

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Effekte von peripher injiziertem Cholecystokinin und Bombesin auf  
das neuronale Aktivierungsmuster von Neuronatin-Nervenzellen im  
Nucleus Tractus Solitarius und Dorsalen Motornucleus des Vagus**

**Cholecystokinin and Bombesin Activate Neuronatin Neurons in the  
Nucleus of the Solitary Tract in the Brainstem**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malika Guggenberger

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.06.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>2. Zusammenfassung und Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Einleitung .....</b>	<b>8</b>
3.1 <i>Neuronatin .....</i>	8
3.2 <i>Cholecystokinin.....</i>	10
3.3 <i>Bombesin.....</i>	12
3.4 <i>C-Fos als Marker von neuronaler Aktivität .....</i>	13
3.5 <i>Ziele der Arbeit .....</i>	14
<b>4. Methoden .....</b>	<b>15</b>
4.1 <i>Peptidpräparation.....</i>	15
4.2 <i>Versuchstiere.....</i>	15
4.3 <i>Tierversuch .....</i>	16
4.4 <i>Herstellung der Gewebeproben .....</i>	17
4.5 <i>Immunhistochemische Dreifachmarkierung zur Darstellung von c-Fos, Neuronatin und Tyrosinhydroxylase .....</i>	17
4.6 <i>Datenerhebung und statistische Auswertung .....</i>	20
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
5.1 <i>Effekte von Cholecystokinin-8S und Bombesin auf die neuronale Aktivierung im Nucleus Tractus Solitarius.....</i>	21
5.2 <i>Effekte von Cholecystokinin-8S und Bombesin auf die neuronale Aktivierung im Dorsalen Motornucleus des Vagus.....</i>	28
<b>6. Diskussion .....</b>	<b>31</b>

6.1 Neuronale Signalwege der Energiehomöostase.....	31
6.2 Neuronatin – Ein Mediator der NTS-vermittelten Sättigung?.....	33
6.2.1 Die Bedeutung intrazellulärer Calcium-Spiegel.....	33
6.2.2 Die Interaktion verschiedener Mediatoren der Sättigungsregulation .....	34
6.2.3 Die Bedeutung der MAPK/ERK-vermittelten Signaltransduktion.....	35
6.3 Neuronatin, Cholecystokinin und Bombesin und die langfristige Regulation des Körpergewichts .....	36
6.4 Ausblick.....	38
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>40</b>
<b>8. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>51</b>
<b>9. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation .....</b>	<b>52</b>
<b>10. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>).....</b>	<b>53</b>
<b>11. Sonderdruck der Publikation.....</b>	<b>66</b>
<i>Die folgende Publikation wird aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht. ....</i>	<i>66</i>
<i>Guggenberger M, Engster KM, Hofmann T, Rose M, Stengel A, Kobelt P. Cholecystokinin and bombesin activate neuronatin neurons in the nucleus of the solitary tract. Brain Res. 2020;1746:147006. ....</i>	<i>66</i>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>77</b>
<b>13. Eigene Publikationen.....</b>	<b>79</b>
<b>14. Danksagung.....</b>	<b>80</b>

# 1. Abkürzungsverzeichnis

AMPA .....	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AP .....	Area Postrema
Arc .....	Nucleus Arcuatus
BN .....	Bombesin
BSA .....	Serum-Rinderalbumin
Ca <sup>2+</sup> .....	Calcium
CART .....	<i>Cocaine and Amphetamine regulated transcript</i>
CCK .....	Cholecystokinin
CCK-8S .....	Cholecystokinin Octapeptid
cLSM .....	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CREB .....	cAMP response element-binding protein
DABCO .....	1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane
DAPI .....	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DMH .....	Dorsomedialer Nucleus des Hypothalamus
DMV .....	Dorsaler Motornucleus des Vagus
ERK .....	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FITC .....	Fluoresceinisothiocyanat
GRP .....	Gastrin-releasing-peptide
i.p. ....	intraperitoneal
KG .....	Körpergewicht

LH ..... Lateromedialer Nucleus des Hypothalamus

M ..... Molare Masse

MAPK ..... Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MCH ..... *Melanocortin-containing hormone*

mRNA ..... *m-Ribo-Nuclein-Acid*

NaCl ..... Natriumchlorid

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O ..... Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

2NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O ..... Dinatriumhydrogenphosphat

NaN<sub>3</sub> ..... Natriumazid

NMB ..... Neuromedin B

NMDA ..... *N-Methyl-D-Aspartat*

Nnat ..... Neuronatin

NTS ..... Nucleus Tractus Solitarius

NUCB2 ..... Nucleobindin 2

OLETF ..... *Otsuka Long Evans Tokushima fatty*

PBS ..... *Phosphate-buffered saline*

PVN ..... Paraventriculärer Nucleus

SEM ..... Standardfehler des Mittelwerts

SNP ..... Einzelnucleotid-Polymorphismus

VIP ..... Vasoactive intestinal peptide

VMH ..... Ventromedialer Nucleus des Hypothalamus

vs. .... versus

## 2. Zusammenfassung und Abstract

Das Proteolipid Neuronatin (Nnat) ist an der Modulation zellulärer Signalwege beteiligt und scheint auch eine Funktion bei der Regulation der Energiehomöostase einzunehmen. Die gastrointestinalen Peptide Cholecystokinin (CCK) und Bombesin (BN) zeigen vor allem hemmende Effekte auf die Kurzzeitregulation der Nahrungsaufnahme, welche durch die Aktivierung verschiedener Hirnkerne wie dem Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und dem Dorsalen Motornucleus des Vagus (DMV) vermittelt werden. In dieser Studie sollte untersucht werden, ob Neuronatin in NTS- oder DMV-Neuronen lokalisiert vorliegt und ob CCK-8S oder BN eine c-Fos-Aktivierung von Nnat-Neuronen bewirkt. Nicht-gefastete männliche Sprague Dawley-Ratten erhielten eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 5,2 bzw. 8,7 nmol CCK-8S /kg oder 26 bzw. 32 nmol Bombesin/kg (n=4) oder eine Vehikellösung (0,15 M NaCl, n=7). 90 Minuten nach der Injektion wurde die Anzahl c-Fos-positiver Neuronen im NTS und DMV bestimmt. Sowohl im NTS als auch im DMV wurden Nnat-positive Neuronen beobachtet. CCK-8S (25-fach und 51-fach,  $p = 0,025$  und  $p = 0,001$ ) und Bombesin (31-fach und 59-fach,  $p=0,007$  und  $p=0,001$ ) bewirkten in beiden Dosierungen im Vergleich zur Vehikel-Lösung einen signifikanten Anstieg c-Fos-positiver Neuronen im NTS. Im DMV wurde kein signifikanter Effekt der CCK- oder BN-Injektionen festgestellt. Beide Dosen CCK-8S (24-fach und 48-fach,  $p=0,011$  und  $p=0,001$ ) und Bombesin (31-fach und 56-fach,  $p=0,002$  und  $p=0,001$ ) führten weiterhin zu einer erhöhten Anzahl aktivierter Nnat-Neuronen im NTS ( $p=0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass i.p. injiziertes CCK-8S oder Bombesin eine erhöhte neuronale Aktivität in Nnat-Neuronen des NTS induzieren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Nnat an der CCK-8S- und Bombesin-vermittelten Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sein könnte.

## Abstract

The proteolipid Neuronatin (Nnat) takes part in the regulation of cellular molecular signaling and also seems to be involved into regulation of energy homeostasis. The gastrointestinal peptides, cholecystinin (CCK) and bombesin (BN), show an effect on the short-term inhibition of food intake. They induce neural activation in several brain nuclei, especially in the nucleus of the solitary tract (NTS) and the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV), which are involved in the regulation of food intake. The aim of the study was to determine whether Nnat immunoreactivity can be detected in the NTS and the DMV, and if the peripheral injection of CCK-8S or BN causes c-Fos activation of Nnat neurons. Non-fasted male Sprague-Dawley rats were treated with an intraperitoneal (i.p.) injection of 5.2 or 8.7 nmol CCK-8S/kg, 26 or 32 nmol BN/kg ( $n=4$  all groups), or vehicle solution (0.15M NaCl;  $n=7$ ). 90 minutes after the injection, the number of c-Fos neurons was determined in the NTS and DMV. In the NTS, as well as in the DMV, we detected Nnat immunoreactive neurons. CCK-8S (25-fold and 51-fold,  $p = 0.025$  and  $p = 0.001$ ) and BN (31-fold and 59-fold,  $p = 0.007$  and  $p = 0.001$ ) at both doses caused a significantly increased number of c-Fos positive neurons in the NTS compared to the vehicle group. In the DMV we observed no significant effect of CCK or BN injection. Both doses of CCK-8S (24-fold and 48-fold  $p=0.011$  and  $p=0.001$ ) and BN (31-fold and 56-fold,  $p=0.002$  and  $p=0.001$ ) also showed an increase of activated Nnat neurons in the NTS ( $p=0.001$ ) compared to the vehicle group. In conclusion, the i.p. injection of CCK-8S or BN induces a higher neuronal activity in NTS Nnat neurons, suggesting that Nnat may take part in the regulation of food intake mediated by peripheral CCK-8S or BN.

## **Manteltext**

Der folgende Text dient zur vertiefenden Darstellung des Forschungsstandes, der Methodik, der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse der Publikation Guggenberger, M., Engster, K.M., Hofmann, T., Rose, M., Stengel, A., Kobelt, P. Cholecystkinin and Bombesin Activate Neuronatin Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract in the Brainstem. Brain Research 17460 (2020) 147006.

## **3. Einleitung**

Adipositas stellt ein weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem dar und gilt als Ursache zahlreicher Folgeerkrankungen wie z.B. Herz-Kreislaufferkrankungen oder Diabetes mellitus (1). Vor diesem Hintergrund ist das Erforschen der physiologischen Prozesse, die zur Regulation des Körpergewichtes und der Nahrungsaufnahme beitragen von Bedeutung. Die Zustände Hunger und Sättigung nehmen bei der Initiierung der Nahrungsaufnahme und deren Beendigung eine zentrale Rolle ein. In den letzten Jahrzehnten wurden bereits zahlreiche Erkenntnisse darüber gewonnen, wie durch Nahrungsaufnahme induzierte periphere Signale in das zentralnervöse System integriert werden und so die Energiehomöostase und das Essverhalten kontrollieren. Der Hypothalamus und der Hirnstamm gelten hierbei als die wichtigen zentralnervösen Regulationszentren. Sowohl auf peripherer als auch auf zentraler Ebene haben dabei appetitregulierende Peptidhormone für die Regulation von Hunger und Sättigkeit eine wichtige Funktion.

### **3.1 Neuronatin**

In den 90er Jahren wurde das Proteolipid Neuronatin in neonatalen Rattenhirnen entdeckt und seine Expression und Beteiligung bei neonatalen Entwicklungsprozessen des Gehirns beschrieben (2, 3). Auf Basis der zuerst in der Ratte entschlüsselten Gensequenz wurde das Neuronatin-Gen auch im menschlichen Genom nachgewiesen und untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Neuronatin u.a. eine Funktion bei der Regulation der Energiehomöostase hat (4). Die Expression von Neuronatin-mRNA erreicht einen Höhepunkt bei frühen neuronalen Differenzierungsprozessen im Rattengehirn, ist aber auch im adulten Gehirn, in der



Hypophyse und den Nebennieren sowie in der Skelettmuskulatur, dem Pankreas, dem Uterus, den Ovarien und in der Lunge nachgewiesen worden (4). Das humane Neuronatin-Gen enthält 3973 Nucleotide und die Neuronatin-mRNA besteht aus zwei verschiedenen Isoformen ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Form), die durch alternatives Splicing generiert werden (4, 5). Das Neuronatin-Gen verfügt über sechs verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren: SP-1, AP-2 (zwei Bindungsstellen), die d-Untereinheit, SRE-2, NF-A1 und ETS (2, 3). An diese binden u.a. Transkriptionsfaktoren, die in die Kontrolle der Adipogenese (Pparg, Klf15, Irf1, Creb1, Egr2, Gata3), der Lipogenese (Mlxipl, Srebp1c), von Inflammationsprozessen (Jun, Stat3), der Signaltransduktion von Insulin und von diabetischer Prädisposition (Foxo1, Tcf7l2) involviert sind (6).

Für eine funktionelle Bedeutung von Neuronatin spricht, dass es einer genomischen Prägung (engl.: Genomic imprinting) unterliegt. Beim Menschen befindet sich das Neuronatin-Gen auf dem Chromosomenabschnitt 20q11.1-12 und liegt somit in einer Imprinting-Region (7, 8). Genomisch geprägte Gene sind häufig an Regulationsprozessen wie z.B. an der Wachstumsregulation und der Kontrolle der Energie- und Glucosehomöostase beteiligt (9, 10). Sie unterliegen nicht den klassischen Regeln der Mendel-Vererbung und sind entweder nur auf dem vom Vater stammenden oder nur auf dem von der Mutter stammenden Chromosom der Nachkommen aktiv. Das Neuronatin-Gen wird nur väterlicherseits exprimiert, während das mütterliche Allel durch Silencing (in Form von Methylierung) ausgeschaltet wird (11, 12). Das Prinzip der genomischen Prägung beruht auf einer reversiblen epigenetischen Modifikation durch Methylierung der DNA ohne Veränderungen der Nucleotidsequenz (13). Die Methylierung der Imprinting-Region ist u.a. abhängig von verschiedenen Umweltbedingungen oder dem Angebot von Methyl-Donoren in der Nahrung (12, 14). Im Neuronatin-Gen wird die mRNA-Expression über Methylierung in der Promotor-Region einer 1.8-kb CpG Insel reguliert (4, 15). Eine geringere Methylierung des Nucleotids Cytosin auf den Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG)- Abschnitten 2 und 3 der Promotor-Region führt zu einer erhöhten Neuronatin-Expression, während eine verminderte Expression über posttranslationale Modifikation der Neuronatin-mRNA durch micro-mRNA verursacht wird (16-18). Micro-mRNAs sind ebenfalls von Bedeutung für die epigenetische Regulation von Wachstum, Differenzierung, Signaltransduktion und Entwicklung von Zellen (19-21). Die micro-RNA 708, die als ein Einflussfaktor für die Neuronatin-Expression detektiert wurde, wird durch ER-Stress induziert und spielt unter anderem in der Tumorentstehung eine Rolle (4, 12, 17, 18).

In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass genomisch geprägte Gene relevant für die Regulation der Nahrungsaufnahme, der Glucosehomöostase und des Lipidmetabolismus sind und somit wahrscheinlich auch an der Pathogenese von metabolischen Störungen wie Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt sind (10, 22). Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass dies auch auf das Neuronatin-Gen zutrifft. Millership et al. zeigten, dass die Ausschaltung des Neuronatin-Gens bei Mäusen mit einem hyperphagen Essverhalten, geringerer körperlicher Aktivität, Übergewicht sowie einer verringerten Sensitivität für die Sättigungseffekte von Leptin einhergeht (23). Weiterhin ist das Auftreten verschiedener Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. Single Nucleotide Polymorphism) im humanen Neuronatin-Gen mit dem Auftreten von schwerer juveniler und adulter Adipositas assoziiert (9). Studien deuten darauf hin, dass eine Veränderung des Methylierungsmusters von Neuronatin einen Einfluss auf die genetische Determinierung von Übergewicht haben könnte. Dalgaard et al. zeigten eine statistische Korrelation zwischen epigenetisch determiniertem Übergewicht und einer verringerten Neuronatin-mRNA Expression im Fettgewebe infolge von Hypermethylierung des codierenden Gens (24). Soubry et al. beobachteten, dass Veränderungen der Methylierung im Neuronatin-Gen sowohl im Spermium als auch in den Nachkommen adipöser Väter zu finden sind (25). In einer weiteren Studie zeigte sich, dass die neugeborenen Töchter von Schwangeren mit höherem Energieumsatz ebenfalls veränderte Methylierungsmuster des Neuronatin-Gens aufwiesen (26). In hypothalamischen Hirnkernen von Mäusen konnte weiterhin beobachtet werden, dass nicht nur im peripheren Gewebe, sondern auch im Gehirn ein Zusammenhang zwischen veränderten Methylierungsmustern von Neuronatin und dem Auftreten von Übergewicht besteht (9). Neuronatin-mRNA wird physiologisch in verschiedenen hypothalamischen Hirnkernen wie dem Paraventriculären Nucleus (PVN), dem Ventromedialen (VMH) und Dorsomedialen Nucleus des Hypothalamus (DMH), dem Lateromedialen hypothalamischen Nucleus (LH) und dem Nucleus Arcuatus (Arc) exprimiert (9). Diese Hirnkerne sind an der Regulation von Hunger und Sättigung mitbeteiligt, was für eine potentielle physiologische Funktion von Neuronatin für die Nahrungsaufnahme spricht.

### **3.2 Cholecystokinin**

Cholecystokinin (CCK) ist ein Peptidhormon aus dem Gastrointestinaltrakt und in die Kontrolle der Nahrungsaufnahme involviert. Endogenes CCK wird als Reaktion auf die

Einnahme von Mahlzeiten bei Anwesenheit verschiedener Nährstoffe wie Fettsäuren, Glucose und Proteinen von enteroendokrinen I-Zellen im proximalen Duodenum und Jejunum ins Blut und an die Umgebung abgegeben und führt zu einer kurzfristigen Inhibition der Nahrungsaufnahme (27-29). Neben der Sättigung ist CCK beteiligt am Sozialverhalten, dem Schlaf- und Stressverhalten, der Hemmung der Magenentleerung, der Beeinflussung der Darmmotilität, des Herz-Kreislauf-Systems und inflammativer Prozesse, der Gallenblasen-, Magensäure-, und Pankreassekretion sowie absorptiven Funktionen (28-30). CCK wird sowohl peripher als auch im ZNS gebildet und wirkt peripher als gastrointestinales Hormon während es im ZNS als Neurotransmitter fungiert (30). Die Inhibition der Nahrungsaufnahme durch peripher gebildetes CCK wird über CCK-Rezeptoren auf vagalen Neuronen vermittelt, die mit dem Hirnstamm kommunizieren (27, 28). Auf den vagalen Afferenzen wirkt CCK ebenfalls als Neurotransmitter (31). Das aus 115 Aminosäuren bestehende präpro-CCK-Protein wird durch posttranslationale oder extrazelluläre Modifikation zu verschiedenen Formen von CCK umgewandelt. Das längste zirkulierende Hormon in Menschen, Ratten und Hunden ist CCK-58 (32). Aus diesem werden durch sequenzielle Proteolyse am Arginin-Terminus kürzere Peptide generiert. CCK-8 wird häufig in experimentellen Studien zu CCK verwendet und ist sowohl im menschlichen Gehirn als auch im Darm zu finden. Die O-Sulfatierung am C-Terminus von CCK führt zu einer erhöhten Aktivität des Hormons im Gastrointestinaltrakt (32). Die biologische Wirkung des Peptids auf die jeweiligen Zielorgane wird über G-Protein-gekoppelte CCK-Rezeptoren vermittelt (33). Für die Vermittlung der Sättigung auf Hirnebene spielen speziell CCK-1-Rezeptoren eine Rolle (28). Zwei verschiedene Rezeptortypen wurden identifiziert und in Anlehnung an ihre zunächst beobachtete anatomische Lokalisation benannt: der CCK-A ('alimentary type') und der CCK-B-Rezeptor ('brain type'). Später stellte man einige Überschneidungen zwischen den Lokalisationen fest, weshalb die Nomenklatur hin zum CCK-1 und CCK-2-Rezeptor geändert wurde (32). Der CCK-1-Rezeptor findet sich im Gastrointestinaltrakt, wo er in den Pankreas-Acinus-Zellen, der Gallenblase, im Pylorus sowie im Plexus myentericus exprimiert wird (28, 34). Aber auch im ZNS, vor allem in Hirnregionen, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind (NTS, Area Postrema (AP), DMH), sowie dem Nervus Vagus ist der Rezeptor lokalisiert (28, 29, 35). Der CCK-2-Rezeptor ist identisch mit dem Gastrin-Rezeptor und kommt im Cortex und dem Hypothalamus sowie auf vagalen Afferenzen, aber auch z.B. in der Magenmukosa vor (28, 36).

