h und 6 h. Der Pearson-Korrelationskoeffizient beträgt hierbei $r = 0,719$ bei 4 h und $r = 0,758$ bei 6 h. Es gab keine Korrelation des MC4R mit dem IL-6 bei 12 h APR (Korrelationskoeffizient: $r = 0,164$, siehe auch Abbildung 23).

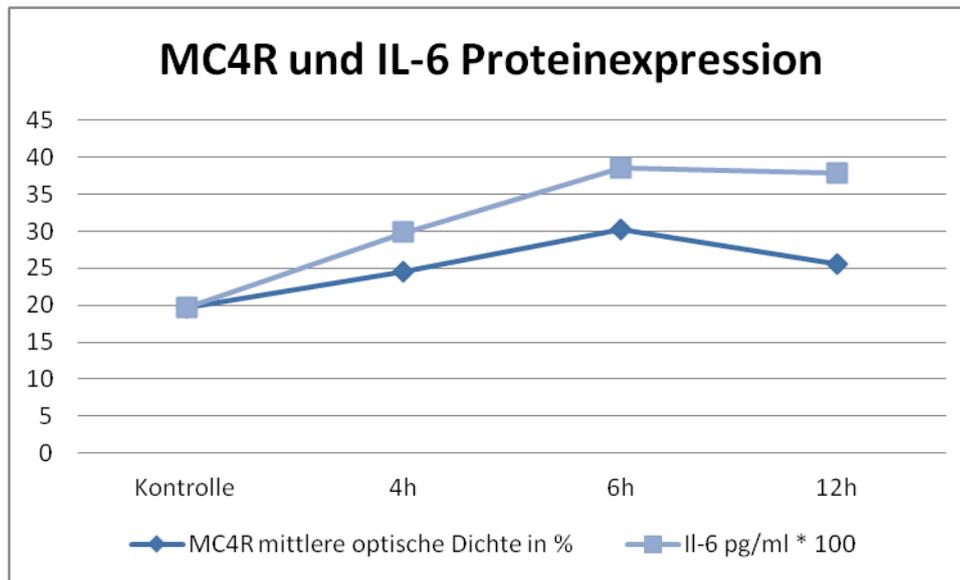


Abbildung 24: Darstellung der MC4R-Proteinexpression im Lebergewebe gemeinsam mit dem Anstieg der IL-6-Konzentration im Serum unter Induktion einer APR.

3.3.3 Immunodetektion des MC4R in Rattenleberkryostatschnitten unter APR

In den meisten Immunfluoreszenzfärbungen, in denen der rabbit-polyklonale Antikörper gegen MC4R benutzt wurde, zeigten sich eine starke Reaktivität des Zellkerns sowie ein schwächeres Signal im Zytoplasma. Dies bestätigte sich ebenfalls im gesamten Lebergewebe. Außerdem konnte im vorliegenden Versuch der Anstieg der Kernexpression des MC4R während der APR sichtbar gemacht werden. Parallel dazu ist der Abfall der zytoplasmatischen MC4R-Expression zum Zeitpunkt von 6 h nach Induktion der APR beobachtet worden.

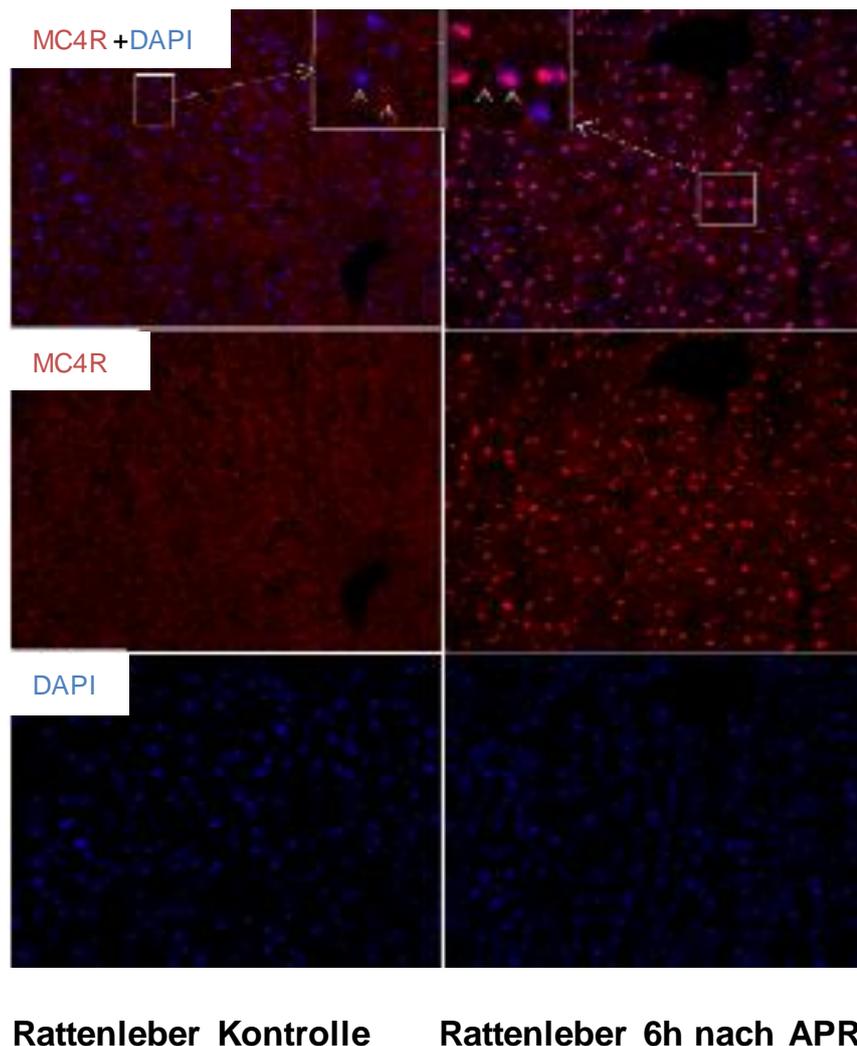


Abbildung 25: Doppelfärbung von Rattenleberschnitten.

Unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers (ab 24233, abcam) direkt gegen den MC4R (rot), gefolgt von einer Fluoreszenzimmunodetektion der Rattenleberschnitte, wurde im Vergleich von Kontrolle und 6 h nach Induktion der Akut-Phase-Reaktion die MC4R-Verteilung dargestellt.

3.3.4 Untersuchungen zur Dynamik des MC4Rs in Zytosol und Nucleusextrakt der Rattenleber

Die Auswertung der Western-Blot-Analysen des Zytosols und des Nucleusextraktes der Rattenleber wurde mit demselben Antikörper gegen MC4R durchgeführt und zeigte dieselben immunoreaktiven Banden bei 37 kDa und 55 kDa, die auch im Rattenlebertotallysat detektiert werden konnten. Die Western-Blot-Bilder des Nucleusextraktes der Leber zeigten einen graduellen Anstieg der Proteinkonzentration des MC4R mit einem Maximum bei 6 h. In derselben Probenreihe zeigen hingegen die Zytosolproben parallel dazu einen Abfall der Proteinkonzentration des MC4R zu demselben Zeitpunkt. Dieses Geschehen läuft

Ergebnisse

exakt parallel zum Zeitpunkt des Beginns der Akut-Phase-Reaktion ab (Abbildung 25).

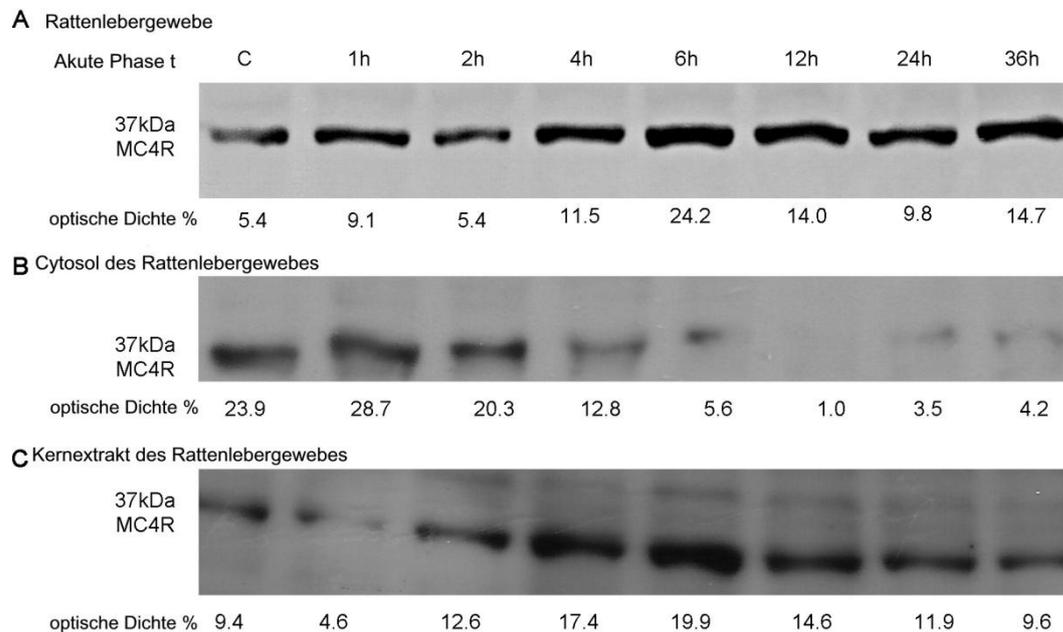


Abbildung 26: MC4R im Rattenleberlysat, Zytosol und Kernextrakt

Repräsentative Western-Blot-Bilder wurden ausgewählt, um den Verlauf während der Akut-Phase-Reaktion zu demonstrieren. 1 h bis 36 h nach der intramuskulären Injektion des Terpentins sind hier dargestellt. Spalte C (C = Kontrolle) entspricht dem Kontrolltier. Darstellung der Messdaten der optischen Densitometrie.

Die erste Spalte, beschriftet mit dem Buchstaben C (C = Control), entspricht dem Kontrolltier und man kann sowohl optisch als auch messbar die Unterschiede im weiteren Verlauf nach Induktion der Akut-Phase-Reaktion auf zellulärer Ebene beobachten. Zum Vergleich wurde in Zeile A das Lebertotallysat derselben Tierreihe untersucht; hierbei ist ein deutlicher Anstieg der MC4R-Proteinkonzentration zum maximalen Akut-Phase-Zeitpunkt zwischen 6 bis 12 h zu erkennen. Die Quantifizierung des Western-Blots mittels optischer Densitometrie ermöglicht es, die Expressionsabschwächung des MC4R-Proteins messbar zu machen. Die angegebenen Messwerte beziehen sich hierbei jeweils auf die betrachtete Zeile und können untereinander in den verschiedenen Zeilen somit nicht als absolute Zahl miteinander verglichen werden. Dennoch lässt sich in diesen Messdaten der oben bereits beschriebene deutliche Trend ebenfalls nachweisen.

