

Aus dem der Klinik für Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Cholecystokinin und Ghrelin -
Untersuchungen zur Nahrungsaufnahmeregulation bei männlichen
Ratten“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Steffen Noetzel

aus Bad Saarow

Datum der Promotion: 11.12.2015

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abstract	5
1 Einleitung	7
2 Zielsetzung	9
3 Methoden	10
3.1 Versuchstiere	10
3.2 Die Fixierung und Präparation des Hirngewebes	10
3.3. Publikation 1: CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem	11
3.3.1 Peptid	11
3.3.2 Versuchsdesign	12
3.3.3 Die c-Fos Immunhistochemie	12
3.3.4 Immundoppelmarkierung gegen c-Fos und NUCB2/Nesfatin-1	13
3.3.5 Immundreifachmarkierung von c-Fos, NUCB2/Nesfatin-1, CRF oder OXY	13
3.3.6 Immundoppelmarkierung gegen NUCB2/Nesfatin-1 und TH	14
3.3.7 Datenerhebung und statistische Auswertung	15
3.4 Publikation 2: Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats	15
3.4.1 Versuchsdesign	15
3.4.2 Die c-Fos Immunhistochemie	15
3.4.3 Immundoppelmarkierung gegen c-Fos und CART	16
3.4.4 Datenerhebung und statistische Auswertung	16
3.5 Publikation 3: Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats	17
3.5.1 Versuchstiere	17
3.5.2 Peptid	17
3.5.3 Versuchsdesign	17
3.5.4 Die c-Fos Immunhistochemie	17
3.5.5 Immundoppelmarkierung von c-Fos und AgRP	17
3.5.6 Immundoppelmarkierung von AgRP und NPY	18
3.5.7 Datenerhebung und statistische Auswertung	19
4 Ergebnisse	19
4.1 Publikation 1	19
4.1.1 Die Effekte von CCK-8s auf die Anzahl c-Fos positiver Neurone im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus, im Nucleus arcuatus und Nucleus tractus solitarii des Hirnstamms	19
4.1.2 Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von c-Fos und NUCB2/Nesfatin-1	20
4.1.3 Die Ergebnisse der Immundreifachmarkierung von c-Fos, NUCB2/Nesfatin-1 und	

	CRF bzw. OXY	20
4.1.4	Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von NUCB2/Nesfatin-1 und TH	21
4.2	Publikation 2	21
4.2.1	Die Effekte von CCK-8S auf die Anzahl c-Fos-positiver Neurone im paraventriculären Nucleus, Nucleus arcuatus und Nucleus tractus solitarii	21
4.2.2	Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von c-Fos und CART nach intraperitonealer Injektion von CCK-8S	21
4.3	Publikation 3	21
4.3.1	Die Effekte von peripher injizierten Ghrelin auf die Anzahl c-Fos positiver Neurone in verschiedenen hypothalamischen Kernen	22
4.3.2	Die Ergebnisse der Doppelmarkierung gegen c-Fos und AgRP bzw. NPY im dorsomedialen hypothalamischen Nucleus	22
5	Diskussion	22
6	Literaturverzeichnis	27
7	Eidesstattliche Versicherung/Selbstständigkeitserklärung	37
8	Anteilerklärung	38
9	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	40
10	Lebenslauf	64
11	Komplette Publikationsliste	66
12	Danksagung	69

Abstract:

Hintergrund: Cholezystokinin (CCK) ist ein anorexinogenes Hormon. Den Neuropeptiden NUCB2/Nesfatin-1, Corticotropin-releasing-factor (CRF), Oxytocin (OXY) sowie dem Cocaine and amphetamine-regulated-transcript (CART) wird eine Rolle bei der zentralen Vermittlung von CCK-Effekten auf die Nahrungsaufnahme zugeschrieben. Das orexinogene Ghrelin vermittelt seine Wirkung vornehmlich über den Nucleus Arcuatus im Hypothalamus (ARC). Unklar ist, ob Ghrelin auch in weiteren Hirnkernen eine vermehrte neuronaler Aktivität induziert. Ziel der vorliegenden Arbeiten war es daher, zu untersuchen, ob CCK eine vermehrte Aktivität in Neuronen induziert, welche NUCB2/Nesfatin-1-, CRF-, OXY- bzw. CART-positiv sind. Zudem wurde untersucht, ob Ghrelin noch in anderen Hirnkernen außer dem ARC zu vermehrter neuronaler Aktivität führt.

Methodik: In den Studien 1 und 2 wurde ungestörten Ratten CCK-8S in den Dosierungen 6 und 10 µg/kg/KG intraperitoneal (i.p.) injiziert. In Studie 1 wurde anschließend mittels Immunfluoreszenz die neuronale Aktivität in NUCB2/Nesfatin-1 Neuronen im paraventriculären Nucleus (PVN) und Nucleus tractus solitarii (NTS) ermittelt. Zudem wurden die aktivierten NUCB2/Nesfatin-1-Neurone auf Kollokalisierung mit OXY, CRF und Tyrosinhydroxylase (TH) geprüft. In Studie 2 wurde die neuronale Aktivität in CART-Neuronen im PVN ermittelt. In der dritten Studie bekamen ungestörte Ratten 3 nmol Ghrelin i.p. injiziert. Anschließend wurde die neuronale Aktivität im ARC und dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus (DMH) gemessen. Zudem erfolgte eine Überprüfung auf Kollokalisierung von aktivierten Neuronen auf Agouti-related peptide und cocaine und Amphetamine-regulated transcript peptide (AgRP) und Neuropeptide Y (NPY).

Ergebnisse: Eine i.p. Injektion von CCK-8S führt dosisabhängig zu einer Steigerung der neuronalen Aktivität in NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen im PVN und NTS sowie in CART-Neuronen im PVN. Es findet sich partiell eine Kollokalisierung von NUCB2/Nesfatin-1 mit OXY bzw. CRF in PVN-Neuronen. NUCB2/Nesfatin-1-Neurone sind zusätzlich in ein Netzwerk aus TH-positiven Fasern eingebettet. Ghrelin führt zu einer vermehrten neuronalen Aktivität im DMH und ARC. Aktivierte Neurone im DMH sind außerdem von einem Netzwerk AgRP-haltiger Nervenfasern umgeben.

Schlussfolgerung: Die zentralnervösen Effekte von peripherem CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme scheinen zumindest teilweise durch NUCB2/Nesfatin-1- bzw. CART-Neurone im PVN und NTS vermittelt zu werden. OXY-, CRF- sowie TH-Neurone scheinen ebenfalls in diese Kaskade involviert zu sein. Anders als bisher bekannt kann auch der DMH

durch die periphere Applikation von Ghrelin beeinflusst werden. Möglich erscheint eine Modulation von Neuronen in diesem Hirnkern durch AgRP-haltige Nervenfasern aus dem ARC, welche durch Ghrelin aktiviert werden.

Abstract:

Background: Cholecystokinin (CCK) is an anorexigenic hormone. The neuropeptides NUCB2/Nesfatin-1, corticotropin-releasing-factor (CRF), oxytocin (OXY) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) could play a role in mediating the effects off CCK on inhibition of food intake. Ghrelin mediates its orexigenic effects on food intake *via* nerv fibers in the nucleus arcuatus of the hypothalamus (ARC) in the brainstem. It is unclear, if ghrelin activates other specific neuronal areas in the hypothalamus, involved in food intake regulation. Therefore, it was the aim of these studies to find out, if CCK affects the neuronal activity in NUCB2/Nesfatin-1-, CRF-, OXY- and CART-neurons. In addition it was tested, if ghrelin affects the neuronal activity in other nuclei in the hypothalamus than the ARC.

Methods: In the studies 1 and 2, *ad libitum* fed rats received 6 and 10µg/kg CCK-8S intraperitoneal (i.p.). In the 1st study neuronal activity in NUCB2/Nesfatin-1 neurons in the paraventricular nucleus (PVN) and nucleus tractus solitarii (NTS) was tested *via* immunofluorescence. Also, it was examined if activated NUCB2/Nesfatin-1 neurons show a co-localization with OXY, CRF and Tyrosine hydroxylase (TH). In the 2nd study, we examined the activity of CART neurons in the PVN. Finally, in the 3rd study unfasted rats receive 3nmol Ghrelin i.p., afterwards the neuronal activity in the ARC and the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) was measured. In addition we examined if activated neurons show co-localization with Agouti-related peptide (AgRP) and neuropeptide Y (NPY).

Results: The i.p. injection of CCK-8S leads to a dose dependent increase of neuronal activity in NUCB2/Nesfatin-1 neurons in the PVN and NTS. The same effect was shown for CART neurons in the PVN. Some of the activated NUCB2/Nesfatin-1 neurons in the PVN also show expression of CRF or OXY. NUCB2/Nesfatin-1 neurons in the PVN are encircled in a dense network of TH positive fibers. The i.p. injection of ghrelin leads to an increase of neuronal activity in the DMH and ARC. Activated neurons in the DMH are embedded in a dense network of AgRP fibers.

Conclusion: The results show that the effects of CCK on food intake could, at least in parts, be mediated by NUCB2/Nesfatin-1 and CART neurons in the PVN and NTS. It seems like OXY, CRF and TH positive neurons are also involved in this cascade. In contrast to other studies we showed, that peripheral ghrelin affects the neuronal activity in the DMH. It seems feasible that

those neurons in the DMH are modulated by AgRP positive fibers, emerging from the ARC.

1 Einleitung

Durch eine zunehmende Verbreitung von Adipositas und Adipositas-assoziierten Erkrankungen gewinnt das physiologische Verständnis der Nahrungsaufnahme- sowie der Sättigungsregulation bei Menschen zunehmend an Bedeutung. Nach heutigem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse wird bei Säugern die Nahrungsaufnahme durch ein kompliziertes Zusammenspiel von humoralen und neuronalen Faktoren gesteuert. Zahlreiche regulierende Mediatoren werden hierbei im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) gebildet und bei Bedarf im Organismus freigesetzt. Die freigesetzten Mediatoren wirken entweder direkt im Gehirn oder aber wirken indirekt über afferente Fasern des Nervus vagus auf das Gehirn ein. Die bidirektionale Informationsübermittlung zwischen Gehirn und GI-Trakt erfolgt hierbei über die sogenannte "brain-gut"-Achse.

Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit stehen zwei gastrointestinale Peptide, die in die oben genannten Regulationsvorgänge involviert sind: Das anorexinogen wirksame Cholecystokinin (CCK), sowie das orexinogen wirksame Ghrelin.

Das Peptidhormon CCK wird u.a. in den I-Zellen des Dünndarms gebildet (Buffa *et al.*, 1976). Durch posttranslationale sowie extrazelluläre Modifikationen entstehen aus einem Vorläufermolekül verschiedene CCK-Fragmente. Dabei sind die Varianten CCK-8, CCK-33 und CCK-58 im Plasma am häufigsten nachweisbar (Eysselein *et al.*, 1987; Larsson *et al.*, 1979; Reeve *et al.*, 1994; Rehfeld *et al.*, 1985; Rehfeld *et al.*, 1985). In den hier durchgeführten Studien wurde mit sulfatiertem CCK-8 gearbeitet (CCK-8S). Die Freisetzung von CCK erfolgt nach einer Mahlzeit und wird vor allem durch die Aufnahme von Proteinen stimuliert (Becker *et al.*, 1984; Himeno *et al.*, 1983; Liddle *et al.*, 1985; Liddle *et al.*; 1986). Der Effekt von peripherem CCK auf die Nahrungsaufnahme wird über den CCK1-Rezeptoren vermittelt. Der CCK1-Rezeptor ist u.a. auf afferenten Anteilen des Nervus vagus lokalisiert. (Smith *et al.*, 1981; Ritter *et al.*, 1985; Day *et al.*, 1994;). Nach peripherer Injektion von CCK-8S lassen sich in verschiedenen Hirnkernen des Hypothalamus und des Hirnstammes, so im Nucleus paraventricularis (PVN), Nucleus dorsomedialis hypothalami sowie im Nucleus tractus solitarii, vermehrt c-Fos immunpositive Neurone nachweisen (Chen DY *et al.*, 1993; Rinaman *et al.*; 1995; Olson *et al.*, 1992; Mönnikes *et al.*, 1997; Kobelt *et al.*, 2005; Kobelt *et al.*, 2006, Chen J *et al.*, 2008). Der Transkriptionsfaktor c-Fos gilt als Marker für neuronale Aktivität im Gehirn

(Dragunow *et al.*, 1989; Hoffman *et al.*, 1993). Die o.g. Hirnkerne sind bei der Nahrungsaufnahmeregulation von funktioneller Bedeutung (Näslund *et al.*, 2007; Moran *et al.*, 2004; Konturek *et al.*, 2004). Die periphere Injektion von CCK-8S induziert u.a. eine neuronale Aktivierung von PVN-Neuronen, die immunpositiv für den Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) oder für Oxytocin (OXY) sind (Verbalis *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1992; Onaka *et al.*, 1995). Beiden Neuropeptiden werden inhibitorische Effekte auf die Nahrungsaufnahme zugeschrieben. (Krahn *et al.*, 1988; Oh-I *et al.*, 2006; Olson *et al.*, 1991).

Eine potentielle Rolle bei der Vermittlung anorexinogener Effekte im Hypothalamus wird dem Neuropeptid Nesfatin-1 zugeordnet (Oh *et al.*, 2006). Das aus 82 Aminosäuren bestehende Molekül entsteht als N-terminales, postrationales Spaltprodukt des Vorläufermoleküls Nucleobindin-2 (NUCB2) (Oh *et al.*, 2006). Studien belegen, dass sowohl die intrazerebroventrikuläre (i.z.v.) Injektion als auch die periphere Gabe von Nesfatin-1 zu einer verminderten Nahrungsaufnahme führen (Oh *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009). Nesfatin-1 konnte u.a. in Nervenzellen des PVN, des NTS sowie des Nucleus arcuatus (ARC) nachgewiesen werden (Brailoiu *et al.*, 2007; Kohno *et al.*, 2008; Goebel *et al.*, 2009; Foo *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte eine Kolokalisation zwischen Nesfatin-1 und CRF bzw. OXY in Nervenzellen des PVN beobachtet werden (Oh *et al.*, 2006; Foo *et al.*, 2008, Brailoiu *et al.*, 2007; Kohno *et al.*, 2008).

Ein weiteres Neuropeptid mit inhibitorischer Wirkung auf die Nahrungsaufnahme ist das Cocaine and amphetamine-regulated transcript (CART)-Peptid, welches u.a. im PVN sowie im ARC synthetisiert wird (Couceyro *et al.*, 1997). So wurde beobachtet, dass CART nach i.z.v. Injektion einen inhibitorischen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme ausübt (Asakawa *et al.*, 2001; Kristensen *et al.*, 1998; Stanley *et al.*, 2001; Vrang *et al.*, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die IZV-Injektion von CART, im PVN und ARC zu einer generellen Steigerung der neuronalen Aktivität führt und es im Speziellen zu einer Aktivierung von CRF- und OXY-Neuronen kommt (Vrang *et al.*, 2000).

Wie oben beschrieben, finden sich verschiedene Neuropeptide, die einen anorexinogen Effekt im Organismus ausüben. Im Gegensatz dazu wurde bis dato nur ein Peptidhormon identifiziert, welches orexinogen wirksam ist. Dabei handelt es sich um das in den X/A-Zellen des Magens produzierte, aus 28 Aminosäuren bestehende Peptidhormon Ghrelin (Kojima *et al.*, 1999; Tschöp *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000, 2001; Nakazato *et al.*, 2001; Rüter *et al.*, 2003; Dornonville *et al.*, 2001). Das im Blut zirkulierende Ghrelin wird zu 80% in der

Magenschleimhaut synthetisiert (Kojima *et al.*, 1999). Posttranslational erfolgt die kovalente Bindung einer Octanoyl-Gruppe an die Aminosäure Serin in Position 3 des Moleküls durch die Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) (Gutierrez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Für die Bindung von Ghrelin an seinen Rezeptor, den growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) ist die Acylgruppe unabdingbar (Hosoda *et al.*, 2000; van der Lely *et al.*, 2004). Verschiedene Untersuchungen berichten, dass peripher injiziertes Ghrelin zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität im Bereich der hypothalamischen Kernen ARC und PVN führt (Rüter *et al.*, 2003; Hashimoto *et al.*, 2007). Insbesondere Neuronen im ARC, aber auch im PVN, tragen auf ihrer Oberfläche den Ghrelin-Rezeptor (GHS-R1a) (Willesen *et al.*, 1999). Zusätzlich bewirkte peripher injiziertes Ghrelin eine vermehrte neuronale Aktivität in ARC-Nervenzellen, die den Neuromodulator Neuropeptide Y (NPY) und das Agouti-related peptide (AgRP) bilden (Hewson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Beiden Neuropeptiden wird eine orexinogene Wirkung zugeschrieben (Clark *et al.*, 1984; Hagan *et al.*, 2000). Man nimmt daher an, dass NPY-/AgRP-Neuronen für die Vermittlung der Ghrelin-Wirkung bedeutsam sind (Chen *et al.*, 2004). Broberger *et al.* konnten zudem mittels immunhistochemischen Markierungen zeigen, dass NPY Neurone, ausgehend vom ARC, Neurone im PVN innervieren (Broberger *et al.*, 1999).

2 Zielsetzung

Im Mittelpunkt dieser Forschungsarbeit stehen die beiden gastrointestinalen Peptidhormone Cholecystokinin und Ghrelin. Im Speziellen wurde untersucht, welchen Effekt die periphere Applikation dieser Peptidhormone auf die neuronale Aktivität in verschiedenen Hirnkernen des Hypothalamus und Hirnstammes hat.

In der ersten Publikation wurde untersucht, ob die intraperitoneale Injektion von CCK bei Ratten einen dosisabhängigen Einfluss auf die neuronale Aktivität von NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Nervenzellen im PVN sowie im NTS haben. In einem zweiten Arbeitsschritt wurde überprüft, ob aktivierte NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktive Neurone im PVN kolokalisiert sind mit CRF oder OXY. Zudem ist bekannt, dass CCK im NTS vermehrt neuronale Aktivität induziert, und dass von diesen aktivierten Neuronen im NTS catecholaminerge Fasern in den PVN projizieren (Rinamann *et al.*, 1995). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob Nesfatin-1-immunreaktive Neurone im PVN und NTS zusätzlich auch Immunreaktivität gegen Tyrosinhydroxylase zeigen.

In der zweiten hier vorgelegten Studie wurde untersucht, ob die periphere Injektion von CCK-8S einen Einfluss auf die neuronale Aktivität von CART-haltigen PVN-Nervenzellen aufweist.

In den Experimenten, welche der dritten Publikation zugrunde liegen, wurde geprüft, ob peripher injiziertes Ghrelin bei Ratten das neuronale Aktivitätsniveau im DMH moduliert. Zudem sollte evaluiert werden, ob durch Ghrelin aktivierte DMH-Neurone umgeben sind von AgRP-haltigen Nervenfasern. AgRP wird exklusiv und gemeinsam mit NPY in ARC-Neuronen gebildet, welche durch Ghrelin aktiviert werden können (Wang *et al.*, 2002; Hewson *et al.*, 2000)

3. Methoden

Die nachfolgenden Arbeitsschritte wurden so oder in ähnlicher Weise in allen Experimenten durchgeführt. Abweichende Arbeitsschritte werden ab 3.3 gesondert aufgeführt. Die Angaben zu Herstellern von Materialien und Chemikalien erfolgen bei Erstnennung vollständig mit Namen und Herstellungsort, bei Wiederholung nur noch namentlich. Ist im Text kein Hersteller genannt, wurden die Chemikalien von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.1 Versuchstiere

Für alle Versuche in den hier veröffentlichten Publikationen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland). Das Körpergewicht der Ratten lag während der Versuche zwischen 250 – 300g/Tier. Die Tiere wurden für mindestens 21 Tage vor Versuchsbeginn unter kontrollierten Umweltbedingungen (12:12h-Licht/Dunkel-Zyklus; Luftfeuchtigkeit 60%; Raumtemperatur $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) in Standardkäfigen (Makrolon-Käfige Typ IV) gehalten. Die Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Standardnagerfutter (Altromin®, Lage, Deutschland). Durch vierzehntägiges tägliches Training mit Einnehmen der für die i.p.-Injektion notwendigen Rückenlage, wurden die Tiere auf die Versuchsanforderungen vorbereitet. Ziel war es hierbei, den Einfluss von Stress auf die Versuchsergebnisse zu minimieren. Sämtliche hier beschriebenen Versuche wurden von den zuständigen Behörden beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (G0053/06; G0089/03).