Die Beteiligung von CCK an der Kurzzeitsättigung konnte in zahlreichen Untersuchungen belegt werden (28, 29). Unmittelbar nach der Nahrungsaufnahme erfolgt die Freisetzung des Peptids. Der Anstieg der CCK-Konzentration im Blut korreliert mit dem Eintreten eines Sättigungsgefühls und einer dosisabhängigen Reduktion der Portionsgröße sowie einer verkürzten Dauer der Nahrungsaufnahme (28, 32). Auch verhaltensbiologische Effekte, welche im Zusammenhang mit der Sättigung auftreten, wie z.B. eine verringerte körperliche Aktivität, wurden bereits beobachtet (28, 32, 37). Die Wirkung von CCK auf die Nahrungsaufnahme beruht wahrscheinlich auf einem Zusammenspiel verschiedener peripherer Faktoren. CCK wird u.a. als Reaktion auf die Magendehnung ausgeschüttet und gilt dadurch als ein möglicher Mediator des durch die Dehnung des Magens ausgelösten Sättigungsgefühls (29, 38). Neben CCK sind zahlreiche weitere Peptide an der Verdauung und an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt. Die akuten Effekte von exogenem CCK auf die Inhibition der Nahrungsaufnahme werden durch die gleichzeitige Anwesenheit anderer peripherer Hormonsignale wie Glukagon, Amylin, Serotonin und GLP-1 sowie durch Insulin oder Leptin verstärkt (28, 29).

### **3.3 Bombesin**

Bombesin ist ein aus 14 Aminosäuren bestehendes Peptid und wurde 1971 aus der Haut des europäischen Frosches *Bombina orientalis* isoliert (39). Die Injektion von Bombesin führt zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme sowohl bei Nagetieren als auch beim Menschen (40). Neben diesem Effekt auf die Nahrungsaufnahme konnten weitere physiologische Eigenschaften des Peptids, wie die Stimulation der Gastrin-Freisetzung sowie der Magensäure im Säuger gezeigt werden (40). Das Gastrin-releasing-peptide (GRP) und Neuromedin B (NMB) sind sogenannte *Bombesin-related peptides*, die eine große strukturelle Ähnlichkeit mit Bombesin aufweisen (40, 41). Bombesin und die Bombesin-ähnlichen Peptide führen nach peripherer Injektion zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, wobei sie sich hinsichtlich Wirkstärke und Wirkdauer unterscheiden (40). Bombesin bindet mit hoher Affinität an die Rezeptoren für NMB und GRP, den NMB-Rezeptor (BN1-Rezeptor), und den GRP-Rezeptor (BN2-Rezeptor). Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (40, 42, 43). Die Rezeptoren sind unter anderem in für die Energiehomöostase relevanten Regionen des ZNS exprimiert, wie z.B. im Hirnstamm und im Hypothalamus (40, 41, 43). Auch in gastrointestinalen Organen wie dem Darm, dem Magen und dem Pankreas befinden sich BN-Rezeptoren (40-42). Der BN1-Rezeptor ist neben der Regulation von zentralen

Prozessen wie Stress und der Thermoregulation auch an der Hemmung der Nahrungsaufnahme beteiligt (40, 41). Der BN2-Rezeptor ist physiologisch in die Regulation der Sekretion von Magensäure und Gallenblasenflüssigkeit sowie der Magenentleerung involviert (40). Zudem vermittelt er eine vermehrte Sekretion des exokrinen Anteils der Pankreas sowie die Sekretion homöostatisch relevanter Hormone wie Insulin, CCK, Peptide YY und Glukagon (40). Sowohl zentral als auch peripher wird der BN-Rezeptor 3 (BN3-Rezeptor) exprimiert, dessen natürlicher Ligand noch nicht identifiziert wurde (40, 44).

Bisher konnten zwar Bombesin-ähnliche Peptide, jedoch kein physiologisch vorhandenes Bombesin in Säugetieren detektiert werden (40). Die Injektion von Bombesin verursacht jedoch verschiedene pharmakologische Effekte in Gehirn, Gastrointestinaltrakt und in der Lunge (40). Des Weiteren stimuliert Bombesin die Sekretion verschiedener gastrointestinaler Hormone wie z.B. Gastrin, Insulin, Glucagon, Somatostatin oder Vasoactive intestinal peptide (VIP) (45, 46). Auf ZNS-Ebene beeinflusst das Peptid homöostatische Funktionen wie die Blutzucker-, Thermo-, und Blutdruckregulation und den Appetit (40). Ähnlich wie CCK hat auch Bombesin eine Bedeutung für die kurzfristige Hemmung der Nahrungsaufnahme bei Säugern (40). Anfangs bestand die Annahme, dass das Peptid seine Effekte auf die Beendigung der Nahrungsaufnahme ausschließlich über eine Verstärkung der endogenen CCK-Ausschüttung vermittelt (40). Der direkte Einfluss von Bombesin auf die CCK-Freisetzung ließ sich in einer Studie auch an Menschen beobachten. Hierbei führte die Gabe von Bombesin-Antagonisten (BIM26226) zu einer Hemmung der CCK-Freisetzung (47). Man konnte aber zeigen, dass Bombesin und CCK die Nahrungsaufnahme auf unterschiedliche Weise hemmen (48). Bombesin bewirkt also eine CCK-Freisetzung, verfügt aber vermutlich auch über einen eigenen Wirkmechanismus auf die Nahrungsaufnahme (40).

### **3.4 C-Fos als Marker von neuronaler Aktivität**

C-Fos ist ein Protoonkogen und ein Marker zur Detektion neuronaler Aktivität in Säugetieren. Das Protein gehört zu der Gruppe sogenannten *Immediately early genes*, wird in Neuronen auf einem basalen Niveau konstitutiv exprimiert und ist an der Mitregulation der Transkriptionsrate von Genen zellulärer Funktionen und des Zellmetabolismus beteiligt (49, 50). Für die Nutzung von c-Fos als Marker für neuronale Aktivität macht man sich die Tatsache zunutze, dass extrazelluläre Stimuli zu einer verstärkten Synthese von c-Fos führten. Dadurch lässt sich mittels immunhistochemischer Detektion dieses Proteins eine Aktivierung

von Neuronen infolge verschiedener externer Reize darstellen (50). Auf diese Weise ist es möglich, die zentrale Wirkung peripher und zentral injizierter Substanzen sowie deren Auswirkungen auf die Aktivierung in bestimmten Hirnregionen zu topographieren und die induzierte neuronale Aktivierung zu quantifizieren (50). Beispielsweise führt die periphere Applikation von CCK oder Bombesin zu einer vergrößerten Anzahl c-Fos-positiver Nervenzellen im NTS und im PVN (51-53).

### **3.5 Ziele der Arbeit**

Das Proteolipid Neuronatin scheint -sowohl peripher als auch auf zentraler Ebene- in die Regulation der Energiehomöostase involviert zu sein. Die Hirnkerne NTS und DMV sind wichtige Regulationszentren für die Vermittlung des Sättigungseffektes durch CCK und Bombesin (27, 40, 54, 55). Vom NTS ausgehende, katecholaminerge Projektionen sind ebenfalls an der Vermittlung der Sättigung beteiligt und werden durch peripheres CCK und Bombesin aktiviert (54, 56-58).

1. Auf dieser Grundlage soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob im NTS und im DMV Neuronatin-Nervenzellen immunhistologisch nachgewiesen werden können.
2. Weiterhin soll geprüft werden, ob die periphere Injektion von CCK-8S und Bombesin eine neuronale Aktivierung (c-Fos) von Neuronatin-Neuronen bewirkt. Dies könnte auf eine physiologische Bedeutung von Neuronatin in der Kurzzeitregulation von Hunger und Sättigkeit hindeuten.
3. Neuronatin-Neuronen sollen außerdem nach CCK- und Bombesin-Injektion immunhistochemisch auf Tyrosinhydroxylase untersucht werden. Die Tyrosinhydroxylase ist das Schlüsselenzym der Katecholaminbiosynthese und kann daher genutzt werden, um katecholaminerge Neuronen zu detektieren (56).

## 4. Methoden

Bei der ersten Nennung der verwendeten Chemikalien und Antikörper werden die Hersteller vollständig aufgeführt, anschließend wird lediglich der Name der Substanz angegeben. Alle Substanzen ohne Angabe des Herstellers wurden in *pro analysi*-Qualität von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

### 4.1 Peptidpräparation

Bombesin (Pyr-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>, Bachem AG, Heidelberg, Deutschland) wurde in sterilem Aqua bidest und sulphatiertes Cholecystokinin-Oktapeptid (CCK-8S, H-Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> (Bachem AG, Heidelberg, Deutschland) in sterilem Aqua bidest und 1% (v/v) 1 N NH<sub>4</sub>OH gelöst, zu 50 µl aliquotiert und bei -20° C gelagert. Direkt vor dem Beginn der Versuche wurden die Peptidlösungen jeweils mit steriler 0,15 M NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) zur gewünschten Konzentration verdünnt. Jede i.p. Injektion hatte ein Endvolumen von 500 µl. Für CCK-8S wurden die Dosierungen 5,2 und 8,7 nmol/kg Körpergewicht (6 und 10 µg/kg KG) und für Bombesin 26 und 32 nmol/kg KG (42 und 51 µg/kg KG) gewählt (51, 53). Die Peptidlösungen wurden unmittelbar vor der Injektion sofort auf Eis gelagert.

### 4.2 Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann Co., Borchon, Deutschland), die bei Ankunft ca. 180g wogen, wurden 21 Tage vor Versuchsbeginn unter konstanten Umgebungsbedingungen gehalten. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns wogen die Tiere 250-300 g. Die Unterbringung der Ratten erfolgte in Gruppen von drei bis vier Tieren in Makrolon-Käfigen. Die standardisierten Versuchsbedingungen bestanden aus einem konstanten zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus (Zwölf-Stunden-Intervalle mit Beginn der Tag-Phase um 6 Uhr morgens), einer Umgebungstemperatur von  $22 \pm 2$  ° und kontrollierter Luftfeuchtigkeit. Die Haltung erfolgte unter freiem Zugang zu Trinkwasser und Altromin® (Lage, Deutschland) Standardnahrung *ad libitum*. Nach einer Akklimatisierungsphase von

sieben Tagen wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 14 Tagen durch regelmäßiges Training (Handling) morgens zwischen 8 und 11 Uhr an die experimentellen Bedingungen gewöhnt, indem täglich die Prozedur der i.p. Injektion nachgeahmt wurde. Dieser Vorgang dient dazu, den Stress für die Tiere bei der Versuchsdurchführung zu reduzieren, um somit die Verfälschung der Studienergebnisse zu verhindern. Die Tierversuche wurden vom Arbeitsgruppenleiter entsprechend ethischer Richtlinien durchgeführt und durch die Tierschutzkommission und vom Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit genehmigt (Tierversuchsnummer G 0067/15).

### 4.3 Tierversuch

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von i.p. appliziertem CCK-8S und Bombesin in jeweils zwei Dosen auf die Anzahl c-Fos-, Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase (TH)-positiver Neuronen im NTS und DMV von Ratten untersucht. Den Versuchstieren wurden zwei verschiedene Konzentrationen von CCK-8S (5,2 und 8,7 nmol/kg KG) und Bombesin (26 und 32 nmol/kg KG) i.p. injiziert, um eventuelle dosisabhängige Unterschiede in der neuronalen Aktivierung zu erfassen. Die Versuchstiere wurden in fünf verschiedene randomisierte Gruppen eingeteilt. Die Gruppe 1 (Vehikelgruppe) bestand aus sieben Versuchstieren, während die anderen Versuchsgruppen aus je vier Tieren bestanden. Gruppe 1 erhielt eine i.p. Injektion von 0,15 M NaCl. Gruppe 2 erhielt 5,2 nmol/kg CCK-8S in 0,15 M NaCl und Gruppe 3 erhielt 8,7 nmol/kg CCK-8S in 0,15 M NaCl. Gruppe 4 erhielt eine Injektion von 26 nmol/kg Bombesin gelöst in 0,15 M NaCl und Gruppe 5 erhielt 32 nmol/kg Bombesin in 0,15 M NaCl. Alle Injektionen wurden stets im gleichen Zeitraum (zwischen 10:00 und 10:30 Uhr), 3,5-4 Stunden nach Beginn der Tag-Phase, durchgeführt. Die Tiere erhielten Nahrung und Wasser *ad libitum*. Jeweils 90 min vor der transkardialen Perfusion wurde entweder das jeweilige Peptid oder die Vehikellösung i.p. injiziert. Nach der Injektion hatten die Versuchstiere weiterhin freien Zugang zu Nahrung und Wasser. 90 Minuten nach der i.p. Peptid- bzw. Kochsalz-Injektion wurden die Versuchstiere mit Ketamin (Ketanest®, DeltaSelect, Dreieich, Deutschland, 100 mg/kg KG) und Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland, 10 mg/kg KG) in Narkose versetzt. Um die Bildung von Thromben zu vermeiden, wurden jedem Versuchstier 2500 U Heparin (Liquemin®, Hoffman-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) i.p. injiziert. Anschließend wurde eine transkardiale Perfusionsfixierung durchgeführt (52).



#### **4.4 Herstellung der Gewebeproben**

Nach der Perfusion wurde die Ratte mit einem Skalpell oberhalb der Claviculae dekapitiert und das Gehirn freigelegt. Die Gehirne wurden über 2 Stunden bei 4 °C in einer 5%igen Saccharose-Lösung gelagert sowie anschließend mit Hilfe einer Gehirn-Matrix (Technisches Forschungslabor der Charité, Berlin, Deutschland) in 1,0 bis 4,5 mm große Koronarsegmente geteilt. Um Gefrierschutz und eine weitere Auswaschung von ungebundenem Fixiermittel zu erzielen, wurden die Gehirnblöcke bei einer Temperatur von 4 °C mit einem aufsteigenden Saccharosegradienten dehydriert. Zuerst wurde eine 15%ige (w/v) Saccharose-Lösung verwendet, in der die Koronarsegmente 12 Stunden lang aufbewahrt wurden. Nachdem die Gehirnblöcke abgesunken waren, wurden sie für weitere 12 Stunden in 27,3%iger (w/v) Saccharose-Lösung gelagert. Nach der Dehydrierung wurden die Gehirnblöcke mittels *Tissue Tec* (Bio Optica, Milano, Italien) auf beschrifteten Korkscheiben fixiert und 20 Minuten lang in gekühltem Hexan bei – 80 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurden die schockgefrorenen Koronarsegmente zum Abdampfen des Hexans für 30 Minuten bei einer Temperatur von -20 °C gelagert. Um das Austrocknen der Gehirnsegmente während der anschließenden Kühlung bei -80 °C zu vermeiden, erfolgte die Lagerung in Plastikgefäßen, die mit 3 ml pulverisiertem gefrorenem Wasser befüllt waren. Im Anschluss wurden am Kryostaten 25 µm dünne koronare Gefrierschnitte vom Hirnstamm angefertigt, in welchem sich sowohl der NTS als auch der DMV befinden. Die gewonnenen Gehirnschnitte wurden dann in Gewebekulturschalen (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) übertragen, wo sie frei in Phosphatpuffer (engl.: phosphate buffered saline, PBS) flottierten. Die 0,5 M konzentrierte Stammlösung PBS besteht aus 249,46 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $2\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 35,28 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), welche unter Erwärmung in 2 Liter *aqua bidest* gelöst wurden. Der pH-Wert wurde auf einen Wert von 7,4 eingestellt.