3.3.5 Serumanalyse des wichtigsten Agonisten α -MSH im Portalvenenblut von TO-behandelten Ratten

α -MSH wurde im Serum des Portalvenenbluts detektiert. Der Mittelwert des Serumlevel des α -MSH im Portalvenenblut der Kontrolltiergruppe lag bei $32,5 \pm 12$. Nach 1 h wurde ein mittleres Serumlevel des α -MSH von 26.7 ± 25.8 , nach 2 h von 37.5 ± 21.9 , nach 4 h von 40.0 ± 7.5 , nach 6 h von 52.5 ± 24.3 und von 23.3 ± 20.6 pg/ml nach 12 h gemessen. Diese Unterschiede im mittleren Serumlevel des α -MSH unter TO-Induktion einer APR waren jedoch nicht signifikant ($p = > 0.05$). Dennoch lässt sich rein deskriptiv eine leichte Zunahme der α -MSH-Enzymkonzentration beschreiben.

3.4 Untersuchungen zur Spezifität und Kontrolle der Ergebnisse

3.4.1 Analyse MC4R mittels Immunpräzipitation und *Immunizing peptides*

Um den Beweis für die Spezifität der immunoreaktiven Banden bei 37 kDa und 55 kDa, die im Western-Blot beschrieben wurden, zu erbringen, wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit einer anschließenden Blockungsmethode durchgeführt. Unter der Verwendung des spezifischen Antikörpers gegen MC4R wurden Lebergewebelysate von verschiedenen Kontrolltieren aus unterschiedlichen Versuchsreihen untersucht (Abbildung 26A). Es zeigte sich (Abbildung 26 A links) ein deutliches Signal der beiden Banden, übereinstimmend mit den herkömmlichen Western-Blot-Analysen. Außerdem wurden die Überstände dieser Proben nach der Immunpräzipitation mit dem identischen Antikörper gegen MC4R untersucht; hierbei zeigte sich keine 37 kDa-Bande und lediglich ein schwaches Signal der zuvor sehr starken 55kDa-immunoreaktiven Bande.

Um die Spezifität dieser beiden Banden im Western-Blot weiter abschätzen zu können, wurde eine sequentielle Rückerprobung der durchlaufenen Schritte der Membran mit unverändertem und neutralisiertem Anti-MC4R-Antikörper durchgeführt (Abbildung 26 B-C). Zuerst wurde die Membran mit dem Lebergewebelysate nach dem Standardprotokoll für Western-Blots, wie oben beschrieben, analysiert, danach der Anti-MC4R-Antikörper durch die Inkubation mit einem spezifischen Immunizing

Ergebnisse

Peptid neutralisiert und es konnte im Western-Blot keine immunoreaktive Bande mehr nachgewiesen werden, es ergaben sich nur unspezifische Hintergrundsignale. In einem zweiten Schritt, nach Stripping dieser Membran, konnte das spezifische Signal des MC4R in beiden Banden erneut durch den Zusatz des spezifischen MC4R-Antikörpers detektiert werden.

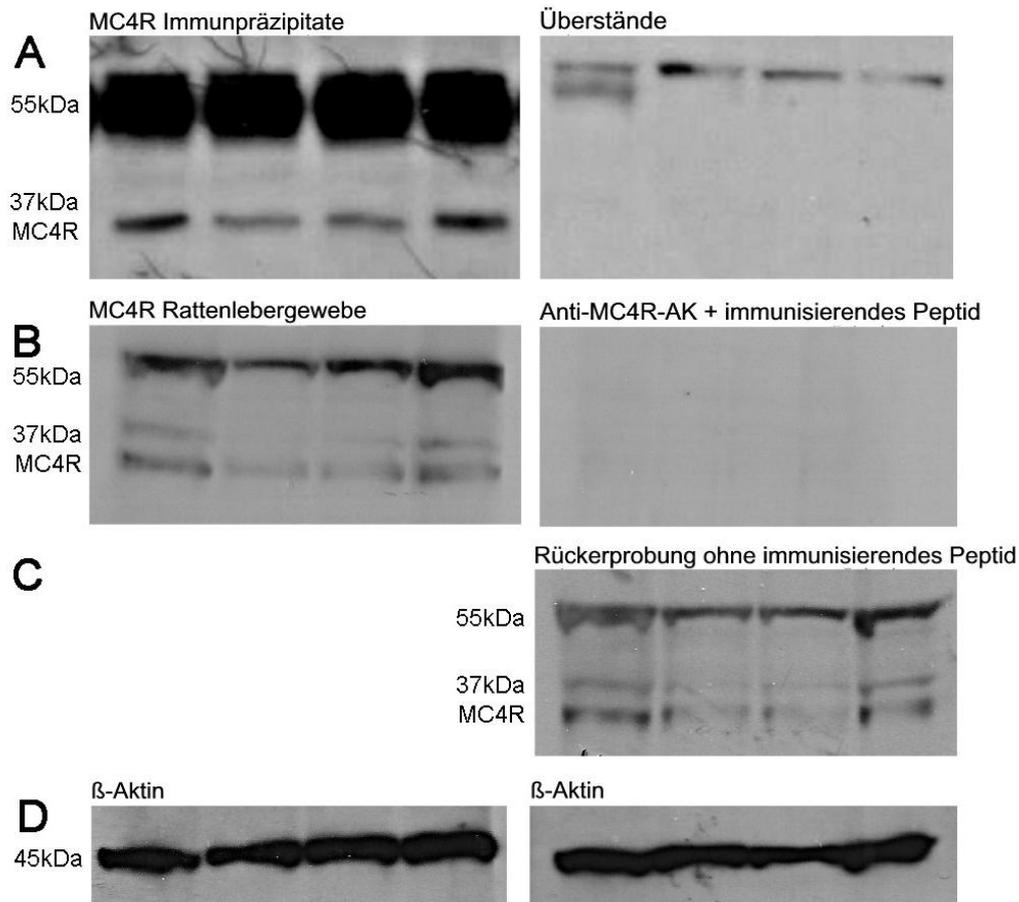


Abbildung 27: Immunpräzipitation des MC4R und anschließende Western-Blot-Analyse und Kontrolle mit spezifischem immunisierendem Peptid.

A, (links) Western-Blot-Analyse von vier Immunopräzipitaten von Rattenleberlysate zeigt eine immunoreaktive Bande bei 55 und 37 kDa. Die 37kDa-Bande repräsentiert den MC4R, die 55kDa-Bande ist wahrscheinlich eine glykosylierte Form des Rezeptors. A (rechts) Western-Blots der Überstände aus der Immunpräzipitation derselben Proben zeigen eine schwache 55kDa-Bande, aber keine 37kDa-Bande. B (links) Rattenleberlysate mit der immunoreaktiven Bande bei 55 und 37 kDa. B (rechts) Nach der Neutralisierung des Anti-MC4R-Antikörpers mittels spezifischen Immunizing Peptids sind beide Banden verschwunden. C) Rückführung derselben Membran nach Stripping mit einem reaktiven Antikörper, beide Banden wurden wieder sichtbar. D) β -Actin war auf allen Membranen nachweisbar.

3.4.2 Vergleichsstudie mit Gehirngewebe der Ratte unter Induktion der APR

Wie aus der Literatur bekannt, ist die Existenz des MC4R im Gehirn der Ratte sehr gut untersucht und Bestandteil aktueller Forschungen (Tao 2010). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit das Rückhirn der Ratte als positive Kontrolle herangezogen und mit identischen Mengen Lebergewebe im Vergleich untersucht. Es wurde eine Bestätigung der immunoreaktiven Banden bei 37 kDa und 55 kDa im Western-Blot erwartet. Hierzu wurde, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, eine Western-Blot-Analyse der Gehirnproben und Leberproben desselben Tieres auf einer Membran geblottet. Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, konnte der Anstieg des MC4R-Proteinlevel

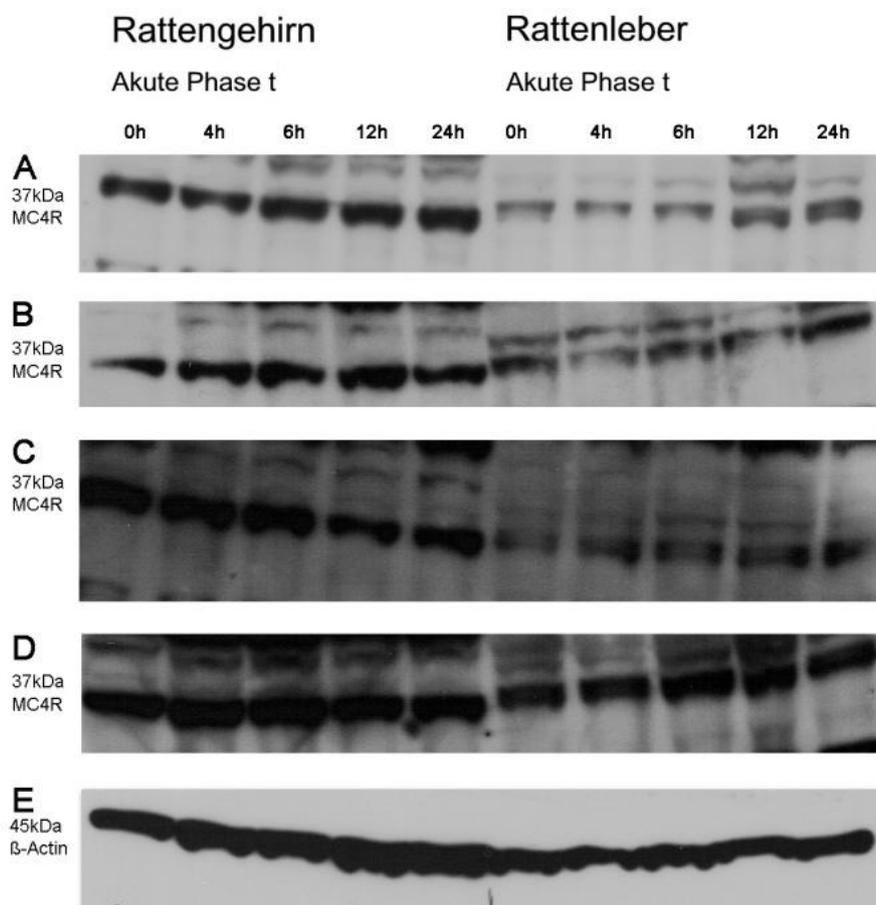


Abbildung 28: Vergleich des MC4R in Rückhirn und Leber der Ratte

A und D zeigen die Western-Blot-Bilder von jeweils demselben Tier, sowohl im Rückhirn als auch im Lebergewebe. C = Kontrolltier ohne Induktion der APR. Des Weiteren sind die Akut-Phase-Zeitpunkte 4 h, 6 h, 12 h und 24 h nach Terpentinölinjektion dargestellt. E zeigt ein repräsentatives Bild der β -Aktin-Kontrolle.