3.2 Die Fixierung und Präparation des Hirngewebes

Die *ad libitum* gefütterten Ratten erhielten zu Versuchsbeginn Peptide in unterschiedlichen Dosierungen oder eine Vehikellösung (0,15M NaCl) entsprechend den unten aufgeführten Versuchen i.p. injiziert. Nach 90 Minuten wurden die Tiere mit 100 mg Ketamin/kg Körpergewicht (KG) (Ketanest®, Curamed, Karlsruhe, Deutschland) und 10 mg Xylazin/kg KG (Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) i.p. narkotisiert. Im Anschluss erfolgt eine i.p. Injektion mit 2500 IE Heparin (Liquemin®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) um eine intrakranielle Thrombenbildung zu verhindern. Nach Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte die transkardiale Perfusionsfixierung der Versuchstiere nach Kobelt *et al.* (2004). Nach Beendigung der Perfusion wurden den Tieren die Gehirne entnommen. Die Gehirne wurden mit einer Kunststoffmatrix in vier koronare Blöcke aufgeteilt (Frontalhirn, Dienzephalon inklusive Hypothalamus, Mesenzephalon und Rhombenzephalon). Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Geweblöcke durch je 12 Stunden Lagerung in Saccharose-Phosphatpuffer-Lösungen aufsteigender Konzentration (5%, 15%, 27,3%) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach Beendigung dieser Prozedur wurden die Geweblöcke mittels eines Einbettmediums auf Korkplatten fixiert und dann unter Anwendung von Flüssigstickstoff (AGA GmbH, Schwechat, Österreich) mit einer Temperatur von -70°C kryokonserviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gefrorenen Hirnblöcke bei -80°C gelagert.

Zu Beginn der immunhistologischen Aufarbeitung wurden mit Hilfe eines Kryotom (Typ HM 500 OM, Mikrom GmbH, Walldorf, Deutschland) 25µm dicke Gehirnschnitte angefertigt. Zur neuroanatomischen Orientierung wurde der stereotaktische Atlas von Paxinos und Watson genutzt (Paxinos & Watson, 1997). Die Aufbewahrung der Gewebeschnitte erfolgte einzeln in Multiwell-Platten (Sarstedt, Newton, USA). Um eine Austrocknung der Schnitte zu verhindern wurden die Multiwell-Platten mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) befüllt.

3.3 Publikation 1: CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem

3.3.1 Peptid

1mg sulfatiertes CCK-8 (CCK-8S) wurde in 1ml 0,1% Ammoniumhydroxid (NH₄OH) gelöst. Es erfolgte die Aliquotierung in Einzelfractionen von je 50µl, welche dann bei -20°C bis zum Versuchsbeginn gelagert wurden. Zu Beginn der Versuche wurde die Peptidlösung mittels 0,15M steriler NaCl-Lösung auf die für die Versuchsreihen benötigten Konzentrationen (6 und

10 µg/kg CCK-8S (5.2 und 8.7 nmol/kg)) verdünnt und bis unmittelbar vor Injektion auf Eis gelagert.

3.3.2 Versuchsdesign

Die Versuchstiere wurden randomisiert und in drei Gruppen (n=4/Gruppe) aufgeteilt. Die Gruppe 1 bekam 6 µg/kg CCK-8S (Bachem AG, Heidelberg, Deutschland) i.p. injiziert und Gruppe 2 erhielt 10 µg/kg CCK-8S i.p.. Eine weitere Gruppe erhielt Vehikellösung (0,15M NaCl) i.p. injiziert. Nach der Injektion wurde den Tieren die Nahrung entzogen, bei *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser. 90 min nach Peptid-Injektion erfolgte die unter 3.2. beschriebene Fixierung und Präparation der Gehirne.

3.3.3 Die c-Fos-Immunhistochemie

Im ersten Schritt wurden die Gewebeschnitte im „free-floating“-Verfahren (Schrell *et al.*, 1982; Kobelt *et al.*, 2004) für 15 Minuten mit Natriumborhydrid (NaBH₄) (1% m/v in PBS) behandelt, um eine Aldehyd-induzierte Autofluoreszenz im Gewebe abzuschwächen. Nach dreimaligem Waschen der Gewebeschnitte mit PBS zur Entfernung des NaBH₄ erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit 5% m/v Rinderserumalbumin (BSA; Sigma, St. Louis, USA) sowie 0,3% v/v Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland). Mit diesem Arbeitsschritt sollten mögliche unspezifische Antikörperbindungen im Gewebe blockiert werden. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Applikation des Primärantikörpers gegen c-Fos (rabbit anti-rat c-Fos (OncogeneResearch Products, Boston, USA) 1:4000 v/v in 5% m/v BSA (Sigma), 0,3% v/v Triton X-100 (Serva), 0,1% m/v NaN₃ in PBS). Nach 42 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden nicht gebundene Primärantikörper im Gewebe durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein fluoreszierender Sekundärantikörper verwendet (FITC-markierter goat anti-rabbit IgG (Sigma) gelöst 1:600 in 5% m/v BSA (Sigma), in PBS). Nach 12 Stunden Inkubation und drei weiteren Waschvorgängen in PBS erfolgte die Gegenfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (2,5 µg/ml in PBS für 15 Minuten). Die Gegenfärbung wurde genutzt um das Zellchromatin darzustellen und diente somit zur Orientierung und zum Auffindung der relevanten Hirnkerne im Gewebe. Zum Abschluss wurden die Gewebsschnitte in einer Antifading-Lösung eingebettet (Sigma; 100 mg/ml 1,4-Diazabizylo[2.2.2]oktan (DABCO) in 90% Glycerin, 10% PBS, pH 7,4), um ein Ausbleichen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen zu vermindern. Zur mikroskopischen Auswertung wurde ein konfokales Laserscanmikroskop benutzt (cLSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

3.3.4 Immundoppelmarkierung gegen *c-Fos* und *NUCB2/Nesfatin-1*

Die Gehirnschnitte wurden analog zu 3.3.3 für 15 Minuten mit 1% m/v NaBH₄ behandelt. Die Behandlung wurde durch ein dreimaligen Waschvorgang mit PBS sowie eine Inkubation mit Wasserstoffperoxid (3% v/v H₂O₂ in PBS) zur Blockierung der Aktivität von endogenen Peroxidasen im Gewebe gestoppt. Nachfolgend erfolgte ein Waschvorgang mit TNT-Waschpuffer (0,1 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Hydrochlorid, 0,15 M NaCl und 0,05% v/v Tween 20, pH 7,5) mit folgender Inkubation in TNT-Blockpuffer (0,1 M Tris Hydrochlorid, 0,15 M NaCl und 1% w/v Normal Serum vom Esel (NDS), pH 7,5) für 1 Stunde. Nach Beendigung der Inkubation wurde der *c-Fos* Primärantikörper für 24 Stunden aufgetragen (1:3000 in TNT-Blockpuffer). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Gewebe dreimal mit TNT-Waschpuffer gewaschen und mit dem ersten Sekundärantikörper für 12 Stunden inkubiert (horseradish peroxidase labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) 1:200 in TNT-Blockpuffer). Durch erneutes dreimaliges Waschen mit TNT-Waschpuffer wurde der nichtgebundene Antikörper entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entwicklung mit TSATM fluorescein oder tetramethyl rhodamin tyramide (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) für 10 Minuten. Nach dreimaligen Spülen der Hirnschnitte mit TNT-Waschpuffer wurde der zweite Primärantikörper für 24 Stunden hinzugeben (rabbit anti-nesfatin-1 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) 1:500 in PBS und 1% m/v NDS). Der nichtgebundene zweite Primärantikörper wurde durch dreimaliges Spülen in PBS entfernt. Alsdann erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (tetramethyl rhodamine isothiocyanat (TRITC) labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:200 in PBS). Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden. Zum Abschluss wurden die Gewebe auf Objektträgern aufgebracht und mit Antifading-Lösung eingedeckt (siehe 3.3.3).

3.3.5 Immundreifachmarkierung von *c-Fos*, *NUCB2/Nesfatin-1*, *CRF* oder *OXY*

Die ersten Arbeitsschritte der Dreifachmarkierungen entsprechen den in 3.3.4 beschriebenen Arbeitsvorgängen bis zur Applikation und Inkubation des zweiten Sekundärantikörpers. Abweichend wurde für die Dreifachmarkierung gegen *c-Fos*, *NUCB2/Nesfatin-1* und *OXY* ein anderer Sekundärantikörper (goat anti rabbit IgG antibody Alex Fluor® 633 (Molecular Probes, Leiden Niederlande) 1:200 in PBS) zur Detektion des Anti-Nesfatin-1-Primärantikörpers benutzt. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschvorgang in PBS erfolgte die Inkubation in 1% m/v

Ziegenerum (NGS) in PBS für 1 Stunde. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit der jeweiligen, dritten Primärantikörperlösung behandelt (CRF-Protokoll: guinea pig anti-CRF (Bachem AG, Heidelberg, Deutschland) 1:200 in 1% m/v NGS; Oxytocin-Protokoll: monoclonal mouse anti-oxytocin (Chemicon International) 1:7000 in 1% m/v NGS). In beiden Fällen erfolgte die Inkubation für 42 Stunden. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte erneut dreimal in PBS gespült. In beiden Protokollen wurden die Schnitte für 12 Stunden in der dritten Sekundärantikörperlösung inkubiert (CRF-Protokoll: anti-guinea pig IgG antibody Alexa Fluor® 633 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 1:200 in 1% m/NGS; Oxytocin-Protokoll: FITC-labeled goat anti-mouse antibody (Sigma) 1:200 in 1% m/v NGS). Anschließend erfolgte die erneute dreimalige Spülung in PBS. Zur Fluoreszenzmarkierung des Zellchromatins wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gebadet. Nach einem letzten dreifachen Waschvorgang mit PBS erfolgte die Einbettung der Hirnschnitte mit Antifading-Lösung. Die Auswertung wurde mit dem konfokalen Laserscannmikroskop durchgeführt.

