

Aus dem  
Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik  
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Rose  
und  
Martin-Luther-Krankenhaus  
Akademisches Lehrkrankenhaus der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Chefarzt: Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Hubert Mönnikes

## **Habilitationsschrift**

### **Die neuronale Mediation von Stress am Beispiel tierexperimenteller Modelle**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Miriam Stengel  
geboren in Berlin**

Eingereicht: Juli 2014  
Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich  
1. Gutachter: Prof. Dr. Paul Enck  
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Layer

**Meiner Familie**

# INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Abkürzungen</b> .....	3
1.	<b>Einleitung</b> .....	4
1.1	Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) ist das bedeutendste Stresshormon .....	5
1.2	Tierexperimentelle Stressmodelle .....	6
1.2.1	Restraint Stress .....	7
1.2.2	Abdominelle Chirurgie .....	7
1.2.3	Injektion von Lipopolysaccharid .....	7
1.2.4	Tail Pinch .....	8
1.2.5	Transgenes Mausmodell mit Überexpression von CRF .....	8
1.3	Auswirkungen von akutem Stress auf gastrointestinale Funktionen .....	9
1.4	Optimierung der experimentellen Rahmenbedingungen .....	12
2.	<b>Eigene Arbeiten</b> .....	14
2.1	Die Bedeutung der optimalen Plastik- und Glasoberflächen in der Peptidforschung .....	14
2.2	Lipopolysaccharid steigert die Plasmaspiegel von Corticotropin-Releasing-Hormon bei Ratten .....	25
2.3	Vergleichende Untersuchung des Verteilungsmusters CRF-immunreaktiver Neurone im Maus- versus Rattengehirn und selektive Fos-Aktivierung CRF-positiver Neurone nach abdominalen Chirurgie .....	36
2.4	Die orexigenen Effekte von Tail Pinch: Die Rolle von Neuropeptid Y-1- und Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren bei Ratten .....	51
2.5	CRF-überexprimierende Mäuse zeigen eine Hirnatrophie und Motordysfunktion .....	64
3.	<b>Diskussion</b> .....	71
4.	<b>Zusammenfassung</b> .....	80
5.	<b>Referenzliste</b> .....	81
6.	<b>Danksagung</b> .....	95
7.	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	97

## ABKÜRZUNGEN

<sup>125</sup> I	radioaktiv markiertes Iodid
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BSA	bovines Serumalbumin
CCK8-S	sulfatiertes Cholecystokinin-8
CCK58	Cholecystokinin-58
CRF	Corticotropin-Releasing-Faktor
CRF <sub>1</sub>	CRF-1-Rezeptor
CRF <sub>2</sub>	CRF-2-Rezeptor
CRF-ÜE	CRF-überexprimierend, CRF-Überexpression
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPE	fäkale Pelletexkretion
GLP-1	Glukagon-like Peptid
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitchromatographie
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
iz	intrazisternal
izv	intraazerebroventrikulär
LPS	Lipopolysaccharid
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nukleus traktus solitarius
Nucb2	Nucleobindin2
PEG	Polyethylenglykol
PVN	Nukleus paraventricularis
RAPID	Akronym für <u>R</u> eduzierte Temperaturen, <u>A</u> zidifikation, <u>P</u> roteaseinhibition, exogene Kontrollisotope, <u>D</u> ilution
RDS	Reizdarmsyndrom
RIA	Radioimmunoassay
TRH	Thyrotropin-Releasing-Hormon
Ucn	Urocortin

## 1. EINLEITUNG

Bereits William Beaumont untersuchte Anfang des 19. Jahrhunderts die Auswirkungen verschiedener Reize auf die gastrointestinale Physiologie. An einem Kriegsverletzten mit posttraumatischer gastrokutane Fistel führte er Experimente durch und beobachtete, dass sich die Durchblutung und Magensekretion in Reaktion auf psychologische und physiologische Reize veränderte [17]. Setzte er seine Versuchsperson Ärger aus, kam es zu einer gesteigerten Magensekretion. Heute weiß man, dass Thyrotropin-Releasing-Hormon (TRH) und der Nervus Vagus gastrale epitheliale und endokrine Zellen stimulieren, die nicht nur Säure sondern auch Pepsin, Serotonin, Histamin und Ghrelin sezernieren und dass diese Mechanismen bei Stress verstärkt ablaufen [202].

