

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

DISSERTATION

Untersuchungen zu appetitregulatorischen Peptiden unter besonderer Beachtung von
Cholecystokinin, Ghrelin und Nesfatin-1

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vanessa Lembke
aus Lübeck

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
1.1	ABSTRACT	3
1.2	EINLEITUNG.....	5
1.3	ZIELSTELLUNG	7
1.4	METHODIK.....	8
1.4.1	<i>Genehmigungen.....</i>	8
1.4.2	<i>Publikation 1: Der Einfluss von CCK-8S auf die Aktivierung von phospho-mTOR- und Oxytocin-positiven Neuronen des Nucleus Paraventricularis.....</i>	8
1.4.3	<i>Publikation 2: Die Auswirkungen einer Blockade des CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme der Ratte.....</i>	10
1.4.4	<i>Publikation 3: Untersuchung zur Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in humaner Magenmukosa in Abhängigkeit vom Body Mass Index.....</i>	11
1.5	ERGEBNISSE.....	14
1.5.1	<i>Publikation 1: Der Einfluss von CCK-8S auf die Aktivierung von phospho-mTOR- und Oxytocin-positiven Neuronen des Nucleus Paraventricularis.....</i>	14
1.5.2	<i>Publikation 2: Die Auswirkungen einer Blockade des CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme der Ratte.....</i>	14
1.5.3	<i>Publikation 3: Untersuchung zur Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in humaner Magenmukosa in Abhängigkeit vom Body Mass Index.....</i>	16
1.6	DISKUSSION	17
1.7	LITERATURVERZEICHNIS	20
2	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG / ANTEILSERKLÄRUNG.....	25
3	DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN.....	27
3.1	SULPHATED CHOLECYSTOKININ-8 ACTIVATES PHOSPHO-mTOR IMMUNOREACTIVE NEURONS OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS IN RATS	27
3.2	THE CCKB ANTAGONIST CI988 REDUCES FOOD INTAKE IN FASTED RATS VIA A DOPAMINE MEDIATED PATHWAY.....	34
3.3	GHRELIN AND NUCB2/NESFATIN-1 ARE EXPRESSED IN THE SAME GASTRIC CELL AND DIFFERENTIALLY CORRELATED WITH BODY MASS INDEX IN OBESE SUBJECTS	43
4	LEBENS LAUF	54
5	VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONS LISTE	55
6	DANKSAGUNG	56

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract

Hintergrund: Cholecystokinin (CCK) ist ein Peptid mit anorexigener Wirkung. Die Serin-Threonin-Kinase mTOR soll in die Integration der verschiedenen peptidergen Sättigungssignale involviert sein. Bislang ist unklar, ob das zentrale CCK-B-Rezeptorsystem die Sättigungsregulation beeinflusst. In der Magenmukosa von Ratten wurden die Hormone NUCB2/Nesfatin-1 und Ghrelin in der X/A-ähnlichen Zelle nachgewiesen. Im Tiermodell hatte der individuelle Ernährungszustand einen Einfluss auf das Expressionsmuster dieser Hormone.

Methodik: Für die erste Studie wurde ungestauten Ratten 6 bzw. 10 µg/kg (5,2 bzw. 8,7 nmol/kg) Körpergewicht CCK-8S intraperitoneal (IP-) injiziert und daraufhin die neuronale Aktivität von phospho-mTOR- und Oxytocin-positiven Neuronen des Nucleus paraventricularis (PVN) mittels Immunfluoreszenzhistologie bestimmt. Für die zweite Studie erhielten gestaute Ratten eine intrazerebroventrikuläre (IZV-) Injektion des CCK-B-Rezeptorantagonisten CI988 in Kombination mit dem CRF-1-Rezeptorantagonisten CP376395 Hydrochlorid, dem CRF-2-Rezeptorantagonisten K41498 oder eine IP-Injektion des Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol. Anschließend wurde die Nahrungsaufnahme der Tiere gemessen. Für die dritte Studie wurde Magenmukosa von adipösen Patienten, die sich einer Sleeve-Gastrektomie unterzogen, histologisch und mittels Western Blot auf die Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in Abhängigkeit vom individuellen BMI untersucht.

Ergebnisse: Eine IP-Injektion von CCK-8S steigerte dosisabhängig die neuronale Aktivität phospho-mTOR-positiver Neuronen des PVN, die partiell mit Oxytocin kolokalisiert waren. CI988 reduzierte nach IZV-Injektion die Nahrungsaufnahme, wobei dieser Effekt nicht durch die CRF-Rezeptorantagonisten, jedoch durch den Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol reversibel war. Ghrelin und NUCB2/Nesfatin-1 sind in der menschlichen X/A-ähnlichen Zelle kolokalisiert. Bei adipösen Menschen konnte beobachtet werden, dass mit steigendem BMI die Anzahl Ghrelin-positiver Magenmukosazellen fiel, während die der NUCB2/Nesfatin-1-positiven Zellen stieg.

Schlussfolgerung: Peripheres CCK scheint im PVN über einen phospho-mTOR-abhängigen Mechanismus zu wirken. Nach Nahrungskarenz hat zentrales CCK eine Bedeutung für die Nahrungsaufnahme. Ghrelin und NUCB2/Nesfatin-1 zeigen in Abhängigkeit vom BMI bei adipösen Menschen unterschiedliche Expressionsmuster und reflektieren möglicherweise einen Adaptionsmechanismus.

Background: Cholecystokinin (CCK) is a peptide with anorexigenic effects. The serine/threonine kinase mTOR is thought to be involved in the integration of peptidergic satiety signals. So far it is unclear whether food intake regulation is influenced by the central CCK-B receptor system. Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 were found in the X/A-like cell of gastric mucosa in rats. Their expression patterns vary depending on the nutritional status of the individual.

Methods: For the first study fasted male Sprague Dawley Rats were injected intraperitoneally (IP) with 6 or 10 µg/kg (5.2 or 8.7 nmol/kg) body weight CCK-8S. Neuronal activity of phospho-mTOR- and oxytocin-positive neurons of the paraventricular nucleus (PVN) was assessed by means of immunohistochemistry. For the second study fasted rats received an intracerebroventricular (ICV) injection of the CCK-B receptor antagonist CI988 in combination with the CRF-1 receptor antagonist CP376395, the CRF-2 receptor antagonist K41498 or IP injection of the dopamine antagonist flupentixol. Subsequently, food intake was quantified. For the third study gastric mucosa of patients undergoing sleeve gastrectomy was investigated by western blot and immunohistochemistry regarding ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 expression depending on body mass index (BMI) of the subject.

Results: IP injection of CCK-8S caused a dose dependent increase in neuronal activity of phospho-mTOR-positive neurons of the PVN, being partially colocalized with oxytocin. ICV injection of CI988 reduced food intake significantly. This effect was abolished by flupentixol, but not the CRF receptor antagonists. In humans ghrelin and nesfatin-1 are colocalized in the X/A-like cell of the gastric mucosa. In obese subjects less ghrelin, but more NUCB2/nesfatin-1 immunoreactivity was observed with increasing BMI.

Conclusion: Phospho-mTOR seems to be involved in the anorexigenic effects of peripheral CCK. Food intake regulation after fasting might be influenced by central CCK. In obese subjects ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 seem to be differentially expressed depending on BMI. This might represent an adaptation mechanism to obesity.