Ergebnisse

während der Akut-Phase-Reaktion ebenfalls im Rückhirn der Ratte beobachtet werden. Dieser Trend lässt sich im Mittel in allen Blots der Zeilen 27 A-D bestätigen. Allerdings ist die Intensität des Signals im Rückhirn deutlich stärker als in der Leber. Die densitometrische Quantifizierung der MC4R-Expression im Rückhirn ergab eine mittlere optische Dichte von 9.09, wohingegen die mittlere optische Dichte des MC4R im Lebergewebe bei 5.38 lag. Somit war die Bande im Hirngewebe der Ratte 1,7-mal stärker als im verglichenen Lebergewebe.

Sehr deutlich kann man den Anstieg der Proteinexpression des MC4R im Lebergewebe der Ratte in allen Bildern 27 A-D nachvollziehen, was in vorhergehenden Analysen demonstriert wurde und dem aktuellen Forschungsstand entspricht.

3.4.3 Immunodetektion des MC4R im Rattengehirn

Auch in der Immunfloreszenzfärbung gelang der Nachweis des MC4R im Rattengehirn als Positivkontrolle für die vorliegenden Untersuchungen zum Lebergewebe. Es zeigt sich ein ähnliches Schema in der Anfärbung wie bei dem zuvor beschriebenen Rattenlebergewebe, mit starkem Signal des Kerns und schwach positivem Signal des Zytoplasmas des Rattengehirns.

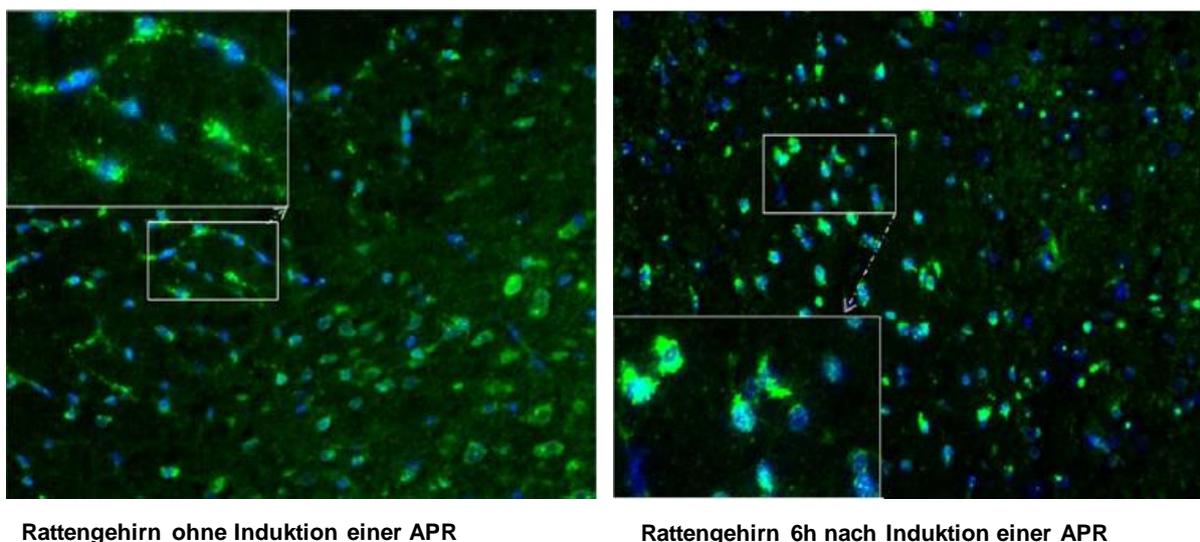


Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der Rattengehirnkryostatschnitte

Unter Verwendung des polyklonalen Antikörpers gegen MC4R (grün) und Immunfluoreszenzdetektion in Rattengehirnschnitten während der Induktion einer APR. Links: Kontroll-Gehirnprobe ohne Induktion einer APR. Rechts: 6 h nach Induktion der APR.

4 Diskussion

4.1 Der MC4R in der Leber und die Regulation unter APR

In dieser Studie wurden die Expression, Regulation und Rolle des MC4R als eines der wichtigsten verantwortlichen antiinflammatorischen Signale in der Rattenleber unter APR untersucht. Die Hochregulation des MC4R während einer Entzündungsreaktion und deren Einfluss auf die Antipyrese und Antiinflammation wurden in der Vergangenheit bereits in verschiedenen Modellen des ZNS untersucht (Catania et al. 2004, Huang et al. 1997, Sinha et al. 2004). Gemäß unserem Wissen ist dies die erste Studie, die die Expression des MC4R in Rattenleberzellen zeigt. Bisher konnte der MC4R einzig in der Leber des Seebarsches und der Flunder nachgewiesen werden (Kobayashi et al. 2008, Sanchez et al. 2009), jedoch wurden keine Funktionsanalysen unter APR durchgeführt.

Die Leber gilt als zentrales Mitglied des Abwehrsystems und ist untrennbar mit der Akut-Phase-Reaktion verknüpft. Auf der anderen Seite stellen Leberzellen das Ziel für Noxen und pathogene Substanzen von verletztem Gewebe oder schädlichen Agenzien dar. In der vorliegenden Arbeit wurden Analysen zur Existenz des MC4R im Lebergewebe der Ratte durchgeführt. Der MC4R wurde in isolierten Zellen wie Hepatozyten und Kupferzellen nachgewiesen. Deshalb richtet sich ein besonderes Augenmerk auf die signifikante Expressionssteigerung des MC4R nach intramuskulärer Injektion von Terpentinöl. Außerdem wurde eine Migration der Proteinform des MC4R vom Zytoplasma in den Nukleus beobachtet.

4.2 Expression des MC4R in der Rattenleber

4.2.1 Existenz des MC4R im Rattenlebergewebe

Der MC4R wurde im Rattenlebergewebe sowohl mittels Immunhistologie und Immunzytologie als auch durch Western-Blot-Analysen und PCR detektiert. Es konnte hierbei im Western-Blot sowohl die immunoreaktive 37kDa-Bande als auch eine Bande mit einem Molekulargewicht von 55 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 16). Ein früher Anstieg der MC4R-Genexpression wurde beginnend nach

1 h gemessen, auch hier zeigte sich ein deutlicher Anstieg mit einem Maximum bei 6 h, was der APR zuzuordnen ist (Abbildung 15).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass beide Banden mit dem MC4R verwandt und in Zusammenhang zu bringen sind; so bezieht sich eine Studie von Peter et al. ausdrücklich auf die Detektion der 55kDa-Bande im Hypothalamus der Ratte und deren Einfluss auf die Entstehung von Übergewicht (Peter et al. 2009). Es ist denkbar, dass es sich bei dieser beschriebenen 55kDa-Bande um die glykosylierte Form des Rezeptors handelt und die 37kDa-Bande die nicht glykosylierte Form repräsentiert, was sich auch seitens der Herstellerangaben zu dieser Bande vermuten lässt. In einigen Western-Blot-Bildern des Lebergewebes der Ratte fiel die Anwesenheit einer morphologisch sehr ähnlichen, aber schwächeren zweiten immunoreaktiven Bande auf, die sich etwas über der eigentlichen 37kDa-Bande abbildete. In Anbetracht der Tatsache, dass die Rezeptordimerisation des MC4R in wissenschaftlichen Arbeiten bereits beschrieben wurde (Biebermann et al. 2003, Elsner et al. 2006), kann man vermutlich von einem Effekt ausgehen, der durch die hohe Konzentration des Rezeptors im Western-Blot sichtbar wird. Diese Annahme wird nicht zuletzt durch die großen Übereinstimmungen in der Oberflächenanalyse der 37kDa-Bande des MC4R deutlich (Abbildung 18).

4.2.2 Expression des MC4R in Hepatozyten und Kupfferzellen

Der Melanocortinrezeptor konnte sowohl in einer Hepatozytenkultur als auch in isolierten Kupfferzellen in Immunhistochemie und Proteinanalysen nachgewiesen werden (Abbildungen 16D, 21). Dies untermauert die Rolle des MC4R als zentraler Drehpunkt in der zellulären Abwehrfunktion. Jeder Zelltyp der Leber hat eigene spezialisierte Abwehrfunktionen, in die der MC4R eingebunden scheint. In zukünftigen Studien sollte man diese Rolle unter Stimulationsversuchen mit toxischen und inflammatorischen Agenzien genauer untersuchen.

4.3 Vergleich des MC4R im Leber- und Hirngewebe der Ratte

Um die Verteilung und Änderung der MC4R-Genexpression unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen, wurde zunächst die Änderung der MC4R-Geneexpression im Rattengehirn als Positivkontrolle herangezogen. Wie bereits erwähnt, sind die Existenz und Bedeutung des MC4R im Hirngewebe sehr gut erforscht und verstanden, wie in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte (Cone 2005, Kishi et al. 2003). Die gemeinsame Proteinanalyse der Gewebe konnte einander entsprechende Banden in beiden Geweben zeigen, sowohl die 37kDa-Bande als auch die 55kDa-Bande waren im Hirngewebe identisch nachweisbar und konnten ausgewertet werden (Abbildung 28). Es zeigten sich deutlich höhere Konzentrationen des MC4R im Gehirn der Tiere. Analog zu den beschriebenen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte eine Arbeitsgruppe unter Leitung von Sanchez ebenfalls eine ähnliche Verteilung der mRNA-Expression des MC4R im Seebarsch detektieren; sie fanden die stärkste Expression im Gehirn und eine niedrige Expression in der Leber des Fisches (Sanchez et al. 2009). Dementsprechend kommt man bei einer speziesübergreifenden Denkweise und Betrachtung zu dieser erwarteten Proteinexpressionsverteilung der Ratte mit etwa doppelt so hohen MC4R-Proteinexpressionen im Gehirn und niedrigeren Expressionen in der Leber. Außerdem unterstreicht diese Beobachtung die evolutionsbiologische Bedeutung des MC4R, der zu den am besten konservierten Rezeptoren in der Evolution der Wirbeltiere gehört (Hughes et al. 2009).