3.3.6 Immundoppelmarkierung gegen NUCB2/Nesfatin-1 und TH

Analog zu 3.3.3 und 3.3.5 erfolgte zunächst eine 15 minütige Inkubation der Gewebeschnitte in einer 1%igen m/v NaBH₄-Lösung. Dem schloss sich die Inkubation in einer Lösung aus 3% m/v NDS und 0,3% v/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen an. Im Anschluss wurde eine Lösung mit beiden Primärantikörpern für 42 Stunden hinzugegeben (rabbit anti-nesfatin-1 1:400 und mouse anti-tyrosine hydroxylase (Sigma) 1:7000 in einer Lösung aus 3% m/v NDS und 0,1% v/v NaN₃ in PBS). Einem erneuten, dreimaligen Waschvorgang mit PBS schloss sich eine zweistündige Inkubation mit einer Lösung aus 3% m/v NDS und 0,1% NaN₃ in PBS an. Nach Entfernung der Inkubationslösung wurden die Präparate für 12 Stunden mit einer Lösung mit beiden Sekundärantikörpern gegen die Primärantikörper behandelt (FITC-labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:200 und TRITC-labeled goat anti-mouse (Sigma) 1:400 in 3% m/v NDS plus 3% m/v NGS und 0,1% v/v NaN₃ in PBS). Die Hirnschnitte wurden erneut in PBS gewaschen und alsdann in einer DAPI-Lösung für 15 Minuten gebadet um das Zellchromatin darzustellen. Die Einbettung der Gewebeschnitte erfolgt in einer Antifading-Lösung. Die Auswertung der Immunmarkierungen im Gewebe erfolgte wiederum mittels eines konfokalen Laserscannmikroskops.

3.3.7 Datenerhebung und statistische Auswertung

Die Quantifizierung der neuronalen Aktivität erfolgte anhand der Auszählung c-Fos-immunpositiver Nervenzellen. Hierbei wurden Neurone mit einer grünen Fluoreszenz im Zellkern als c-Fos-positiv klassifiziert. Jeder dritte konsekutive koronare Hirnschnitt wurde im Bereich des PVN, des ARC und des NTS bilateral auf c-Fos-Signale ausgezählt. Alle weiteren Schnitte wurden für die o.g. Doppel- und Dreifachmarkierungen verwendet. Die Lokalisierung der Hirnkerne im Gewebe erfolgte nach dem Atlas von Paxinos and Watson (1997). Die mikroskopische Auswertung der Hirnschnitte durch den Untersucher wurde verblindet durchgeführt. Zur Auswertung der Doppelmarkierung von c-Fos und Nesfatin 1 wurde in den Hirnkernen PVN und NTS die Gesamtzahl aller c-Fos-positiven Zellkerne bestimmt. Zusätzlich wurden die Neurone gezählt, die sowohl eine Immunreaktivität für c-Fos im Zellkern als auch für NUCB2/Nesfatin-1 im Zytoplasma zeigten. Aus diesen Daten konnte der Prozentsatz der NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Nervenzellen errechnet werden, die gleichzeitig eine Immunreaktion gegen c-Fos zeigten. Zusätzlich wurde der Prozentsatz von aktivierten (c-Fos-positiven) NUCB2/Nesfatin-immunreaktiven Neuronen bestimmt, die gleichzeitig positiv für OXY oder CRF waren. Alle Ergebnisse werden angegeben als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM). Die Daten wurden durch eine Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurde mit dem Turkey post hoc Test evaluiert. $P < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3.4. *Publikation 2: Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats*

3.4.1 *Versuchsdesign*

Die Vorbereitung, Haltung und das Training der Versuchstiere entsprach dem in 3.1. geschildertem Vorgehen. Die Vorbereitung der Peptide erfolgte analog zu den in 3.3.2 dargestellten Abläufen. Die Versuchstiere wurden randomisiert und in 3 Gruppen (n=4) aufgeteilt. Diese erhielten 6 μ g/kg KG (Gruppe 1) bzw. 10 μ g/kg KG CCK8-S (Gruppe 2) i.p. verabreicht. Die dritte Gruppe erhielt Vehikellösung (0,15M NaCl). 90 Minuten nach i.p. Injektion von CCK-8S bzw. von Vehikellösung erfolgte die unter 3.2. beschriebene Gewinnung des fixierten Hirngewebes.

3.4.2 *Die c-Fos-Immunhistochemie*

Die Arbeitsschritte der immunhistochemischen c-Fos-Markierung entsprechen den in 3.3.3 geschilderten Abläufen.

3.4.3 Immundoppelmarkierung gegen c-Fos und CART

Die Hirnschnitte wurden zunächst mit NaBH₄-Lösung für 15 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde das Gewebe für eine Stunde in PBS-Blockpuffer (0,1M PBS, 1% m/v BSA, 0,3% v/v Triton X-100 und 0,05% v/v Phenylhydrazin, pH 7,5) gebadet. Nachfolgend wurde der erste Primärantikörper für 24 Stunden appliziert (rabbit anti-c-Fos, 1:3000 in PBS-Blockpuffer). Die Hirnschnitte wurden dann erneut einem dreimaligen Waschvorgang in PBS unterzogen. Im Anschluss wurde die Sekundärantikörperlösung (goat biotin-SP-conjugated anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) 1:1000 in 1% m/v BSA in PBS) zugegeben und die Gewebe für 12 Stunden inkubiert. Nach dreimaliger Spülung in PBS wurden die Schnitte in Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (ABC-Komplex (Vector Laboratories, Peterborough, UK) 1: 1000 in PBS) für 5 Stunden inkubiert. Im nächsten Arbeitsschritt wurden alle Hirnschnitte erneut in PBS gespült und dann mit TSA™ (Tyramide Signal Amplification) fluorescein tyramide (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) für 15 Minuten behandelt. Nachfolgend wurden die Hirngewebe, nach erneuter PBS-Spülung, zunächst für 1 Stunde in PBS mit 1% m/v BSA und im Anschluss für 24 Stunden die zweite Primärantikörperlösung (anti-rabbit-CART (Phoenix-Pharmaceuticals, Inc.) 1:1500 in PBS und 1% m/v BSA) aufgetragen. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Gewebeschnitte, nach PBS-Waschung, in der zweiten Sekundärantikörperlösung (tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) labeled donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in PBS) für 12 Stunden inkubiert. Zur Gegenfärbung des Zellchromatins, wurden die Schnitte für 15 Minuten in DAPI gebadet. Im letzten Arbeitsschritt wurden die Gewebeschnitte nochmals in PBS gewaschen, dann einzeln auf Objektträger aufgebracht und abschließend in Antifading-Lösung eingebettet. Die Analyse der immunhistochemischen Doppelfärbung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

3.4.4 Datenerhebung und statistische Auswertung

Die Quantifizierung der neuronalen Aktivität (c-Fos-positive Neurone) erfolgte wie in 3.3.7 beschrieben. Die Quantifizierung der c-Fos- und CART-positiven Nervenzellen wurde durch Auszählen von c-Fos-, CART- sowie c-Fos- und CART-immunreaktiven Neurone bilateral in den Hirnkernen PVN, ARC und NTS erreicht. Anschließend wurde der Prozentsatz der sowohl CART- als auch c-Fos-positiven Neurone berechnet. Alle Ergebnisse sind dargestellt als

Mittelwert \pm SEM. Die Daten wurden mittels Kruskal–Wallis ANOVA analysiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit der Student–Newman–Keuls Methode berechnet. Es wurde $P < 0,05$ als Signifikant festgelegt.

3.5 Publikation 3: *Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats*

3.5.1 Versuchstiere

Auch in der Publikation 3 wurden männliche Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 250-300g verwendet. Die Vorbereitung, die Haltung und das Training der Tiere mit Einnehmen der für die i.p. Injektion notwendigen Rückenlage erfolgten wie in 3.1. dargestellt.

3.5.2 Peptid

In dieser Versuchsreihe wurde das orexinogene Peptid Ghrelin verwendet (Tocris, Ellisville, USA). Zunächst wurde 1 mg/ml Ratten-Ghrelin in sterilem, destilliertem Wasser gelöst und es wurden Aliquots mit einem Volumen von je 50 μ l gebildet. Anschließend wurden die Peptid-Lösungen bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn erfolgte eine weitere Verdünnung mit 0,15M NaCl auf eine finale Konzentration von 3 nmol Ghrelin in einem Volumen von 0,5ml.

3.5.3 Versuchsdesign

Die Ratten wurden wie in den vorherigen Versuchen randomisiert und zu Versuchsbeginn in 2 Gruppen á 5 Tiere aufgeteilt (n=5). Der ersten Gruppe wurde Ratten-Ghrelin in einer Dosierung von 3 nmol/0,5ml i.p. injiziert. Die zweite Gruppe erhielt isotone Vehikellösung i.p. injiziert (0,15M NaCl/0,5 ml). Unmittelbar nach den Injektionen wurde den Tieren die Nahrung entzogen (Trinkwasser *ad libitum*). Nach 90 Minuten wurde dann die transkardiale Perfusionsfixierung unter Vollnarkose durchgeführt. Die Präparation der Gehirne erfolgte wie in 3.2. dargestellt.

3.5.4. Die c-Fos-Immunhistochemie

Auch in dieser Versuchsreihe wurde eine c-Fos-Immunhistochemie durchgeführt. Dabei entsprachen die durchgeführten Arbeitsschritte denen, die bereits in Abschnitt 3.3.3 ausführlich dargestellt wurden. Auf eine erneute Darstellung wird daher an dieser Stelle verzichtet.