1.2 Einleitung

Die Regulation der Nahrungsaufnahme beruht unter anderem auf engen Wechselwirkungen zwischen dem Gastrointestinaltrakt und dem Gehirn, für die der Begriff „Brain-Gut-Achse“ geprägt wurde. Neben appetitfördernden und appetithemmenden Hormonen und Neuropeptiden sind der Nervus vagus, sowie bestimmte hypothalamische Kerngebiete in diese Regelkreise involviert (1).

Cholecystokin (CCK) ist ein Peptidhormon mit anorexigener Wirkung (2). Durch posttranslationale Modifizierung des Vorläuferhormons Präprocholecystokin (3) entstehen unter anderem die zirkulierenden, biologisch aktiven Formen CCK-12, CCK-8 und CCK-4 (4). Man nimmt heute an, dass die appetithemmenden Effekte von peripher appliziertem CCK über CCK-A-Rezeptoren an vagalen Afferenzen vermittelt werden (5, 6). Über den Nervus vagus gelangen die Signale zum Nucleus tractus solitarii (NTS) und über weitere neuronale Verschaltungen zu hypothalamischen Kerngebieten wie dem Nucleus paraventricularis (PVN) (7-9). Immunhistochemische Studien nutzten den Transkriptionsfaktor c-Fos als Marker für neuronale Aktivität (10) um die Effekte von CCK auf verschiedene Bereiche des Gehirns zu untersuchen. Nach peripherer Injektion von sulfatiertem CCK-8 (CCK-8S) ließ sich eine vermehrte c-Fos Expression in Zellen des PVN (11), in zum NTS projizierenden Neuronen des PVN (12) und in Zellen des NTS (13) selbst nachweisen. Die aktivierten Nervenzellen waren dabei für verschiedene, ebenso anorexigene Neuropeptide, positiv, darunter NUCB2/Nesfatin-1 (13), Corticotropin Releasing Factor (CRF), sowie Oxytocin (11).

Die Serin/Threonin-Kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) reguliert in Abhängigkeit vom Energiestatus der Zelle die Transkription (14) und Translation (15) von Proteinen. Zusätzlich scheint mTOR einen Einfluss auf die Regulation der Nahrungsaufnahme zu haben (16). Phosphoryliertes (phospho-), somit aktiviertes, mTOR konnte unter anderem in den für die Nahrungsaufnahme relevanten Hypothalamusregionen, dem PVN und dem Nucleus Arcuatus (ARC) nachgewiesen werden (16). In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte mTOR-Aktivität die Nahrungsaufnahme hemmt und zu einer verminderten mRNA-Expression des orexigenen Neuropeptid Y (NPY) führt (16). Bislang ist unklar, inwiefern phospho-mTOR und CCK bei der Sättigungsregulation interagieren.

Neben dem bereits erwähnten CCK-A-Rezeptor wird mittlerweile auch dem hauptsächlich im Gehirn lokalisierten CCK-B-Rezeptor eine Bedeutung in den Regulationskreisläufen der Nahrungsaufnahme zugeschrieben, wobei seine Rolle noch nicht abschließend geklärt ist. Die zentrale Injektion der beiden CCK-B-Rezeptorantagonisten D-135158 und L365,260

induzierte in Studien eine Steigerung der Nahrungsaufnahme (17-19). In einigen Experimenten waren CCK-B-Rezeptor-defiziente Mäuse hyperphag (20, 21) und adipös (22), in anderen Experimenten war wiederum keine Änderung des Fressverhaltens und Phänotyps zu erkennen (23). Nach intrazerebroventrikulärer (IZV-) Injektion des CCK-B-Rezeptorantagonisten L365,260 verringerten Ratten ihre Nahrungszufuhr (24). In der vorliegenden Arbeit wurde CI988 (PD 134308), ein spezifischer CCK-B-Rezeptorantagonist mit anxiolytischer Wirkung, verwendet (25). CRF (26, 27) und Dopamin (28) inhibieren die Nahrungsaufnahme. CCK und CRF sind häufig in hypothalamischen Neuronen kolokalisiert (29). Ein Einfluss dieser Neurotransmitter auf das CCK-vermittelte Sättigungsgefühl erscheint somit möglich.

Das vorrangig aus der X/A-ähnlichen Zelle der Magenmukosa stammende (30) Peptidhormon Ghrelin gilt als orexigen (31, 32). Damit Ghrelin seine Wirkung am Growth Hormone Secretagogue Rezeptor 1a (GHS-R1a) entfalten kann, bedarf es der n-Oktanylierung an der dritten Aminosäure (33) durch das Enzym Ghrelin-*O*-Acyltransferase (GOAT) (34, 35). Der Ernährungszustand eines Individuums beeinflusst den Ghrelin-Plasmaspiegel im Sinne einer Erniedrigung bei hohem Body Mass Index (BMI) (36), und einer Erhöhung bei niedrigem BMI (37). In der Magenmukosa von Ratten wurde eine Kolokalisation von Ghrelin und Nucleobindin2 (NUCB2) /Nesfatin-1 in X/A-ähnlichen Zellen beobachtet (38). Studien an humaner Magenmukosa fehlen hierzu bislang. Nesfatin-1 ist ein anorexigenes Peptidhormon, welches aus dem Protein NUCB2 nach posttranslationaler Modifikation hervorgeht (39). NUCB2/Nesfatin-1-positive Neuronen wurden auch in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen (39, 40). Anorexia-nervosa-Patienten weisen einen erniedrigten NUCB2/Nesfatin-1-Plasmaspiegel auf (41). Diese Beobachtung spricht für einen peripheren Adaptionsmechanismus des Organismus an seinen Ernährungszustand.

1.3 Zielstellung

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel angefertigt, die Wirkungsweisen und Interaktionen zwischen wichtigen zentralen und peripheren Peptiden und Hormonen der Sättigungsregulation untersuchen.

In der ersten Publikation wurde analysiert, inwiefern phospho-mTOR und Oxytocin im PVN an der Vermittlung der Effekte von peripherem CCK-8S beteiligt sind.

In der zweiten Publikation sollte ein möglicher regulatorischer Einfluss des CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme untersucht werden. Zudem wurde überprüft, ob das CRF- und das Dopamin-System in diese Regelkreisläufe involviert sind und somit einen eventuellen CCK-B-Rezeptor-vermittelten Effekt auf die Nahrungsaufnahme modulieren können.

In den Studien der dritten Publikation wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Body Mass Index adipöser Patienten und der Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in der Magenmukosa evaluiert.

1.4 Methodik

1.4.1 Genehmigungen

Die Tierversuche waren durch die Tierschutzkommission beim Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt worden (Tierschutznummern G0053/06 und G0127/09). Die humane Studie wurde im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und war durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA1/225/10).

1.4.2 Publikation 1: Der Einfluss von CCK-8S auf die Aktivierung von phospho-mTOR- und Oxytocin-positiven Neuronen des Nucleus Paraventricularis

Versuchsaufbau

Für die Versuche wurden männliche Sprague Dawley Ratten (Harlan Winkelmann Co., Borcheln, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 170-190 g verwendet. Die Tiere hatten zuvor freien Zugang zu Standard-Rattenfutter (Altromin®, Lage, Deutschland) und Trinkwasser. Zu Beginn der Experimente wurde den Tieren jeweils 500 µl einer Lösung mit 6 µg/kg Körpergewicht (KG) (5,2 nmol/kg KG) CCK-8S (Bachem AG, Heidelberg, Deutschland) (Anzahl (n) =4), 10 µg/kg KG (8,7 nmol/kg KG) CCK-8S (n=4) bzw. reine Vehikellösung (0,15 M Natriumchloridlösung, Braun, Melsungen, Deutschland) (n=4) intraperitoneal (IP) injiziert. 90 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere narkotisiert und analog dem bereits beschriebenen Protokoll (42) transkardial mit Fixierlösung perfundiert, ihre Hirne entnommen und für die Immunhistologie aufbereitet.