Des Weiteren war ein Anstieg des MC4R-Proteinlevel im Rattengehirn während der APR, analog dem Verlauf in der Leber, zu beobachten. Ähnliche Expressionsanstiege wurden 2007 in der Forschergruppe von Caruso et al. schon in Astrozyten dokumentiert; hierbei wurde ein LPS-Modell verwendet, das viele Parallelen zum TO-Modell besitzt und ebenfalls eine APR induziert (Caruso et al. 2007). Über eine Aktivierung des MC4R durch den Agonisten α -MSH kommt es zur Inhibition der iNOS- und COX-2-Expression sowie der NO- und PGE₂-Produktion im Hypothalamus (Caruso et al. 2004). Mehrere In-vivo- und In-vitro-Experimente konnten zeigen, dass die Melanocortinrezeptoraktivierung ein wichtiger Schritt in der Begrenzung einer Entzündungsreaktion ist und zur lokalen und systemischen Abwehr gehört (Caruso et al. 2007, Catania und Lipton 1993). Diese Effekte

verhindern apoptotische Prozesse und wirken sich im Gehirn neuroprotektiv aus (Giuliani et al. 2006). Wir gehen davon aus, dass der MC4R in der Leber der Ratte eine ähnlich zentrale Rolle in der Eingrenzung der APR spielen kann.

Es wurden außerdem verschiedene Rattengehirnschnitte mittels Immunfluoreszenzfärbung als Positivkontrolle auf die Existenz des MC4R untersucht. Hierbei zeigten sich ähnliche Muster der Anfärbbarkeit des Rezeptors wie im untersuchten Lebergewebe. Nach Induktion der APR wurde eine Zunahme des MC4R-Signals detektiert. Die Signale zeigen sich sehr stark im Bereich der Zellkerne und mit schwächerer Intensität im Zytoplasma (Abbildung 29).

4.4 Dynamik des MC4R während der APR

In der durchgeführten Untersuchung zeigte sich nach densitometrischer Prüfung der Western-Blots ein signifikanter Anstieg des MC4R in der Leber während der Akut-Phase-Reaktion. Diese Proteinexpressionssteigerung ist während 4 h, 6 h und 12 h nach Induktion der APR im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant am größten (Abbildungen 22, 23). Die gesteigerte Expression wurde auch auf mRNA-Ebene gezeigt (Abbildung 15).

Dieser frühe Anstieg des mRNA-Level geht mit einer maximalen Proteinexpression bei 6 h einher und passt damit sehr gut zu der zellbiologischen Abfolge von Transkription und Translation. Der Anstieg des MC4R könnte auf den Anstieg des wichtigen Akut-Phase-Zytokins IL-6 zurückzuführen sein (Abbildung 25). Wie unsere Abteilung bereits in früheren Arbeiten zeigen konnte, induziert eine Gewebeschädigung (z.B. durch TO) eine APR. Die APR gilt als einer der Hauptmechanismen des Körpers, um eine Homöostase wiederherzustellen. Dieser Mechanismus wird in Ratte und Maus stark durch das Zytokin IL-6 reguliert (Ramadori und Christ 1999, Ramadori et al. 2010, Sheikh et al. 2006).

Parallel zum Anstieg des MC4R steigen auch die IL-6 Spiegel während der APR messbar. Die Verbindung zwischen Akut-Phase-Zytokinen und dem Melanocortinsystem beinhaltet möglicherweise eine kausale Verknüpfung und sollte in zukünftigen Studien genauere Betrachtung finden.

4.4.1 Einfluss der α -MSH-Konzentration im Portalvenenblut

Der Melanocortin-4-Rezeptor ist als strenger Regulator in der Energiehomöostase und Appetitregulation bekannt (Sinha et al. 2004), wohingegen seine antiinflammatorischen Eigenschaften durch die Bindung des Liganden α -MSH eingeleitet werden. Verschiedene Studien konnten den Mechanismus der antiinflammatorischen Effekte des α -MSH beweisen. α -MSH führt zu einer cAMP-Erhöhung und Inhibition des wichtigsten proinflammatorischen Moleküls NO, was wiederum zur Hemmung des NF κ B, ein Transkriptionsfaktor, der ubiquitär in allen Zellen und Geweben vorkommt, führt. Durch die Hemmung des NF κ B sinkt die Zytokinkonzentration, einschließlich IL-1, IL-6, IL-8, TNF α , NO sowie PGE2, wodurch sich der antiinflammatorische Einfluss des MC4R potenziert (Catania et al. 2004, Delgado et al. 1998, Ichiyama et al. 1999a, Ichiyama et al. 1999b).

Dieser wichtige natürliche Agonist des MC4R, das α -MSH, wurde mit Portalvenenblut der Ratte zu allen Zeitpunkten der APR untersucht. Allerdings zeigte sich hierbei kein signifikanter Anstieg des Hormons. Lediglich ein schwacher Trend mit großer Schwankungsbreite konnte detektiert werden. Möglicherweise liegt hier ein Regulationsmechanismus zur Erhöhung der Sensitivität des Zielorgans Leber auf α -MSH während der APR zugrunde. Durch die Zunahme der Rezeptordichte des MC4R kann die Sensitivität erhöht werden. Weiter gedacht wäre diese Beobachtung auch für die Steigerung der Inflammationsantwort von Bedeutung, sodass ein größeres antiinflammatorisches Potenzial der Leber binnen kurzer Zeit zur Verfügung steht. Ähnliche Mechanismen sind zum Beispiel am Uterus verschiedener Spezies bekannt; hier kommt es zur Steigerung der Sensitivität des Uterus gegenüber dem Hormon Oxytocin durch Steigerung der Rezeptordichte des Oxytocinrezeptors (Fuchs et al. 1995).

4.5 Lokalisation und Distribution des MC4R in Rattengehirn und Rattenleber während der APR

Um die Lokalisation der MC4R-Genexpression unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen, wurde zunächst eine Immunfluoreszenzfärbung des Rattengehirns als Positivkontrolle herangezogen. Es konnte demonstriert werden, dass die

Zellkerne der Astrozyten ein starkes MC4R-positives Signal zeigten, wohingegen das Zytoplasma schwächer gefärbt war (Abbildung 29). Außerdem sah man hier eine optische Zunahme der Rezeptordichte im Bereich der Kernmembran unter APR. Identische Veränderungen und Distributionen wurden auch im Lebergewebe beobachtet (Abbildung 26). Denkbar wäre, dass hierbei eine Translokation des MC4R von der Zellmembran in die Kernmembran stattfindet. Der Prozess der Internalisierung ermöglicht einem phosphorylierten Rezeptor (z.B. einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor wie dem MC4R) den Rückzug von der Zelloberfläche und somit neue Möglichkeiten der Regulation von Kernprozessen.

4.6 Wissenschaftlicher Bezug der durchgeführten Untersuchung auf andere Einflussfaktoren der Antiinflammation

Das mikrosomale Enzym Hämoxxygenase-1 (HO-1) wurde als ein Enzym charakterisiert, das essentielle Reaktionen des Hämstoffwechsels katalysiert und als „protektives“ Gen bei inflammatorischem Geschehen gilt. Es wurde gezeigt, dass durch eine Vielzahl von Stimuli, eingeschlossen proinflammatorische Enzyme, die Expression des HO-1 gesteigert werden kann. Die Produkte, die durch den Hämabbau entstehen, wie Biliverdin, Fe²⁺ und Kohlenmonoxid (CO), besitzen selbst ebenfalls antiinflammatorische Effekte und haben hemmende Einflüsse auf Apoptose und Proliferation (Bach 2005, Wagener et al. 2003).

In einer vorausgegangenen Studie unserer Abteilung konnte die Forschergruppe um Tron et al. die Hochregulation des HO-1-Gens im Lebergewebe bei Terpeninöl-induzierter Inflammation detektieren (Tron et al. 2005).

Des Weiteren bezeugen die Arbeiten von Lam et al. sowohl in vitro als auch in vivo die Induktion des HO-1-Gens in Maus-Makrophagen durch die Aktivierung des Melanocortinrezeptors (Lam et al. 2005), sodass man den Schluss zulassen kann, dass dieser Mechanismus der MC4R-abhängigen HO-1-Induktion möglicherweise auch in den Kupfferschen Sternzellen, den spezialisierten Makrophagen der Leber, eine Rolle spielt. Es lässt sich sogar vermuten, dass auch in den Hepatozyten ein solcher Regelkreis existiert, da in der vorliegenden Arbeit sowohl der MC4R als auch das HO-1-Gen in den isolierten Hepatozyten der Ratten nachgewiesen werden konnte. Die Erhöhung der cAMP-Formation galt lange als Hauptsignal einer

Aktivierung von Melanocortinrezeptoren (Wikberg et al. 2000). Aufgrund dieses Signalmoleküls entsteht die Verbindung zur HO-1-Induktion (Immenschuh et al. 1998). In Untersuchungen einer Hepatozytenkultur wurde die transkriptionelle Induktion des HO-1-Gens durch den cAMP-abhängigen PKA-Signaltransduktionsweg beschrieben (Durante et al. 1997, Immenschuh et al. 1998). Dieser Fakt ist besonders wichtig vor dem Hintergrund, dass die Aktivierung des MC4R zur Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels führt. Somit gilt die aus den vorliegenden Ergebnissen ableitbare Hypothese, dass ein funktioneller Link der HO-1-Induktion in den Hepatozyten während der APR möglicherweise durch die MC4R-Aktivierung und den daraus folgenden cAMP-Anstieg getriggert wird. Infolgedessen nimmt der MC4R eine wichtige Rolle in der Antiinflammation unter Akut-Phase-Bedingungen ein.

4.7 Hepatoprotektive Effekte von α -MSH

In Anbetracht der direkten Effekte des Haupt-MC4R-Liganden α -MSH im Lebergewebe gibt es weitere Studien, die ähnliche Zusammenhänge, analog zu der hier vorliegenden Arbeit, untersucht haben. Chiao et al. testeten in einem Modell einer LPS-induzierten Leberinflammation, ob α -MSH diese Entzündungsreaktion reduzieren kann. Die Forschergruppe fand heraus, dass nach i.v. Applikation von α -MSH über die Schwanzvene der Ratte die Leberinflammation über die Eindämmung der NO-Produktion verhindert werden kann. Es wurde außerdem ein Rückgang der hepatischen neutrophilen Granulozyten-Infiltration beobachtet und ein LPS-induzierter Anstieg der TNF α -mRNA-Level in der Leber. Bemerkenswert war, dass α -MSH in der histologischen Beurteilung die LPS-induzierten Hepatozytenschäden reduzierte (Chiao et al. 1996).

