

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen**

Betreuer: PD Dr. Thomas Hübschle

**Immunhistochemische Analyse der  
Leptin-induzierten Transkriptionsfaktoren  
STAT3 und STAT5  
im Gehirn der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Jörg Mütze**

Tierarzt aus Frankenberg (Hessen)

Gießen 2005

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. KAPITEL</b>	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Molekularer Aufbau des Hormons „Leptin“ des weißen Fettgewebes	1
1.2. Entdeckung und Historie	3
1.3. Synthese und Freisetzung	6
1.3.1. Beeinflussung der Leptin-Synthese und -Sekretion	6
1.4. Transport und Transportproteine	7
1.5. Übertritt in das Gehirn	7
1.5.1. Transport über die Blut-Hirn-Schranke	8
1.5.2. Diffusion in Hirnregionen	9
1.6. Signaltransduktion	10
1.6.1. Molekularer Aufbau der Leptin-Rezeptor-Isoformen	10
1.6.2. Signalkaskade und Gentranskription	12
1.6.2.1. JAK-STAT-Kaskade	13
1.6.2.1.1. STAT3	16
1.6.2.1.2. STAT5	17
1.7. Abbau und Elimination	19
1.8. Das Problem der Leptin-Resistenz	19
1.9. Leptin-vermittelte Wirkungen auf den Organismus	22
1.9.1. Regulation von hypothalamischen Neurotransmittern und Neuropeptiden	23
1.9.1.1. Das Neuropeptid Y (NPY)	24
1.9.1.2. Das Agouti-verwandte Peptid (AgRP)	24
1.9.1.3. Das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH)	25
1.9.1.4. Das Orexin bzw. Hypokretin	25
1.9.1.5. Das Proopiomelanocortin (POMC)	26
1.9.1.6. Das Cocain- und Amphetamin-regulierte Transkript (CART)	27
1.9.1.7. Das Galanin-ähnliche Peptid (GALP)	27
1.9.1.8. Der „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF)	28
1.9.2. Regulation auf Ebene des autonomen Nervensystems	28
1.9.3. Regulation auf Ebene des Neuroendokriniums (Hypophyse)	29

1.9.3.1. Regulation der Gonadotropine	30
1.9.3.2. Regulation der Glucocorticoide	30
1.9.3.3. Regulation der Schilddrüsenhormone	32
1.9.3.4. Regulation des Wachstumshormons	33
1.9.3.5. Regulation des Prolaktins	33
1.10. Zielstrukturen für Leptin im <i>Hypothalamus</i> der Ratte	34
1.10.1. Der Nucleus arcuatus (ARC)	35
1.10.2. Der Nucleus hypothalamicus ventromedialis (VMH)	38
1.10.3. Der Nucleus hypothalamicus dorsomedialis (DMH)	39
1.10.4. Der Nucleus paraventricularis (PaV)	40
1.10.5. Die Area laterale hypothalami (LH)	42
1.10.6. Die Area retrochiasmatica (RCH)	43
1.10.7. Der Nucleus praemamillaris ventralis (PMV)	44
1.11. Hintergrund und Fragestellung der wissenschaftlichen Arbeit	45
<b>2. KAPITEL:</b>	<b>49</b>
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>49</b>
2.1. Versuchstiere	49
2.2. Operation	49
2.2.1. Narkose	50
2.2.2. i.c.v.-Kanülierung des Ventriculus lateralis (V <sub>l</sub> )	50
2.2.3. Angiotensin-II-Trinktest	53
2.3. Verwendete Substanzen	54
2.3.1. Leptin	54
2.3.2. Pyrogenfreie, isotonische Kochsalzlösung zur Applikation	54
2.4. Verwendete Lösungen und Puffer	55
2.4.1. Phosphatpuffer (PB)	55
2.4.2. Paraformaldehyd- (PFA) Lösung	55
2.4.3. Saccharoselösung (Sucrose)	56
2.4.4. Isotonische Kochsalzlösung (Saline) zur Perfusion	56
2.5. Durchführung der Tierversuche	56
2.5.1. Stimulation der Versuchstiere	56
2.5.1.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)	56

2.5.1.2. Systemische Stimulation (i.p.)	57
2.5.2. Perfusion	57
2.6. Präparation der Gehirne	58
2.6.1. Aufbereitung für die „free-floating-Methode“	59
2.6.2. Aufbereitung für die „Fluoreszenz-Methode“	59
2.7. Schneiden der Gehirne	59
2.7.1. Schneiden für die „free-floating-Methode“	60
2.7.2. Schneiden für die „Fluoreszenz-Methode“	60
2.8. Analyse der Gehirnproben	61
2.8.1. Grundlage der Immunhistochemie	61
2.8.1.1. Avidin-Biotin-Methode	61
2.8.2. Verwendete Antikörper	63
2.8.2.1. Der anti-STAT3-Antikörper	63
2.8.2.2. Der anti-STAT5-Antikörper	64
2.8.3. Immunhistochemische Protokolle	65
2.8.3.1. Verwendete Substanzen und Lösungen	65
2.8.3.2. „Free-floating-Methode“	65
2.8.3.3. „Fluoreszenz-Methode“	68
2.8.3.3.1. Weiterführendes Protokoll mit dem neuronalen Marker (NeuN)	70
2.8.3.3.2. Weiterführendes Protokoll mit dem endothelialen Marker (vW)	71
2.8.3.3.3. Weiterführendes Protokoll mit dem Astrozyten-Marker (GFAP)	71
2.9. Analyse der Blutproben	72
2.9.1. Der Leptin-Radioimmunoassay (RIA)	72
2.9.1.1. Prinzip des Leptin-Radioimmunoassays	72
2.9.1.2. Durchführung des Leptin-Radioimmunoassays	73
2.9.2. Der Interleukin-6-(IL-6)-Bioassay	74
2.9.2.1. Prinzip des IL-6-Bioassays	74
2.9.2.2. Verwendete Zelllinie	74
2.9.2.3. Vorbereitung der Zellen für den IL-6-Bioassay	76
2.9.2.4. Durchführung des IL-6-Bioassays	76
2.9.3. Der Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Bioassay	78
2.9.3.1. Prinzip des TNF-Bioassays	78
2.9.3.2. Verwendete Zelllinie	78