Als Pionier der Stressforschung definierte jedoch erst Hans Selye ein Jahrhundert später die „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung“ als Stress [171]. Die Aktivierung des Corticotropin-Releasing-Faktor-(CRF)-CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Signaltransduktionsweges ist der Drehpunkt der endokrinen und anxiogenen Stressantwort. CRF, welches 1981 am Salk Institut von Wiley Vale entdeckt wurde [214], reguliert und beeinflusst viele Körperfunktionen. Präklinische Studien konnten zeigen, dass die Aktivierung des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors durch exogenes CRF oder Stress viele Symptome auslöst, wie sie auch beim Reizdarmsyndrom (RDS) zu finden sind wie z.B. ängstliches und hypervigilantes Verhalten auf zentraler Ebene. Jedoch kommt es auch zu Veränderungen des autonomen und enterischen Nervensystems, was zu viszeraler Hypersensitivität und gesteigerter Kolonmotilität, Schleimsekretion, erhöhter Darmepithelpermeabilität und damit einhergehend bakterieller Translokation [194] führen kann. Die Folge sind quälende Symptome wie Diarrhö mit Schleimabsonderung, Bauchkrämpfe, Meteorismus und Schmerzen. Auch geht das Reizdarmsyndrom oft mit extraintestinalen Komorbiditäten wie Depression und Fibromyalgie einher, wie wir in einer systematischen Analyse herausarbeiten konnten [155]. Es ist bekannt, dass Stress kein Reizdarmsyndrom auslösen kann, jedoch bestehende Symptome verschlechtert. Momentan sind keine wirksamen kausalen Therapieoptionen zur Behandlung des RDS bekannt. Im Tierversuch verhinderte der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist die stressinduzierte viszerale Hypersensitivität [217], und auch beim Menschen verbesserte die periphere Gabe eines CRF-Antagonisten die

gastrointestinale Motilität, viszerale Sensitivität und negative Wahrnehmung nach Darmstimulation [58, 99, 165]. Dies forcierte die Entwicklung klinisch anwendbarer CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei Patienten mit Reizdarmsyndrom [237]. Bisher erbrachte die klinische Prüfung des CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei Reizdarmpatienten dennoch nicht die gewünschten Effekte. Eine Reduktion von Stress bzw. das Erlernen von Strategien, damit umzugehen, gehört jedoch zur Basistherapie.

In der vorliegenden Arbeit werden die physiologischen Mechanismen der gastrointestinalen Stressantwort dargestellt und auf neuronaler Ebene charakterisiert, wobei besonders auf die Verbindung zwischen Gehirn und Darm, die sogenannte Brain-Gut-Achse, fokussiert wird.

## **1.1 Corticotropin-Releasing-Faktor (CRF) ist das bedeutendste Stresshormon**

Zur Familie der CRF-ähnlichen Peptide gehören Urotensin-I im Fisch, Sauvagine in Amphibien, und die in Säugetieren vertretenen CRF und Urocortine (Ucn) 1, 2 und 3 [73, 113, 114]. Die Primärstruktur des CRF besteht aus 41 Aminosäuren und ist hochkonserviert in allen Säugetierarten mit einer hundertprozentigen Sequenzhomologie zwischen Ratte, Maus und Mensch [113, 169]. Aufgrund seiner Bindung an das CRF-Binding-Protein [18, 224] sowie der schnellen Degradation von freiem CRF und den dadurch bedingten Verlust bereits niedriger Ausgangswerte ist die Messung von Plasma- und Gewebe-CRF erschwert [18, 107, 109, 153, 198].