Eine weitere Studie zeigte, dass α -MSH eine durch Tetrachlorkohlenstoff verursachte Leberfibrose reversibel beeinflussen kann sowie die fibrogene und proinflammatorische Genantwort hemmt (Lee et al. 2006). Zusammengefasst zeigen alle diese Studien, dass der hepatoprotektive Effekt des α -MSH auf die Existenz eines Signalweges über die Aktivierung von Melanocortinrezeptoren in der Leber hindeutet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten ebenfalls darauf hin, dass

die Effekte von α -MSH in der Leber über die Aktivierung und Induktion des MC4R, vor allem in Hepatozyten, vermittelt sein können.

4.8 MC4R und Appetitregulation

Der MC4R als Teil des zentralen Melanocortinsystems ist ebenfalls für seine Mediatorwirkung auf Appetitanregung und appetithemmende Signale bekannt. Er hat Einfluss auf Appetit, Nahrungsaufnahme sowie Körpergewicht und Energiehaushalt (Li et al. 2000). Sogar die chronische zentrale oder periphere Gabe von nicht selektiven Melanocortinrezeptoragonisten kann nachweislich die Nahrungsaufnahme vermindern und somit zu Gewichtsverlust führen. Beobachtungen an MC4R-knock-out-Mäusen (MC4R^{-/-}) zeigen ein Missverhältnis in Fettkonsum und Fettsäureoxidation verglichen mit dem Wildtyp, wodurch die Schlüsselrolle dieses Rezeptors in der Regulation des Energiehaushalts deutlich wird (Butler 2006). In dem speziellen Modell einer APR, das hier Anwendung fand, wurde eine Inflammationsreaktion *in vivo* simuliert. Durch die Hochregulation des Rezeptors während der APR, um die oben beschriebenen antiinflammatorischen Effekte einzuleiten, wäre auch ein Appetitverlust erklärbar. Um diesen Effekt jedoch genauer zu beleuchten, müsste zuvor ein längerer Zeitraum der täglichen Nahrungsaufnahme der Tiere untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Die Melanocortinrezeptorfamilie ist für ihre antiinflammatorischen Effekte bekannt. Der Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) ist ein Teil des zentralen Melanocortin-Systems, er ist aber auch ein wichtiges regulatives Element in der Antiinflammation und kontrolliert die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen.

Die Leber selbst ist das Hauptorgan im Abwehrsystem des Körpers und untrennbar mit der Akut-Phase-Reaktion (APR) verbunden. Durch zahlreiche Regelmechanismen unterstützt die Leber die Abwehrreaktion und trägt zur Wiederherstellung einer Homöostase bei. Die Akut-Phase-Reaktion wurde in der vorliegenden Studie durch die intramuskuläre Injektion von Terpentinöl (TO) induziert. TO führt im injizierten Muskel zu einer lokalen Inflammation und nachfolgend zur Induktion einer systemischen APR.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach der Expression des MC4R in der Leber der Ratte und seiner Dynamik während der Induktion einer Akut-Phase-Reaktion. Für den MC4R selbst wurden mRNA- und Proteinanalysen sowie Immunpräzipitationen und verschiedene Färbemethoden angewendet. Der MC4R wurde mittels Immunzytologie in Hepatozytenkulturen und isolierten Kupfferzellen nachgewiesen.

Die Zusammenschau der erbrachten Ergebnisse konnte die Existenz des MC4R in der Rattenleber bestätigen. So zeigen sowohl die Western-Blot-Analysen als auch mRNA-Analysen eine Expression des Rezeptors in der Rattenleber an. Die Peroxidasefärbung und indirekte Immunfluoreszenzfärbung liefern das histologische Korrelat dieser Ergebnisse und eine deutliche Signalanreicherung des MC4R in den Leberzellen. Es zeigten sich histologisch die vermehrte Distribution des MC4R im Bereich der Zellkerne sowie ein schwächeres MC4R-Signal im Zytoplasma. Dieses Verteilungsmuster bestätigte sich auch in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung der Rattenhepatozytenkultur und in den isolierten Kupfferzellen. Eine durchgeführte Immunpräzipitation bestätigt die Spezifität des MC4R-Signals in der Leber.

Um die Dynamik des MC4R während der APR zu beleuchten, wurden verschiedene Zeitpunkte nach der Induktion der APR untersucht. Die durch TO ausgelöste systemische Inflammation wurde anhand der steigenden IL-6-Spiegel detektiert. Zeitgleich wurden mRNA- und Proteinexpressionslevel in der Leber der Ratten

Zusammenfassung

gemessen. Die Akut-Phase-Reaktion wirkt als Stimulus für die Expression des MC4R in der Leber. Es bestätigt sich die Annahme, dass die APR zu einem signifikanten Anstieg des MC4R in der Leber führt. Somit scheint der MC4R sowohl in die Akut-Phase-Reaktion als auch in die systemische Inflammation eingebunden zu sein. Dies beinhaltet die Möglichkeit, dass ein funktioneller Link zwischen der Produktion von Akut-Phase-Proteinen und dem Melanocortinsystem in der Leber unter APR besteht. Um weitere funktionelle Aspekte des MC4R zu erfassen, wurde das MC4R-Level konsekutiv im Vergleich zu Gehirnproben desselben Tieres untersucht. Das MC4R-Proteinlevel des Rattengehirns ist bezogen auf die Gewebemenge etwa doppelt so hoch wie in der Leber. Es konnten allerdings ähnliche Expressionssteigerungen in dem MC4R wie in der Leber beschrieben werden. Es wurde eine deutliche Zunahme der Rezeptordichte im Bereich der Zellkerne 6 h nach Induktion der APR detektiert. Möglicherweise handelt es sich hierbei um die Beobachtung einer Translokation des Melanocortin-4-Rezeptors von der Zelloberfläche in die Kernmembran.

Die vorliegende Arbeit kann ferner durch vorhergehende Untersuchungen des HO-1-Gens an demselben Modell auf eine mögliche funktionelle Verknüpfung dieses Enzyms mit dem MC4R hinweisen. Die Resultate dieser Arbeit zeigen, dass der MC4R an der antiinflammatorischen Funktion der Leber während der Akut-Phase-Reaktion und an der Inhibierung der Zytokin- und Chemokinproduktion beteiligt ist.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der Tabellen

<i>Tabelle 1: Übersicht über Zytokine vom Interleukin-1- und Interleukin-6-Typ</i>	12
<i>Tabelle 2: Übersicht ausgewählter Akut-Phase-Proteine</i>	13
<i>Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, biologische Substanzen, Antikörper und Primer</i>	28
<i>Tabelle 4: Verwendete Geräte</i>	29
<i>Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien</i>	29
<i>Tabelle 6: Verwendete Kits</i>	30
<i>Tabelle 7: Reagenzien zur Gewinnung von cDNA</i>	37
<i>Tabelle 8: Primersequenzen für die rt-PCR</i>	41
<i>Tabelle 9: Amplifikations-Temperaturverlauf zur Durchführung der rtPCR</i>	42
<i>Tabelle 10: Zusammensetzung des Tris-HCl-Lysis-Puffers</i>	44
<i>Tabelle 11: Zusammensetzung des Puffers A</i>	46
<i>Tabelle 12: Zusammensetzung des Puffers C</i>	47
<i>Tabelle 13: Zusammensetzung des Krebs-Ringer-Puffers</i>	48

6.2 Verzeichnis der Abbildungen

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lebergewebes</i>	8
<i>Abbildung 2: Induktion der Akut-Phase-Reaktion</i>	11
<i>Abbildung 3: Darstellung der Kristallstruktur von IL-6. Dargestellt sind die 4 Haupthelices</i>	15
<i>Abbildung 4: Schematischer Überblick über die wichtigsten Peptide, die durch limitierte Proteolyse aus dem Polypeptid POMC gewonnen werden können</i>	18
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des MC4R</i>	20
<i>Abbildung 6: Die Melanocortin-Rezeptorfamilie und ihre Eigenschaften</i>	20
<i>Abbildung 7: Die Regulation des Energiehaushalts durch das Melanocortinsystem</i>	21
<i>Abbildung 8: Signaltransduktionsweg des MC4R</i>	25
<i>Abbildung 9: Schematische Darstellung des Temperaturverlaufs bei der rt-PCR</i>	38
<i>Abbildung 10: PCR-Kurve von drei cDNA-Proben mit eingezeichnetem Threshold</i>	39
<i>Abbildung 11: Amplifikationskurven</i>	40
<i>Abbildung 12: Amplifikations-Temperaturverlauf zur Durchführung der rt-PCR</i>	42
<i>Abbildung 13: Elektrophoresekammer (invitrogen)</i>	45
<i>Abbildung 14: MC4R-mRNA in der Rattenleber</i>	54
<i>Abbildung 15: qRT-PCR-Analyse von Total-RNA der Rattenleber während der APR</i>	54
<i>Abbildung 16: MC4R-Analyse des Rattenlebergewebes</i>	55
<i>Abbildung 17: Western-Blot-Bild der Firma abcam des MC4-Rezeptor-Antikörpers (ab 24233)</i> .	55
<i>Abbildung 18: Oberflächenplot eines suspekten MC4R-Dimer in der Western-Blot-Analyse</i>	56

Abbildung 19: MC4R-Peroxidase-Färbung von Rattenleber-Kryostatschnitten..... 58

Abbildung 20: Indirekte Immunfluoreszenz des MC4R in der Rattenleber 60

Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis des MC4R in primär kultivierten Kupferzellen (links) und Hepatozyten (rechts)..... 61

Abbildung 22: Western-Blot-Analyse des MC4R in der Rattenleber während der APR..... 62

Abbildung 23: MC4R-Proteinexpression während der APR in der Leber der Ratte..... 63

Abbildung 24: Darstellung der MC4R-Proteinexpression im Lebergewebe gemeinsam mit dem Anstieg der IL-6-Konzentration im Serum unter Induktion einer APR. 64

Abbildung 25: Doppelfärbung von Rattenleberschnitten. 65

Abbildung 26: MC4R im Rattenleberlysate, Zytosol und Kernextrakt..... 66

Abbildung 27: Immunpräzipitation des MC4R und anschließende Western-Blot-Analyse und Kontrolle mit spezifischem immunisierendem Peptid..... 68