Immunfluoreszenzhistologie zum Nachweis von c-Fos im PVN, ARC und NTS

25 µm dicke Gewebeschnitte aus den Bereichen des PVN, ARC und NTS wurden nach der „free-floating“-Methode zum immunfluoreszenzhistochemischen Nachweis von c-Fos markiert. Hierzu wurde nach üblicher Vorbereitung (13, 42) der Anti-c-Fos-Antikörper (Rabbit anti-c-Fos Antibody, Oncogene Research Products, Boston, USA) 1:3000 in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) mit 1% w/v bovinem Serum Albumin (BSA, Sigma, St. Louis, USA) für 24 Stunden mit den Gewebeschnitten inkubiert. Auf den Sekundärantikörper (Goat Biotin-SP-conjugated anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA, 1:1000 in PBS-BSA) folgte die Amplifizierung des Fluoreszenzsignals mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und TSA™ Tetramethyl Fluorescein Tyramide (PerkinElmer, Waltham, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Zur Orientierung im Gewebe wurde eine Kernfärbung mit 4',6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma, St. Louis, USA) durchgeführt.

Immunfluoreszenzhistologie zum Nachweis von c-Fos und phospho-mTOR im PVN

An die oben beschriebene c-Fos-Färbung schloss sich bei diesem Protokoll die 24-stündige Inkubation mit dem Anti-phospho-mTOR-Antikörper (Rabbit anti-phospho-mTOR Antibody, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, USA, 1:1000 in PBS-BSA) an. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Goat Biotin-SP-conjugated anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., 1:500 in PBS-BSA) wurde das Fluoreszenzsignal mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (1:1000 in Blockierpuffer) und TSA™ Tetramethyl Rhodamine Tyramide verstärkt. Auch hier erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI.

Immunfluoreszenzhistologie zum Nachweis von c-Fos, phospho-mTOR und Oxytocin im PVN

Die Markierung von c-Fos und phospho-mTOR erfolgte wie zuvor beschrieben, mit dem Unterschied, dass bei diesem Protokoll das c-Fos-Fluoreszenzsignal mit TSA™ Tetramethyl Rhodamine Tyramide und das phospho-mTOR-Fluoreszenzsignal mit TSA™ Tetramethyl Fluorescein Tyramide amplifiziert wurden. Der Anti-Oxytocin-Antikörper (Mouse anti-Oxytocin Monoclonal Antibody, Chemicon International, Temecula, USA, 1:6000 in PBS-BSA) wurde ebenfalls 24 Stunden mit den Gehirnschnitten inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor® 633 Goat anti-Mouse IgG (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, 1:300 in PBS-BSA) verwendet. Die Gegenfärbung der Zellkerne wurde mit DAPI durchgeführt.

Mikroskopische und statistische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung wurde am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop Typ 510 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) vorgenommen. Hierbei wurde die Anzahl von c-Fos-positiven Neuronen bilateral in jedem vierten Gewebeschnitt des PVN, ARC und NTS bestimmt. Im PVN wurden weiterhin die Anzahl von phospho-mTOR-positiven Nervenzellen und die Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen, die mit phospho-mTOR kolokalisiert waren, ermittelt. Des Weiteren wurden die mit phospho-mTOR und Oxytocin kolokalisierten c-Fos-positiven Neuronen in jedem vierten Schnitt des PVN gezählt (n=3/Gruppe). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und mittels Varianzanalyse oder dem Kruskal-Wallis Test analysiert. Mit dem Student-Newman-Keuls oder Fisher LSD post hoc Test wurden die Unterschiede zwischen den Gruppe bewertet. Als signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen.

1.4.3 Publikation 2: Die Auswirkungen einer Blockade des CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme der Ratte

Vorbereitungen zu den IZV Injektionen:

Männlichen Sprague Dawley Ratten (Harlan Winkelmann Co.) mit einem Körpergewicht von 170-190 g wurde in Vorbereitung auf die Experimente eine 22-Gauge-Führungskanüle (Plastics One, Roanoke, USA) in den rechten lateralen Hirnventrikel implantiert. Die Führungskanüle wurde 0,8 mm posterior, 1,5 mm rechts lateral und 3,5 mm ventral vom Bregma stereotaktisch platziert.

Versuchsaufbau: Die Auswirkungen einer Blockade des zentralen CCK-B-, CRF-1- oder CRF-2-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme bei gefasteten Ratten vor der Lichtphase

Nach 24-stündiger Nahrungskarenz bei freiem Zugang zu Trinkwasser wurden den Tieren folgende Lösungen mit einem jeweiligen Gesamtvolumen von 10 µl IZV injiziert: Vgl. Tabelle 1

Tabelle 1

IZV-Injektion	IP-Injektion	Metabolischer Status	Anzahl
DMSO	-	<i>ad libitum</i> gefüttert	14
DMSO	-	gefastet	15
10 nmol CI988 + DMSO	-	gefastet	8
49 nmol CI988 + DMSO	-	gefastet	15
2 nmol K41498 + DMSO	-	gefastet	6
49 nmol CI988 + 2 nmol K41498 + DMSO	-	gefastet	6
3 nmol CP 376395 +DMSO	-	gefastet	7
49 nmol CI988 +3nmol CP376395 + DMSO	-	gefastet	6
DMSO	197 nmol Flupentixol/kg	gefastet	6
49 nmol CI988 + DMSO	197 nmol Flupentixol/kg	gefastet	7
DMSO	493 nmol Flupentixol/kg	gefastet	6
49 nmol CI988 + DMSO	493 nmol Flupentixol/kg	gefastet	7

Unmittelbar nach den Injektionen und kurz vor Beginn der Lichtphase wurde den Tieren zuvor abgewogenes Futter präsentiert. Über einen Zeitraum von 11 Stunden wurde zu den Zeitpunkten ½ und 1-11 Stunden post injectionem die Futtermenge bestimmt und daraus die kumulative Nahrungsaufnahme berechnet.

Versuchsaufbau: Die Auswirkungen einer Blockade des zentralen CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme bei ungefasteten Ratten vor der Dunkelphase

30 Minuten vor Einsetzen der Dunkelphase wurde ungestauten Tieren entweder 49 nmol CI988 (n=12) oder Vehikellösung (DMSO, n=15) IZV injiziert. Zu Beginn der Dunkelphase erhielten die Tiere Zugang zu abgewogenem Futter und die kumulative Nahrungsaufnahme wurde über einen Zeitraum von 11 Stunden erfasst.

Versuchsaufbau: Die Auswirkungen einer Blockade des peripheren CCK-B-Rezeptorsystems bei gefasteten Ratten vor der Lichtphase

Nach 24-stündiger Nahrungskarenz bei uneingeschränktem Zugang zu Trinkwasser erhielten die Ratten entweder den CCK-B-Rezeptorantagonisten CI988 in einer Dosierung von 488 nmol/kg KG (n=6), von 1626 nmol/kg KG (n=6) oder Vehikellösung (DMSO, n=6) 30 Minuten vor Beginn der Lichtphase IP injiziert. In Einzelkäfigen wurde den Tieren abgewogenes Futter zugänglich gemacht. Das Futter wurde zu den Zeitpunkten ½, 1, 2, 3, 4, 5 und 11 Stunden post injectionem erneut gewogen und die kumulative Nahrungsaufnahme festgestellt.