2.9.3.3. Vorbereitung der Zellen für den TNF-Bioassay	79
2.9.3.4. Durchführung des TNF-Bioassays	80
2.10. Auswertung und Statistik	81
2.10.1. Histologie	81
2.10.1.1. Durchlicht-Mikroskopie	82
2.10.1.2. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	82
2.10.2. Auswertung der Assays	85
2.10.2.1. Leptin-Radioimmunoassay	85
2.10.2.2. IL-6-Bioassay	86
2.10.2.3. TNF-Bioassay	87
2.11. Versuchsprotokolle	88
2.11.1. i.c.v.-Applikation	88
2.11.2. i.p.-Applikation	89
<b>3. KAPITEL:</b>	<b>90</b>
<b>ERGEBNISSE</b>	<b>90</b>
3.1. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT3 nach peripherer Stimulation	90
3.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT3-Translokation	90
3.1.2. Neuroanatomischer Nachweis der STAT3-Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des ZNS	98
3.1.2.1. STAT3-Translokation in Neuronen	98
3.1.2.2. STAT3-Translokation in Endothelzellen	103
3.1.2.3. STAT3-Translokation in Zellen des Plexus choroideus (PC)	106
3.2. Nachweis des Transkriptionsfaktors STAT5	107
3.2.1. Zentrale Stimulation (i.c.v.)	107
3.2.1.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation	107
3.2.2. Periphere Stimulation (i.p.)	112
3.2.2.1. Neuroanatomischer Vergleich der Leptin- und NaCl-induzierten nukleären STAT5-Translokation	112
3.2.2.2. Quantitative Auswertung der Leptin-induzierten nukleären STAT5-Translokation	119

3.2.2.3. Neuroanatomischer Nachweis der Leptin-induzierten nukleären STAT5- Translokation in unterschiedlichen Zelltypen des zentralen Nervensystems	121
3.2.2.3.1. STAT5-Translokation in Neuronen	121
3.2.2.3.2. STAT5-Translokation in Astrozyten	129
3.2.2.3.3. STAT5-Translokation in Ependymzellen	132
3.2.3. Neuroanatomischer Vergleich der nukleären STAT5-Translokation nach zentraler und peripherer Leptin-Applikation	135
3.3. Quantitativer Vergleich der Leptin-induzierten nukleären STAT3- und STAT5- Translokation im ARC	137
3.4. Messung der Plasma-Zytokin-Konzentrationen nach systemischer Stimulation	138
3.4.1. Messung der Leptin-Konzentrationen	138
3.4.2. Messung der IL-6-Konzentrationen	139
3.4.3. Messung der TNF-Konzentrationen	140
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	141
<b>4. KAPITEL</b>	<b>144</b>
<b>DISKUSSION</b>	<b>144</b>
4.1. Überlegungen zur Methodik	144
4.1.1. Wahl des Injektionsweges für die Leptin-Applikation	144
4.1.2. Wahl des Markers für Leptin-aktivierte Zellen im ZNS	145
4.1.2.1. Alternative Möglichkeiten zur Detektion Leptin-aktivierter Zellen	147
4.1.3. Problem der STAT-Markierung in Endothelzellen	149
4.2. Die STAT-Kartierung	150
4.2.1. Überlegungen zur Spezifität der nukleären STAT-Translokation	150
4.2.2. STAT3	152
4.2.2.1. Neurone	154
4.2.2.2. Endothelzellen	156
4.2.2.3. Andere Zellphänotypen	157
4.2.3. STAT5	158
4.2.3.1. Neurone	160
4.2.3.2. Andere Zellphänotypen	162
4.3. Schlussfolgerung und Zukunftsperspektiven	163

<b>5. KAPITEL</b>	<b>166</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>166</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>168</b>
<b>6. KAPITEL</b>	<b>170</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>170</b>
<b>7. KAPITEL:</b>	<b>173</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>173</b>
<b>8. KAPITEL</b>	<b>199</b>
<b>ANHANG</b>	<b>199</b>
8.1. Publikationen	199
8.1.1. Originalarbeiten in Fachzeitschriften	199
8.1.2. Veröffentlichte Abstracts	199
8.2. Danksagung	200
8.3. Erklärung	201