Abbildung 28: Vergleich des MC4R in Rückenmark und Leber der Ratte..... 69

Abbildung 29: Immunfluoreszenzfärbung der Rattengehirnkryostatschnitte..... 70

6.3 Verzeichnis der Abkürzungen

AK	Antikörper
APP	Akut-Phase-Proteine
APR	Akut-Phase-Reaktion
bp	Basenpaare
ca.	circa
cAMP	Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
COX-2	Cyclooxygenase-2
Ct.	Threshold cycle
DNA	deoxyribonucleic acid
dsRNA	double-stranded ribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Foetal Bovine Serum
GABA	Gammaaminobuttersäure
gp	Glykoprotein
IF	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Nitric oxide synthase
IP	Immunpräzipitation
kDA	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor

<i>MOPS</i>	<i>3-(N-morpholino) propanesulfonic acid</i>
<i>NFκB</i>	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<i>NO</i>	<i>Nitric oxide</i>
<i>OD</i>	<i>Optical density</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PGE₂</i>	<i>Prostaglandin E₂</i>
<i>PKA</i>	<i>Protein Kinase A</i>
<i>PMSF</i>	<i>Phenylmethyl sulfonylfluoride</i>
<i>RNA</i>	<i>ribonucleic acid</i>
<i>RNase</i>	<i>Ribonuklease</i>
<i>rtPCR</i>	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
<i>SIRS</i>	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
<i>STAT-3</i>	<i>Signal transducer und activator of transcription 3</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor-Nekrose-Faktor-α</i>
<i>TO</i>	<i>Terpentinöl</i>
<i>TRIS</i>	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane</i>
<i>U/min</i>	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
<i>α-MSH</i>	<i>α-melanocyte-stimulating hormon</i>

7 Verzeichnis der Literatur

Aderka D, Le JM und Vilcek J; (1989):

IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice.

J Immunol 143, 3517-3523

Alcaraz M, Fernandez P und Guillen Mi; (2003):

Anti-inflammatory action of the heme oxygenase-1 pathway.

Curr Pharm Des 9, 2541-2551

Anundi I, Lahteenmäki T, Rundgren M, Moldeus P und Lindros Ko; (1993):

Zonation of acetaminophen metabolism und cytochrome P450 2E1-mediated toxicity studied in isolated periportal und perivenous hepatocytes.

Biochem Pharmacol 45, 1251-1259

Bach F; (2005):

Heme oxygenase-1: a therapeutic amplification funnel.

FASEB J 19, 1216-1219

Barton B; (1997):

IL-6: insights into novel biological activities.

Clin Immunol Immunopathol 85, 16-20

Basso B, Gimenez F und Lopez C; (2005):

IL-1beta, IL-6 und IL-8 levels in gyneco-obstetric infections.

Infect Dis Obstet Gynecol 13, 207-211

Baumann H und Gauldie J; (1994):

The acute phase response.

Immunol Today 15, 74-80

Benoit S, Schwartz M, Lachey J, Hagan M, Rushing P, Blake K, Yagaloff K, Kurylko G, Franco L, Danhoo W und Seeley R; (2000):

A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats und mice without producing aversive consequences.

J Neurosci 20, 3442-3448

Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T und Luger T; (1997):

Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes.

J Immunol 158, 3378-3384

Bhatnagar R, Schirmer R, Ernst M und Decker K; (1981):

Superoxide release by zymosan-stimulated rat Kupffer cells in-vitro.

Eur J Biochem 119, 171-175

Biebermann H, Krude H, Elsner A, Chubanov V, Gudermann T und Gruters A; (2003):
Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization.

Diabetes 52, 2984-2988

Bitensky M und Burstein S; (1965):

Effects of cyclic adenosine monophosphate und melanocyte-stimulating hormone on frog skin in-vitro.

Nature 208, 1282-1284

Blagaic V, Houra K, Turcic P, Stambuk N, Konjevoda P, Boban-Blagaic A, Kelava T, Kos M, Aralica G und Culo F; (2010):

The Influence of alpha-, beta-, und gamma-Melanocyte Stimulating Hormone on Acetaminophen Induced Liver Lesions in Male CBA Mice.

Molecules 15, 1232-1241

Blouin A, Bolender R und Weibel E; (1977):

Distribution of organelles und membranes between hepatocytes und nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study.

J Cell Biol 72, 441-455

Boelen A, Maas M, Lowik C, Platvoet M und Wiersinga W; (1996):

Induced illness in interleukin-6 (IL-6) knock-out mice: a causal role of IL-6 in the development of the low 3,5,3'-triiodothyronine syndrome.

Endocrinology 137, 5250-5254

Bouwens L, De Bleser P, Vunderkerken K, Geerts B und Wisse E; (1992):

Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells.

Enzyme 46, 155-168

Buggy J; (1998):

Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway.

Biochem J 331 (Pt 1), 211-216

Burt A, Le Bail B, Balabaud C und Bioulac-Sage P; (1993):

Morphologic investigation of sinusoidal cells.

Semin Liver Dis 13, 21-38

Busam K, Homfeld A, Zawatzky R, Kastner S, Bauer J, Gerok W und Decker K; (1990):

Virus-vs endotoxin-induced activation of liver macrophages.

Eur J Biochem 191, 577-582

Butler A; (2006):

The melanocortin system und energy balance.

Peptides 27, 281-290

Butler A, Marks D, Fan W, Kuhn C, Bartolome M und Cone R; (2001):

Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat.

Nat Neurosci 4, 605-611

Caruso C, Mohn C, Karara A, Rettori V, Watanobe H, Schioth H, Seilicovich A und Lasaga M; (2004):

Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase und cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats.

Neuroendocrinology 79, 278-286

Caruso C, Durund D, Schioth H, Rey R, Seilicovich A und Lasaga M; (2007):

Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response und prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide und interferon-gamma in astrocytes.

Endocrinology 148, 4918-4926

Catania A und Lipton J; (1993):

alpha-Melanocyte stimulating hormone in the modulation of host reactions.

Endocr Rev 14, 564-576

Catania A, Airaghi L, Colombo G und Lipton J; (2000):

Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology und disease states.

Trends Endocrinol Metab 11, 304-308

Catania A, Gatti S, Colombo G und Lipton J; (2004):

Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation.

Pharmacol Rev 56, 1-29

Cavaillon J, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C und Payen D; (2003):

Zytokine cascade in sepsis.

Scund J Infect Dis 35, 535-544

Chen W, Kelly M, Opitz-Araya X, Thomas R, Low M und Cone R; (1997):

Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides.

Cell 91, 789-798

Cheung C, Clifton D und Steiner R; (1997):

Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus.

Endocrinology 138, 4489-4492

Chhajlani V; (1996):

Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues.

Biochem Mol Biol Int 38, 73-80

Chiao H, Foster S, Thomas R, Lipton J und Star R; (1996):

Alpha-melanocyte-stimulating hormone reduces endotoxin-induced liver inflammation.

J Clin Invest 97, 2038-2044

Chirgwin J, Przybyla A, Macdonald R und Rutter W; (1979):

Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.

Biochemistry 18, 5294-5299

Coffin J; (1996):

Retrovirus restriction revealed.

Nature 382, 762-763

Cone R; (1999):

[The central melanocortin system und its role in energy homeostasis].
Ann Endocrinol (Paris) 60, 3-9

Cone R; (2005):

Anatomy und regulation of the central melanocortin system.
Nat Neurosci 8, 571-578

Delgado R, Carlin A, Airaghi L, Demitri Mt, Meda L, Galimberti D, Baron P, Lipton J und Catania A; (1998):

Melanocortin peptides inhibit production of proinflammatory Zytokines und nitric oxide by activated microglia.

J Leukoc Biol 63, 740-745

Dijkstra C, Dopp Ea, Joling P und Kraal G; (1985):

The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 und ED3.

Immunology 54, 589-599

Dini L, Lentini A, Diez Gd, Rocha M, Falasca L, Serafino L und Vidal-Vanaclocha F; (1995):

Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells.

J Cell Sci 108 (Pt 3), 967-973

Doenecke D und Karlson P:

Karlsons *Biochemie und Pathobiochemie*. 15., komplett überarb. und neugestaltete Aufl.; Thieme, Stuttgart u.a. 2005

Duhe R und Farrar W; (1998):

Structural und mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword.

J Interferon Zytokine Res 18, 1-15

Durante W, Christodoulides N, Cheng K, Peyton K, Sunahara R und Schafer A; (1997):
cAMP induces heme oxygenase-1 gene expression und carbon monoxide production in vascular smooth muscle.

Am J Physiol 273, H317-323

Eberle A, Kriwaczek V und Schwyzer R; (1978):

Mechanism of alpha-melanotropin action.

Bull Schweiz Akad Med Wiss 34, 99-111

Ebersole J und Cappelli D; (2000):

Acute-phase reactants in infections und inflammatory diseases.

Periodontol 2000 23, 19-49

Elsner A, Tarnow P, Schaefer M, Ambrugger P, Krude H, Gruters A und Biebermann H; (2006):

MC4R oligomerizes independently of extracellular cysteine residues.

Peptides 27, 372-379

Englaro W, Rezzonico R, Durund-Clement M, Lallemond D, Ortonne J und Ballotti R; (1995):

Mitogen-activated protein kinase pathway und AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells.

J Biol Chem 270, 24315-24320

Fearon D und Locksley R; (1996):

The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.

Science 272, 50-53

Feldmann G, Scoazec J, Racine L und Bernuau D; (1992):

Functional hepatocellular heterogeneity for the production of plasma proteins.

Enzyme 46, 139-154

Fey G und Fuller G; (1987):

Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators.

Mol Biol Med 4, 323-338

Fuchs A, Fields M, Freidman S, Shemesh M und Ivell R; (1995):

Oxytocin und the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, und oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha und E2 release.

Adv Exp Med Biol 395, 405-420

Gabay C und Kushner I; (1999):

Acute-phase proteins und other systemic responses to inflammation.

N Engl J Med 340, 448-454

Gantz I und Fong T; (2003):

The melanocortin system.

Am J Physiol Endocrinol Metab 284, E468-474

Gantz I, Konda Y, Tashiro T, Shimoto Y, Miwa H, Munzert G, Watson S, Delvalle J und Yamada T; (1993):

Molecular cloning of a novel melanocortin receptor.

J Biol Chem 268, 8246-8250

Gatsios P, Haubeck H, Van De Leur E, Frisch W, Apte S, Greiling H, Heinrich P und Graeve L; (1996):

Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 und TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells.

Eur J Biochem 241, 56-63

Getting S, Schioth H und Perretti M; (2003):

Dissection of the anti-inflammatory effect of the core und C-terminal (KPV) alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides.