Datenauswertung

Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde nach der IZV-Injektion in g/Ratte und nach der IP-Injektion in g/kg KG angegeben. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt und mittels Varianzanalyse untersucht. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit der Fisher LSD Methode bewertet. Die Nahrungsaufnahme während der Dunkelphase wurde mittels T-Test geprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ definiert.

1.4.4 Publikation 3: Untersuchung zur Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in humaner Magenmukosa in Abhängigkeit vom Body Mass Index

Studiendesign

Für diese Studie wurde Magengewebe verwendet, welches adipösen Patienten im Rahmen einer Sleeve-Gastrektomie im Zentrum für Adipositas und Bariatrische Chirurgie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, entnommen wurde. Die 14 Individuen wurden entsprechend ihres BMI in zwei Gruppen eingeteilt (Gruppe A: 40-50 kg/m² und Gruppe B: 55-65 kg/m²).

Immunhistologie zum Nachweis von Ghrelin, NUCB2/Nesfatin-1 und GOAT

Die 10 μ m dicken Gewebeschnitte der Magenmukosa wurden zunächst mit Natriumborhydrid und Triton-X-100 vorbehandelt. Daraufhin wurden der Anti-Ghrelin-Antikörper (Goat polyclonal Anti-Ghrelin Antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) 1:1000

und der Anti-Nesfatin-1-Antikörper (Rabbit Polyclonal anti-Nesfatin-1 Antibody, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, USA) 1:400 bzw. der Anti-GOAT-Antikörper (Rabbit Polyclonal anti-GOAT Antibody, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) 1:500 in einer Lösung aus 1% v/v Normal Donkey Serum (NDS) und 0,3% v/v Triton X-100 in PBS 24 Stunden lang mit den Gewebeschnitten inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten TRITC-labeled donkey anti-goat IgG und FITC-labeled donkey anti-rabbit IgG (beide Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:300 bzw. 1: 200 verdünnt in PBS-NDS. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI.

Präabsorptions- und Kreuzreaktivitätstest

Zur Kontrolle wurde das gleiche Färbeprotokoll erneut nach Präabsorption des Anti-Ghrelin- bzw. Anti-Nesfatin-1-Antikörpers angewendet. Jeweils 1 ml der Primärantikörperlösungen (Goat anti-Ghrelin Antibody, Santa Cruz, 1:1000 und Rabbit anti-Nesfatin Antibody, Phoenix Pharmaceuticals, 1:400) wurde zusammen mit 20 µg humanem Ghrelin-Peptid bzw. 100 µg humanem Nesfatin-1-Peptid in PBS-NDS vorinkubiert. Nach Zentrifugation der Lösung wurde der Überstand für oben genannte Markierung benutzt.

Um Kreuzreaktivitäten zwischen den Peptiden und Antikörpern auszuschließen wurden 100 µg humanes Nesfatin-1-Peptid (Phoenix Pharmaceuticals) mit 1 ml Anti-Ghrelin-Antikörperlösung (Goat anti-Ghrelin Antibody, Santa Cruz, 1:1000 in PBS-NDS), sowie 20 µg Ghrelin-Peptid mit 1 ml Anti-Nesfatin-1-Antikörperlösung (Rabbit anti-Nesfatin Antibody, Phoenix Pharmaceuticals, 1:400 in PBS-NDS) vorinkubiert und anschließend in oben beschriebenen Protokoll angewendet.

Western Blot

Die Proteinkonzentration der Magenmukosa wurde mit dem BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) entsprechend den Herstelleranweisungen bestimmt. Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit Gelprobenpuffer (4% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,05% w/v Bromphenolblau, 20% Glycerol, 1% v/v Mercaptoethanol in 0,1 Tris-Puffer, pH 6,8) 1 Minute lang gekocht. Die Taschen eines 4-12% SDS-Polyacrylamidgels (NuPage, Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden mit jeweils 20 µl der Proteinprobenlösung versehen. Eine Tasche wurde mit 10 µl Lösung eines Molekulargewichtsmarkers (SeeBlue, Invitrogen) befüllt. Die Gele wurden in eine mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt. Die aufgetragenen Proteinproben wurden entsprechend ihrer Molekülgröße elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembranen (Bio-Plot-NC, Costar, Cambridge, USA) transferiert. Nach Färbung mit Ponceau S in 3%

Trichloressigsäure und Vorinkubation mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) und 5% v/v fettfreier Milch (Carnation, Nestlé, Glendale, CA, USA) wurden die Antikörperlösungen, Anti-Ghrelin (Santa Cruz) oder Anti-Nesfatin-1 (Phoenix Pharmaceuticals) in einer Konzentration von 1:1000 bzw. 1:2000 in TBS für 60 Minuten mit den Membranen inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Anti-Goat oder Anti-Rabbit IgG (beide Promega, Madison, USA, 1:2000 in TBS) verwendet. Die Membranen wurden in einem Alkalische-Phosphatase-Puffer mit 0,3% v/v Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Lösung und 0,15% v/v 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-1-phosphat-Lösung entwickelt.

Datenauswertung

Der Untersuchende war zum Zeitpunkt der Auszählung gegenüber dem BMI des Patienten, dessen Gewebeprobe vorlag, verblindet. In zehn aufeinander folgenden Gewebeschnitten wurden jeweils die Ghrelin-, die NUCB2/Nesfatin-1- und die GOAT-positiven Zellen ausgezählt. Außerdem wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, in denen die genannten Peptide und Proteine kolokalisiert waren. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und mittels Varianzanalyse analysiert. Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde mittels Mann-Whitney Test untersucht, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant festgelegt wurde.

1.5 Ergebnisse

1.5.1 Publikation 1: Der Einfluss von CCK-8S auf die Aktivierung von phospho-mTOR- und Oxytocin-positiven Neuronen des Nucleus Paraventricularis

Die IP-Injektion von 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG (5,2 nmol/kg KG) bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG (8,7 nmol/kg KG) CCK-8S steigerte die Anzahl von c-Fos-positiven Neuronen im PVN (103 ± 13 bzw. 165 ± 14 Neuronen/Hirnschnitt, $p < 0,05$) im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant (4 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt, $p < 0,05$). Während weder 6 noch 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG CCK-8S eine Veränderung in der Anzahl c-Fos-positiver Neurone (1 ± 1 bzw. 3 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt) im Vergleich zur Vehikelgruppe (3 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt, $p > 0,05$) im ARC hervorrief, wurde eine signifikante, dosisabhängige Steigerung der neuronalen Aktivierung im NTS registriert (Vehikel: 2 ± 1 vs. 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: 51 ± 2 vs. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: 155 ± 11 Neuronen/Hirnschnitt, $p < 0,05$).

Die Markierung von phospho-mTOR zeigte im NTS keinerlei Immunreaktivität. Im PVN fand sich in den mit CCK-8S behandelten Gruppen keine signifikant höhere Anzahl von phospho-mTOR-positiven Nervenzellen (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: 255 ± 30 vs. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: 229 ± 46 Neuronen/Hirnschnitt, $p > 0,05$) im Vergleich zur Vehikelgruppe (197 ± 24 Neurone/Hirnschnitt).