#### **4.5 Immunhistochemische Dreifachmarkierung zur Darstellung von c-Fos, Neuronatin und Tyrosinhydroxylase**

Nach Absaugen der PBS-Lösung wurden die Gehirnschnitte für 15 Minuten in 1% (w/v) Natriumborhydrid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Das in 0,1 M PBS, pH 7,4 gelöste Natriumborhydrid führt zu einer reduzierten Aldehyd-induzierten Hintergrund-Fluoreszenz des Gewebes (59). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die überschüssige Natriumborhydrid-Lösung durch dreimaliges Waschen (1 x 5 min, 1 x 20 min

und 1 x 30 min) mit 0,1% (w/v)  $\text{NaN}_3$  in PBS (PBS- $\text{NaN}_3$ ) aus dem Gewebe entfernt. Im nächsten Arbeitsschritt folgte die Inkubation mit Blockierungsmittel bestehend aus 1% (w/v) Serum-Rinderalbumin (BSA, Sigma, St. Louis, USA), 0,3% (w/v) Triton-X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland), 0,1% (w/v)  $\text{NaN}_3$  und 0,05% (v/v) Phenylhydrazin in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Durch diesen Inkubationsschritt sollen unspezifische Bindungen der Antikörper an das Gewebe verhindert werden. Phenylhydrazin bewirkt eine Hemmung endogener Peroxidasen im Gewebe. Anschließend folgte die Immunmarkierung zum Nachweis von c-Fos. Dazu wurde der Primär-Rabbit-Anti-Rat c-Fos-Antikörper (Oncogene Research Products, Boston, MA, USA) 1:4000 in 0,3 % (w/v) Triton-X-100 und 5 % (w/v) BSA in PBS- $\text{NaN}_3$  gelöst und jeweils 250  $\mu\text{l}$  dieser Lösung auf jeden Schnitt gegeben. Die Gehirnschnitte wurden für 24 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Danach wurde nicht gebundener Primärantikörper mit dreimaligem Waschen in PBS- $\text{NaN}_3$  (1 x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 60 min) entfernt. Darauf folgte die Vorinkubation der Gehirnschnitte mit 1% (w/v) BSA in PBS- $\text{NaN}_3$  für 60 Minuten. Der Sekundär-Goat-Biotin-SP-conjugated-Anti-Rabbit IgG-Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) wurde 1:1000 in Blockierungslösung (1% w/v BSA in PBS- $\text{NaN}_3$ ) verdünnt. Im Anschluss wurde auf jeden Gewebeschnitt 250  $\mu\text{l}$  dieser Antikörper-Lösung gegeben und für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS (1 x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 60 min) wurden die Gewebeschnitte mit einem in der Konzentration 1:200 in PBS verdünnten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC-Komplex, Vector Laboratories, Peterborough, UK) inkubiert. Nach 6-stündiger Einwirkzeit folgten erneut drei PBS-Waschschritte (1 x 10 min, 1 x 20 min, 1x 60 min). Nach diesem Arbeitsschritt wurden die Gewebeschnitte in Boratpuffer mit einem pH von 7,4 bei Raumtemperatur für weitere 60 Minuten inkubiert. Unmittelbar danach folgte ein Amplifikationsschritt mit Tyramide-Lösung (PerkinElmer, Waltham, USA). Das hierbei verwendete Tyramide war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin (TRITC) gekoppelt. Die Tyramide-Lösung wurde im Verhältnis von 1:300 in Boratpuffer, pH 7,4, verdünnt und mit 0,003% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  versetzt. Die Gehirnschnitte wurden für 10 Minuten in dieser Lösung inkubiert und dann dreimal in PBS gewaschen (1 x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 20 min). Zum Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Gehirnschnitte für 60 Minuten in einer Lösung mit 1% (w/v) BSA und 0,1% (w/v)  $\text{NaN}_3$  in PBS inkubiert. Danach wurde der zweite Primärantikörper auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Hierzu wurde der Primär-Anti-Rabbit Neuronatin-Antikörper (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, USA) 1:400 in 1% BSA in PBS- $\text{NaN}_3$  verdünnt und je 250  $\mu\text{l}$  dieser Lösung pro

Gehirnschnitt aufgetragen. Nach 48 Stunden wurde nicht gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-NaN<sub>3</sub> (1x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 60 min) entfernt. Erneut wurde eine Vorinkubation bestehend aus 1% (w/v) BSA in PBS-NaN<sub>3</sub> für 60 Minuten auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugierten Sekundär-Goat Anti-Rabbit IgG-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:400 in einer Lösung aus 1% (w/v) BSA in PBS mit 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub> verdünnt. Danach wurden jeweils 250 µl auf die Gewebeschnitte aufgetragen und für 12 Stunden inkubiert. Überschüssige, nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS-NaN<sub>3</sub> (1x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 30 min) aus den Präparaten entfernt. Der Primär-Anti-Mouse Tyrosinhydroxylase-Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) wurde in einer Konzentration von 1:6000 in einer Lösung mit 1% (w/v) BSA in PBS verdünnt. Jeder Gehirnschnitt wurde mit 250 µl benetzt und für 24 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-NaN<sub>3</sub> (1x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 60 min) wurde der Sekundärantikörper aufgetragen. Der mit dem Fluorochrom Alexa Fluor™ 633 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) konjugierte Goat-Anti-Mouse IgG-Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:400 mit PBS-NaN<sub>3</sub> verdünnt. Von der Lösung wurden je 250 µl je Gehirnschnitt aufgetragen und für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1x 10 min, 1 x 20 min, 1 x 60 min) wurde die Inkubation beendet. Die Gegenfärbung mit dem Fluorochrom 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma, St. Louis, USA) dient zur Auffindung der Hirnkerngebiete. DAPI ist ein Fluorochrom, das Zellchromatin anfärbt. Hierzu wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten mit jeweils 150 µl DAPI-Lösung versehen (2 µg DAPI in 1 ml PBS). Das Gewebe wurde dreimal mit PBS gewaschen (1x 5 min, 1 x 10 min, 1 x 15 min), um das nicht gebundene DAPI zu entfernen. Im Anschluss folgte die Einbettung mit Eindeckmittel (100 mg/ml 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane (DABCO), Sigma, St.Louis, USA; in 90% v/v Glycerin, 10 % v/v PBS, pH 7,4). Die Anwendung von DABCO sorgt für den Fluoreszenzerhalt der Fluorochrome nach Anregung durch das Laser-Scanning-Mikroskop. Nachdem ein Deckglas auf die Gewebeschnitte aufgebracht wurde, wurden diese bei -20 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

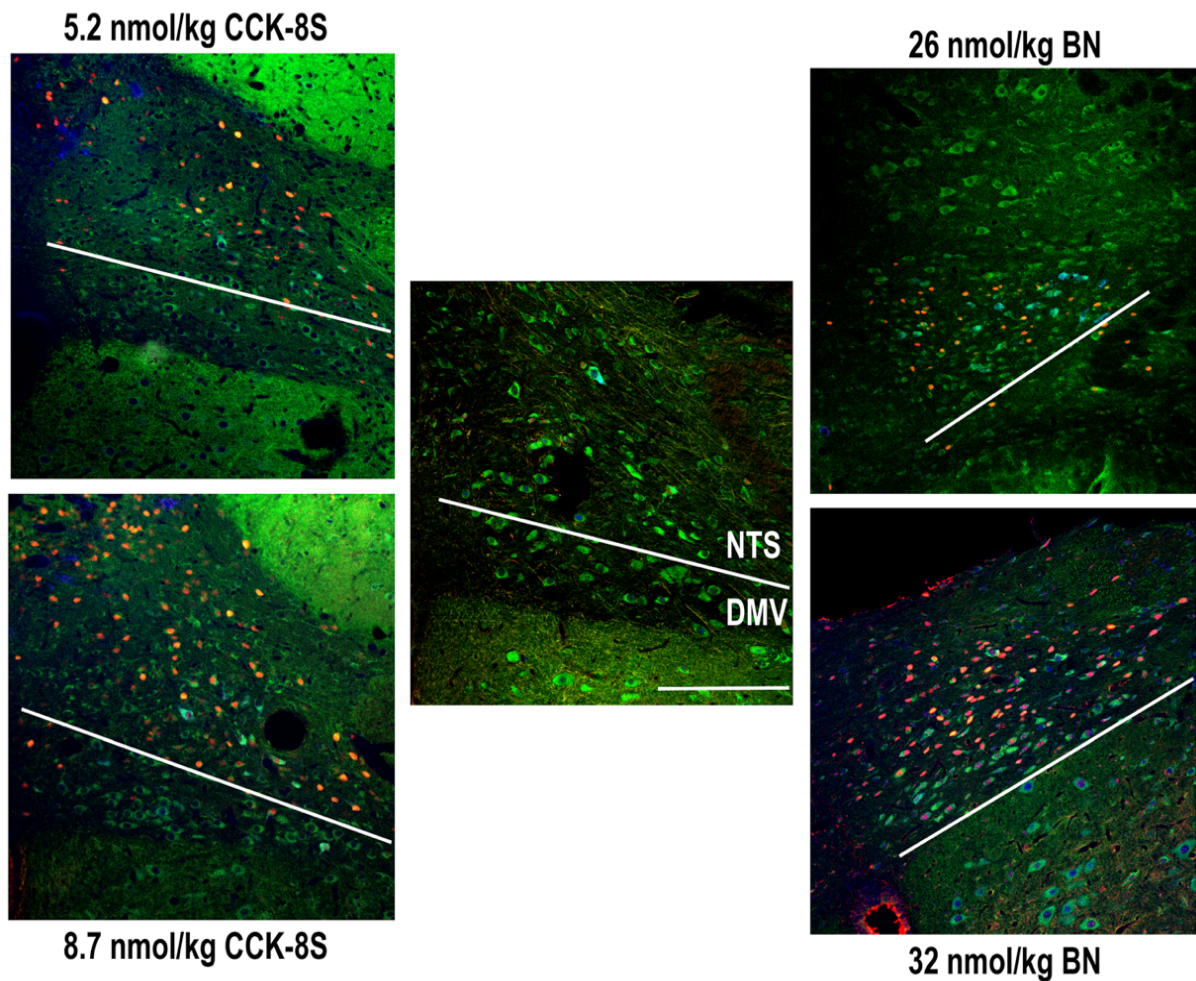
## 4.6 Datenerhebung und statistische Auswertung

Nach erfolgter Immunmarkierung wurde jeder dritte Gehirnschnitt unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM 760, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) analysiert. Am cLSM wurde der Grad der neuronalen Aktivierung in den Hirnstammregionen NTS und DMV (Bregma -13,24 bis -14,30 mm) beurteilt. Die Bereiche der Hirnkerne wurden mit Hilfe des Atlas von Paxinos und Watson festgelegt (60). Neuronen, deren Zellkern ein rotes Fluoreszenzsignal zeigte, galten als c-Fos-positiv. Neuronen mit grün fluoreszierendem Zytoplasma galten als Neuronatin-positiv und Neuronen mit blau fluoreszierendem Zytoplasma als Tyrosinhydroxylase-positiv. Nur Neuronen mit sowohl grünem als auch blauem Fluoreszenzsignal (türkises Signal) im Zytoplasma wurden als zweifach positiv für Neuronatin und Tyrosinhydroxylase gewertet. Die Anzahl der für c-Fos-, Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase positiven Neuronen wurde pro Gehirnschnitt dokumentiert. Anschließend wurde jeweils der Mittelwert pro Gehirnschnitt im NTS und DMV berechnet. Die Anzahl der einfach-, zweifach- und dreifach-positiven Neuronen wurde ebenfalls bestimmt und der Mittelwert pro Gehirnschnitt und pro Ratte berechnet. Die Quantifizierung der immunhistologischen Signale erfolgte verblindet. Für die statistische Analyse der Rohdaten wurde die Statistiksoftware SigmaStat 3.1. verwendet. Alle Daten wurden als Mittelwert (engl.: Mean)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (engl.: Standard error of mean, SEM) dargestellt. Die Daten wurden entweder mithilfe von Varianzanalyse (ANOVA) oder bei von der Normalverteilung abweichenden Daten mithilfe des Kruskal-Wallis-H-Testes (ANOVA on ranks) analysiert. Auftretende Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Least Significant Difference-Test (Fischer) oder dem Dunn-Test ausgewertet. Bei  $p < 0,05$  galt der Unterschied als statistisch signifikant.

## 5. Ergebnisse

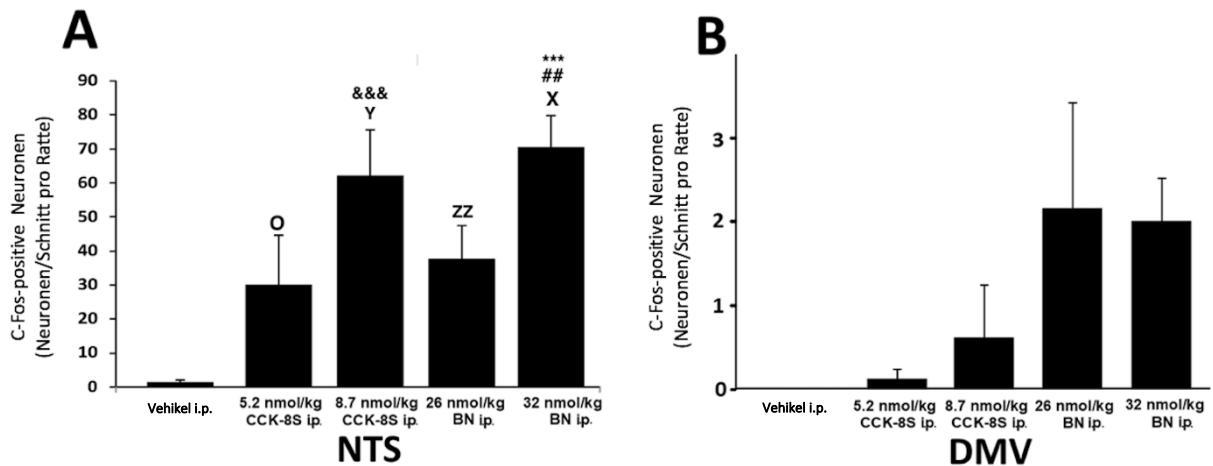
### 5.1 Effekte von Cholecystokin-8S und Bombesin auf die neuronale Aktivierung im Nucleus Tractus Solitarius

Die i.p. Injektion von CCK-8S führte in Abhängigkeit von der Dosis (5,2 oder 8,7 nmol/kg) zu einer signifikant erhöhten Anzahl von c-Fos-positiven NTS-Neuronen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert  $\pm$  SEM:  $1,2 \pm 0,9$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, siehe *Abbildung 1 und 2A*) führten 5,2 nmol/kg CCK-8S (Mittelwert  $\pm$  SEM:  $30 \pm 15$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.025$ ) zu einen 25-fachen Anstieg während 8,7 nmol/kg CCK-8S einen 51-fachen Anstieg der c-Fos-positiven Neuronen im NTS bewirkten ( $62 \pm 14$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.001$ , siehe *Abbildung 1 und 2A*). Auch die Injektion von Bombesin führte zu einer signifikanten, dosisabhängigen Erhöhung der Anzahl c-Fos-positiver Neuronen im NTS. Die Dosis von 26 nmol/kg Bombesin führte zu einem 31-fachen Anstieg ( $38 \pm 8$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.007$ ) und 32 nmol/kg Bombesin zu einem 59-fachen Anstieg der aktivierten Neuronen ( $71 \pm 8$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.001$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $1,2 \pm 0,9$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, siehe *Abbildung 1 und 2A*). Im NTS konnten zahlreiche Neuronatin-Neuronen beobachtet werden. Im Vergleich zur Vehikelgruppe ( $62 \pm 5$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) zeigte sich weder ein signifikanter Anstieg der Neuronatin-Neuronen nach der Injektion von 5,2 und 8,7 nmol/kg CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK:  $69 \pm 5$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $69 \pm 10$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0.05$ ) noch von 26 und 32 nmol/kg Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $71 \pm 4$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $58 \pm 3$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0.05$ , siehe *Abbildung 3A*). Auch die Nervenfortsätzen einiger Neuronatin-Neuronen waren positiv für Neuronatin (siehe *Abbildung 10*). Zudem konnte beobachtet werden, dass der Neuronatin-Antikörper in vesikulären Strukturen lokalisiert vorliegt (siehe *Abbildung 10*). Nach Injektion von 5,2 nmol/kg CCK-8S ( $19 \pm 9$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.011$ ) sowie 8,7 nmol/kg CCK-8S ( $38 \pm 7$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.001$ ) wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0,8 \pm 0,6$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, siehe *Abbildung 1 und 4A*) eine erhöhte Anzahl c-Fos-positiver Neuronatin-Neuronen im NTS festgestellt. 8,7 nmol/kg CCK-8S führten zu einer zweifach erhöhten Anzahl neuronal aktivierter Neuronatin-Neuronen ( $38 \pm 7$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) im Vergleich zur mit 5,2 nmol/kg CCK-8S behandelten Gruppe ( $19 \pm 9$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.017$ ). Auch



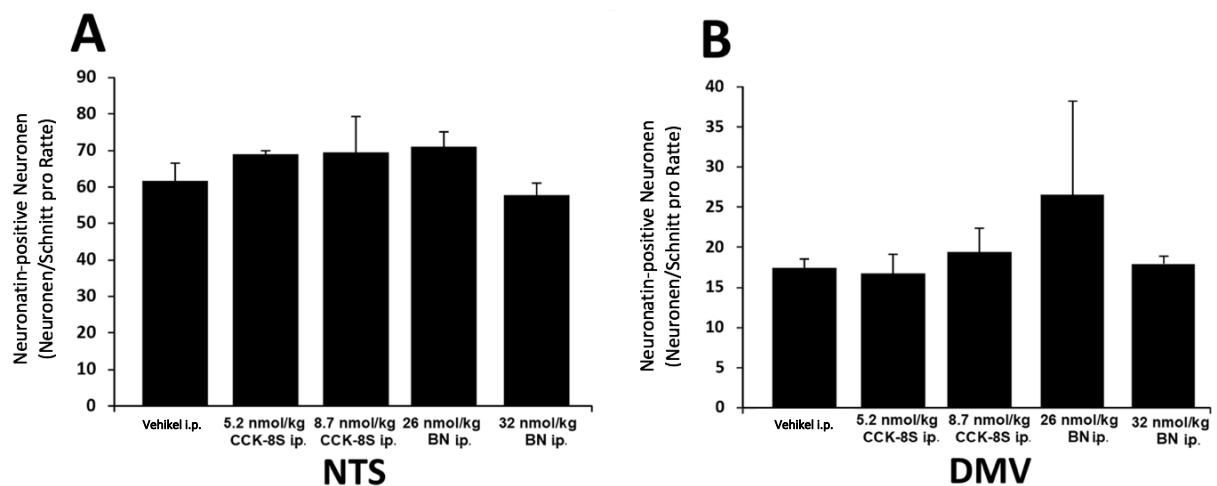
**Abbildung 1: Repräsentative Abbildungen der immunhistochemischen Darstellung der neuronalen Aktivitätsmarker c-Fos, Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) der Ratte (61)**

90 Minuten nach der i.p. Applikation von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg) und Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg) zeigte sich im Vergleich zur mit 0,15 M NaCl behandelten Vehikelgruppe (mittlere Abbildung) ein signifikanter, dosisabhängiger Anstieg der c-Fos-positiven Neuronen (rotes Fluoreszenzsignal) im NTS, jedoch nicht im DMV. Während eine vergrößerte Anzahl von aktivierten (c-Fos-positiven) Neuronatin-positiven (grünes Fluoreszenzsignal) Neuronen sowohl nach Injektion von CCK-8S als auch von Bombesin beobachtet werden konnte, blieb die Anzahl der Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen (blaues Fluoreszenzsignal) im Vergleich zur Vehikelgruppe unverändert. Weiterhin zeigte sich nach der Injektion von Bombesin eine erhöhte Anzahl aktivierter, Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase-positiver Neuronen im NTS, nicht jedoch im DMV. Die weiße Linie markiert die Grenze zwischen NTS und DMV im Hirnstamm. Die anatomischen Grenzen beruhen auf dem stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (60). Der weiße Balken repräsentiert 200 µm. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV= Dorsaler Motornucleus des Vagus