3.5.5 Immundoppelmarkierung von c-Fos und AgRP

Die in Multiwell-Platten frei flottierenden Hirnschnitte wurden zunächst für 15 Minuten mit NaBH₄ (1% m/v) vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation in einer Lösung aus NDS (5% m/v), Triton X-100 (0,3% v/v) und PBS zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen. Nach Ablauf von 60 Minuten wurde eine Lösung bestehend aus zwei Primärantikörpern (rabbit anti-c-Fos 1:2000 und goat anti-AgRP (Neuromics, Minnesota, USA) 1:500 sowie 5% m/v NDS und 0,1% v/v NaN₃) für 42 Stunden aufgetragen. Nach Ablauf der Inkubationszeit sowie dreimaligem Spülen in PBS erfolgte eine zweistündige Inkubation der Gewebe in einer Lösung aus NDS (5% m/v) und NaN₃ (0,1% v/v). Im Anschluss wurde der erste Sekundärantikörper (TRITC-markierter donkey-anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:200 in 5% w/v NDS in PBS) zugeführt und die Schnitte für 12 Stunden in dieser Lösung gebadet. Nach dreimaligem Spülen in PBS wurde wiederum für 2 Stunden eine Inkubationslösung (3% m/v NGS und 0,1% v/v NaN₃ in PBS) appliziert. Der zweistündigen Inkubation folgte die Zugabe des zweiten Sekundärantikörpers (goat biotin-SP-conjugated anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:1000 in 3% m/v NGS und 1% v/v NaN₃ in PBS). Nach 12 Stunden Inkubation in der Sekundärantikörperlösung wurden die Schnitte in PBS gespült, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Im nächsten Arbeitsschritt wurde Avidin-D-konjugiertes Fluorescein (20µg/ml; Vector Laboratories, Burlingame, USA) in Sørensenpuffer (pH8,0) hinzugegeben und die Gewebe für 5 Stunden in dieser Lösung belassen. In einem vorletzten Arbeitsschritt wurde das Zellchromatin mittels DAPI markiert. Zum Abschluss erfolgte das Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträgern sowie die Eindecken des Gewebes mit Antifading-Lösung und Deckglas. Die Präparate konnten nun im cLSM analysiert werden.

3.5.6 Immundoppelmarkierung von AgRP und NPY

Die Vorbereitung der Schnitte bis zum Auftragen des Primärantikörpers erfolgte wie in 3.5.5 dargestellt. Die Schnitte wurden dann in einer Lösung mit den Primärantikörpern (anti-NPY guinea pig (Abcam, Cambridge, UK) 1:500 und goat anti-AgRP (Neuromics, Minnesota, USA) 1:500 in 5% m/v NDS und 0,1% v/v NaN₃ in PBS) für 42 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS und Inkubation in einer Lösung aus 5% m/v NDS, 0,1% v/v NaN₃ und PBS für 2 Stunden erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper (FITC-labeled donkey-anti-goat IgG 1:200 und TRITC-labeled donkey-anti-guinea pig (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) 1:200 in 5% m/v NDS in PBS). Nach 42 Stunden erfolgte das Entfernen der Sekundärantikörper durch dreimaliges Spülen des Gewebes mit PBS. Anschließend wurden die Hirnschnitte für 15 min in DAPI gebadet. Nach erneutem Waschen in PBS erfolgte das

Aufziehen des Gewebes auf Objektträgern und die Einbettung in einer Antifading-Lösung. Die mikroskopische Auswertung erfolgte wie in 3.3.3 dargestellt.

3.5.7 Datenerhebung und statistische Auswertung

Die Quantifizierung der neuronalen Aktivität erfolgte anhand der Auszählung c-Fos positiver Nervenzellen. Zellen mit einem grünen Fluoreszenzsignal im Zellkern wurden als c-Fos-positiv gewertet. Jeder dritte Gewebeschnitt wurde zur Quantifizierung der c-Fos-positiven Neurone ausgewählt. Die übrigen Präparate wurden für die Doppelmarkierungen verwendet. Untersucht wurden verschiedene Hirnkerne PVN, ARC, DMH, NTS und der Nucleus ventromedialis hypothalami (VMH) sowie die Area postrema (AP). In diesen Hirnkernen wurde jeweils die Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen bestimmt. Dabei wurde bei paarig angelegten Hirnkernen jeweils beiden Seiten ausgezählt. Im Areal des DMH wurde im Rahmen der Doppelmarkierungen zusätzlich die Anzahl c-Fos-positiver Neurone bestimmt die entweder eine Immunreaktion auf AgRP oder NPY zeigten. Zudem wurde die Anzahl von Neuronen im DMH gezählt, die sowohl AgRP- und NPY-positiv waren, unabhängig von c-Fos. Zur anatomischen Orientierung im Bereich des Hypothalamus und des Hirnstammes wurde der Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos G et al., 1997) benutzt. Die mikroskopische Begutachtung und die Auszählung der Schnitte erfolgten verblindet. Nach Abschluss der Auszählung wurde die durchschnittliche Anzahl c-Fos positiver Zellen für die jeweiligen Hirnkerne errechnet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben und wurden auf Normalverteilung geprüft. Unterschiede wurden mit dem Student t-Test ermittelt, wobei für P ein Wert von $<0,05$ als signifikant angesehen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Publikation 1: CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem

4.1.1 Die Effekte von CCK-8s auf die Anzahl c-Fos positiver Neurone im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus, im Nucleus arcuatus und Nucleus tractus solitarii des Hirnstammes

Die i.p. Injektion von CCK-8S führte in beiden Dosierungen (6 und 10 μ g/kg KG) zu einem signifikanten Anstieg von c-Fos-positiven Nervenzellen im PVN. Dabei war ein

dosisabhängiger Effekt (Mittelwert \pm SEM: 207 ± 16 ($6\mu\text{g/kg KG}$) vs. 293 ± 22 ($10\mu\text{g/kg KG}$) Neurone/Schnitt, $P < 0,05$) gegenüber der Vehikel-Gruppe (27 ± 1 Neurone/Schnitt, $P < 0,05$) zu beobachten. Im Gegensatz dazu hatte die i.p. Injektion von CCK-8S keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität im ARC (25 ± 4 ($6\mu\text{g/kg KG}$) und 29 ± 1 ($10\mu\text{g/kg KG}$) Neurone/Schnitte) im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (25 ± 4 Neurone/Schnitt, $P > 0,05$). Im Bereich des NTS konnte wie im PVN eine dosisabhängige Steigerung der neuronalen Aktivität nach Behandlung mit CCK-8S (6 und $10\mu\text{g/kg KG}$) beobachtet werden.

4.1.2 Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von *c-Fos* und *NUCB2/Nesfatin-1*

Im PVN wurden 218 ± 29 NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktive Neurone/Schnitt gezählt. Diese Neurone wurden sowohl im magno- als auch im parvozellulären Subnucleus des PVN beobachtet. Die Doppelmarkierung von NUCB2/Nesfatin-1 und *c-Fos* zeigte, dass nach peripherer Injektion von CCK-8S (6 und $10\mu\text{g/kg KG}$) die Anzahl der *c-Fos*-positiven Zellen, die auch mit NUCB2/Nesfatin-1 kolokalisiert sind, anstieg. Dabei zeigte sich, im Vergleich zur Vehikelgruppe, ein ~ 4 -facher ($6\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) bzw. ein ~ 7 -facher ($10\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) Anstieg. Unter hoher mikroskopischer Vergrößerung von Neuronen mit Immunreaktivität für *c-Fos* und NUCB2/Nesfatin-1 war erkennbar, dass sich das angefärbte NUCB2/Nesfatin-1 ausschließlich im Zytoplasma darstellte, während *c-Fos* nur in den Zellkernen zu beobachten war.

Im NTS und in der AP wurde ebenfalls die Anzahl von NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Neuronen ausgezählt. Im NTS wurden 132 ± 25 NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktive Neurone/Schnitt gefunden. Im NTS konnte eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der neuronalen Aktivität in NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen nach IP-Gabe von CCK-8S (6 und $10\mu\text{g/kg KG}$) im Vergleich zur Vehikel-Gruppe beobachtet werden (9 ± 3 ($6\mu\text{g/kg KG}$) und 26 ± 2 ($10\mu\text{g/kg KG}$) Neurone/Schnitt vs. $0,06 \pm 0,06$ Neurone/Schnitt, $P < 0,05$). In der AP konnten keine NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Zellen beobachtet werden.

4.1.3 Die Ergebnisse der Immundreifachmarkierung von *c-Fos*, *NUCB2/Nesfatin-1* und *CRF* bzw. *OXY*

Die Dreifachmarkierung im PVN gegen *c-Fos*, NUCB2/Nesfatin-1 und CRF zeigte, dass $51 \pm 7,5\%$ ($6\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) bzw. $60 \pm 7,3\%$ ($10\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) der *c-Fos*- und NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Nervenzellen auch positiv für das Neuropeptid CRF waren. Bei der Dreifachmarkierung gegen *c-Fos*, NUCB2/Nesfatin-1 und OXY konnte beobachtet werden, dass $37,5 \pm 4,7\%$ ($6\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) bzw. $49,8 \pm 4,8\%$ ($10\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) der *c-*

Fos- und NUCB2/Nesfatin-1-immunreaktiven Neurone eine Kolokalisation mit dem Neuropeptid OXY aufweisen.

4.1.4 *Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von NUCB2/Nesfatin-1 und TH*

In PVN-Zellen konnte keine Kolokalisation von NUCB2/Nesfatin-1 und TH beobachtet werden. Allerdings sind die NUCB2/Nesfatin-1-Nervenzellen im PVN in einem dichten Netzwerk aus TH-haltigen Nervenfasern eingebettet.

4.2 *Publikation 2: Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats*

4.2.1 *Die Effekte von CCK-8S auf die Anzahl c-Fos-positiver Neurone im paraventriculären Nucleus, Nucleus arcuatus und Nucleus tractus solitarii*

Im PVN führte sowohl die i.p. Gabe von 6µg/kg KG CCK-8S als auch von 10µg/kg KG CCK-8S zu einem signifikanten Anstieg von Zellen die immunpositiv für c-Fos waren (102 ± 6 (6µg/kg KG) und 150 ± 5 (10µg/kg KG) Neurone/Schnitt vs. 18 ± 7 Neurone/Schnitt $P < 0,05$). Auch im NTS konnte dieser Effekt auf die neuronale Aktivität nach CCK-8S-Injektion beobachtet werden (65 ± 13 (6µg/kg KG) und 182 ± 16 (10µg/kg KG) Neurone/Schnitt vs. 7 ± 1 Neurone/Schnitt, $P < 0,05$). Im ARC zeigt sich hingegen kein signifikanter Effekt auf die neuronale Aktivität im Vergleich zur Vehikelgruppe.