Auch der Anteil an phospho-mTOR-haltigen Oxytocin-Neuronen stieg nach Gabe von 6 bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG CCK-8S ($62 \pm 11\%$ bzw. $64 \pm 6\%$ Neuronen/Hirnschnitt) im Vergleich zur Vehikelgruppe ($48 \pm 5\%$ Neuronen/Hirnschnitt, $p > 0,05$) nicht signifikant an.

Jedoch nahm der Anteil an c-Fos-positiven Neuronen, die mit phospho-mTOR kolokalisiert waren, in den CCK-8S-Gruppen zu (Vehikel: $0 \pm 0\%$ vs. 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: $17 \pm 2\%$ vs. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG: $24 \pm 1\%$, $p < 0,05$).

Nach der Dreifachmarkierung erwiesen sich $9,8 \pm 3,6\%$ (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG CCK-8S) bzw. $19,5 \pm 3,3\%$ (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG CCK-8S) der Oxytocin-Neuronen als mit c-Fos und phospho-mTOR kolokalisiert.

1.5.2 Publikation 2: Die Auswirkungen einer Blockade des CCK-B-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme der Ratte

Die Auswirkungen einer Blockade des zentralen CCK-B-, CRF-1- oder CRF-2-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme der gefasteten Ratte vor der Lichtphase

Bereits zwei Stunden nach der IZV-Injektion von 49 nmol des CCK-B-Rezeptorantagonisten CI988 zeigten die gefasteten Tiere eine signifikant reduzierte Nahrungsaufnahme verglichen mit

der DMSO-behandelten Kontrollgruppe ($4,43 \pm 0,64$ g/Ratte vs. $6,4 \pm 0,61$ g/Ratte, $p < 0,05$). Die signifikante Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme war über den gesamten Messzeitraum von 11 Stunden zu beobachten ($14,07 \pm 1,24$ g/Ratte vs. $18,38 \pm 0,99$ g/Ratte, $p < 0,05$). Weder die IZV-Injektion des CRF-1-Rezeptorantagonisten (3 nmol CP376396 Hydrochlorid) noch die des CRF-2-Rezeptorantagonisten (2 nmol K41498) änderten die verzehrte Futtermenge im Vergleich zur Vehikelgruppe 11 Stunden nach der Injektion ($15,93 \pm 1,29$ bzw. $17,16 \pm 1,67$ vs. $18,38 \pm 0,99$ g/Ratte, $p > 0,05$). Die beiden CRF-Rezeptorantagonisten hatten während des gesamten Messzeitraumes ebenso keinen Effekt auf die durch CI988 reduzierte kumulative Nahrungsaufnahme.

Auch der Dopamin-Rezeptorantagonist Flupentixol allein injiziert führte nach IP-Injektion in beiden Dosierungen zu keiner Beeinflussung der Nahrungsaufnahme. Ebenso modulierte die Vorbehandlung mit 197 nmol/kg KG Flupentixol unmittelbar vor der IZV-Injektion von CI988 die durch CI988 reduzierte Nahrungsaufnahme nicht. Jedoch wurde die nach IZV-Injektion von CI988 beobachtete Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme durch die Vorbehandlung mit 493 nmol/kg Flupentixol 2,4,5,7 und 10 Stunden nach der IP-Injektion komplett aufgehoben (Flupentixol + CI988: $16,06 \pm 0,95$ g/Ratte vs. Vehikel + CI988: $12,37 \pm 1,22$ g/Ratte nach 10 Stunden, $p < 0,05$).

Auswirkungen einer IZV-Injektion von CI988 auf die Nahrungsaufnahme der ungesteteten Ratte während der Dunkelphase

Bei ungesteteten Tieren konnte der CCK-B-Rezeptorantagonist CI988 bei der verwendeten Dosis von 49 nmol/Ratte nach IZV-Injektion im Vergleich zur Vehikelgruppe keine Reduktion der Nahrungsaufnahme während der gesamten Beobachtungsdauer von 11 Stunden bewirken.

Auswirkungen einer IP-Injektion von CI988 auf die Nahrungsaufnahme der gesteteten Ratte

11 Stunden nach der IP-Injektion von 488 nmol/kg CI988 konnte bei den Tieren kein signifikanter Unterschied in der aufgenommenen Futtermenge im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren festgestellt werden (488 nmol/kg CI988: $45,19 \pm 2,67$ vs. Vehikel: $42,06 \pm 2,83$ g/kg KG). Bei einer Dosis von 1626 nmol/kg war jedoch im Vergleich zur Vehikelgruppe 2, 4 und 5 Stunden post injectionem eine statistisch signifikant reduzierte Nahrungsaufnahme erkennbar (1626 nmol/kg CI988: $13,43 \pm 2,79$ vs. Vehikel: $24,27 \pm 1,95$ g/kg KG nach 5 Stunden, $p < 0,05$).

1.5.3 Publikation 3: Untersuchung zur Ghrelin- und NUCB2/Nesfatin-1-Expression in humaner Magenmukosa in Abhängigkeit vom Body Mass Index

Nach immunhistochemischer Doppelmarkierung gegen Ghrelin und NUCB2/Nesfatin-1 konnte eine weitgehende Kolo-kalisierung der beiden Peptide in der menschlichen Magenmukosa festgestellt werden. In 78% der NUCB2/Nesfatin-1-positiven Zellen fand sich Ghrelin-Immunreaktivität. Bei der Auswertung hochauflösender Bilder konnte beobachtet werden, dass Ghrelin und NUCB2/Nesfatin-1 im Zytoplasma von Magenmukosazellen in denselben intrazellulären Vesikeln vorkommen. In der Magenmukosa war Ghrelin zudem mit GOAT kolo-kalisiert. 65% der GOAT-positiven Zellen wiesen Ghrelin-Immunreaktivität auf. In den hochauflösenden Aufnahmen erschienen Ghrelin und GOAT intrazellulär in denselben zytoplasmatischen Vesikeln kolo-kalisiert.

Mit ansteigendem BMI verringerte sich die Anzahl Ghrelin-positiver Zellen (55-65 kg/m²: 96 ± 12 vs. 40-50 kg/m²: 204 ± 21 Zellen/Gewebeschnitt, p<0,05), während die Anzahl NUCB2/Nesfatin-1-positiver Zellen anstieg (118 ± 10 vs. 82 ± 11 Zellen/Gewebeschnitt, p<0,05). Ähnlich wie bei Ghrelin war die Immunreaktivität für GOAT ebenfalls negativ korreliert mit steigendem BMI, wenn auch nicht signifikant (40,1 ± 9 vs. 20,9 ± 4,3 Zellen/Gewebeschnitt, p>0,05).

Die Präabsorption des Anti-Ghrelin-Antikörpers mit Ghrelin-Peptid und des Anti-NUCB2/Nesfatin-1-Antikörpers mit Nesfatin-1-Peptid führte zum fast vollständigen Fehlen von Immunfluoreszenz-Signalen. Nach dem Auslassen der Primärantikörperlösungen waren ebenso keine Markierungen im Gewebe zu finden. Vorinkubation des Anti-NUCB2/Nesfatin-1-Antikörpers mit Ghrelin-Peptid und des Anti-Ghrelin-Antikörpers mit Nesfatin-1-Peptid veränderte das Ergebnis der Immunhistologie nicht.