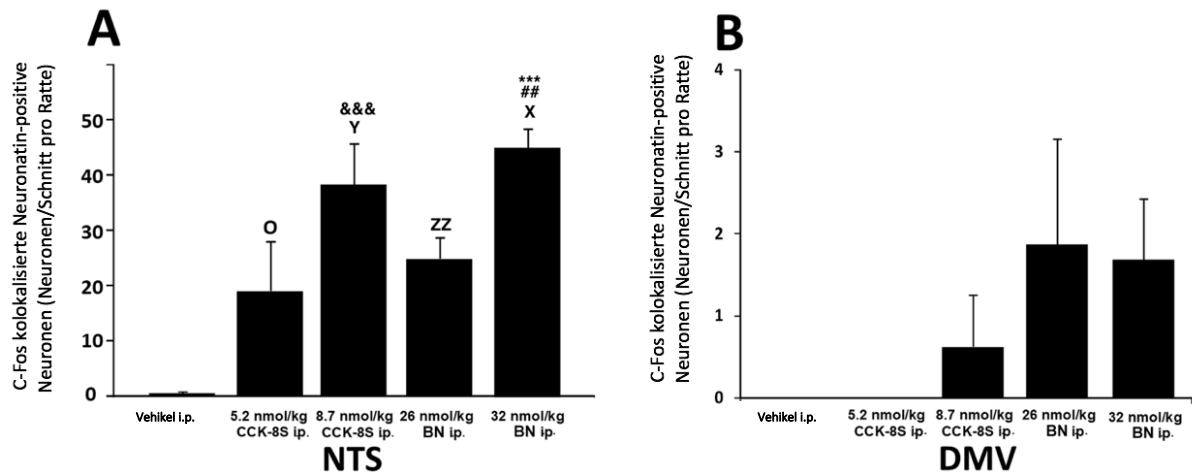
**Abbildung 2: Die Wirkung von CCK-8S und Bombesin auf die Anzahl c-Fos-positiver Neuronen im Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) (modifiziert nach (61))**

90 min nach der i.p. Applikation von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) und Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4) zeigte sich im NTS eine signifikante, dosisabhängig erhöhte Anzahl der c-Fos-Signale im Vergleich zur Vehikelgruppe (n=7) (A). Im DMV führte die Injektion der beiden Peptide zu keinem signifikanten Anstieg der c-Fos-positiven Neuronen (B). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. \*\*\* p < 0.001, ## p < 0.01, X p < 0.05 vs. Vehikel, vs. 5.2 nmol/kg CCK-8S und vs. 26 nmol/kg BN; ZZ p < 0.01 vs. Vehikel; &&& p < 0.001, Y p < 0.05 vs. Vehikel, vs. 5.2 nmol/kg CCK-8S; O p < 0.05 vs. 5.2 nmol/kg CCK-8S. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV=Dorsaler Motornucleus des Vagus



**Abbildung 3: Neuronatin-positive Neuronen im Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) (modifiziert nach (61))**

Die Anzahl der Neuronatin-positiven Neuronen zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=7) weder im NTS (A) noch im DMV (B) einen signifikanten Anstieg 90 min nach der i.p. Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) oder Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV= Dorsaler Motornucleus des Vagus

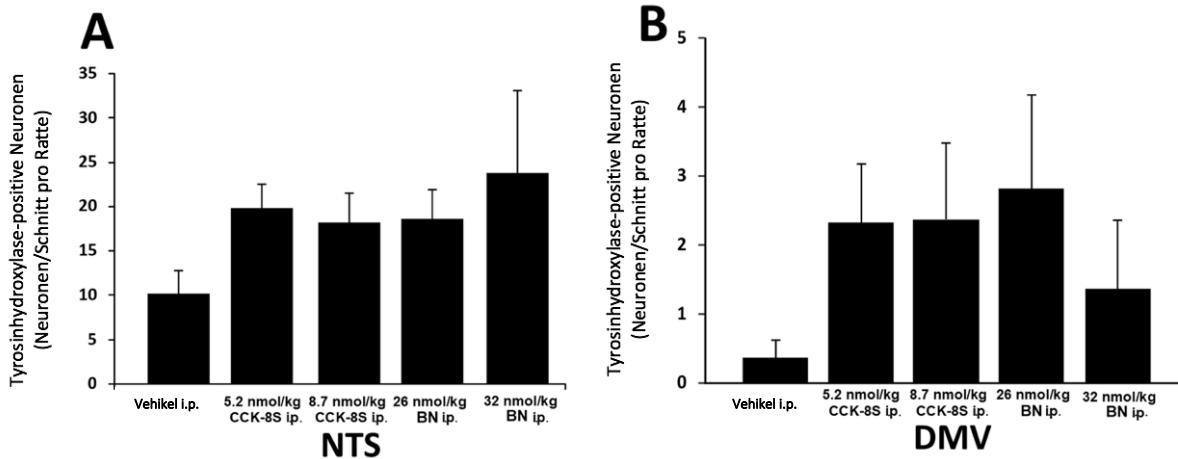


**Abbildung 4: C-Fos-Signale in Neuronatin-Neuronen des Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) nach Injektion von CCK-8S und Bombesin (modifiziert nach (61))**

Die periphere Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) und Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4) führte nach 90 min im Vergleich zur Vehikelgruppe zu einer dosisabhängig vermehrten Anzahl aktivierter (c-Fos-positiver) Neuronatin-positiver Neuronen im NTS (A). Im DMV zeigte sich nach Peptidinjektion kein signifikanter Effekt auf die Anzahl der aktivierten Neuronatin-positiven Neuronen (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. \*\*\*  $p < 0.001$ , ##  $p < 0.01$ , <sup>x</sup>  $p < 0.05$  vs. Vehikel, vs. 5.2 nmol/kg CCK-8S, und vs. 26 nmol/kg CCK-8S; <sup>ZZ</sup>  $p < 0.01$  vs. Vehikel, &&&  $p < 0.001$ , <sup>Y</sup>  $p < 0.05$  vs. Vehikel und vs. 5.2 nmol/kg CCK-8S, <sup>O</sup>  $p < 0.05$  vs. Vehikel. NTS= Nucleus Tractus Solitarius, DMV= Dorsaler Motornucleus des Vagus

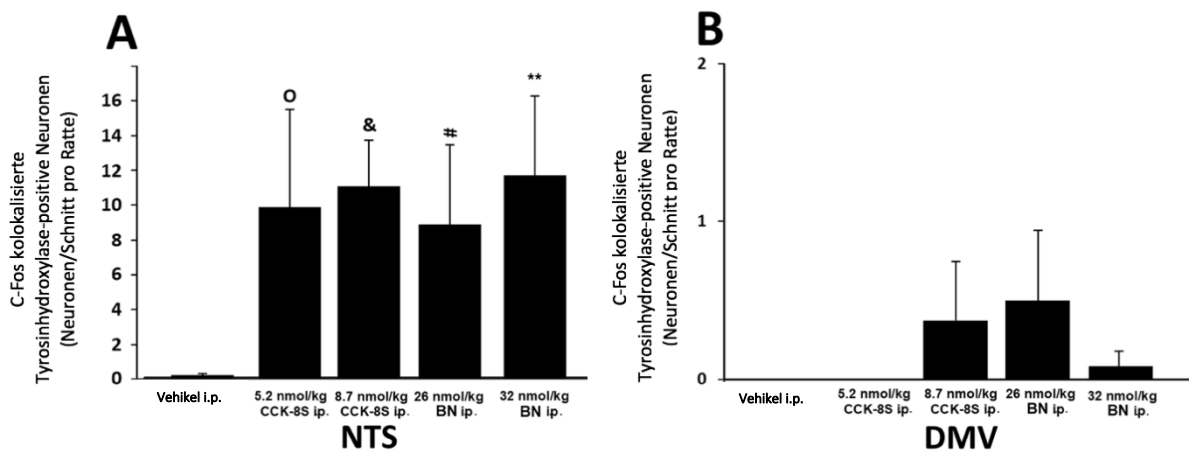
Bombesin bewirkte eine dosisabhängige erhöhte Anzahl neuronaler Aktivierungssignale (c-Fos) von Neuronatin-positiven Nervenzellen (26 nmol/kg Bombesin:  $25 \pm 4$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $45 \pm 3$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.002$  und  $p = 0.001$ ) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $0,15$  m NaCl;  $0,8 \pm 0,6$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, siehe *Abbildung 1 und 4A*). Die Injektion von 32 nmol/kg Bombesin aktivierte eine 1,8-fach erhöhte Anzahl von Nervenzellen im Vergleich zur niedrigeren Dosis ( $p = 0.013$ , siehe *Abbildung 4A*). Neben Neuronatin-positiven Neuronen wurden auch Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen im NTS aller Behandlungsgruppen beobachtet. Auch die Anzahl der Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $10 \pm 3$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) weder durch CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $9 \pm 4$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $16 \pm 2$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) noch durch Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $19 \pm 3$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $24 \pm 8$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 5A*) statistisch signifikant an. Die Untersuchung der Tyrosinhydroxylase-Neuronen auf zelluläre Kolokalisation mit dem neuronalen Aktivitätsmarker c-Fos zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0.2 \pm 0.1$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) einen signifikanten Anstieg von





**Abbildung 5: Tyrosinhydroxylase-positive Neuronen im Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S und Bombesin (modifiziert nach (61))**

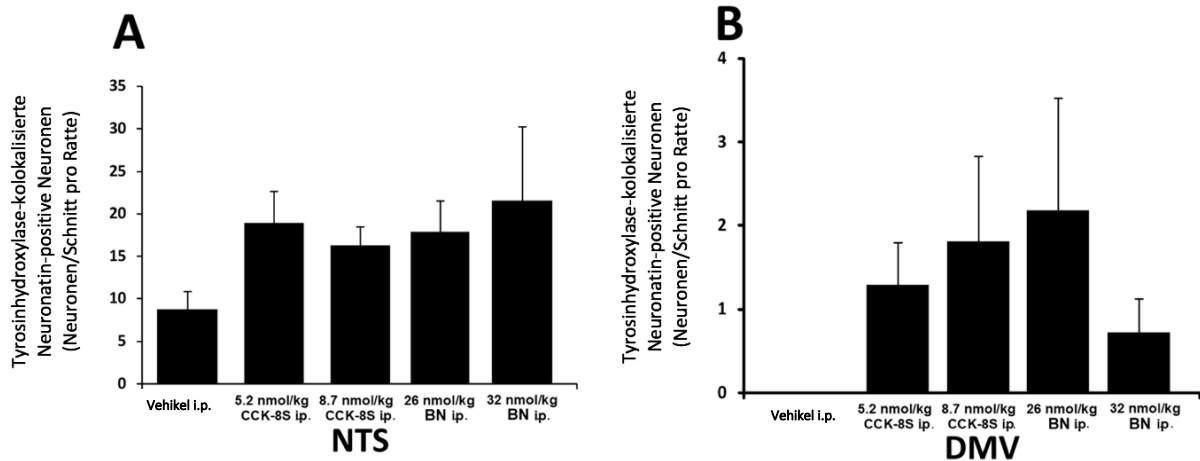
Die i.p. Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) oder Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4) zeigte nach 90 min im Vergleich zur Vehikelgruppe (n=7) keinen Effekt auf die Anzahl von Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen im NTS (A) oder im DMV (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV=Dorsaler Motornucleus des Vagus



**Abbildung 6: Wirkung von intraperitoneal injiziertem CCK-8S und Bombesin auf die Anzahl c-Fos-positiver Signale in Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen des Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) (modifiziert nach (61))**

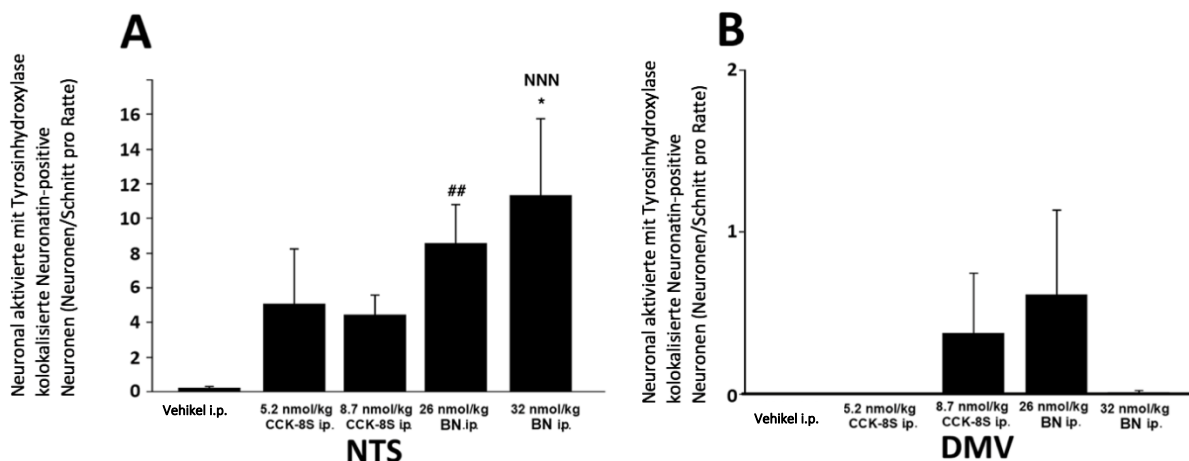
90 Minuten nach der i.p. Injektion von 5,2 nmol/kg bzw. 8,7 nmol/kg CCK-8S (n=4) und 26 nmol/kg bzw. 32 nmol/kg Bombesin (BN, n=4) war verglichen mit der Vehikelgruppe (n=7) ein statistisch signifikant erhöhte Anzahl der c-Fos-aktivierten Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen im NTS (A), jedoch nicht im DMV (B) zu beobachten. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. \*\* p = 0,01, #p < 0,05, &p < 0,05, O p < 0,05 vs. Vehikel. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV= Dorsaler Motornucleus des Vagus

aktivierten Tyrosinhydroxylase-Neuronen sowohl nach der Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $10 \pm 6$  und 8,7 nmol/kg CCK-11  $\pm 3$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.026$  und  $p = 0.014$ ) als auch von Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $9 \pm 2$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $12 \pm 4$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.043$  und  $p = 0.01$ , siehe Abbildung 6A). Zwischen den verschiedenen Dosen von CCK-8S und Bombesin bestand kein signifikanter Unterschied. Die Untersuchungen zeigten, dass Neuronatin-Neuronen teilweise auch Tyrosinhydroxylase-positiv waren. Die Anzahl der sowohl Neuronatin- als auch Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied nach der Behandlung mit CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $19 \pm 4$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $16 \pm 2$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) oder mit Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $18 \pm 4$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $22 \pm 8$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) im Vergleich zur Vehikelgruppe ( $9 \pm 2$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe Abbildung 7A). Nach der i.p. Injektion von CCK-8S oder Bombesin kam es zu einem Anstieg der Anzahl von aktivierten, c-Fos-positiven Neuronen im NTS, bei denen partiell eine Kolo-kalisation von Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Zytoplasma vorlag (siehe Abbildungen 8 A, 9 A und B). In Abbildung 9 ist die immunhistochemische Dreifachfärbung der Antigene nach Injektion von 8,7 nmol/kg CCK-8S und 32 nmol/kg Bombesin repräsentativ dargestellt. Nach Injektion von CCK-8S und Bombesin zeigte sich das rote c-Fos-Signal im Kern, während die Fluoreszenzsignale von Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Zytoplasma auftraten und bei Überlagerung ein türkises Signal ergaben. Die Behandlung mit Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $9 \pm 2$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $11 \pm 4$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p = 0.09$  und  $p = 0.001$ , siehe Abbildung 8 A) induzierte gegenüber der Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Zunahme aktivierter, mit Tyrosinhydroxylase kolo-kalisierter Neuronatin-Neuronen. Zwischen den verschiedenen Dosen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied beobachtet werden ( $9 \pm 2$  und  $11 \pm 4$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe Abbildung 8 A). Nach der Injektion von CCK-8S zeigte sich ein Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe, dieser war im Gegensatz zu Bombesin nicht statistisch signifikant ( $0,2 \pm 0,1$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe Abbildungen 8 A).