4.2.2 *Die Ergebnisse der Immundoppelmarkierung von c-Fos und CART nach intraperitonealer Injektion von CCK-8S*

Nach intraperitonealer Injektion von CCK-8S konnten dosisunabhängig 116 ± 11 CART immunreaktive Neurone/Schnitt ($P > 0,05$) ausgezählt werden. Die CART-Neurone waren hauptsächlich im parvozellulären Anteil des PVN sowie in der periventriculären Zone lokalisiert. Die Doppelmarkierung von c-Fos und CART zeigte, dass mit steigender Dosierung von CCK-8S die Anzahl von CART Neuronen, die auch c-Fos-positiv waren anstieg (19 ± 3 (6µg/kg KG CCK-8S) und 29 ± 7 (10µg/kg KG CCK-8S) Neurone/Schnitt vs. 1 ± 0 Neurone/Schnitt, $P < 0,05$). Zudem konnte bei hoher mikroskopischer Vergrößerung festgestellt werden, dass die CART-Markierung nur im Zytoplasma und in Axonen von Nervenzellen zu finden war. C-Fos konnte hingegen nur im Zellkern detektiert werden.

4.3 *Publikation 3: Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats*

4.3.1 Die Effekte von peripher injizierten Ghrelin auf die Anzahl c-Fos positiver Neurone in verschiedenen hypothalamischen Kernen

Die i.p. Injektion von 3 nmol Ghrelin /Ratte induzierte bei Ratten eine Verdopplung der Anzahl c-Fos-positiver Neurone im Bereich des ARC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (49 ± 2 vs. 23 ± 2 Neurone/Schnitte, $P=0,001$). Im PVN stieg die Anzahl der c-Fos positiven Neurone um den Faktor 1,9 (69 ± 5 vs. 34 ± 3 Neurone/Schnitt, $P = 0,001$) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Interessanterweise führte die i.p. Injektion von Ghrelin auch im DMH der Versuchstiere zur einer 1,7-fachen Steigerung der neuronalen Aktivität (142 ± 5 vs. 83 ± 5 Neurone/Schnitt, $P<0,001$). Die Mehrzahl der durch Ghrelin aktivierten Neurone befand sich im ventralen Anteil des DMH (87 ± 6 Neurone/Schnitt). Im Bereich des VMH (53 ± 3 vs. 48 ± 3 Neurone/Schnitt, $P=0,177$), des NTS (42 ± 2 vs. 40 ± 3 Neurone/Schnitt, $P=0,603$) und in der Area postrema des Hirnstammes (7 ± 1 vs. 5 ± 1 Neurone/Schnitt, $P= 0,096$) führte die i.p. Gabe von Ghrelin zu keiner Steigerung des neuronalen Aktivität.

4.3.2 Die Ergebnisse der Doppelmarkierung gegen c-Fos und AgRP bzw. NPY im dorsomedialen hypothalamischen Nucleus (DMH)

Bei der immunhistologischen Markierung von c-Fos und AgRP wurde beobachtet, dass die Mehrzahl der durch Ghrelin aktivierten Neurone im DMH in ein Netzwerk aus AgRP-positiven Nervenfasern eingebettet ist. In der konfokalen Laserscannmikroskopie konnte beobachtet werden, dass diese Nervenzellen vor allem im ventralen Anteil des DMH lokalisiert sind. Die Doppelmarkierung gegen AgRP und NPY zeigte, dass die AgRP-positiven Nervenfasern im ventralen DMH mit dem Neuropeptid NPY kolokalisiert sind.

5 Diskussion

In den ersten beiden Publikationen berichten wir, dass peripher injiziertes sulfatiertes Cholezystokinin-8 (CCK-8S) zu einer neuronalen Aktivierung im PVN und NTS führt. Unsere Beobachtungen zur neuronalen Aktivierung in diesen Hirnkernen nach peripherer CCK-8S-Injektion sind im Einklang mit zahlreichen anderen Forschungsarbeiten (Chen DY *et al.*, 1993; Rinaman *et al.*; 1995; Olson *et al.*, 1992; Mönnikes *et al.*, 1997; Kobelt *et al.*, 2005; Kobelt *et al.*, 2006, Chen J *et al.*, 2008).

In der ersten Publikation konnte gezeigt werden, dass eine i.p. Injektion von CCK-8S die Anzahl von c-Fos-positiven PVN-Neuronen steigert, und dass hierbei eine dosisabhängige Kolokalisation mit NUCB2/Nesfatin-1 zu beobachten war. Zusätzlich konnte mittels Dreifachmarkierungen nachgewiesen werden, dass $51 \pm 7.5\%$ ($6\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) bzw. $60 \pm 7.3\%$ ($10\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) der aktivierten NUCB2/Nesfatin-1-Zellen CRF bzw. zu $37.5 \pm 4.7\%$ ($6\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) bzw. $49.8 \pm 4.8\%$ ($10\mu\text{g/kg KG CCK-8S}$) OXY enthalten. Für die drei Neuropeptide CRF, OXY und Nesfatin-1 ist bekannt, dass sie alle eine inhibitorische Wirkung auf die Nahrungsaufnahme haben (Verbalis *et al.*, 1991; Rinaman *et al.*, 1995; Krahn *et al.*, 1988; Olson *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009).

Uchoa *et al.* konnten 2009 nachweisen, dass die Nahrungsaufnahme von Ratten nach einer längeren Fastenphase die Anzahl von c-Fos-positiven CRF-Neuronen im PVN erhöht (Uchoa *et al.* 2009). In einer Untersuchung von Kohno *et al.* zeigte sich, dass es bei Nahrungsaufnahme bei Ratten nach einer 48-stündigen Fastenphase zu einem deutlichen Anstieg der neuronalen Aktivität von NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen im PVN kommt (Kohno *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung für die neuronale Aktivierung von NUCB2/Nesfatin-1-Zellen im PVN könnte durch eine postprandiale Freisetzung von CCK bedingt sein.

Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Neuropeptid OXY im PVN eine funktionelle Rolle bei der inhibitorischen Wirkung von peripheren CCK auf Nahrungsaufnahme spielt (Olson *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1992). Zudem belegen Studien, dass die i.z.v. Injektion von α -melanocytostimulating hormone (α -MSH) zu einer vermehrten Aktivierung von Oxytocin-Neuronen im PVN, sowie zu einer erhöhten Expression von NUCB2-mRNA führt. (Oh *et al.*, 2006; Sabatier *et al.*, 2006; Caquineau *et al.*, 2006). Eine Vorbehandlung von Versuchstieren mit dem MC3/MC4-Rezeptorantagonisten SHU9119 hingegen führte zu einer Verminderung des inhibitorischen Effektes von peripherem CCK auf die Nahrungsaufnahme (Blevins *et al.*, 2009). Damit ist es denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete neuronale Aktivierung von NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen mit Kolokalisation von OXY über α -MSH vermittelt sein könnte.

Wir konnten demonstrieren, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S auch im NTS zu einer Steigerung der neuronalen Aktivität von NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen führt. Peripher injiziertes CCK-8S führt zudem zu einer vermehrten Aktivität von noradrenergen Neuronen im NTS sowie in der ventrolateralen Medulla und im Locus caeruleus (Rinaman *et al.*, 1995; Buller *et al.*, 1996; Mönnikes *et al.*, 1997; Kobelt *et al.*, 2006;). Einzelne dieser noradrenergen Nervenfasern aus dem NTS projizieren in den PVN (Sawchenko *et al.*, 1982). Die Ergebnisse

einer Arbeit von Ueta *et al.* von 1993 legen nahe, dass diese noradrenergen Verbindungen zwischen NTS und PVN eine Rolle bei der Modulation von CCK-Effekten auf die Nahrungsaufnahme spielen. So konnte gezeigt werden, dass nach Blockade der noradrenergen Transmission im PVN mittels Phentolamin die Anzahl der durch peripheres CCK-8S aktivierten Oxytocin-Neuronen sank. (Ueta *et al.*, 1993). Interessanterweise konnten wir nun beobachten, dass auch NUCB2/Nesfatin-1 immunreaktive PVN-Neurone umgeben waren von einem katecholaminergen Nervenfasernetzwerk. Die Beobachtung lässt vermuten, dass NUCB2/Nesfatin-1-Neurone im PVN durch katecholaminerge Nervenfasern aus dem NTS moduliert werden können, insbesondere da bekannt ist, dass peripheres CCK zu einer vermehrten Aktivität in katecholaminhaltigen Neuronen im NTS führt, für welche Projektionen in den PVN beschrieben sind (Rinaman *et al.*, 1995). Weitere Untersuchungen müssen überprüfen, ob die von uns gefundene vermehrte Aktivität von NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen im NTS, ebenfalls nach peripherer CCK-Injektion, in diese Regelkreise involviert sind.

In der zweiten Publikation konnten wir beobachten, dass peripher injiziertes CCK-8S zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität in CART-positiven PVN-Neuronen führt. Wie bereits erläutert besitzt der PVN eine funktionelle Bedeutung bei der Vermittlung der CCK-Effekte auf die kurzfristige Nahrungsaufnahmehemmung. Die nahrungsinhibitorischen Neuropeptide NUCB2/Nesfatin-1 (wie oben ausgeführt), CRF und OXY sind in den dortigen Nervenzellen lokalisiert und werden durch peripher injiziertes CCK-8S aktiviert (Verbalis *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1991;). Erwähnenswert ist, dass für CCK-8S und CART synergistische Effekte auf die Nahrungsaufnahme beschrieben wurden (Maletinska *et al.*, 2008). Vor diesem Hintergrund verwundert es nicht, dass CART-Neurone im PVN von peripher injiziertem CCK-8S aktiviert werden können. Zieht man in Betracht, dass die i.z.v. Injektion von CART-Peptid zu einer vermehrten neuronalen Aktivierung von CRF- und OXY-Neuronen im PVN (Vrang *et al.*, 1999) führt, erscheint es denkbar, dass die durch CCK-8S ausgelöste neuronale Aktivierung von CRF- und OXY-Neuronen im PVN durch CART vermittelt sein könnte.