Im Western Blot der Magenmukosaproteine wurde Ghrelin nicht wie erwartet bei 3kDa detektiert, jedoch war eine starke Bande bei 28 kDa vorhanden. Diese könnte ein SDS-stabiles Dimer von Prä-pro-Ghrelin repräsentieren. NUCB2 konnte erwartungsgemäß bei 50 kDa gefunden werden. Auf Höhe von 10 kDa war jedoch kein Hinweis auf Nesfatin-1 zu sehen.

1.6 Diskussion

In der ersten Publikation wird berichtet, dass die periphere Injektion von CCK-8S eine neuronale Aktivitätssteigerung (c-Fos) von phospho-mTOR-positiven Neuronen im PVN induziert, die partiell mit dem Neuropeptid Oxytocin kolokalisiert sind. Diese Beobachtung bestätigt ältere Studien, die ebenfalls eine neuronale Aktivierung von PVN-Zellen nach peripherer CCK-8S-Injektion beschrieben (43, 44) und zudem berichteten, dass die aktivierten Nervenzellen positiv für Nesfatin-1 (13), CRF und Oxytocin (11) waren. Die anorexigene Wirkung (45, 46) von Oxytocin scheint in engem Zusammenhang mit CCK zu stehen, da die IZV-Injektion eines Oxytocin-Rezeptorantagonisten die sättigende Wirkung von CCK-8S aufheben konnte (47).

Unsere Experimente zeigten eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter phospho-mTOR Neuronen nach CCK-8S-Injektion. In Abhängigkeit von der Energiehomöostase der Zelle reguliert mTOR die Transkription (14) und Translation (15) von Proteinen sowie die Nahrungsaufnahme (16). Phospho-mTOR-Neuronen wurden in zahlreichen Gehirnarealen nachgewiesen, in hohen Konzentrationen im ARC und PVN (16). Der PVN gehört zur vorderen Kerngruppe des Hypothalamus und hat Einfluss auf die Thermo- und Kreislaufregulation, sowie die Regulation von Stress, Reproduktion und Nahrungsaufnahme (48). Diese kontinuierliche Integration verschiedener Signale könnte eine Begründung für die relativ konstante Anzahl von phospho-mTOR-positiven Neuronen auch nach CCK-8S-Injektion sein. Mit Hilfe der Immunhistologie konnte lediglich ein nicht-signifikanter Trend in Richtung einer erhöhten Gesamtzahl von phospho-mTOR-positiven Nervenzellen beobachtet werden.

Im PVN erwiesen sich viele oxytocinerge Nervenzellen mit phospho-mTOR kolokalisiert. Nach der Injektion von CCK-8S wurde eine dosisabhängige Aktivierung dieser Neuronen verzeichnet. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass phospho-mTOR nach CCK-8S-Injektion eine Rolle in der oxytocinergen Signaltransduktion spielt. CCK-8S aktiviert noradrenerge Nervenzellen im NTS, die über Projektionen zum PVN verfügen (8). Es wird zudem vermutet, dass oxytocinerge Neuronen des PVN durch katecholaminerge Projektionen aus der A2-Zellgruppe des NTS innerviert werden (8). Nach Unterbrechung der noradrenergen Transmission konnte keine Aktivierung Oxytocin-haltiger Nervenzellen durch CCK-8S ausgelöst werden (49). Daher ist denkbar, dass katecholaminerge Signalwege unter Beteiligung von Oxytocin-Neuronen Einfluss auf die phospho-mTOR-Aktivität im PVN ausüben können.

In den Experimenten der zweiten Publikation wurde eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme nach einer IZV-Injektion des CCK-B-Rezeptorantagonisten CI988 verzeichnet. Der Dopamin-Rezeptorantagonist Flupentixol vermochte diesen Effekt aufzuheben.

Zahlreiche Studien untersuchten den Einfluss des CCK-B-Rezeptors auf die Sättigungsregulation mit unterschiedlichen Ergebnissen. Während der IZV injizierte Antagonist L365,260 die Nahrungsaufnahme reduzierte (24), löste PD135158 nach IZV-Injektion eine Steigerung selbiger aus (17). Diese abweichenden Ergebnisse lassen sich zum Einen auf den kurzen Untersuchungszeitraum von einer Stunde und zum Anderen auf die Verwendung unterschiedlicher CCK-B-Rezeptorantagonisten mit verschiedenen Angriffspunkten am Rezeptormolekül (50) zurückführen.

Interessanterweise konnte die vorliegende Studie herausarbeiten, dass CI988 nur bei 24 Stunden gefasteten, nicht aber bei *ad libitum* gefütterten Tieren eine Minderung der Nahrungsaufnahme induzieren konnte. Somit scheint die metabolische Ausgangssituation für die pharmakologische Wirksamkeit des CCK-B-Rezeptorantagonisten von Bedeutung zu sein.

Obwohl CRF bekanntermaßen ein anorexigenes (27), mit CCK häufig kolokalisiertes (29) und synergistisch wirkendes (51) Neuropeptid ist, konnten weder ein CRF-1- noch ein CRF-2-Rezeptorantagonist die Wirkung von CI988 auf die Nahrungsaufnahme beeinflussen.

Hingegen vermochte die Vorbehandlung mit dem Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol die durch CI988 ausgelöste Reduktion der Nahrungsaufnahme zu verhindern. Dass Dopamin appetithemmende Eigenschaften besitzt, war zuvor durch viele Studien untermauert worden. Apomorphin, ein Dopaminrezeptoragonist, vermindert die Nahrungsaufnahme, wobei diesem Effekt durch Flupentixol entgegen gewirkt werden kann (52, 53). Dopamin-Konzentrationen im lateralen Hypothalamus werden durch Nahrungsaufnahme gesteigert, senken den Appetit und fallen nach Beendigung der Nahrungsaufnahme wieder ab (28, 54-56). Während CCK inhibitorische Wirkung auf Dopamin zu haben scheint (57), stimuliert CI988 in Mikrodialyse-Studien die Dopamin-Freisetzung aus Nervenzellen des Nucleus accumbens (58). Somit ist denkbar, dass die inhibitorische Wirkung von CCK auf Dopamin-Neuronen durch den CCK-B-Rezeptorantagonisten CI988 blockiert werden kann.

In der dritten Publikation untersuchten wir die Auswirkungen des BMI auf den immunhistochemischen Phänotyp der Magenmukosa von adipösen Patienten. Bei der Ratte sollen NUCB2/Nesfatin-1 und Ghrelin intrazellulär in unterschiedlichen Vesikeln lokalisiert sein (38). In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass beim Menschen NUCB2/Nesfatin-1 und Ghrelin in denselben intrazellulären Vesikeln kolokalisiert sind. Die Spezifität der Antikörper wurde durch Präabsorption des Anti-Ghrelin-Antikörpers mit Ghrelin, respektive des Anti-NUCB2/Nesfatin-1-Antikörpers mit Nesfatin-1 getestet. Nach Präabsorption wurde keine bzw. eine stark reduzierte Immunfärbung gesehen. Eine Vertauschung von Ghrelin und Nesfatin-1

beim Präabsorptionstest veränderte das Ergebnis der Immunhistologie nicht und spricht somit gegen eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern.