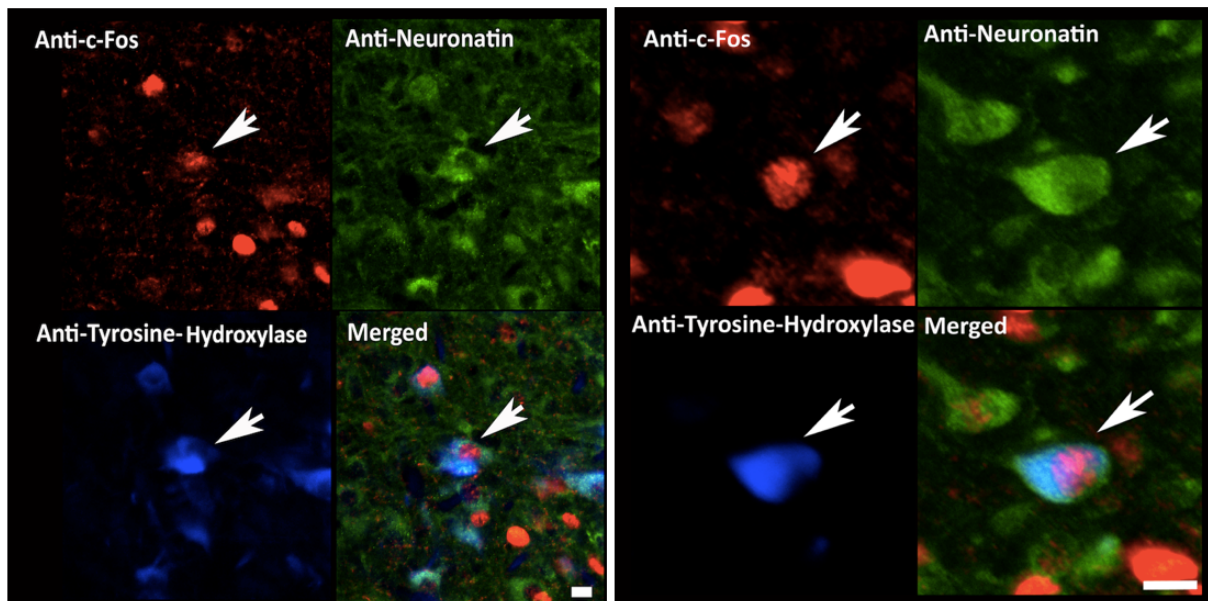
**Abbildung 7: Mit Tyrosinhydroxylase kolokalisiert vorliegende Neuronatin-Neuronen im Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) (modifiziert nach (61))**

Die i.p. Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) oder Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4) zeigte nach 90 min im Vergleich zur Vehikelgruppe keinen Effekt auf die Anzahl der mit Tyrosinhydroxylase kolokalisiert vorliegenden Neuronen im NTS (A) und im DMV (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben: NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV=Dorsaler Motornucleus des Vagus



**Abbildung 8: Die Wirkung von CCK-8S und Bombesin auf die Anzahl c-Fos-positiver Signale in Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen des Nucleus Tractus Solitarius (NTS) und Dorsomedialen Nucleus des Vagus (DMV) (modifiziert nach (61))**

Im NTS lagen aktivierte Neuronatin-Neuronen 90 min nach der i.p. Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg oder 8,7 nmol/kg, je n=4) und Bombesin (BN, 26 nmol/kg oder 32 nmol/kg, je n=4) teilweise mit Tyrosinhydroxylase kolokalisiert vor. Nach der Injektion zeigte sich ein signifikanter Anstieg der für alle drei Antigene positiven Neuronen im Vergleich zur Vehikelgruppe (n=7), während durch die i.p. Injektion von CCK-8S keine statistische Signifikanz erreicht wurde (A). Im DMV wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben. <sup>NNN</sup>p < 0.001, \*p < 0.05 vs. Vehikel und vs. 8.7 nmol/kg CCK-8S; ##p < 0.01 vs. Vehikel. NTS=Nucleus Tractus Solitarius, DMV= Dorsaler Motornucleus des Vagus

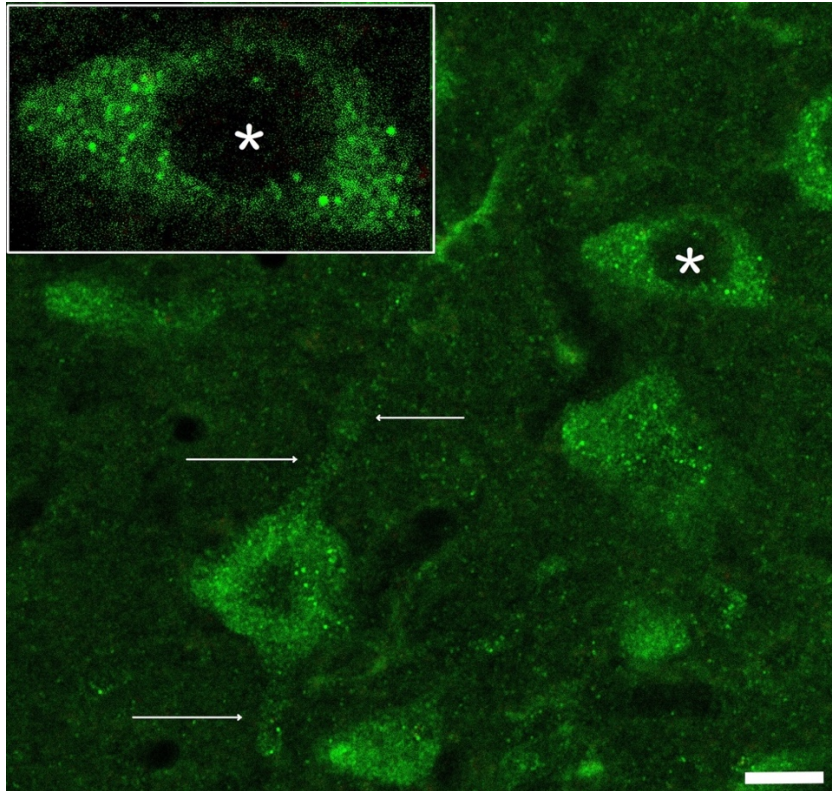
**A****B**

**Abbildung 9: Repräsentative Darstellung der immunhistochemischen Dreifachfärbung der Antigene c-Fos, Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Nucleus Tractus Solitarius nach Injektion von 8,7 nmol/kg CCK-8S und 32 nmol/kg Bombesin (61)**

90 Minuten nach i.p. Injektion von CCK-8S (A) und Bombesin (B) lassen sich in Neuronen des NTS mithilfe immunhistochemischer Markierungen Signale sowohl für c-Fos (rotes Fluoreszenzsignal), als auch für Neuronatin (grünes Fluoreszenzsignal) und Tyrosinhydroxylase (blaues Fluoreszenzsignal) darstellen. Die Vergrößerung zeigt, dass die c-Fos-positiven Signale im Zellkern der Neuronen lokalisiert sind, während Tyrosinhydroxylase und Neuronatin im Zytoplasma vorliegen. In den aktivierten Zellen (c-Fos positiv) sind Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Zytoplasma partiell kolokalisiert. Nach Überlagerung der einzelnen Farbkanäle der Darstellungen von c-Fos, Neuronatin und Tyrosinhydroxylase ergibt sich durch die Überlagerung von Neuronatin und Tyrosinhydroxylase ein türkises Fluoreszenzsignal im Zytoplasma der Neuronen (Pfeil). Der weiße Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

## **5.2 Effekte von Cholecystokin-8S und Bombesin auf die neuronale Aktivierung im Dorsalen Motornucleus des Vagus**

Die i.p. Injektion von 5,2 bzw. 8,7 nmol/kg CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $0,13 \pm 0,13$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $0,63 \pm 0,63$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) und 26 bzw. 32 nmol/kg Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $2,2 \pm 1,3$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $2,01 \pm 0,5$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 1 und 2B*) bewirkte im Dorsalen Motornucleus des Vagus (DMV) keine statistisch signifikant erhöhte Anzahl von c-Fos positiven Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $0 \pm 0$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p >$



**Abbildung 10: Vergrößerte mikroskopische Darstellung von Neuronatin-Neuronen im Nucleus Tractus Solitarius (61)**

Bei stärkerer Vergrößerung zeigt sich, dass einige der Neuronen im NTS über Neuronatin-positive Nervenfasern verfügen (weiße Pfeile). Bei weiterer digitaler Vergrößerung eines Neurons (mit Stern gekennzeichnet, siehe weißer Kasten) ist erkennbar, dass sich im Neuronatin-positiven Zellkörper vesikelförmige Strukturen befinden, die ebenfalls mit dem Neuronatin-Antikörper markiert sind. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

0,05). Ähnlich wie im NTS führte die Behandlung mit den beiden Dosen CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $17 \pm 3$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $19 \pm 3$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) oder Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $27 \pm 12$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $18 \pm 1$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) nicht zu einer statistisch signifikant vergrößerten Anzahl der beobachteten Neuronatin-Neuronen im Vergleich zur Vehikelgruppe ( $17 \pm 1$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 3B*). Daher zeigte sich auch keine signifikant erhöhte Anzahl c-Fos-positiver Neuronatin-Neuronen nach der Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $0 \pm 0$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $0,63 \pm 0,63$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, jeweils  $p > 0,05$ ) oder Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $1,88 \pm 1,29$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $1,68 \pm 0,65$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, jeweils  $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 4B*). Im DMV wurden weder nach der i.p. Injektion mit Vehikel-Lösung ( $0,36 \pm 0,26$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) noch nach i.p. Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $2,33 \pm 0,84$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $2,38 \pm 1,1$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p >$

0,05) oder Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $2,82 \pm 1,35$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $1,37 \pm 0,71$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) eine statistisch signifikante Anzahl von Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen beobachtet ( $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 5B*). Hierbei führte im Vergleich zum Vehikel ( $0 \pm 0$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) weder die periphere Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $1,29 \pm 0,52$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $1,81 \pm 1,02$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ ) noch von Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $2,19 \pm 1,34$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $0,72 \pm 0,26$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe *Abbildung 7B*) zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Neuronen im DMV, in denen Tyrosinhydroxylase und Neuronatin kolokalisiert vorlagen. Weiterhin zeigte sich keine statistisch signifikant erhöhte Anzahl c-Fos-positiver Tyrosinhydroxylase-Neuronen nach CCK-8S-Injektion (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $0 \pm 0$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $0,38 \pm 0,38$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) oder Bombesin-Injektion (26 nmol/kg Bombesin:  $0,50 \pm 0,45$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $0,08 \pm 0,08$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, jeweils  $p > 0,05$ , *Abbildung 6B*). Die Anzahl der c-Fos-, Neuronatin- und Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen stieg ebenfalls nach der Behandlung mit CCK-8S (5,2 nmol/kg CCK-8S:  $0 \pm 0$  und 8,7 nmol/kg CCK-8S:  $0,38 \pm 0,38$  Neuronen/Schnitt pro Ratte) oder Bombesin (26 nmol/kg Bombesin:  $0,62 \pm 0,52$  und 32 nmol/kg Bombesin:  $0,03 \pm 0,03$  Neuronen/Schnitt pro Ratte, jeweils  $p > 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe an ( $0 \pm 0$  Neuronen/Schnitt pro Ratte,  $p > 0,05$ , siehe *Abbildungen 1 und 8B*), erreichte jedoch kein signifikantes Niveau.

## 6. Diskussion

### 6.1 Neuronale Signalwege der Energiehomöostase

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl im NTS als auch im DMV des Hirnstamms Neuronatin-Neuronen vorhanden sind. Die i.p. Injektion der Peptide CCK-8S in den Dosierungen 5,2 und 8,7 nmol/kg und Bombesin in den Dosierungen 26 und 32 nmol/kg führte im NTS zu einer dosisabhängig erhöhten Anzahl von c-Fos-positiven Neuronen. Weiterhin kam es im NTS zu einer dosisabhängigen Zunahme der neuronalen Aktivierung (c-Fos) Neuronatin-positiver Neuronen, während die Gesamtanzahl der Neuronatin-positiven Neuronen im NTS wie im DMV unverändert blieb. Bereits in früheren Studien wurde gezeigt, dass die i.p. Injektion von sulphatiertem CCK-8 und Bombesin im NTS eine erhöhte neuronale Aktivität bewirkte (51-53). Im DMV konnte in der vorliegenden Studie hingegen keine signifikant erhöhte Anzahl an c-Fos-Neuronen festgestellt werden, was ebenfalls mit den Beobachtungen früherer Studien übereinstimmt (51, 53).

Der NTS nimmt durch die Kommunikation mit verschiedenen weiteren Hirnarealen in der Regulation der Nahrungsaufnahme und so auch für die Wirkung von CCK und Bombesin eine Schlüsselstellung ein (27, 40, 54, 55). Das zeigt sich auch durch experimentelle Läsionen des NTS, die sowohl die Bombesin- als auch CCK-vermittelte Wirkung auf die Sättigung hemmen (40, 55, 62). Die Effekte von peripherem CCK und Bombesin auf die Hemmung der Nahrungsaufnahme werden -zumindest teilweise- über gastrale und abdominale vagale Afferenzen zum NTS und DMV vermittelt (40, 55). Auch dies konnte in Läsionsstudien belegt werden (63, 64). Die Durchführung einer Vagotomie führt zu einer reduzierten Wirkung von CCK auf die Sättigung, hat allerdings allein keinen Einfluss auf die Bombesin-vermittelte Sättigung (63, 64). Lediglich nach zusätzlicher Zerstörung thorakaler Spinalnerven zeigt Bombesin keine Wirkung mehr auf die Sättigung (65). Das viszerosensorische Signal von peripherem CCK wird über CCK-1-Rezeptoren auf gastralen und abdominalen vagalen Afferenzen vermittelt (54). Diese Afferenzen projizieren zum NTS, wo systemisches CCK u.a. auch katecholaminerge Neuronen aktiviert (54, 56, 66, 67). Die periphere Injektion von Bombesin führt ebenfalls zu einer neuronalen Aktivierung katecholaminerger Neuronen des NTS (53). Auch in der vorliegenden Studie konnte im NTS nach Injektion von CCK-8S und Bombesin eine signifikante Anzahl von aktivierten Neuronen beobachtet werden, welche positiv für Tyrosinhydroxylase waren (56). Vom NTS

ausgehende, katecholaminerge Projektionen sind an der Aktivierung verschiedener weiterer Hirnareale wie z.B. des DMV oder hypothalamischen Kernen beteiligt (54, 56, 57). Die enge neuronale Verbindung zwischen dem NTS und dem DMV ist bedeutsam für die Formierung vagaler Efferenzen, die Informationen wieder zurück zum oberen Gastrointestinaltrakt leiten (57). Die funktionelle Bedeutung katecholaminerger Neuronen für die CCK-vermittelte Sättigung wird auch durch Läsionsstudien deutlich, in denen gezeigt wurde, dass nach der Zerstörung katecholaminerger Neuronen im NTS kein inhibitorischer Effekt mehr durch i.p. appliziertes CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme auftrat (68). Weiterhin korreliert der Effekt von CCK auf die Hemmung der Nahrungsaufnahme mit der Anzahl der katecholaminerger Neuronen im NTS. Das unterstreicht die funktionelle Bedeutung katecholaminerger Signalwege für die Vermittlung der Sättigungseffekte von CCK (56, 68). Die Hemmung der CCK-vermittelten Sättigung geht außerdem mit einer geringeren Aktivität (Phosphorylierung) der Tyrosinhydroxylase einher (56). In unserer Untersuchung wurde eine Kollokalisierung von Neuronatin und Tyrosinhydroxylase im Zytoplasma von NTS-Neuronen beobachtet. Die Injektion von CCK-8S und Bombesin bewirkte eine vermehrte Anzahl aktivierter Neuronatin-Neuronen, die teilweise auch für Tyrosinhydroxylase positiv waren. Durch die i.p. Injektion von Bombesin kam es bei beiden Dosen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Anzahl von c-Fos positiven NTS-Neuronen, in denen sowohl Tyrosinhydroxylase und Neuronatin kolokalisiert vorlagen. Die Injektion von CCK-8S führte hier allerdings zu keiner signifikant erhöhten Anzahl aktivierter Tyrosinhydroxylase- oder Neuronatin-positiver Neuronen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die begrenzte Fallzahl der Untersuchung sein. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass Neuronatin-Neuronen im NTS durch CCK und Bombesin aktiviert werden und somit auf periphere Sättigungssignale reagibel sind. Hierbei könnten auch katecholaminerge Signalwege involviert sein.

Weiterhin ist die neuronale Verbindung zwischen dem NTS und hypothalamischen Hirnkernen von zentraler Bedeutung für die Vermittlung der Sättigung (54). In früheren Untersuchungen wurde eine Expression der Neuronatin-mRNA im Hypothalamus beobachtet, wo das Proteolipid partiell in Neuronen mit Mediatoren der Appetitregulation wie CART (,cocaine and amphetamine regulated transcript‘), MCH (,melanin-concentrating hormone‘) und Orexin kolokalisiert vorliegt (69). Neuronatin-haltige Neuronen befinden sich also sowohl im NTS als auch in hypothalamischen Hirnkernen und könnten dort bei nahrungsregulierenden Prozessen eine Rolle zu spielen. In dieser Studie wurde beobachtet, dass sich Neuronatin zum Teil auch in Nervenfasern im NTS befand. Dies könnte für eine



Involvierung von Neuronatin in die neuronale Kommunikation sprechen. Auch eine neuromodulatorische Funktion von Neuronatin kann vermutet werden, da in der aktuellen Untersuchung zahlreiche zytoplasmatische Vesikel-ähnliche, durch den Neuronatin-Antikörper markierte Strukturen in NTS-Neuronen darstellbar waren.

## **6.2 Neuronatin – Ein Mediator der NTS-vermittelten Sättigung?**

### ***6.2.1 Die Bedeutung intrazellulärer Calcium-Spiegel***

In einigen Studien wurde eine Modulation intrazellulärer Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-Spiegel durch Neuronatin beobachtet (4). Möglicherweise hat Neuronatin über diesen Mechanismus auch einen Effekt auf die Regulation der Nahrungsaufnahme (70). Das Proteolipid fungiert als Antagonist der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2 im Endoplasmatischen Retikulum. Die SERCA2 bewirkt einen Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zurück in das Endoplasmatische Retikulum, sodass Neuronatin auf diese Weise die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bewirkt (4). In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass Neuronatin auf zahlreiche Zellen wie z.B. embryonale Stammzellen, hippocampale Neuronen, Pankreaszellen oder auch Zellen des Medulloblastoms durch die Modulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel einen Einfluss hat (4). In einer Studie von Suh et al. wurde z.B. beobachtet, dass Neuronatin über die Erhöhung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel und eine verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors cAMP response element-binding protein (CREB) die Insulin-abhängige Differenzierung von Adipozyten im Fettgewebe fördert (71).

$\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signalwege scheinen für die Regulation des Körpergewichts eine Bedeutung zu haben (72). Daher stellt sich die Frage, ob auch Neuronatin auf zentraler Ebene über die Modulation intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel einen Einfluss auf die Energiehomöostase/Nahrungsaufnahme haben könnte. Das Neuropeptid Nesfatin-1 bewirkt beispielsweise ebenfalls eine Modulation  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Signalkaskaden, über welche es seine Wirkung im Gehirn vermittelt (72). Das Neuropeptid wird im gesamten Nervensystem sowie in peripheren Geweben wie z.B. in der Magenmukosa, im Fettgewebe sowie im Pankreas exprimiert (73, 74) und bewirkt über die Modulation von N-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in Neuronen vagaler Afferenzen, deren Exzitation in einer Aktivierung von NTS-Neuronen resultiert (75, 76). Dieser Mechanismus führt über eine Hemmung der Nahrungsaufnahme zur Verringerung von Übergewicht (72). Ze-Feng Xia et al. zeigten, dass

die Injektion von Nesfatin-1 in den Hirnstamm einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in Neuronen des DMV bewirkt, was wiederum über die Aktivierung des Vagus zu einer Gewichtsabnahme führt (77). Ob ähnliche Mechanismen für die funktionelle Bedeutung von Neuronatin im NTS und DMV relevant sind, könnte künftig untersucht werden.