In der dritten Publikation haben wir uns mit dem orexinogen wirksamen Ghrelin und seinen Auswirkungen auf die neuronale Aktivierung verschiedener Hirnkerne befasst. Hier konnten wir beobachten, dass peripher injiziertes Ghrelin auch im Bereich des DMH zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität (c-Fos) im Vergleich zur Kontrollgruppe führt. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die aktivierten DMH-Neurone in ein Netzwerk aus AgRP-haltigen Nervenfasern eingebettet waren. Peripher injiziertes Ghrelin induziert eine neuronale Aktivierung im ARC (Wang *et al.*, 2002; Hewson *et al.*, 2002; Takayama *et al.*, 2007). Hierbei

konnte gezeigt werden, dass diese neuronal aktivierten ARC-Nervenzellen die orexinogenen Neuropeptide NPY und AgRP enthalten (Hewson *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Die NPY/AgRP-Neuronen im ARC sind die einzig bekannte Synthesquelle für AgRP im Gehirn (Broberger *et al.*, 1998). Vor diesem Hintergrund ist es wahrscheinlich, dass die neuronale Aktivierung von DMH-Neuronen nach einer peripheren Ghrelin-Injektion *via* AgRP-haltiger Projektionen aus dem ARC induziert wird. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der stimulativer Effekt von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme durch i.z.v. Gabe von Anti-AgRP-Antikörpern gehemmt werden konnte (Nakazato *et al.*, 2001).

Mögliche Kritikpunkte an den vorliegenden Arbeiten bestehen darin, dass bekannt ist, dass CCK-8S in hoher Dosierung eine Stressantwort bei Ratten auslöst (Zanoveli *et al.*, 2004). Auch konnte gezeigt werden, dass die IZV-Injektion von Nesfatin-1 ebenfalls eine Stressantwort bei Ratten induziert (Merali *et al.*, 2008). Demnach könnte die beobachtete neuronale Aktivierung nach CCK-8S-Injektion von NUCB2/Nesfatin-1-Nervenzellen im PVN durch Stress ausgelöst sein. Dies könnte insbesondere für die Dosierung von 10 µg/kg KG CCK-8S zutreffen. CCK-8S-Dosen von kleiner 8 µg/kg KG induzieren keinen Stress (Morley, 1987). Auch gibt es widersprüchliche Studien (Oh *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2009) zur Arbeit von Merali *et al.*, die berichten, dass die periphere Nesfatin-1-Injektion keinerlei Stresssymptome induziert. In Hinblick auf die hier vorgelegte Ghrelin-Studie lässt sich kritisieren, dass die Ergebnisse in Widerspruch zu früheren Studien stehen in denen Ghrelin keinerlei Effekt auf die Anzahl c-Fos-positiver Neurone im DMH nach i.p. Injektion auslösen konnte (Wang *et al.*, 2002; Takayama *et al.*, 2007). Dieser Unterschied mag durch die von uns verwendete konfokale Laserscanmikroskopie erklärt sein, welche eine genauere optische Analyse der Hirnschnitte zulässt.

Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse unserer Studien im Gesamtkontext der Nahrungsaufnahme- und Sättigungsregulation einzuordnen. So wäre es zum Beispiel interessant zu sehen, ob NUCB2/Nesfatin-1 bzw. CART auch eine modulatorische Rolle, z.B. eine inhibitorische, bei der Vermittlung der zentralnervösen Ghrelin-Effekte spielen. Des Weiteren wurde postuliert, dass die Aktivierung von NUCB2/Nesfatin-1- und OXY-Neuronen über α -MSH vermittelt sein könnte. Zudem sind NUCB2/Nesfatin-1 Neurone im PVN in ein Netzwerk aus TH-positiven Nervenfasern eingebettet welche möglicherweise diese Neurone modulieren. Interessant wäre es zu beobachten, ob die Blockade von katecholaminergen Nervenfasern bzw. von α -MSH zu einer Verminderung der NUCB2/Nesfatin-1-Immunreaktivität nach i.p. CCK-Gabe führt. Von weiterem Interesse könnte außerdem sein, ob NUCB2/Nesfatin-1 und CART im

PVN kolokalisiert sind und sich möglicherweise gegenseitig beeinflussen. Letztlich könnten diese weiteren Untersuchungen dazu führen, die von uns hier dargelegten Ergebnisse und deren Einordnung zu stützen.

6 Literaturverzeichnis

- Asakawa A, Inui A, Yuzuriha H, Nagata T, Kaga T, Ueno N, et al. Cocaine/amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice. *Horm Metab Res.* 2001;33:554–8.
- Balkan B, Koylu E, Pogun S, Kuhar MJ. Effects of adrenalectomy on CART expression in the rat arcuate nucleus. *Synapse.* 2003;50:14–9.
- Becker HD, Werner M, Schafmayer A. Release of radioimmunologic cholecystokinin in human subjects. *Am J Surg.* 1984;147:124–9.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology.* 2007;148:5088–94.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(25):15043–8.
- Buffa R, Solcia E, Go VL. Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology.* 1976;70:528–32.
- Buller KM, Day TA. Involvement of medullary catecholamine cells in neuroendocrine responses to systemic cholecystokinin. *J Neuroendocrinol* 1996;8:819–24.
- Calogero AE, Nicolosi AM, Moncada ML, Coniglione F, Vicari E, Polosa P. Effects of cholecystokinin octapeptide on the hypothalamic–pituitary–adrenal axis function and on vasopressin, prolactin and growth hormone release in humans. *Neuroendocrinology* 1993;58:71–6.

- Caquineau C, Leng G, Guan XM, Jiang M, Van der PL, Douglas AJ. Effects of α -melanocyte-stimulating hormone on magnocellular oxytocin neurones and their activation at intromission in male rats. *J Neuroendocrinol* 2006;18:685–91.
- Chen DY, Deutsch JA, Gonzalez MF, Gu Y. The induction and suppression of cfos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718. *Neurosci Lett*. 1993;149:91–4.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarth DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agoutirelated protein. *Endocrinology*. 2004;145(6):2607-12.
- Chen J, Scott KA, Zhao Z, Moran TH, Bi S. Characterization of the feeding inhibition and neural activation produced by dorsomedial hypothalamic cholecystokinin administration. *Neuroscience* 2008;152:178–88.
- Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, Kalra SP. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology*: 1984;115:427–429.
- Couceyro PR, Koylu EO, Kuhar MJ. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat*. 1997;12:229–41.
- Day HE, McKnight AT, Poat JA, Hughes J. Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism. *Neuropharmacology*. 1994;33:719–27.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;71(3):469-80.

- Dornonville de la Cour C, Björkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Håkanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept.* 2001;99(2-3):141-50.
- Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods.* 1989 Sep;29(3):261-5.
- Eysselein VE, Eberlein GA, Hesse WH, Singer MV, Goebell H, Reeve Jr JR. Cholecystokinin-58 is the major circulating form of cholecystokinin in canine blood. *J Biol Chem.* 1987;262:214-7.
- Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience.* 2008 Oct 15;156(3):563-79.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett.* 2009;452:241-6.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(17):6320-5.
- Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van der Ploeg LH, Woods SC, Seeley RJ. Long-term orexigenic effects of AgRP-(83-132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am. J. Physiol., Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2000;279:R47-R52.
- Hashimoto H, Fujihara H, Kawasaki M, Saito T, Shibata M, Otsubo H, Takei Y, Ueta Y. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. *Endocrinology.* 2007;148:1638-1647.

Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(11):1047-9.

Himeno S, Tarui S, Kanayama S, Kuroshima T, Shinomura Y, Hayashi C, Tateishi K, Imagawa K, Hashimura E, Hamaoka T. Plasma cholecystokinin responses after ingestion of liquid meal and intraduodenal infusion of fat, amino acids, or hydrochloric acid in man: analysis with region specific radioimmunoassay. *Am J Gastroenterol.* 1983;78:703-7.

Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1993 Jul;14(3):173-213.

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(3):909-13.

Kamilaris TC, Johnson EO, Calogero AE, Kalogeras KT, Bernardini R, Chrousos GP. Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 1992;130:1764-74.

Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Bae HG, Rüter J, Klapp BF, Wiedenmann B, Mönnikes H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004;1:45-52.

Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, van der Voort I, Veh RW, Werner CR, Klapp BF, Wiedenmann B, Wang L, Taché Y, Monnikes H. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288:R751-8.

Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort I, Tebbe JJ, Veh RW, Klapp BF, Wiedenmann B, Taché Y, Monnikes H. Peripheral injection of CCK-8S

- induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res.* 2006;1117:109–17.
- Kohno D, Nakata M, Maejima Y, Shimizu H, Sedbazar U, Yoshida N, Dezaki K, Onaka T, Mori M, Yada T. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology.* 2008;149:1295–301.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormonereleasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656-60.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Ling NC, DeSouza EB, Kuhar MJ. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol.* 1997;9:823–33.
- Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Behavioral effects of corticotropinreleasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res:* 1988;443:63–9.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;393:72–6.
- Larsson LI, Rehfeld JF. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* 1979;165:201–18.
- Liddle RA, Goldfine ID, Rosen MS, Taplitz RA, Williams JA. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest.* 1985;75:1144–52.

- Liddle RA, Green GM, Conrad CK, Williams JA. Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. *Am J Physiol.* 1986;251:G243–8.
- Maletinska L, Maixnerova J, Matyskova R, Haugvicova R, Pirnik Z, Kiss A, et al. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci.* 2008;9:101.
- Merali Z, Cayer C, Kent P, Anisman H. Nesfatin-1 increases anxiety- and fear-related behaviors in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;201:115–23.
- Mönnikes H, Lauer G, Arnold R. Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat. *Brain Res.* 1997;770:277–88.
- Moran TH. Gut peptides in the control of food intake: 30 years of ideas. *Physiol Behav.* 2004 Aug;82(1):175-80.
- Morley JE. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev.* 1987;8:256–87.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001;409(6817):194-8.
- Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav.* 2007 Sep 10;92(1-2):256-62.
- Oh I, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006;443:709–12.
- Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hruby VJ, Stricker EM, Verbalis JG. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides.* 1991;12:113–8.