Der Western Blot detektierte NUCB2 wie erwartet bei 50 kDa, jedoch war das Peptid Nesfatin-1 nicht bei 10 kDa nachweisbar. Dies wurde bereits mehrfach in Studien beobachtet (38, 59-62) und lässt sich möglicherweise mit einer extrazellulären Prozessierung des Peptids erklären. Die fehlende Darstellung von Ghrelin im Western Blot könnte mit dem geringen Molekulargewicht von 3 kDa erklärt werden, welches zu einem Verlust beim Membrantransfer beigetragen haben könnte. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die endogene Ghrelin-Produktion unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Mit steigendem BMI fiel die Anzahl Ghrelin-positiver Zellen ab, gleichzeitig stieg jedoch die Anzahl von NUCB2/Nesfatin-1-positiven Zellen. Ähnliche Zusammenhänge wurden auch für die Plasmaspiegel der Peptide und den BMI des Individuums konstatiert, so waren Ghrelin-Plasmaspiegel bei adipösen Probanden erniedrigt (36), jedoch bei anorektischen Patienten erhöht (37), wobei letztere zudem einen verminderten Nesfatin-1-Spiegel aufwiesen (41). Betrachtet man die X/A-ähnliche Zelle als die Hauptquelle der genannten Peptide ist es denkbar, dass ihre Expression mit den Plasmaspiegeln von Ghrelin und NUCB2/Nesfatin-1 korreliert. Aufgrund der gegensätzlichen Wirkungen der Peptide könnten die beobachteten Veränderungen einen physiologischen Adaptationsmechanismus darstellen um die Nahrungsaufnahme bei steigendem BMI zu begrenzen.

Das Ghrelin-acetylierende Enzym GOAT wurde in der vorliegenden Arbeit partiell kolokalisiert mit Ghrelin gefunden. Dass nicht alle GOAT-positiven Zellen Ghrelin enthielten, deutet möglicherweise auf eine weitere physiologische Bedeutung des Enzyms hin.

Limitierungen der Studien könnten darin bestehen, dass es sich lediglich um deskriptive Daten handelt. Es kann nicht festgestellt werden, ob die veränderte Ghrelin- und NUCB2-Nesfatin-1-Expression die Ursache oder die Folge des erhöhten BMI ist.

Obwohl die Daten signifikant sind, wurde die Studie an einer kleinen Studienpopulation durchgeführt. Die Ergebnisse sollten anhand einer größer angelegten Studie bestätigt werden. Zudem wären Untersuchungen an gesunder, menschlicher Magenmukosa von normalgewichtigen Individuen sinnvoll. Ebenso könnten die präoperativ erhobenen Daten durch postoperative ergänzt werden um mögliche Veränderungen als Folge der bariatrischen Chirurgie zu identifizieren.

1.7 Literaturverzeichnis

1. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55(1 Pt 2):137-54.
2. Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 1973;84(3):488.
3. Deschenes RJ, Lorenz LJ, Haun RS, Roos BA, Collier KJ, Dixon JE. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(3):726-30.
4. Rehfeld JF, Holst JJ, Jensen SL. The molecular nature of vascularly released cholecystokinin from the isolated perfused porcine duodenum. *Regul Pept*. 1982;3(1):15-28.
5. Moran TH, Robinson PH, Goldrich MS, McHugh PR. Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions. *Brain Res*. 1986;362(1):175-9.
6. 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.
7. Luckman SM. Fos-like immunoreactivity in the brainstem of the rat following peripheral administration of cholecystokinin. *J Neuroendocrinol*. 1992;4(2):149-52.
8. 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.
9. Day HE, McKnight AT, Poat JA, Hughes J. Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism. *Neuropharmacology*. 1994;33(6):719-27.
10. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988;240(4857):1328-31.
11. Verbalis JG, Stricker EM, Robinson AG, Hoffman GE. Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol*. 1991;3(2):205-13.
12. Olson BR, Hoffman GE, Sved AF, Stricker EM, Verbalis JG. Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex. *Brain Res*. 1992;569(2):238-48.
13. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wissner AS, Bannert N, et al. 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.

14. Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 1999;13(24):3271-9.

15. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991;253(5022):905-9.

16. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science.* 2006;312(5775):927-30.

17. Dorré D, Smith GP. CholecystokininB receptor antagonist increases food intake in rats. *Physiology & Behavior.* 1998;65(1):11-4.

18. Schick RR, Schusdziarra V, Yaksh TL, Go VL. Brain regions where cholecystokinin exerts its effect on satiety. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;713:242-54.

19. Sills TL, Vaccarino FJ. Individual differences in the feeding response to CCKB antagonists: role of the nucleus accumbens. *Peptides.* 1996;17(4):593-9.

20. Miyasaka K, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Masuda M, et al. Energy metabolism and turnover are increased in mice lacking the cholecystokinin-B receptor. *J Nutr.* 2002;132(4):739-41.

21. Clerc P, Coll Constans MG, Lulka H, Broussaud S, Guigné C, Leung-Theung-Long S, et al. Involvement of Cholecystokinin 2 Receptor in Food Intake Regulation: Hyperphagia and Increased Fat Deposition in Cholecystokinin 2 Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology.* 2012;148(3):1039-49.

22. Weiland TJ, Voudouris NJ, Kent S. The role of CCK2 receptors in energy homeostasis: insights from the CCK2 receptor-deficient mouse. *Physiol Behav.* 2004;82(2-3):471-6.

23. Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, Nguyen M, Al-Haider W, Schmitz F, et al. 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.

24. Corp ES, Curcio M, Gibbs J, Smith GP. The effect of centrally administered CCK-receptor antagonists on food intake in rats. *Physiol Behav.* 1997;61(6):823-7.

25. Hughes J, Boden P, Costall B, Domeney A, Kelly E, Horwell DC, et al. Development of a class of selective cholecystokinin type B receptor antagonists having potent anxiolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6728-32.

26. Britton DR, Koob GF, Rivier J, Vale W. Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci.* 1982;31(4):363-7.

27. Morley JE, Levine AS. Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci.* 1982;31(14):1459-64.
28. Leibowitz SF, Rossakis C. L-Dopa feeding suppression: effect on catecholamine neurons of the perifornical lateral hypothalamus. *Psychopharmacology (Berl).* 1979;61(3):273-80.
29. Vanderhaeghen JJ, Goldman S, Lotstra F, Van Reeth O, Deschepper C, Rossier J, et al. Co-existence of cholecystokinin- or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci.* 1985;448:334-44.
30. Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology.* 2000;141(11):4255-61.
31. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000;407(6806):908-13.
32. Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(12):5992.
33. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;279(3):909-13.
34. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(17):6320-5.
35. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell.* 2008;132(3):387-96.
36. Katsuki A, Urakawa H, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, et al. Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(5):573-7.
37. Janas-Kozik M, Krupka-Matuszczyk I, Malinowska-Kolodziej I, Lewin-Kowalik J. Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul Pept.* 2007;140(1-2):43-6.
38. Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, et al. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology.* 2009;150(1):232-8.

39. Oh IS, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature*. 2006;443(7112):709-12.
40. Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, et al. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*. 2007;148(10):5088-94.
41. Ogiso K, Asakawa A, Amitani H, Nakahara T, Ushikai M, Haruta I, et al. Plasma nesfatin-1 concentrations in restricting-type anorexia nervosa. *Peptides*. 2011;32(1):150-3.
42. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Bae HG, Ruter J, Klapp BF, et al. 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.
43. Wang L, Martinez V, Barrachina MD, Tache Y. Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res*. 1998;791(1-2):157-66.
44. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, et al. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R751-8.
45. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. *Peptides*. 1989;10(1):89-93.
46. Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hruby VJ, Stricker EM, Verbalis JG. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*. 1991;12(1):113-8.
47. Olson BR, Drutarosky MD, Stricker EM, Verbalis JG. Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology*. 1991;129(2):785-91.
48. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(6):717-27.
49. Ueta Y, Kannan H, Higuchi T, Negoro H, Yamashita H. CCK-8 excites oxytocin-secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats--possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Res Bull*. 1993;32(5):453-9.
50. Ladurelle N, Sebret A, Garbay C, Roques BP, Dauge V. Opposite effects of CCK(B) agonists in grooming behaviour in rats: further evidence for two CCK(B) subsites. *Br J Pharmacol*. 1998;124(6):1091-8.