### **6.2.2 Die Interaktion verschiedener Mediatoren der Sättigungsregulation**

Wahrscheinlich ist die Regulation der Nahrungsaufnahme abhängig von der Interaktion verschiedener Hirnkerne sowie zahlreicher Mediatoren wie z.B. CART, POMC, serotonerger oder katecholaminerger Fasern sowie peripherer Sättigungspeptide. In der vorliegenden Studie sowie einer früheren Studie von Vrang et al. wurde bereits gezeigt, dass auch Neuronatin im Gehirn mit Mediatoren der Sättigungsregulation wie CART (LH) oder Tyrosinhydroxylase (NTS) kolokalisiert vorliegt (69). Möglicherweise liegt Neuronatin im Gehirn noch mit weiteren appetitregulierenden Mediatoren kolokalisiert vor. Nucleobindin2 (NUCB2)/Nesfatin-1 liegt beispielsweise im Gehirn gemeinsam mit Serotonin vor (78). Serotonin bewirkt ähnlich wie CCK eine Reduktion der Nahrungsaufnahme (79). Auch wird der Effekt von Serotonin auf die Nahrungsaufnahme ebenfalls über vagale Rezeptoren sowie Serotonin-Rezeptoren auf Neuronen des NTS und DMV vermittelt (78). Der NTS wird durch serotonerge Fasern aus den Raphé-Kernen innerviert (80). Vermutlich interagieren CCK und Serotonin während der NTS-abhängigen Hemmung der Nahrungsaufnahme. Die Mikroinjektion des Serotonin-Antagonisten Ondansetron in den medialen NTS bewirkt beispielsweise eine Suppression der CCK-vermittelten Sättigung, während die gleichzeitige Administration von CCK-8S und Serotonin zu einer synergistischen Verstärkung des Sättigungseffektes führt (81). Weiterhin wurde beobachtet, dass die i.p. Injektion von CCK-8S zu einer c-Fos-Aktivierung von NTS-Neuronen führt, die in enger räumlicher Beziehung zu serotonergen Nervenfasern stehen. Diese NTS-Neuronen sind teilweise auch positiv für Tyrosinhydroxylase (51). Ein ähnlicher Effekt von CCK-8S und Bombesin zeigte sich auch auf die Aktivierung von NUCB2/Nesfatin-1-Neuronen im NTS und DMV, welche zum Teil mit Tyrosinhydroxylase kolokalisiert sind (53, 82). Durch immunhistochemische Studien wird versucht, Rückschlüsse auf die komplexe Interaktion zentraler Mediatoren zu ziehen, die an der Vermittlung der Sättigung, etwa durch periphere Sättigungspeptide beteiligt sind. Wir beobachteten, dass die i.p. Injektion von CCK und Bombesin Neuronatin-Neuronen des NTS aktiviert, die teilweise positiv für Tyrosinhydroxylase sind. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass Neuronatin mit diesen Mediatoren der Sättigung interagiert.

### **6.2.3 Die Bedeutung der MAPK/ERK-vermittelten Signaltransduktion**

Vermutlich bewirkt Neuronatin über die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel eine Phosphorylierung von ERK 1/2 und verstärkt somit die MAPK/ERK-Signalkaskade, die an der Regulation verschiedener Prozesse wie zellulärer Differenzierung, Apoptose und auch zentraler Mechanismen der Energiehomöostase beteiligt ist (83, 84). ERK 1/2 und CREB wurden bereits in früheren Studien als Mediatoren der durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  ausgelösten c-Fos-Expression in verschiedenen Neuronen, u.a. auch NTS-Neuronen, identifiziert (85, 86). Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in NTS-Neuronen spielt eine Rolle bei der zentralen Verarbeitung peripherer, gastrointestinaler Signale. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom wird durch Glutamat ausgelöst, welches von zum NTS führenden vagalen Afferenzen ausgeschüttet wird und dort via NMDA- und AMPA-Rezeptoren wirkt. Dies ist wahrscheinlich auch für die Wirkung von CCK auf die Sättigung von Bedeutung (84). Daher schlussfolgerten Berthoud et al., dass die Kombination von erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und der Aktivierung von ERK-Signalwegen einen Einfluss auf die Exzitation und die Feuerrate von NTS-Neuronen und somit auf zentrale energiehomöostatische Regulationsprozesse auf Hirnstammebene haben könnte (84). Diese Hypothese prüften Sutton et al. an Versuchsratten, indem sie mithilfe von exogenem CCK vagale, afferente Sättigungssignale aktivierten. Die periphere Injektion von CCK-8S führte zu einer Stimulation des MAPK/ERK-Signalweges durch Phosphorylierung von ERK 1/2 in NTS-Neuronen. Eine Hemmung dieser Signalkaskaden vermindert die Sättigungseffekte von CCK (87). Die Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges scheint also notwendig für die CCK-vermittelte Sättigung zu sein (84). Sutton et al. beobachteten außerdem catecholaminerge A2/C2-Neuronen im NTS, welche CCK-induziertes phospho-ERK enthielten (87). In weiteren Studien wurde später gezeigt, dass die CCK-induzierte Aktivierung des ERK-Signalweges teilweise in Tyrosinhydroxylase-Neuronen des NTS stattfindet (56). Babic et al. schlussfolgerten, dass die Aktivierung von Tyrosinhydroxylase-Neuronen via phospho-ERK im NTS wahrscheinlich an der Vermittlung der Sättigungseffekte von CCK beteiligt ist (56). Wir zeigten, dass peripheres CCK-8S eine neuronale Aktivierung von Neuronatin-Nervenzellen im NTS induziert. Daher wäre es denkbar, dass die beschriebenen Effekte von CCK auf die Phosphorylierung von ERK und der damit zusammenhängende  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom auch in Neuronatin-Neuronen von Bedeutung sind. Neuronatin könnte über die Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel und die Phosphorylierung von ERK 1/2 möglicherweise auch selbstständig zu einer Verstärkung der CCK-vermittelten Effekte im NTS beitragen. Dies könnte in zukünftigen Untersuchungen genauer evaluiert werden.

Weiterhin wäre zu eruieren, welche Stellung katecholaminerge Signalwege in der Aktivierung von Neuronatin-Neuronen durch periphere Sättigungssignale einnehmen. Frühere Studien deuten darauf hin, dass auch Bombesin-ähnliche Peptide wie Neuromedin B über die Bombesin-Rezeptoren eine Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs bewirken könnten (88). Ähnliche intrazelluläre Mechanismen könnten somit potentiell auch für die Vermittlung der Sättigung durch Bombesin relevant sein.

### **6.3 Neuronatin, Cholecystokinin und Bombesin und die langfristige Regulation des Körpergewichts**

Die meisten Studien zu CCK und Bombesin belegen die Bedeutung der Peptide für die Kurzzeitregulation der Nahrungsaufnahme (32, 40). Die funktionelle Bedeutung von CCK für die Kurzzeitsättigung in Tieren und Menschen ist gut untersucht. Weniger eindeutige Forschungsergebnisse gibt es bisher zu der Frage, inwieweit das Peptid oder seine Rezeptoren die Regulation des Körpergewichts längerfristig beeinflussen. Während z.B. sogenannte Otsuka Long Evans Tokushima fatty (OLETF) Ratten mit einer genetischen Mutation des CCK-1-Rezeptors hyperphages Essverhalten und Übergewicht entwickelten, trat bei Mäusen mit einem komplett ausgeschalteten CCK-1-Rezeptor zwar ebenso wie bei den Ratten keine Sättigung durch die Injektion von CCK auf, jedoch zeigten die Versuchstiere eine normale Körpergewichtsregulation (89, 90). Ob der CCK1-Rezeptor eine ausschlaggebende Rolle für die längerfristige Energiehomöostase spielt, lässt sich anhand der Studien an OLETF-Ratten also nicht eindeutig feststellen (28). In Studien wurde gezeigt, dass verschiedene Polymorphismen der Promotor-Region des CCK-1-Rezeptor-Gens mit Übergewicht assoziiert sind, jedoch kommen diese nur selten bei Menschen vor (91-93). In anderen Studien wurde untersucht, inwieweit die Menge an peripher zirkulierendem CCK für die Gewichtsregulation von Bedeutung ist. Schwer adipöse Patienten weisen z.B. im Vergleich zu Versuchspersonen mit moderatem Übergewicht oder Normalgewicht unter Fastenbedingungen niedrigere CCK-Konzentrationen im Blut auf (94). Die dauerhafte Injektion von CCK führt allerdings langfristig nicht zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme oder des Gewichts, sondern zu einer Desensibilisierung für CCK (95). Ebenso führt eine hochkalorische Diät über mehrere Wochen zu einer verminderten Sensibilität für CCK (96). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar einige Studien auf eine Bedeutung von CCK für das Gleichgewicht der Energiehomöostase hindeuten, sich jedoch keine eindeutige Aussage ableiten lässt (28).

Auch Bombesin und Bombesin-ähnliche Peptide sind vor allem als kurzfristig auf die Regulation der Sättigkeit wirkende periphere Signale beschrieben (40). Besonders der BN3-Rezeptor, dessen natürlicher Ligand bisher nicht bekannt ist, scheint für die Regulation des Energieverbrauchs, der Nahrungsaufnahme, der Glucosehomöostase und des Körpergewichts eine Rolle zu spielen (41). Versuchstiere mit funktionslosem BN3-Rezeptor entwickeln Hyperphagie, eine verringerte Glucosetoleranz, Hypertonie und Adipositas (97). Die c-Fos-Aktivierung von BN3-Rezeptor-exprimierenden Neuronen im DMH führt bei Mäusen u.a. zu einer erhöhten Körpertemperatur und einem erhöhten Energieverbrauch, während die Aktivierung im PVN zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, nicht jedoch des Energieverbrauchs führt (98). Im Skelettmuskel adipöser Versuchspersonen zeigt sich weiterhin eine verminderte Expression von BN3-Rezeptor-mRNA (41).

Die aktuelle Studie zeigt, dass CCK-8S und Bombesin als akute Sättigungssignale die neuronale Aktivierung von Neuronatin-positiven NTS-Nervenzellen bewirken. Somit beeinflussen die beiden gastrointestinalen Hormone zumindest kurzfristig ein Proteolipid, welches durch epigenetische Mechanismen modulierbar ist und womöglich in der langfristigen Regulation des Körpergewichts eine Rolle spielt (8, 69). Neben Übergewicht der Eltern führen auch periphere Faktoren wie vorgeburtliche und postnatale Unterernährung, die mit Schwankungen von Hormonen wie Insulin, Leptin, Ghrelin in der Blutzirkulation einhergehen, zu einem höheren Risiko für die spätere Entwicklung von Übergewicht bei den Nachkommen (99). Als Ursache hierfür könnten neurotrophische Effekte dieser Hormone von Bedeutung sein. Epigenetisch programmierte Veränderungen der Genexpression - möglicherweise auch von genomisch geprägten Genen wie Neuronatin- scheinen dabei eine zellphysiologische Funktion zu besitzen (99). Die akute Reagibilität von Neuronatin auf metabolisch relevante, periphere Faktoren zeigte sich bereits in einer vorhergehenden Studie, in der die periphere Injektion des anorektisch wirksamen Hormons Leptin die forcierte Expression von Neuronatin-mRNA im PVN, LH und DMH bewirkte (100). Nach einer 48-stündigen Fastenperiode -und somit geringeren Leptinspiegeln- wurde dabei sowohl in adipösen als auch normalgewichtigen Versuchstieren eine verminderte Expression von Neuronatin-mRNA im PVN, DMH, ARC, LH und Ventromedialen Hypothalamus detektiert (69). Allerdings konnte in einer anderen Studie an Mäusen mit hochkalorischer Diät und erhöhten Leptin-Spiegeln keine veränderte hypothalamische Neuronatin-Expression festgestellt werden (101).

## 6.4 Ausblick

Frühere Studien deuten ebenso wie auch diese Untersuchung darauf hin, dass periphere Hunger-Sättigungs-Signale Neuronatin auf genetischer und neuronaler Ebene beeinflussen könnten (69). Bisher ist die Bedeutung von Neuronatin für die Energiehomöostase nicht detailliert geklärt, erste Studien deuten aber auf eine Rolle des Proteolipids in der längerfristigen Regulation der Energiehomöostase hin (14, 24, 25, 69). Die neuronale Aktivierung Neuronatin-enthaltender Nervenzellen via CCK und Bombesin zeigt, dass zentrales Neuronatin auch an neuronalen Prozessen der kurzfristigen, NTS-vermittelten Regulation der Sättigung beteiligt ist. Zur detaillierteren Untersuchung wäre auch die Darstellung der mRNA-Expression von Neuronatin in NTS-Neuronen, beispielsweise vor und nach Injektion von CCK-8S und Bombesin oder auch unter verschiedenen Ernährungsbedingungen wie z.B. Fastenzuständen von Interesse. Da insbesondere auch der Hypothalamus eine zentrale Stellung in der Regulation von Hunger und Sättigkeit spielt, sollten Neuronatin-Neuronen und der Effekt von CCK-8S und Bombesin auf c-Fos-Expressionsmuster ebenfalls in diesem Hirnareal untersucht werden. Weiterhin könnte untersucht werden, inwiefern Neuronatin auch an der neuronalen Kommunikation zwischen Hypothalamus und NTS beteiligt ist. Vermutlich besitzt Neuronatin eine modulatorische Funktion in zellulären Signalwegen wie beispielsweise der MAP/ERK-Signalkaskade, die ebenfalls an der Beendigung der Nahrungsaufnahme beteiligt sein könnte (84). Die potentielle Bedeutung des ERK-Signalweges und Neuronatin für die zentrale Wirkung von peripheren Sättigungssignalen wie CCK-8S oder Bombesin könnte in weiteren Untersuchungen genauer untersucht werden.

Die Ausschüttung gastrointestinaler Sättigungspeptide wie CCK, Bombesin oder Leptin führt zur neuronalen Aktivierung verschiedener Neuronenpopulationen beispielsweise im NTS oder PVN. Diese Neuronen bzw. Nervenfasern enthalten Mediatoren wie z.B. Katecholamine, Neuronatin, NUCB2/Nesfatin-1, CART oder Serotonin, die wahrscheinlich für die Appetitregulation von Bedeutung sind und zum Teil in Kolokalisation miteinander vorliegen (51, 53, 69, 82). Hunger und Sättigkeit werden durch ein komplexes Zusammenspiel dieser verschiedenen Mediatoren auf neuronaler Ebene reguliert. Die Aktivierung von Neuronatin-Neuronen, teilweise in Kolokalisation mit Tyrosinhydroxylase, als Reaktion auf die kurzfristigen Sättigungssignale CCK und Bombesin wurde in der aktuellen Studie erstmals beobachtet. Zur weiteren Untersuchung könnten immunhistochemische

Kolokalisationsstudien mit anderen appetitregulatorischen Mediatoren durchgeführt werden. Funktionelle Studien, in denen neben neuronaler Aktivierung auch das Sättigungsverhalten der Ratten untersucht wird, könnten zu einem umfassenderen Verständnis beitragen. Inwieweit periphere Signale wie CCK und Bombesin im Zusammenspiel mit Neuronatin als epigenetisch modulierbares Gen eventuell auch die längerfristige Körpergewichtsregulation beeinflussen, gilt es noch in weiteren experimentellen Studien zu klären.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Jia H, Lubetkin EI. Trends in quality-adjusted life-years lost contributed by smoking and obesity. *Am J Prev Med.* 2010;38(2):138-44.
2. Dou D, Joseph R. Cloning of human neuronatin gene and its localization to chromosome-20q 11.2-12: the deduced protein is a novel 'proteolipid'. *Brain Res.* 1996;723(1-2):8-22.
3. Dou D, Joseph R. Structure and organization of the human neuronatin gene. *Genomics.* 1996;33(2):292-7.
4. Pitale PM, Howse W, Gorbatyuk M. Neuronatin Protein in Health and Disease. *J Cell Physiol.* 2017;232(3):477-81.
5. Chu K, Tsai MJ. Neuronatin, a downstream target of BETA2/NeuroD1 in the pancreas, is involved in glucose-mediated insulin secretion. *Diabetes.* 2005;54(4):1064-73.
6. Li X, Thomason PA, Withers DJ, Scott J. Bio-informatics analysis of a gene co-expression module in adipose tissue containing the diet-responsive gene Nnat. *BMC systems biology.* 2010;4(1):175.
7. Kagitani F, Kuroiwa Y, Wakana S, Shiroishi T, Miyoshi N, Kobayashi S, Nishida M, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Peg5/Neuronatin is an imprinted gene located on sub-distal chromosome 2 in the mouse. *Nucleic acids research.* 1997;25(17):3428-32.
8. John RM, Aparicio SA, Ainscough JF, Arney KL, Khosla S, Hawker K, Hilton KJ, Barton SC, Surani MA. Imprinted expression of neuronatin from modified BAC transgenes reveals regulation by distinct and distant enhancers. *Dev Biol.* 2001;236(2):387-99.
9. Vrang N, Meyre D, Froguel P, Jelsing J, Tang-Christensen M, Vatin V, Mikkelsen, JD, Thstrup, K, Larsen, LK, Cullberg, KB, Fahrenkrug, J, Jacobson, P, Sjostrom, L, Carlsson, LM, Liu, Y, Liu, X, Deng, HW, Larsen, PJ. The imprinted gene neuronatin is regulated by metabolic status and associated with obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(7):1289-96.



10. Lindsay RS, Kobes S, Knowler WC, Bennett PH, Hanson RL. Genome-wide linkage analysis assessing parent-of-origin effects in the inheritance of type 2 diabetes and BMI in Pima Indians. *Diabetes*. 2001;50(12):2850-7.
11. Kikyo N, Williamson CM, John RM, Barton SC, Beechey CV, Ball ST, Cattanach, BM Surani, MA, Peters, J. Genetic and functional analysis of neuronatin in mice with maternal or paternal duplication of distal Chr 2. *Dev Biol*. 1997;190(1):66-77.
12. Joseph RM. Neuronatin gene: Imprinted and misfolded. *Genomics*. 2014;103(2-3):183-8.
13. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes (Basel)*. 2014;5(3):635-55.
14. Soubry A, Murphy SK, Wang F, Huang Z, Vidal AC, Fuemmeler BF, Kurtzberg, J, Murtha, A, Jirtle, RL, Schildkraut, JM, Hoyo, C. Newborns of obese parents have altered DNA methylation patterns at imprinted genes. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(4):650-7.
15. Evans HK, Wylie AA, Murphy SK, Jirtle RL. The neuronatin gene resides in a "micro-imprinted" domain on human chromosome 20q11.2. *Genomics*. 2001;77(1-2):99-104.
16. Gu T, Su X, Zhao S, Li C. Methylation differences of the neuronatin gene promoter region in liver between normal and cloned pigs. *Anim Genet*. 2014;45(1):122-4.
17. Yang J, Wei J, Wu Y, Wang Z, Guo Y, Lee P, Li, X. Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer. *Oncogenesis*. 2015;4:e158.
18. Vatsa N, Kumar V, Singh BK, Kumar SS, Sharma A, Jana NR. Down-Regulation of miRNA-708 Promotes Aberrant Calcium Signaling by Targeting Neuronatin in a Mouse Model of Angelman Syndrome. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:35.
19. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*. 2005;132(21):4653-62.
20. Fineberg SK, Kosik KS, Davidson BL. MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron*. 2009;64(3):303-9.