J Pharmacol Exp Ther 306, 631-637

Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, Leone S, Bazzani C, Minutoli L, Bitto A, Cainazzo M, Marini H, Zaffe D, Botticelli A, Pizzala R, Savio M, Necchi D, Schioth HB, Bertolini A, Squadrito F und Guarini S; (2006):

Both early und delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia.

Endocrinology 147, 1126-1135

Gressner A; (1991):

Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research und clinical outlook.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 29, 293-311

Grewe M, Duyster J, Dieter P, Henninger H, Schulze-Specking A und Decker K; (1992):
Prostaglandin D2 und E2 syntheses in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by lipopolysaccharide und phorbol ester.

Biol Chem Hoppe Seyler 373, 655-664

Haase I:

Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg: Als persönliche Mitteilung. Hamburg 2008

Hagan M, Rushing P, Schwartz MW, Yagaloff K, Burn P, Woods SC und Seeley R; (1999):

Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding.

J Neurosci 19, 2362-2367

Halter J, Steinberg J, Fink G, Lutz C, Picone A, Maybury R, Fedors N, Dirocco J, Lee H und Nieman G; (2005):

Evidence of systemic Zytokine release in patients undergoing cardiopulmonary bypass.

J Extra Corpor Technol 37, 272-277

Harris J; (1959):

Studies on pituitary polypeptide hormones. III. The structure of alpha-melanocyte-stimulating hormone from pig pituitary glands.

Biochem J 71, 451-459

Heinig J, Keeley F, Robson P, Sower S und Youson J; (1995):

The appearance of proopiomelanocortin early in vertebrate evolution: cloning und sequencing of POMC from a Lamprey pituitary cDNA library.

Gen Comp Endocrinol 99, 137-144

Heinrich P, Castell J und Undus T; (1990):

Interleukin-6 und the acute phase response.

Biochem J 265, 621-636

Heinrich P, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F und Graeve L; (1998):

Interleukin-6-type Zytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway.

Biochem J 334 (Pt 2), 297-314

Heinrich P, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G und Schaper F; (2003):

Principles of interleukin (IL)-6-type Zytokine signalling und its regulation.

Biochem J 374, 1-20

- Hendriks H, Verhoofstad W, Brouwer A, De Leeuw A und Knook D; (1985):
Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver.
Exp Cell Res 160, 138-149
- Hiltz Me, Catania A und Lipton Jm; (1992):
Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha und endogenous pyrogen but not that caused by LTB4, PAF und rIL-8.
Zytokine 4, 320-328
- Huang Q, Entwistle M, Alvaro J, Duman R, Hraby V und Tatro J; (1997):
Antipyretic role of endogenous melanocortins mediated by central melanocortin receptors during endotoxin-induced fever.
J Neurosci 17, 3343-3351
- Hughes D, Hinney A, Brumm H, Wermter A, Biebermann H, Hebebrund J und Stoneking M; (2009):
Increased constraints on MC4R during primate und human evolution.
Hum Genet 124, 633-647
- Huszar D, Lynch C, Fairchild-Huntress V, Dunmore J, Fang Q, Berkemeier L, Gu W, Kesterson R, Boston B, Cone R, Smith F, Campfield L, Burn P und Lee F; (1997):
Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice.
Cell 88, 131-141
- Ichiyama T, Sakai T, Catania A, Barsh G, Furukawa S und Lipton J; (1999a):
Inhibition of peripheral NF-kappaB activation by central action of alpha-melanocyte-stimulating hormone.
J Neuroimmunol 99, 211-217
- Ichiyama T, Zhao H, Catania A, Furukawa S und Lipton J; (1999b):
alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation und IkappaBalpha degradation in human glioma cells und in experimental brain inflammation.
Exp Neurol 157, 359-365
- Immenschuh S, Kietzmann T, Hinke V, Wiederhold M, Katz N und Muller-Eberhard U; (1998):
The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures.
Mol Pharmacol 53, 483-491
- Jungermann K; (1995):
Zonation of metabolism und gene expression in liver.
Histochem Cell Biol 103, 81-91
- Jungermann K und Katz N; (1989):
Functional specialization of different hepatocyte populations.
Physiol Rev 69, 708-764
- Jungermann K und Kietzmann T; (1996):
Zonation of parenchymal und nonparenchymal metabolism in liver.
Annu Rev Nutr 16, 179-203

- Kapas S, Purbrick A und Hinson JP; (1995):
Role of tyrosine kinase und protein kinase C in the steroidogenic actions of angiotensin II, alpha-melanocyte-stimulating hormone und corticotropin in the rat adrenal cortex.
Biochem J 305 (Pt 2), 433-438
- Kim Yi, Song Ke, Ryeon Hk, Hwang Yj, Yun Yk, Lee Jw und Chun By; (2002):
Enhanced inflammatory Zytokine production at ischemia/reperfusion in human liver resection.
Hepatogastroenterology 49, 1077-1082
- Kishi T, Aschkenasi C, Lee Ce, Mountjoy Kg, Saper Cb und Elmquist Jk; (2003):
Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat.
J Comp Neurol 457, 213-235
- Knittel T, Fellmer P, Neubauer K, Kawakami M, Grundmann A und Ramadori G; (1997):
The complement-activating protease P100 is expressed by hepatocytes und is induced by IL-6 in-vitro und during the acute phase reaction in-vivo.
Lab Invest 77, 221-230
- Knolle P und Gerken G; (2000):
Local control of the immune response in the liver.
Immunol Rev 174, 21-34
- Knook D und Sleyster E; (1980):
Isolated parenchymal, Kupffer und endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content.
Biochem Biophys Res Commun 96, 250-257
- Kobayashi Y, Tsuchiya K, Yamanome T, Schioth Hb, Kawauchi H und Takahashi A; (2008):
*Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*.*
Gen Comp Endocrinol 155, 280-287
- Koj A; (1996):
Initiation of acute phase response und synthesis of Zytokines.
Biochim Biophys Acta 1317, 84-94
- Kojima I, Kojima K und Rasmussen H; (1985):
Role of calcium und cAMP in the action of adrenocorticotropin on aldosterone secretion.
J Biol Chem 260, 4248-4256
- Kresse M, Latta M, Kunstle G, Riehle Hm, Van Rooijen N, Hentze H, Tiegs G, Biburger M, Lucas R und Wendel A; (2005):
Kupffer cell-expressed membrane-bound TNF mediates melphalan hepatotoxicity via activation of both TNF receptors.
J Immunol 175, 4076-4083
- Kushner I; (1982):
The phenomenon of the acute phase response.
Ann N Y Acad Sci 389, 39-48

La Flamme A, Macdonald A und Pearce E; (2000):

Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs.
J Immunol 164, 2419-2426

Lam C, Getting S und Perretti M; (2005):

In-vitro und in-vivo induction of heme oxygenase 1 in mouse macrophages following melanocortin receptor activation.
J Immunol 174, 2297-2304

Larsson L; (1981):

Adrenocorticotropin-like und alpha-melanotropin-like peptides in a subpopulation of human gastrin cell granules: bioassay, immunoassay, und immunocytochemical evidence.
Proc Natl Acad Sci U S A 78, 2990-2994

Lee T, Jawan B, Chou W, Lu CN, Wu CL, Kuo H, Concejero A und Wang C; (2006):

Alpha-melanocyte-stimulating hormone gene therapy reverses carbon tetrachloride induced liver fibrosis in mice.
J Gene Med 8, 764-772

Li J, Finniss S, Yang YK, Zeng Q, Qu S, Barsh G, Dickinson C und Gantz I; (2000):

Agouti-related protein-like immunoreactivity: characterization of release from and presence in serum.
Endocrinology 141, 1942-1950

Lipton J, Zhao H, Ichiyama T, Barsh G und Catania A; (1999):

Mechanisms of antiinflammatory action of alpha-MSH peptides. In-vivo und in-vitro evidence.
Ann N Y Acad Sci 885, 173-182

Lipton J, Catania A und Ichiyama T; (2000):

Marshaling the Anti-Inflammatory Influence of the Neuroimmunomodulator alpha-MSH.
News Physiol Sci 15, 192-195

Luger Ta, Schwarz T, Kalden H, Scholzen T, Schwarz A und Brzoska T; (1999):

Role of epidermal cell-derived alpha-melanocyte stimulating hormone in ultraviolet light mediated local immunosuppression.
Ann N Y Acad Sci 885, 209-216

Luheshi G, Stefferl A, Turnbull A, Dascombe Mj, Brouwer S, Hopkins S und Rothwell N; (1997):

Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral und brain IL-1 und TNF-alpha in the rat.
Am J Physiol 272, R862-868

Maines M, Trakshel G und Kutty R; (1986):

Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible.
J Biol Chem 261, 411-419

Mains R, Eipper B und Ling N; (1977):
Common precursor to corticotropins und endorphins.
Proc Natl Acad Sci U S A 74, 3014-3018

Malik I, Baumgartner B, Naz N, Sheikh N, Moriconi F und Ramadori G;
Changes in gene expression of DOR und other thyroid hormone receptors in rat liver during acute-phase response.
Cell Tissue Res 342, 261-272

Manna Skund Aggarwal B; (1998):
Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents.
J Immunol 161, 2873-2880

Misra U, Bradford B, Handler J und Thurman R; (1992):
Chronic ethanol treatment induces H₂O₂ production selectively in pericentral regions of the liver lobule.
Alcohol Clin Exp Res 16, 839-842

Mizuno T, Kleopoulos S, Bergen HT, Roberts J, Priest C und Mobbs C; (1998):
Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting und [corrected] in ob/ob und db/db mice, but is stimulated by leptin.
Diabetes 47, 294-297

Mizuno T und Mobbs C; (1999):
Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin und stimulated by fasting.
Endocrinology 140, 814-817

Moshage H; (1997):
Zytokines und the hepatic acute phase response.
J Pathol 181, 257-266

Mountjoy K, Mortrud M, Low M, Simerly Rb und Cone R; (1994):
Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine und autonomic control circuits in the brain.
Mol Endocrinol 8, 1298-1308

Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang Ac, Cohen Sn und Numa S; (1979):
Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor.
Nature 278, 423-427

Nakatani K, Kaneda K, Seki S und Nakajima Y; (2004):
Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology und function.
Med Electron Microsc 37, 29-36

Oberholzer A, Oberholzer C und Moldawer LI; (2000):
Zytokine signaling--regulation of the immune response in normal und critically ill states.
Crit Care Med 28, N3-12

Oh J, Van Wagoner N, Rose-John S und Benveniste E; (1998):
Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression.
J Immunol 161, 4992-4999

Otterbein L, Soares Mp, Yamashita K und Bach F; (2003):
Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme.
Trends Immunol 24, 449-455