51. Gourcerol G, Wang L, Wang YH, Million M, Tache Y. Urocortins and cholecystokinin-8 act synergistically to increase satiation in lean but not obese mice: involvement of corticotropin-releasing factor receptor-2 pathway. *Endocrinology*. 2007;148(12):6115-23.
52. Bednar I, Carrer H, Qureshi GA, Sodersten P. Dopamine D1 or D2 antagonists enhance inhibition of consummatory ingestive behavior by CCK-8. *Am J Physiol*. 1995;269(4 Pt 2):R896-903.
53. Bednar I, Forsberg G, Linden A, Qureshi GA, Sodersten P. Involvement of dopamine in inhibition of food intake by cholecystokinin octapeptide in male rats. *J Neuroendocrinol*. 1991;3(5):491-6.
54. Meguid MM, Yang ZJ, Koseki M. Eating induced rise in LHA-dopamine correlates with meal size in normal and bulbectomized rats. *Brain Res Bull*. 1995;36(5):487-90.
55. Meguid MM, Yang ZJ, Montante A. Lateral hypothalamic dopaminergic neural activity in response to total parenteral nutrition. *Surgery*. 1993;114(2):400-5; discussion 5-6.
56. Yang ZJ, Koseki M, Meguid MM, Laviano A. Eating-related increase of dopamine concentration in the LHA with oronasal stimulation. *Am J Physiol*. 1996;270(2 Pt 2):R315-8.
57. Fuxe K, Andersson K, Locatelli V, Agnati LF, Hokfelt T, Skirboll L, et al. Cholecystokinin peptides produce marked reduction of dopamine turnover in discrete areas in the rat brain following intraventricular injection. *Eur J Pharmacol*. 1980;67(2-3):329-31.
58. Corwin RL, Jorn A, Hardy M, Crawley JN. The CCK-B antagonist CI-988 increases dopamine levels in microdialysate from the rat nucleus accumbens via a tetrodotoxin- and calcium-independent mechanism. *J Neurochem*. 1995;65(1):208-17.
59. Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience*. 2008;156(3):563-79.
60. Garcia-Galiano D, Navarro VM, Roa J, Ruiz-Pino F, Sanchez-Garrido MA, Pineda R, et al. The anorexigenic neuropeptide, nesfatin-1, is indispensable for normal puberty onset in the female rat. *J Neurosci*. 2010;30(23):7783-92.
61. Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S. Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS One*. 2010;5(12):e15201.
62. Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, et al. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*. 2010;151(7):3169-80.

2 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vanessa Lembke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zu appetitregulatorischen Peptiden unter besonderer Beachtung von Cholecystokinin, Ghrelin und Nesfatin-1“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

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

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

Berlin, den 8.12.2013

Vanessa Lembke

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Vanessa Lembke hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: **Lembke V***, Goebel M*, Frommelt L, Inhoff T, Lommel R, Stengel A, Taché Y, Grötzinger C, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Kobelt P.

Titel: Sulphated cholecystokinin-8 activates phospho-mTOR immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Zeitschrift: Peptides

Erscheinungsjahr: 2011

Anteil: 60%

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Tierexperimente, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Publikation 2:

Autoren: Frommelt L*, **Lembke V***, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Mönnikes H, Wiedenmann B, Klapp BF, Stengel A, Kobelt P.

Titel: The CCKB antagonist CI988 reduces food intake in fasted rats via a dopamine mediated pathway.

Zeitschrift: Peptides

Erscheinungsjahr: 2013

Anteil: 40%

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit an der Durchführung der Tierexperimente, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Publikation 3:

Autoren: Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, **Lembke V**, Ahnis A, Elbelt U, Lambrecht NW, Ordemann J, Klapp BF, Kobelt P.

Titel: Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects.

Zeitschrift: Histochemistry and Cell Biology

Erscheinungsjahr: 2013

Anteil: 20%

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Geteilte Erstautorenschaften sind mit * gekennzeichnet.

Berlin, den 8.12.2013

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Kobelt

Vanessa Lembke

3 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

3.1 Sulphated cholecystinin-8 activates phospho-mTOR immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats

Lembke V*, Goebel M*, Frommelt L, Inhoff T, Lommel R, Stengel A, Taché Y, Grötzinger C, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Kobelt P.

Peptides. 2011 Jan;32(1):65-70

Impact Faktor 2011: 2.434

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2010.09.025>

* geteilte Erstautorenschaft

3.2 **The CCKB antagonist CI988 reduces food intake in fasted rats via a dopamine mediated pathway**

Frommelt L*, **Lembke V***, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Mönnikes H, Wiedenmann B, Klapp BF, Stengel A, Kobelt P.

Peptides. 2013 Jan;39:111-8

Impact Faktor 2013: 2,614

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2012.11.012>

*geteilte Erstautorenschaft

3.3 Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects

Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, **Lembke V**, Ahnis A, Elbelt U, Lambrecht NW, Ordemann J, Klapp BF, Kobelt P.

Histochem Cell Biol. 2013 Jun;139(6):909-18

Impact Faktor 2013: 2,927

<http://dx.doi.org/10.1007/s00418-013-1087-8>

4 Lebenslauf

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

5 Vollständige Publikationsliste

Publikationen

Geteilte Erstautorenschaften sind mit * gekennzeichnet.

Sulphated cholecystokinin-8 activates phospho-mTOR immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Lembke V*, Goebel M*, Frommelt L, Inhoff T, Lommel R, Stengel A, Taché Y, Grötzing C, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Kobelt P.
Peptides. 2011 Jan;32(1):65-70

The CCKB antagonist CI988 reduces food intake in fasted rats via a dopamine mediated pathway.

Frommelt L*, **Lembke V***, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Mönnikes H, Wiedenmann B, Klapp BF, Stengel A, Kobelt P.
Peptides. 2013 Jan;39:111-8

Ghrelin and NUCB2/nesfatin-1 are expressed in the same gastric cell and differentially correlated with body mass index in obese subjects.

Stengel A, Hofmann T, Goebel-Stengel M, **Lembke V**, Ahnis A, Elbelt U, Lambrecht NW, Ordemann J, Klapp BF, Kobelt P.
Histochem Cell Biol. 2013 Jun;139(6):909-18

Vorträge

Sulphated cholecystokinin-8 activates phospho-mTOR immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e.V.,
Freising, 04.-06. März 2011

The CCKB antagonist CI988 reduces food intake in fasted rats via a dopamine mediated pathway.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität e.V.,
Freising, 24.-26. Februar 2012

6 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Kobelt für die Bereitstellung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung und die Förderung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.

Ich danke meiner Kollegin und Freundin Frau Lisa Frommelt für die kontinuierliche, gute Zusammenarbeit und gegenseitige Motivation. Unserem technischen Assistenten Herrn Reinhard Lommel danke ich für das freundliche Arbeitsklima im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Johannes, da sie die Grundvoraussetzungen für die Entstehung dieser Arbeit geschaffen haben.