21. Inui M, Martello G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):252-63.
22. Weinstein LS, Xie T, Qasem A, Wang J, Chen M. The role of GNAS and other imprinted genes in the development of obesity. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(1):6-17.
23. Millership SJ, Tunster SJ, Van de Pette M, Choudhury AI, Irvine EE, Christian M, Fisher, AG, John, RM, Scott, J, Withers, DJ. Neuronatin deletion causes postnatal growth restriction and adult obesity in 129S2/Sv mice. *Mol Metab.* 2018;18:97-106.
24. Dalgaard K, Landgraf K, Heyne S, Lempradl A, Longinotto J, Gossens K, Ruf, M, Orthofer, M, Strogantsev, R, Selvaraj, M, Lu, TT, Casas, E, Teperino, R, Surani, MA, Zvetkova, I, Rimmington, D, Tung, YC, Lam, B, Larder, R, Yeo, GS, O'Rahilly, S, Vavouri, T, Whitelaw, E, Penninger, JM, Jenuwein, T, Cheung, CL, Ferguson-Smith, AC, Coll, AP, Körner, A, Pospisilik, JA. Trim28 Haploinsufficiency Triggers Bi-stable Epigenetic Obesity. *Cell.* 2016;164(3):353-64.
25. Soubry A, Guo L, Huang Z, Hoyo C, Romanus S, Price T, Murphy, SK. Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clinical Epigenetics.* 2016;8(1).
26. Gonzalez-Nahm S, Mendez M, Robinson W, Murphy SK, Hoyo C, Hogan V, Rowley, D. Low maternal adherence to a Mediterranean diet is associated with increase in methylation at the MEG3-IG differentially methylated region in female infants. *Environ Epigenet.* 2017;3(2):dvx007.
27. D'Agostino G, Lyons DJ, Cristiano C, Burke LK, Madara JC, Campbell JN, Garcia, AP, Land, BB, Lowell, BB, Dileone, RJ, Heisler, LK. Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. *Elife.* 2016;5.
28. Little TJ, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation. *Obes Rev.* 2005;6(4):297-306.
29. Pathak V, Flatt PR, Irwin N. Cholecystokinin (CCK) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Peptides.* 2018;100:229-35.

30. Okonkwo O, Adeyinka A. Biochemistry, Cholecystokinin (CCK). StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
31. Larsson LI, Rehfeld JF. Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system. *Brain Res.* 1979;165(2):201-18.
32. Moran TH, Kinzig KP. Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(2):G183-8.
33. Innis RB, Snyder SH. Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(11):6917-21.
34. Smith GT, Moran TH, Coyle JT, Kuhar MJ, O'Donahue TL, McHugh PR. Anatomic localization of cholecystokinin receptors to the pyloric sphincter. *Am J Physiol.* 1984;246(1 Pt 2):R127-30.
35. Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res.* 1986;362(1):175-9.
36. Gaudreau P, Quirion R, St-Pierre S, Pert CB. Characterization and visualization of cholecystokinin receptors in rat brain using [<sup>3</sup>H]pentagastrin. *Peptides.* 1983;4(5):755-62.
37. Antin J, Gibbs J, Holt J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1975;89(7):784-90.
38. Melton PM, Kissileff HR, Pi-Sunyer FX. Cholecystokinin (CCK-8) affects gastric pressure and ratings of hunger and fullness in women. *Am J Physiol.* 1992;263(2 Pt 2):R452-6.
39. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia.* 1971;27(2):166-7.
40. Sayegh AI. The role of bombesin and bombesin-related peptides in the short-term control of food intake. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;114:343-70.

41. Li M, Liang P, Liu D, Yuan F, Chen GC, Zhang L, Liu, Y, Liu, H. Bombesin Receptor Subtype-3 in Human Diseases. *Arch Med Res.* 2019;50(7):463-7.
42. LaPelusa A, Bass AN, Jan A. *Biochemistry, Bombesin.* StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2020, StatPearls Publishing LLC.; 2020.
43. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15(1):58-64.
44. Guan XM, Chen H, Dobbelaar PH, Dong Y, Fong TM, Gagen K, Gorski, J, He, S, Howard, AD, Jian, T, Jiang, M, Kan, Y, Kelly, TM, Kosinski, J, Lin, L. S, Liu, J, Marsh, DJ, Metzger, JM, Miller, R, Nargund, RP, Palyha, O, Shearman, L, Shen, Z, Stearns, R, Strack, AM, Stribling, S, Tang, YS, Wang, SP, White, A, Yu, H, Reitman, ML. Regulation of energy homeostasis by bombesin receptor subtype-3: selective receptor agonists for the treatment of obesity. *Cell Metab.* 2010;11(2):101-12.
45. McDonald TJ, Ghatei MA, Bloom SR, Adrian TE, Mochizuki T, Yanaihara C, Yanaihara, N. Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide (GRP). *Regul Pept.* 1983;5(2):125-37.
46. Ghatei MA, Jung RT, Stevenson JC, Hillyard CJ, Adrian TE, Lee YC, Christofides, ND, Sarson, DL, Mashiter, K, MacIntyre, I, Bloom, SR. Bombesin: action on gut hormones and calcium in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54(5):980-5.
47. Degen LP, Peng F, Collet A, Rossi L, Ketterer S, Serrano Y, Larsen, F, Beglinger, C, Hildebrand, P. Blockade of GRP receptors inhibits gastric emptying and gallbladder contraction but accelerates small intestinal transit. *Gastroenterology.* 2001;120(2):361-8.
48. Gibbs J, Fauser D, Rowe E, Rolls BJ, Rolls E, Maddison S. Bombesin suppresses feeding in rats. *Nature.* 1979;282(5735):208.
49. Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:421-51.

50. Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1993;14(3):173-213.
51. Engster KM, Frommelt L, Hofmann T, Nolte S, Fischer F, Rose M, Stengel A, Kobelt P. Peripheral injected cholecystokinin-8S modulates the concentration of serotonin in nerve fibers of the rat brainstem. *Peptides.* 2014;59:25-33.
52. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Bae HG, Ruter J, Klapp BF, Wiedenmann, B, Monnikes, H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004;13(1):45-52.
53. Engster KM, Kroczek AL, Rose M, Stengel A, Kobelt P. Peripheral injection of bombesin induces c-Fos in NUCB2/nesfatin-1 neurons. *Brain Res.* 2016;1648(Pt A):46-53.
54. Blevins JE, Baskin DG. Hypothalamic-brainstem circuits controlling eating. *Forum Nutr.* 2010;63:133-40.
55. Ritter RC, editor *Gastrointestinal Peptides and the Control of Food Intake* 2010.
56. Babic T, Townsend RL, Patterson LM, Sutton GM, Zheng H, Berthoud HR. Phenotype of neurons in the nucleus of the solitary tract that express CCK-induced activation of the ERK signaling pathway. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(4):R845-54.
57. Travagli RA, Hermann GE, Browning KN, Rogers RC. Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:279-305.
58. Carver-Moore K, Gray TS, Brown MR. Central nervous system site of action of bombesin to elevate plasma concentrations of catecholamines. *Brain Res.* 1991;541(2):225-31.
59. Clancy B, Cauller LJ. Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods.* 1998;83(2):97-102.
60. Paxinos P, Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego. 1997.

61. Guggenberger M, Engster KM, Hofmann T, Rose M, Stengel A, Kobelt P. Cholecystokinin and bombesin activate neuronatin neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 2020;1746:147006.
62. Crawley JN, Schwaber JS. Nucleus tractus solitarius lesions block the behavioral actions of cholecystokinin. *Peptides.* 1983;4(5):743-7.
63. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science.* 1981;213(4511):1036-7.
64. Smith G, Jerome C, Gibbs J. Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. *Peptides.* 1981;2(4):409-11.
65. Stuckey JA, Gibbs J, Smith GP. Neural disconnection of gut from brain blocks bombesin-induced satiety. *Peptides.* 1985;6(6):1249-52.
66. Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 2010;1350:18-34.
67. 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(2):246-56.
68. Rinaman L. Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci.* 2003;23(31):10084-92.
69. Vrang N, Meyre D, Froguel P, Jelsing J, Tang-Christensen M, Vatin V, Mikkelsen J, Thirstrup, K, Larsen, LK, Cullberg, KB. The imprinted gene neuronatin is regulated by metabolic status and associated with obesity. *Obesity.* 2010;18(7):1289-96.
70. Braun JL, Geromella MS, Hamstra SI, Fajardo VA. Neuronatin regulates whole-body metabolism: is thermogenesis involved? *FASEB Bioadv.* 2020;2(10):579-86.
71. Suh YH, Kim WH, Moon C, Hong YH, Eun SY, Lim JH, Choi, JS, Song, J, Jung, MH. Ectopic expression of Neuronatin potentiates adipogenesis through enhanced

phosphorylation of cAMP-response element-binding protein in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(2):481-9.

72. Song Z, Wang Y, Zhang F, Yao F, Sun C. Calcium Signaling Pathways: Key Pathways in the Regulation of Obesity. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).

73. Wei Y, Li J, Wang H, Wang G. NUCB2/nesfatin-1: Expression and functions in the regulation of emotion and stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2018;81:221-7.

74. Schalla MA, Stengel A. Current Understanding of the Role of Nesfatin-1. *J Endocr Soc.* 2018;2(10):1188-206.

75. Gao S, Guo F, Sun X, Zhang N, Gong Y, Xu L. The Inhibitory Effects of Nesfatin-1 in Ventromedial Hypothalamus on Gastric Function and Its Regulation by Nucleus Accumbens. *Front Physiol.* 2016;7:634.

76. Ueno H, Nakazato M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *J Diabetes Investig.* 2016;7(6):812-8.

77. Xia ZF, Fritze DM, Li JY, Chai B, Zhang C, Zhang W, Mulholland, MW. Nesfatin-1 inhibits gastric acid secretion via a central vagal mechanism in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303(5):G570-7.

78. Stengel A, Taché Y. Role of brain NUCB2/nesfatin-1 in the regulation of food intake. *Curr Pharm Des.* 2013;19(39):6955-9.

79. Pollock JD, Rowland N. Peripherally administered serotonin decreases food intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1981;15(2):179-83.

80. Schaffar N, Kessler JP, Bosler O, Jean A. Central serotonergic projections to the nucleus tractus solitarius: evidence from a double labeling study in the rat. *Neuroscience.* 1988;26(3):951-8.

81. Hayes MR, Covasa M. CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Peptides*. 2005;26(11):2322-30.
82. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, Wiedemann B, Klapp B, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P. 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. *Regul Pept*. 2009;157(1-3):84-91.
83. Lin HH, Bell E, Uwanogho D, Perfect LW, Noristani H, Bates TJ, Snetkov V, Price J, Sun YM. Neuronatin promotes neural lineage in ESCs via Ca<sup>2+</sup> signaling. *Stem Cells*. 2010;28(11):1950-60.
84. Berthoud HR, Sutton GM, Townsend RL, Patterson LM, Zheng H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav*. 2006;89(4):517-24.
85. Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME. Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci*. 1996;16(17):5425-36.
86. Chandler LJ, Sutton G, Dorairaj NR, Norwood D. N-methyl D-aspartate receptor-mediated bidirectional control of extracellular signal-regulated kinase activity in cortical neuronal cultures. *J Biol Chem*. 2001;276(4):2627-36.
87. Sutton GM, Patterson LM, Berthoud HR. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystinin-induced suppression of food intake in rats. *J Neurosci*. 2004;24(45):10240-7.
88. Moody TW. Peptide receptors as cancer drug targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1455(1):141-8.
89. Moran TH, Katz LF, Plata-Salaman CR, Schwartz GJ. Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystinin A receptors. *Am J Physiol*. 1998;274(3):R618-25.



90. Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, Nguyen M, Al-Haider W, Schmitz F, Bonner-Weir, S, Kanarek, R, Beinborn, M. The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest.* 1999;103(3):383-91.
91. Funakoshi A, Miyasaka K, Matsumoto H, Yamamori S, Takiguchi S, Kataoka K, Takata, Y, Matsusue, K, Kono, A, Shimokata, H. Gene structure of human cholecystokinin (CCK) type-A receptor: body fat content is related to CCK type-A receptor gene promoter polymorphism. *FEBS Lett.* 2000;466(2-3):264-6.
92. Miller LJ, Holicky EL, Ulrich CD, Wieben ED. Abnormal processing of the human cholecystokinin receptor gene in association with gallstones and obesity. *Gastroenterology.* 1995;109(4):1375-80.
93. Inoue H, Iannotti CA, Welling CM, Veile R, Donis-Keller H, Permutt MA. Human cholecystokinin type A receptor gene: cytogenetic localization, physical mapping, and identification of two missense variants in patients with obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Genomics.* 1997;42(2):331-5.
94. Zwirska-Korczala K, Konturek SJ, Sadowski M, Wylezol M, Kuka D, Sowa P, Adamczyk-Sowa, M, Kukla, M, Berdowska, A, Rehfeld, JF, Bielanski, W, Brzozowski, T. Basal and postprandial plasma levels of PYY, ghrelin, cholecystokinin, gastrin and insulin in women with moderate and morbid obesity and metabolic syndrome. *J Physiol Pharmacol.* 2007;58 Suppl 1:13-35.
95. Covasa M, Marcuson JK, Ritter RC. Diminished satiation in rats exposed to elevated levels of endogenous or exogenous cholecystokinin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280(2):R331-7.
96. Covasa M, Grahn J, Ritter RC. High fat maintenance diet attenuates hindbrain neuronal response to CCK. *Regul Pept.* 2000;86(1-3):83-8.
97. Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, Maeno, H, Imaki, J, Kikuyama, S, Wada, E, Wada, K. Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature.* 1997;390(6656):165-9.

98. Piñol RA, Zahler SH, Li C, Saha A, Tan BK, Škop V, Gavrilova, O, Xiao, C, Krashes, MJ, Reitman, ML, *Brs3* neurons in the mouse dorsomedial hypothalamus regulate body temperature, energy expenditure, and heart rate, but not food intake. *Nature Neuroscience*. 2018;21(11):1530-40.
99. Bouret SG. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *J Nutr*. 2010;140(3):653-7.
100. Tung YC, Ma M, Piper S, Coll A, O'Rahilly S, Yeo GS. Novel leptin-regulated genes revealed by transcriptional profiling of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci*. 2008;28(47):12419-26.
101. Scott WR, Gelegen C, Chandarana K, Karra E, Yousseif A, Amouyal C, Choudhury, AI, Andreelli, F, Withers, DJ, Batterham, RL. Differential pre-mRNA splicing regulates *Nnat* isoforms in the hypothalamus after gastric bypass surgery in mice. *PLoS One*. 2013;8(3):e59407.

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Malika Guggenberger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Effekte von peripher injiziertem Cholecystokinin und Bombesin auf das neuronale Aktivierungsmuster von Neuronatin-Nervenzellen im Nucleus Tractus Solitarius und Dorsalen Motornucleus des Vagus“ („Cholecystokinin and bombesin activate neuronatin neurons in the nucleus of the solitary tract in the brainstem“) 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

## 9. Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Malika Guggenberger hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Malika Guggenberger, Kim-Marie Engster, Tobias Homann, Matthias Rose, Andreas Stengel and Peter Kobelt, Cholecystokinin and bombesin activate neuronatin neurons in the nucleus of the solitary tract, *Brain Research*, 2020; 1746:147006.

Beitrag im Einzelnen: Im Rahmen dieser Untersuchung habe ich die Gehirnpräparate aufgearbeitet und am Kryostaten die Gewebeschnitte für die immunhistochemischen Untersuchungen hergestellt. Alle immunhistologischen Arbeitsschritte sowie die Herstellung aller Arbeitslösungen wurden von mir vorgenommen. Die quantitative und qualitative Analyse der gewonnenen mikroskopischen Präparate wurden von mir selbstständig am konfokalen Laserscanningmikroskop durchgeführt. Die gewonnenen Informationen der quantitativen Analyse wurden ausschließlich von mir statistisch mit Hilfe des Programms SigmaStat 3.1. ausgewertet und auch grafisch veranschaulicht. Die Ergebnisse der Laserscanningmikroskopie sowie der statistischen Auswertung sind in den Abbildungen 1-10 zu sehen. Die erforderlichen Literaturrecherchen zur Interpretation der Ergebnisse wurden von mir durchgeführt. Zudem habe ich den wissenschaftlichen Fachartikel (inklusive des Bildmaterials) für das Fachjournal *Brain Research* selbstständig angefertigt bzw. verfasst, sowie die erforderliche Revision bearbeitet und erneut hochgeladen.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## 10. Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge<sup>SM</sup>)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 267 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	43,107	33.162	0.068480
2	NATURE NEUROSCIENCE	63,390	21.126	0.164700
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	20,206	18.174	0.041660
4	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,377	17.194	0.010240
5	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,095	16.173	0.040040
6	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,695	15.221	0.010560
7	NEURON	95,348	14.403	0.218680
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,163	12.314	0.024480
9	Annual Review of Neuroscience	14,042	12.043	0.015020
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	20,353	11.973	0.049290
11	BRAIN	52,970	11.814	0.074030
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	43,122	11.501	0.053320
13	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,929	10.658	0.013230
14	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
15	SLEEP MEDICINE REVIEWS	6,920	10.517	0.010920
16	ANNALS OF NEUROLOGY	37,336	9.496	0.048630
17	Molecular Neurodegeneration	4,248	8.274	0.011350
18	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	26,724	8.002	0.051580
19	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,196	7.852	0.005490
20	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	1,996	7.353	0.008220
21	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	25,672	7.160	0.039090

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	Brain Stimulation	5,457	6.919	0.014470
23	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,876	6.878	0.006420
24	NEUROENDOCRINOLOGY	5,046	6.804	0.005690
25	NEUROSCIENTIST	4,986	6.791	0.008520
26	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	14,533	6.170	0.025700
27	BRAIN PATHOLOGY	5,263	6.155	0.007880
28	Alzheimers Research & Therapy	3,160	6.142	0.010700
29	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	175,046	6.074	0.233460
30	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,766	6.040	0.028050
31	PAIN	38,312	6.029	0.039070
32	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	15,090	6.014	0.033650
33	Acta Neuropathologica Communications	3,063	5.883	0.014190
34	Translational Stroke Research	1,955	5.847	0.004330
35	GLIA	14,003	5.829	0.018760
36	NEUROIMAGE	99,720	5.812	0.132720
37	NEURAL NETWORKS	13,063	5.785	0.016060
38	NEUROPSYCHOLOGY REVIEW	2,971	5.739	0.003940
39	Molecular Autism	2,107	5.712	0.008000
40	Journal of Neuroinflammation	11,767	5.700	0.023240
41	Multiple Sclerosis Journal	11,501	5.649	0.022750
42	Annual Review of Vision Science	458	5.622	0.003300
43	Neurotherapeutics	4,475	5.552	0.009060
44	Translational Neurodegeneration	810	5.534	0.002420