- Olson BR, Hoffman GE, Sved AF, Stricker EM, Verbalis JG. Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex. *Brain Res.* 1992;569:238–48.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego, USA. 1997.
- Reeve Jr JR, Eysselein VE, Ho FJ, Chew P, Vigna SR, Liddle RA, et al. Natural and synthetic CCK-58. Novel reagents for studying cholecystokinin physiology. *Ann NY Acad Sci.* 1994;713:11–21.
- Rehfeld JF. Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters? *J Neurochem.* 1985;44:1–10.
- Rehfeld JF, Hansen HF, Marley PD, Stengaard-Pedersen K. Molecular forms of cholecystokinin in the brain and the relationship to neuronal gastrins. *Ann NY Acad Sci.* 1985;448:11–23.
- Rinaman L, Hoffman GE, Dohanics J, Le WW, Stricker EM, Verbalis JG. Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol.* 1995;360:246–56.
- Ritter RC, Ladenheim EE. Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol.* 1985;248:R501–4.
- Rüter J, Kobelt P, Tebbe JJ, Avsar Y, Veh R, Wang L, Klapp BF, Wiedenmann B, Taché Y, Mönnikes H. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res.* 2003;991(1-2):26-33.
- Sabatier N. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and oxytocin: a peptide signalling cascade in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2006;18:703–10.

- Sarkar S, Legradi G, Lechan RM. Intracerebroventricular administration of alphanelanocyte stimulating hormone increases phosphorylation of CREB in TRH- and CRH-producing neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* 2002;945:50–9.
- Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 1982;257:275–325.
- Schrell U, Sofroniew MV. Use of serial 1-2 micrometer paraffin sections in neuropeptide immunocytochemistry for sequential analysis of different substances contained within the same neurons. *J Histochem Cytochem.* 1982;6:512-6.
- Shimizu H, Oh I, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology.* 2009;150:662–71.
- Smith GP, Jerome C, Gibbs J. Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. *Peptides.* 1981;2:409–11.
- Stanley SA, Small CJ, Murphy KG, Rayes E, Abbott CR, Seal LJ, et al. Actions of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide on regulation of appetite and hypothalamo-pituitary axes in vitro and in vivo in male rats. *Brain Res.* 2001;893:186–94.
- Takayama K, Johno Y, Hayashi K, Yakabi K, Tanaka T, Ro S. Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. *Neurosci Lett.* 2007;417(3):292-6.
- Tschöp, M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000;407:908–913.

- Uchoa ET, Sabino HA, Ruginsk SG, Ntunes-Rodrigues J, Elias LL. Hypophagia induced by glucocorticoid deficiency is associated with an increased activation of satiety-related responses. *J Appl Physiol.* 2009;106:596–604.
- Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamashita H. CCK-8 excites oxytocin secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats—possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Res Bull.* 1993;32:453–9.
- Van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev.* 2004;25(3):426-57.
- Verbalis JG, Stricker EM, Robinson AG, Hoffman GE. Cholecystokinin activates c-Fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol.* 1991;3:205–13.
- Vrang N, Tang-Christensen M, Larsen PJ, Kristensen P. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res.* 1999;818:499–509.
- Vrang N, Larsen PJ, Kristensen P, Tang-Christensen M. Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology.* 2000;141:794–801.
- Wang C, Billington CJ, Levine AS, Kotz CM. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport.* 2000;11:3251–5.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett.* 2002;325(1):47-51.

- Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*. 1999;70(5):306-16.
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology*. 2000;141:4325–4328.
- Wren AM, Small CJ, Abbott CR, Dhillon WS, Seal LJ, Cohen MA, Batterham RL, Taheri S, Stanley SA, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes*. 2001;50:2540–2547.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008;132(3):387-96.
- Zanoveli JM, Netto CF, Guimaraes FS, Zangrossi Jr H. Systemic and intra-dorsal periaqueductal gray injections of cholecystokinin sulfated octapeptide (CCK-8S) induce a panic-like response in rats submitted to the elevated T-maze. *Peptides* 2004;25:1935–41.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Steffen Noetzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Cholecystokinin und Ghrelin Untersuchungen zur Nahrungsaufnahmeregulation an männlichen Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

8 Anteilserklärungen an den erfolgten Publikationen

Steffen Noetzel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: Steffen Noetzel*, Andreas Stengel*, Tobias Inhoff, Miriam Goebel, Anna-Sophia Wissner, Norbert Bannert, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Taché, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt (* geteilte Erstautorenschaft)

Titel: CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem

Zeitschrift: Regulatory Peptides

Jahr: 2009

Beitrag im Einzelnen (90%):

Planung und Durchführung der Tierexperimente, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Auswertung der gewonnenen Daten, Verfassen des Manuskripts, Betreuung des Review-Prozesses

Publikation 2:

Autoren: Lisa Peter*, Andreas Stengel*, Steffen Noetzel, Tobias Inhoff, Miriam Goebel, Yvette Taché, Rüdiger W. Veh, Norbert Bannert, Carsten Grötzinger, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt,

Titel: Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats (* geteilte Erstautorenschaft)

Zeitschrift: Peptides

Jahr: 2010

Beitrag im Einzelnen (10%):

Gewinnen und Auswahl der geeigneten Gewebe, Durchführung von immunhistochemischen Färbungen, Analyse der mikroskopischen Bilder.

Publikation 3:

Autoren: Peter Kobelt, Anna-Sophia Wisser, Andreas Stengel, Miriam Goebel, Tobias Inhoff, Steffen Noetzel, Rüdiger W. Veh, Norbert Bannert, Ivo van der Voort, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Taché, Hubert Mönnikes

Titel: Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats

Zeitschrift: Brain Research

Jahr: 2008

Beitrag im Einzelnen (35%):

Mitarbeit an der Durchführung der Tierexperimente, Durchführung von immunhistochemischen Färbungen.

Steffen Noetzel

9 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Die ausgewählten Publikationen sind aus rechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Dissertation nicht in Kopie enthalten. Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

Publikation 1

CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem.

Noetzel S*, Stengel A*, Inhoff T, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P.

Regul Pept. 2009 Oct 9;157(1-3):84-91. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19540880

Impact factor 2009: 2.160

<http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2009.06.009>

Publikation 2

Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Peter L*, Stengel A*, Noetzel S, Inhoff T, Goebel M, Taché Y, Veh RW, Bannert N, Grötzinger C, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P.

Peptides. 2010 Jun;31(6):1118-23. Epub 2010 Mar 20.

Impact factor 2010: 2.654

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.03.013>

Publikation 3

Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.

Kobelt P, Wissler AS, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.

Brain Res. 2008 Apr 14;1204:77-86

Impact factor 2008: 2.494

<http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.brainres.2008.01.054>

10 Lebenslauf

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

11 Vollständige Publikationsliste

Zeitschriftenbeiträge

Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Peter L^{*}, Stengel A^{*}, **Noetzel S**, Inhoff T, Goebel M, Taché Y, Veh RW, Bannert N, Grötzinger C, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P. (* geteilte Erstautorenschaft)

Peptides. 2010 Jun;31(6):1118-23. Epub 2010 Mar 20.

Impact factor 2010: 2.654

CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem.

Noetzel S^{*}, Stengel A^{*}, Inhoff T, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P. (* geteilte Erstautorenschaft)

Regul Pept. 2009 Oct 9;157(1-3):84-91. Epub 2009 Jun 21. PMID: 19540880

Impact factor 2009: 2.160

Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.

Inhoff T^{*}, Mönnikes H^{*}, **Noetzel S**, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P. (* geteilte Erstautorenschaft)

Peptides. 2008 Dec;29(12):2159-68

Impact factor 2008: 2.565

Peripheral obestatin has no effect on feeding behavior and brain Fos expression in rodents.

Kobelt P, Wisser AS, Stengel A, Goebel M, Bannert N, Gourcerol G, Inhoff T, **Noetzel S**, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.

Peptides. 2008 Jun;29(6):1018-27

Impact factor 2008: 2.565

Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.

Kobelt P, Wissner AS, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, **Noetzel S**, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.

Brain Res. 2008 Apr 14;1204:77-86

Impact factor 2008: 2.494

Vorträge

Peripheral injection of CCK-8S activates Cocaine-and-Amphetamine-regulated-transcript (CART)-neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität

27.03. – 29.03.2009, Hohenkammer

Poster

Peripheres CCK-8S induziert dosisabhängig neuronale Aktivität in Nesfatin-1 immunreaktiven Zellen des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus in Ratten

Stengel A*, **Noetzel S***, Inhoff T, Goebel M, Wissner AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P (* geteilte Erstautorenschaft)

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, 30.09. – 03.10.2009, Hamburg

Periphere Injektion von CCK-8S induziert c-Fos in CART-positiven Neuronen des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus in Ratten

Kobelt P, **Noetzel S**, Inhoff T, Stengel A, Goebel M, Wissner AS, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, 30.09. – 03.10.2009, Hamburg

Peripheral Injection of CCK-8s Activates Cart Positive Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus

Andreas Stengel, **Steffen Noetzel**, Tobias Inhoff, Miriam Goebel, Hubert Monnikes, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Tache, Peter Kobelt

Digestive Disease Week 2009, 30.05. – 04.06.2009, Chicago, IL, USA

Des-acyl Ghrelin Inhibits the Orexigenic Effect of Peripherally Injected Ghrelin

Andreas Stengel, Peter Kobelt, Tobias Inhoff, **Steffen Noetzel**, Anna-Sophia Wisser, Miriam Goebel, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Tache, Hubert Monnikes

Digestive Disease Week 2008, 17.05. – 22.05.2008, San Diego, CA, USA

12 Danksagungen

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Kobelt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Unterstützung bei diesem Projekt. Lieber Peter, ich danke dir vor allen Anderen für deine Unterstützung in den vergangenen Jahren. Ohne deine unendliche Geduld und Beharrlichkeit, mit der du mich immer wieder motiviert hast, wäre Vieles nicht möglich gewesen. Ich danke dir, dass du mir stets mit all deiner Erfahrung und deinem Wissen mit Rat und Tat zur Seite standest. Peter, ich danke dir aufrichtig.

Lieber Tobias, ich danke dir für ungezählte Stunden an meiner Seite im Labor und am Schreibtisch. Ohne Dich wären viele Tage und Sachen schwerer Gefallen. Ich danke Dir von ganzem Herzen.

Ich danke meiner Frau Reni. Liebe Reni, ohne Dich gäbe es diese Arbeit nicht. Ich liebe dich.

Ich danke meinen Eltern für die unendliche Unterstützung während all der Jahre des Studiums, der Arbeit, der Promotion und bin sehr traurig, dass mein Vater diese nicht mehr bis zum Abschluß erleben konnte.

Zusätzlich möchte ich folgende Menschen erwähnen, die mich immer wieder über die Jahre unterstützt und motiviert haben: Dr. Dieter B., Hans S., Axel S. sowie meine kleine Tochter Annemarie.