Pannen B und Robotham J; (1995):
The acute-phase response.
New Horiz 3, 183-197

Papanicolaou D, Wilder R, Manolagas S und Chrousos G; (1998):
The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.
Ann Intern Med 128, 127-137

Pathan N, Hemingway C, Alizadeh A, Stephens A, Boldrick J, Oragui E, McCabe C, Welch S, Whitney A, O'gara P, Nadel S, Relman D, Harding S und Levin M; (2004):
Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock.
Lancet 363, 203-209

Pellegrini S und Dusanter-Fourt I; (1997):
The structure, regulation und function of the Janus kinases (JAKs) und the signal transducers und activators of transcription (STATs).
Eur J Biochem 248, 615-633

Perlmutter D, Dinarello Ca, Punsal PI und Colten HR; (1986):
Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression.
J Clin Invest 78, 1349-1354

Peter JC, Bekel A, Lecourt A, Zipfel G, Eftekhari P, Nesslinger M, Breidert M, Muller S, Kessler L und Hofbauer Kg; (2009):
Anti-melanocortin-4 receptor autoantibodies in obesity.
J Clin Endocrinol Metab 94, 793-800

Rabes H, Tuczek H und Skoruppa W; (1975):
[Cell kinetic studies on the interference between proliferative und functional metabolism in regenerating rat liver after application of phenobarbital (author's transl)].
Virchows Arch B Cell Pathol 17, 347-361

Rajora N, Boccoli G, Burns D, Sharma S, Catania Ap und Lipton J; (1997):
alpha-MSH modulates local und circulating tumor necrosis factor-alpha in experimental brain inflammation.
J Neurosci 17, 2181-2186

Ramadori G und Meyer Zum Büschenfelde KH; (1990):
[The acute phase reaction und its mediators. II: Alpha tumor necrosis factor und interleukin 6].
Z Gastroenterol 28, 14-21

Ramadori G und Christ B; (1999):
Zytokines und the hepatic acute-phase response.
Semin Liver Dis 19, 141-155

Ramadori G und Armbrust T; (2001):
Zytokines in the liver.
Eur J Gastroenterol Hepatol 13, 777-78

Ramadori P, Ahmad G und Ramadori G; (2010):
Cellular und molecular mechanisms regulating the hepatic erythropoietin expression during acute-phase response: a role for IL-6.
Lab Invest 90, 1306-1324

Ridker PM, Rifai N, Stampfer Mj und Hennekens Ch; (2000):
Plasma concentration of interleukin-6 und the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.
Circulation 101, 1767-1772

Rieder H, Armbrust T, Meyer Zum Buschenfelde K und Ramadori G; (1993):
Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis: expression of transforming growth factor-beta 1 receptors und modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor-beta 1.
Hepatology 18, 937-944

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, Van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G und Mantovani A; (1997):
Role of IL-6 und its soluble receptor in induction of chemokines und leukocyte recruitment.
Immunity 6, 315-325

Sanchez E, Rubio Vc, Thompson D, Metz J, Flik G, Millhauser G und Cerda-Reverter J; (2009):
*Phosphodiesterase inhibitor-dependent inverse agonism of agouti-related protein on melanocortin 4 receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*).*
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 296, R1293-1306

Sasse D, Spornitz U und Maly I; (1992):
Liver architecture.
Enzyme 46, 8-32

Schumann J, Bluethmann H und Tiegs G; (2000a):
*Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFR1- und TNFR2-dependent liver toxicity in mice.*
Immunol Lett 74, 165-172

Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, Van Rooijen N und Tiegs G; (2000b):
Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice.
Am J Pathol 157, 1671-1683

Schwartz M, Seeley R, Woods S, Weigle DS, Campfield L, Burn P und Baskin D; (1997):
Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus.
Diabetes 46, 2119-2123

Seglen P; (1973):
Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion.
Exp Cell Res 82, 391-398

Seglen P; (1976):
Preparation of isolated rat liver cells.
Methods Cell Biol 13, 29-83

Sheikh N, Tron K, Dudas J und Ramadori G; (2006):
Zytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 is released by the noninjured liver in a rat acute-phase model.
Lab Invest 86, 800-814

Singer J, Fialkow P, Dow L, Ernst C und Steinmann L; (1979):
Unicellular or multicellular origin of human granulocyte-macrophage colonies in-vitro.
Blood 54, 1395-1399

Sinha P, Schioth H und Tatro J; (2004):
Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic und hyperthermic actions of centrally administered alpha-MSH.
Brain Res 1001, 150-158

Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke Nm, Olson B und Klenk D; (1985):
Measurement of protein using bicinchoninic acid.
Anal Biochem 150, 76-85

Somers W, Stahl M und Seehra J; (1997):
1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization und signaling.
EMBO J 16, 989-997

Taga T; (1997):
The signal transducer gp130 is shared by interleukin-6 family of haematopoietic und neurotrophic Zytokines.
Ann Med 29, 63-72

Tao Y; (2010):
The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, und Pathophysiology.
Endocr Rev

Tatro JB; (1996):
Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides.
Neuroimmunomodulation 3, 259-284

Tello K, Christiansen H, Gurleyen H, Dudas J, Rave-Frank M, Hess Cf, Ramadori G und Saile B; (2008):

Irradiation leads to apoptosis of Kupffer cells by a Hsp27-dependant pathway followed by release of TNF-alpha.

Radiat Environ Biophys 47, 389-397

Towbin H, Staehelin T und Gordon J; (1992):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure und some applications. 1979.

Biotechnology 24, 145-149

Trautwein C, Boker K und Manns M; (1994):

Hepatocyte und immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms.

Gut 35, 1163-1166

Trey J und Kushner I; (1995):

The acute phase response und the hematopoietic system: the role of Zytokines.

Crit Rev Oncol Hematol 21, 1-18

Tron K, Novosyadlyy R, Dudas J, Samoylenko A, Kietzmann T und Ramadori G; (2005):

Upregulation of heme oxygenase-1 gene by turpentine oil-induced localized inflammation: involvement of interleukin-6.

Lab Invest 85, 376-387

Tron K, Samoylenko A, Musikowski G, Kobe F, Immenschuh S, Schaper F, Ramadori G und Kietzmann T; (2006):

Regulation of rat heme oxygenase-1 expression by interleukin-6 via the Jak/STAT pathway in hepatocytes.

J Hepatol 45, 72-80

Ulich T, Guo K, Irwin B, Remick D und Davatelis G; (1990):

Endotoxin-induced Zytokine gene expression in-vivo. II. Regulation of tumor necrosis factor und interleukin-1 alpha/beta expression und suppression.

Am J Pathol 137, 1173-1185

Ulich T, Guo K, Remick D, Del Castillo J und Yin S; (1991):

Endotoxin-induced Zytokine gene expression in-vivo. III. IL-6 mRNA und serum protein expression und the in-vivo hematologic effects of IL-6.

J Immunol 146, 2316-2323

Vachharajani Tj, Work J, Issekutz A und Granger D; (2000):

Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 278, H1613-1617

Van Der Kraan M, Tatro J, Entwistle M, Brakkee J, Burbach J, Adan R und Gispen W; (1999):

Expression of melanocortin receptors und pro-opiomelanocortin in the rat spinal cord in relation to neurotrophic effects of melanocortins.

Brain Res Mol Brain Res 63, 276-286

Van Snick J; (1990):
Interleukin-6: an overview.
Annu Rev Immunol 8, 253-278

Von Kupffer K; (1876):
Ueber Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Prof. Waldyer.
Arch Mikr Anat 12, 353-358

Von Kupffer K; (1899):
Ueber die sogenannten Sternzellen der Säugethierleber.
Arch Mikr Anat 54, 254-288

Vrinten D, Gispen W, Groen G und Adan R; (2000):
Antagonism of the melanocortin system reduces cold und mechanical allodynia in mononeuropathic rats.
J Neurosci 20, 8131-8137

Wagener F, Volk HD, Willis D, Abraham N, Soares M, Adema G und Figdor C; (2003):
Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation.
Pharmacol Rev 55, 551-571

Wake K; (2004):
Karl Wilhelm Kupffer Und His Contributions To Modern Hepatology.
Comp Hepatol 3 Suppl 1, S2

Wegenka U, Buschmann J, Luttkicken C, Heinrich P und Horn F; (1993):
Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level.
Mol Cell Biol 13, 276-288

Wikberg J, Muceniece R, Mundrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C und Skottner A; (2000):
New aspects on the melanocortins und their receptors.
Pharmacol Res 42, 393-420

Willis D, Moore Ar, Frederick R und Willoughby Da; (1996):
Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response.
Nat Med 2, 87-90

Wisse E, Van't Noordende Jm, Van Der Meulen J und Daems W; (1976):
The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids und peripheral blood.
Cell Tissue Res 173, 423-435

Wisse E, Luo D, Vermijlen D, Kanellopoulou C, De Zanger R und Braet F; (1997):
On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells.
Semin Liver Dis 17, 265-286

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Giuliano Ramadori. Durch die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, hat er mir die Gelegenheit gegeben, Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu entdecken. Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Giuliano Ramadori insbesondere dafür bedanken, dass er mich stets tatkräftig unterstützte und mich mit der Bereitschaft zur Diskussion und Offenheit für anstehende Fragen begleitete.

Herrn Dr. Malik danke ich insbesondere, er hat mir mit seinem fundierten Fachwissen viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit gegeben.

Für die Möglichkeit, methodische Fragen klären zu können, danke ich Frau Prof. Dr. Sabine Mihm.

Frau Annika Krüger und Frau Sandra Georgi möchte ich für exzellente technische Unterstützung und die praktischen Ratschläge bei der Durchführung der Untersuchungen danken.

PD Dr. Hassan Dihazi möchte ich für die weitreichende Unterstützung und für die hilfreichen Tipps bei der Durchführung der molekularbiologischen Experimente danken. Ich möchte Herrn Dr. Pier Luigi Ramadori für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit danken.

Ferner gilt mein Dank Dr. Anna-Sophia Fritzsche und Dr. Jakob Triebel für die fachlichen Ratschläge bei Anfertigung und Korrektur der Arbeit. Für die formalen und sprachlichen Ratschläge möchte ich Dr. Lisa Baltruschat meinen Dank aussprechen. Des Weiteren gilt meiner großer Dank Herrn Stephan Münchmeyer für die administrative Unterstützung.

An dieser Stelle danke ich des Weiteren allen nicht namentlich genannten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich mit Hilfsbereitschaft, Ratschlägen und Humor durch meine ersten Schritte im wissenschaftlichen Arbeiten begleitet haben.