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
45	CEREBRAL CORTEX	30,675	5.437	0.059570
46	JOURNAL OF PAIN	10,405	5.424	0.018280
47	NEUROBIOLOGY OF DISEASE	16,363	5.160	0.026710
48	NEUROINFORMATICS	1,277	5.127	0.002920
49	JOURNAL OF PHYSIOLOGY-LONDON	52,037	4.950	0.041100
50	BIPOLAR DISORDERS	5,143	4.936	0.006760
51	Developmental Cognitive Neuroscience	2,470	4.920	0.009240
52	JOURNAL OF PSYCHIATRY & NEUROSCIENCE	3,293	4.899	0.004540
53	JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY	35,902	4.870	0.026140
54	Dialogues in Clinical Neuroscience	3,384	4.867	0.004730
55	Annals of Clinical and Translational Neurology	1,858	4.656	0.008750
56	CURRENT OPINION IN NEUROLOGY	5,290	4.647	0.009650
57	MOLECULAR NEUROBIOLOGY	12,806	4.586	0.027560
58	SLEEP	21,434	4.571	0.024240
59	Current Neuropharmacology	3,508	4.568	0.005650
60	EXPERIMENTAL NEUROLOGY	20,500	4.562	0.023440
61	HUMAN BRAIN MAPPING	22,040	4.554	0.043230
62	Journal of Neural Engineering	7,336	4.551	0.012190
63	EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	7,488	4.468	0.015500
64	CEPHALALGIA	9,983	4.438	0.014480
65	NEUROBIOLOGY OF AGING	22,409	4.398	0.037090
66	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY	10,488	4.387	0.016970

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
67	NEUROPHARMACOLOGY	20,604	4.367	0.034460
68	PROGRESS IN NEURO- PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY	10,674	4.315	0.012400
69	Cognitive Computation	1,578	4.287	0.002230
70	CORTEX	10,302	4.275	0.024590
71	Neuroscience Bulletin	2,027	4.246	0.004070
72	JOURNAL OF PSYCHOPHARMACOLOGY	6,460	4.221	0.010120
73	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	6,551	4.207	0.012320
74	JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH	12,976	4.139	0.010060
75	Molecular Brain	2,467	4.051	0.007180
76	PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY	16,809	4.013	0.028150
77	NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL	8,775	3.994	0.009020
78	NUTRITIONAL NEUROSCIENCE	1,778	3.950	0.002260
79	Frontiers in Systems Neuroscience	4,801	3.928	0.015360
80	JOURNAL OF HEADACHE AND PAIN	3,308	3.918	0.007210
81	Frontiers in Cellular Neuroscience	9,711	3.900	0.035870
82	Journal of Neuroimmune Pharmacology	2,486	3.870	0.004750
83	ACS Chemical Neuroscience	5,238	3.861	0.013320
84	CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOLOGY	4,488	3.811	0.005740
85	NEUROGASTROENTEROLOGY AND MOTILITY	8,314	3.803	0.014510
86	JOURNAL OF NEUROTRAUMA	14,754	3.754	0.019770
87	Fluids and Barriers of the CNS	1,127	3.727	0.002650
88	Frontiers in Molecular Neuroscience	4,752	3.720	0.014230



Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
89	Journal of Parkinsons Disease	1,768	3.698	0.006340
90	CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	19,574	3.675	0.021420
91	Social Cognitive and Affective Neuroscience	6,966	3.662	0.020880
92	Frontiers in Neuroscience	13,198	3.648	0.043000
93	Frontiers in Aging Neuroscience	6,791	3.633	0.020910
94	Brain Structure & Function	6,077	3.622	0.019520
95	NEURAL PLASTICITY	3,691	3.591	0.010510
96	Journal of Neurodevelopmental Disorders	1,253	3.590	0.003420
97	Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation	4,974	3.582	0.008800
98	Neurophotonics	809	3.581	0.002760
99	JOURNAL OF ALZHEIMERS DISEASE	20,383	3.517	0.041470
100	PSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCES	3,720	3.489	0.004230
101	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	9,205	3.460	0.007510
102	JOURNAL OF SLEEP RESEARCH	5,432	3.432	0.007450
103	PSYCHOPHARMACOLOGY	23,565	3.424	0.022260
104	Current Opinion in Behavioral Sciences	1,763	3.422	0.009020
105	CEREBELLUM	2,785	3.413	0.005970
106	Current Neurology and Neuroscience Reports	3,004	3.400	0.007210
107	CNS Neuroscience & Therapeutics	2,993	3.394	0.005990
108	PSYCHOPHYSIOLOGY	14,275	3.378	0.012150
109	Cognitive Neuroscience	570	3.361	0.001630
110	NEUROTOXICITY RESEARCH	3,067	3.311	0.003750

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "NEUROSCIENCES"

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
111	HIPPOCAMPUS	8,733	3.267	0.013090
112	NEUROTOXICOLOGY	7,180	3.263	0.007100
113	NEUROSCIENCE	45,939	3.244	0.050820
114	JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY	30,418	3.239	0.017320
115	Current Alzheimer Research	4,026	3.211	0.005930
116	EUROPEAN JOURNAL OF PAIN	7,263	3.188	0.011070
117	GENES BRAIN AND BEHAVIOR	3,670	3.157	0.005300
118	BRAIN TOPOGRAPHY	2,629	3.104	0.004920
119	BRAIN RESEARCH BULLETIN	9,445	3.103	0.006570
120	Frontiers in Neural Circuits	3,107	3.101	0.014190
121	JOURNAL OF THE INTERNATIONAL NEUROPSYCHOLOGICAL SOCIETY	6,773	3.098	0.007380
122	Nature and Science of Sleep	520	3.054	0.001290
123	JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY	5,826	3.040	0.005430
124	Purinergic Signalling	1,617	3.038	0.002390
125	JOURNAL OF COGNITIVE NEUROSCIENCE	16,898	3.029	0.017960
126	Cognitive Neurodynamics	914	3.021	0.001650
127	NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY	6,836	3.010	0.013440
128	Frontiers in Neuroinformatics	609	3.000	0.001370
129	Progress in Brain Research	8,018	2.961	0.006860
130	HEARING RESEARCH	9,237	2.952	0.010490
131	BRAIN RESEARCH	53,805	2.929	0.031770
132	Frontiers in Neuroanatomy	2,971	2.923	0.010280

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "NEUROSCIENCES"

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
133	JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION	6,900	2.903	0.008030
134	NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY	3,789	2.902	0.003360
135	NEUROPSYCHOLOGIA	25,503	2.872	0.028230
136	Frontiers in Human Neuroscience	18,310	2.870	0.060330
137	MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE	6,693	2.855	0.007020
138	JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY	10,184	2.832	0.009550
139	Frontiers in Integrative Neuroscience	2,134	2.810	0.005670
140	NEUROLOGIC CLINICS	2,233	2.802	0.003290
141	Neurodegenerative Diseases	1,560	2.798	0.002450
142	Brain Sciences	1,190	2.786	0.003460
143	JOURNAL OF NEUROSCIENCE METHODS	17,224	2.785	0.016110
144	EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE	25,695	2.784	0.021530
145	NEUROCHEMICAL RESEARCH	9,744	2.782	0.012030
146	JOURNAL OF VESTIBULAR RESEARCH-EQUILIBRIUM & ORIENTATION	1,117	2.774	0.001440
147	PHARMACOLOGY BIOCHEMISTRY AND BEHAVIOR	12,045	2.773	0.008570
148	BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH	25,833	2.770	0.034190
149	SEIZURE-EUROPEAN JOURNAL OF EPILEPSY	5,557	2.765	0.010290
150	CNS & Neurological Disorders-Drug Targets	2,898	2.761	0.004910
151	IEEE Transactions on Cognitive and Developmental Systems	221	2.755	0.000300
152	Molecular Pain	3,466	2.746	0.005720
153	JARO-JOURNAL OF THE ASSOCIATION FOR RESEARCH IN OTOLARYNGOLOGY	2,145	2.716	0.003400
154	NEUROLOGY INDIA	2,607	2.708	0.001990

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
155	ASN Neuro	936	2.707	0.001890
156	BRAIN AND LANGUAGE	6,613	2.700	0.008080
157	Frontiers in Neuroinformatics	2,213	2.680	0.007300
158	NEUROPSYCHOLOGICAL REHABILITATION	2,173	2.667	0.002360
159	COGNITIVE AFFECTIVE & BEHAVIORAL NEUROSCIENCE	3,775	2.661	0.007460
160	JOURNAL OF THE NEUROLOGICAL SCIENCES	17,679	2.651	0.023320
161	Frontiers in Neurology	6,274	2.635	0.019550
162	Experimental Neurobiology	876	2.630	0.002520
163	Frontiers in Behavioral Neuroscience	6,340	2.622	0.022380
164	BMC NEUROSCIENCE	4,813	2.620	0.005520
165	BRAIN AND COGNITION	6,828	2.619	0.006650
166	JOURNAL OF NEUROPHYSIOLOGY	43,309	2.614	0.037050
167	NEUROMUSCULAR DISORDERS	5,164	2.612	0.008560
168	Developmental Neurobiology	3,083	2.600	0.005580
169	JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE	5,244	2.577	0.007890
170	NEUROMOLECULAR MEDICINE	1,960	2.576	0.002630
171	International Review of Neurobiology	2,778	2.551	0.003960
172	SYNAPSE	3,956	2.545	0.002550
173	CLINICAL AUTONOMIC RESEARCH	1,761	2.485	0.001950
174	NEUROLOGICAL SCIENCES	5,637	2.484	0.009990
175	NEUROPSYCHOLOGY	5,707	2.477	0.006470
176	Neural Regeneration Research	3,648	2.472	0.008930
177	Clinical Psychopharmacology and Neuroscience	644	2.470	0.001400

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
178	Behavioral and Brain Functions	1,586	2.457	0.001710
179	JOURNAL OF THE PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM	1,600	2.441	0.002130
180	GAIT & POSTURE	14,352	2.414	0.017290
181	METABOLIC BRAIN DISEASE	3,070	2.411	0.005510
182	INTERNATIONAL JOURNAL OF PSYCHOPHYSIOLOGY	7,897	2.407	0.009880
182	NEUROPEPTIDES	2,050	2.407	0.002520
184	MUSCLE & NERVE	12,279	2.393	0.014620
185	LEARNING & MEMORY	6,065	2.373	0.007230
186	INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE	3,383	2.367	0.004070
187	JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY	2,315	2.357	0.002280
188	CHEMICAL SENSES	4,443	2.336	0.003880
189	Frontiers in Computational Neuroscience	2,458	2.323	0.008650
190	Neural Development	994	2.317	0.001970
191	JOURNAL OF NEUROVIROLOGY	2,577	2.302	0.004270
192	NEURAL COMPUTATION	14,077	2.261	0.006250
193	AUTONOMIC NEUROSCIENCE-BASIC & CLINICAL	2,742	2.247	0.003710
194	VISION RESEARCH	15,884	2.178	0.010650
195	NEUROSCIENCE LETTERS	33,765	2.173	0.027830
196	STRESS-THE INTERNATIONAL JOURNAL ON THE BIOLOGY OF STRESS	2,538	2.168	0.003510
197	NEUROPHYSIOLOGIE CLINIQUE-CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	1,230	2.167	0.001380
198	NEUROPATHOLOGY	1,783	2.161	0.002720
199	REVIEWS IN THE NEUROSCIENCES	2,021	2.157	0.002730

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
200	Computational Intelligence and Neuroscience	2,499	2.154	0.002800
200	Social Neuroscience	1,794	2.154	0.003680
202	DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE	2,145	2.125	0.002460
203	BEHAVIORAL NEUROSCIENCE	6,665	2.102	0.004200
204	Journal of Mathematical Neuroscience	169	2.091	0.000790
205	Brain and Behavior	2,043	2.072	0.006700
206	NEUROSCIENCE RESEARCH	4,944	2.071	0.004920
207	AUDIOLOGY AND NEURO-OTOLOGY	1,825	2.053	0.002500
208	NEUROIMAGING CLINICS OF NORTH AMERICA	1,173	2.046	0.001310
209	Translational Neuroscience	376	2.038	0.001010
210	NEUROLOGICAL RESEARCH	3,894	1.983	0.003940
211	ACTA NEUROPSYCHIATRICA	863	1.978	0.001510
212	JOURNAL OF NEUROPSYCHIATRY AND CLINICAL NEUROSCIENCES	3,615	1.971	0.002540
213	HUMAN MOVEMENT SCIENCE	4,836	1.928	0.006030
214	STEREOTACTIC AND FUNCTIONAL NEUROSURGERY	1,807	1.905	0.002220
215	JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY A-NEUROETHOLOGY SENSORY NEURAL AND BEHAVIORAL PHYSIOLOGY	4,992	1.882	0.003930
216	EXPERIMENTAL BRAIN RESEARCH	21,880	1.878	0.014760
217	INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROSCIENCE	3,479	1.852	0.003860
218	RESTORATIVE NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE	1,952	1.839	0.002980
219	CLINICAL EEG AND NEUROSCIENCE	1,018	1.822	0.001510
220	CURRENT NEUROVASCULAR RESEARCH	1,044	1.811	0.001370

Selected JCR Year: 2018; Selected Categories: "NEUROSCIENCES"

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
221	BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY	2,627	1.788	0.002550
222	JOURNAL OF ELECTROMYOGRAPHY AND KINESIOLOGY	5,533	1.753	0.005230
223	JOURNAL OF NEUROGENETICS	731	1.698	0.001270
224	NEUROPSYCHOBIOLOGY	2,645	1.675	0.001820
225	JOURNAL OF CLINICAL NEUROPHYSIOLOGY	3,076	1.673	0.003540
226	BRAIN INJURY	6,229	1.665	0.007820
227	Journal of Stroke & Cerebrovascular Diseases	5,853	1.646	0.016500
228	VISUAL NEUROSCIENCE	2,222	1.645	0.001510
229	ACTA NEUROLOGICA BELGICA	991	1.612	0.001670
230	Biologically Inspired Cognitive Architectures	256	1.597	0.000360
231	JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE	8,027	1.593	0.013450
232	JOURNAL OF COMPUTATIONAL NEUROSCIENCE	1,928	1.568	0.002210
233	JOURNAL OF MUSCULOSKELETAL & NEURONAL INTERACTIONS	1,564	1.562	0.001780
234	BRAIN BEHAVIOR AND EVOLUTION	2,195	1.542	0.002110
235	ACTA NEUROBIOLOGIAE EXPERIMENTALIS	1,179	1.529	0.001050
236	ACTAS ESPANOLAS DE PSIQUIATRIA	592	1.479	0.000520
237	Cognitive Systems Research	690	1.384	0.000640
238	PSYCHIATRIC GENETICS	920	1.375	0.001180
239	NEUROIMMUNOMODULATION	1,409	1.351	0.001330
240	JOURNAL OF MOTOR BEHAVIOR	2,432	1.313	0.001820
241	BIOLOGICAL CYBERNETICS	4,672	1.305	0.001450
242	MOTOR CONTROL	779	1.302	0.000590
243	JOURNAL OF NEUROLINGUISTICS	1,015	1.247	0.001190

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
244	EUROPEAN NEUROLOGY	3,068	1.235	0.003160
244	SOMATOSENSORY AND MOTOR RESEARCH	780	1.235	0.000630
246	FOLIA NEUROPATHOLOGICA	635	1.160	0.000700
247	NEUROREPORT	13,203	1.146	0.005030
248	Journal of Integrative Neuroscience	419	1.139	0.000450
249	ARQUIVOS DE NEURO-PSIQUIATRIA	2,995	1.048	0.003210
250	JOURNAL OF PSYCHOPHYSIOLOGY	763	1.000	0.000400
250	NETWORK-COMPUTATION IN NEURAL SYSTEMS	755	1.000	0.000110
252	ARCHIVES ITALIENNES DE BIOLOGIE	656	0.974	0.000420
253	Brain Impairment	357	0.958	0.000430
254	ENCEPHALE-REVUE DE PSYCHIATRIE CLINIQUE BIOLOGIQUE ET THERAPEUTIQUE	1,295	0.865	0.001050
255	Chemosensory Perception	373	0.824	0.000590
256	INVERTEBRATE NEUROSCIENCE	323	0.800	0.000190
257	Sleep and Biological Rhythms	600	0.752	0.000830
258	NEUROENDOCRINOLOGY LETTERS	2,082	0.698	0.001720
259	NEUROCHIRURGIA	296	0.519	0.000230
260	ACUPUNCTURE & ELECTROTHERAPEUTICS RESEARCH	194	0.417	0.000030
261	CESKA A SLOVENSKA NEUROLOGIE A NEUROCHIRURGIE	223	0.355	0.000140
262	Neurochemical Journal	163	0.298	0.000150
263	ZHURNAL VYSSHEI NERVNOI DEYATELNOSTI IMENI I P PAVLOVA	290	0.269	0.000170
264	NEUROPHYSIOLOGY	224	0.267	0.000180
265	Journal of the History of the Neurosciences	250	0.244	0.000190



<b>Rank</b>	<b>Full Journal Title</b>	<b>Total Cites</b>	<b>Journal Impact Factor</b>	<b>Eigenfactor Score</b>
266	Ideggogyaszati Szemle-Clinical Neuroscience	144	0.113	0.000150
267	Journal of Neurological Sciences-Turkish	89	0.075	0.000050

Copyright © 2019 Clarivate Analytics

## **11. Sonderdruck der Publikation**

Die folgende Publikation wird aus urheberrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Guggenberger M, Engster KM, Hofmann T, Rose M, Stengel A, Kobelt P. Cholecystokinin and bombesin activate neuronatin neurons in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 2020;1746:147006.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628919/> DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147006>

## **12. Lebenslauf**

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

## **13. Eigene Publikationen**

Guggenberger, M., Engster, K.M., Hofmann, T., Rose, M., Stengel, A., Kobelt, P. Cholecystokinin and Bombesin Activate Neuronatin Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract in the Brainstem. *Brain Research*, 2020; 1746:147006.

## **14. Danksagung**

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. rer. nat. Peter Kobelt für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die außerordentlich engagierte und geduldige Unterstützung jeder Phase meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei Kim-Marie Engster und den technischen Assistent/Innen Petra Busse, Petra Moschansky und Reinhard Lommelt für die Einführung in Labortechniken und die gute, freundschaftliche Kooperation im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Stengel für die gute Zusammenarbeit und die Revision des Publikationsmanuskripts.

Ich danke meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und die Ermutigung in jeder Lebenslage.