CRF und die Urocortine interagieren mit zwei Rezeptoren, dem CRF<sub>1</sub>- und dem CRF<sub>2</sub>-Rezeptor, an welche sie mit unterschiedlichen Affinitäten binden [73, 79]. Es ist bekannt und bereits vielfach bestätigt, dass das zentrale CRF-System eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Stressantwort spielt [14, 194]. Im Einzelnen ist CRF in akute stressbedingte Verhaltensänderungen, Energiehaushalt und endokrine, kardiovaskuläre, immune und gastrointestinale Funktionen involviert [14, 54, 147, 204]. CRF wird in peripheren Geweben wie dem Darm [110, 219] und Immunzellen- und organen [1, 11, 235] bei Versuchstieren und Menschen [12, 85, 94] exprimiert, findet sich jedoch hauptsächlich im Gehirn [23, 199]. Die vielfachen zentralen Funktionen des CRF sind eng mit seiner ubiquitären Verteilung im

hypothalamischen-hypophysären System aber auch extrahypothalamischen Regionen wie dem limbischen System, kortikalen und Stammhirnregionen verknüpft [42, 130, 138, 145, 151, 168, 177, 201].

Zur Blockierung stressbedingter Reaktionen können CRF-Rezeptor-Antagonisten im Tierversuch sowohl peripher als auch zentral injiziert werden. Als Antagonisten an beiden CRF-Rezeptoren wirken Astressin und Astressin-B [160], während Antalarmin und CP-154,526 [34, 81, 173, 236] selektiv den CRF<sub>1</sub>-Rezeptor und Antisauvagine-30, Sauvagine 11-40 sowie Astressin<sub>2</sub>-B [33, 158, 163] selektiv den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor blockieren.

Um künstlich akut Stress zu erzeugen, kommt im Umkehrschluss in der tierexperimentellen Verhaltensforschung die Injektion von endogenen oder synthetischen CRF-Rezeptorliganden zum Einsatz. An den CRF<sub>1</sub>-Rezeptor binden CRF, Ucn 1 [70, 79] sowie die selektiven Peptid-CRF<sub>1</sub>-Agonisten Cortagine und Stressin1-a, [53, 70, 159]. An den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor binden Ucn 2 und 3 und schwach CRF [70, 79] Zur Erforschung akuter stressbedingter Veränderungen kommen alternativ verschiedene tierexperimentelle Stressmodelle in Betracht.

## 1.2 Tierexperimentelle Stressmodelle

Stressoren können verschiedenen Ursprungs sein, jedoch ist eine grobe Einteilung in psychologische (emotionale) und physikalische (systemische) sowie akute und chronische Stressoren möglich [77].

Psychologische Stressoren erregen kortikale limbische und pontine Hirnregionen, die den Hypothalamus aktivieren [47, 172]. Im Gegensatz dazu aktivieren die potenziell lebensbedrohlichen physikalischen Stressoren direkt den Hypothalamus *via* aufsteigende katecholaminerge Projektionen vom Hirnstamm, so dass eine Stressverarbeitung auf kortikaler Ebene umgangen wird [172].

Viele Studien benutzen das immediate early gene c-fos Protein (Fos) in der Immunhistochemie als Marker neuronaler Aktivität. Die Kombination eines Stressors mit nachfolgender Fos-Immunhistochemie ermöglicht die Visualisierung neuronaler Aktivierung der durch akuten oder chronischen Stress aktivierten Gehirnareale [45, 50, 166] und deren Charakterisierung in Bezug auf die autonome Regulation gastrointestinaler Funktionen [15, 25, 26, 205].

### **1.2.1 Restraint Stress**

„Restraint Stress“ ist ein psychologisches Stressmodell, bei welchem die Tiere in ihrem Bewegungsspielraum für kurze Zeit stark eingeschränkt werden. Die Tiere sind jedoch keinem Schmerz oder unmittelbaren physikalischen Stress ausgesetzt [46, 68, 77]. Restraint Stress ist als akutes und chronisches Stressmodell einsetzbar. Bei der chronischen Anwendung können die Tiere über einen definierten längeren Zeitraum wiederholt dem Stress ausgesetzt werden (z.B. einmal täglich über 14 Tage).

### **1.2.2 Abdominelle Chirurgie**

Das Modell der abdominalen Chirurgie dient der Erforschung des postoperativen Ileus, welcher bei vielen Patienten nach Operationen am Gastrointestinaltrakt auftritt und durch eine Verzögerung der Magen- und Darmtransitzeit gekennzeichnet ist [234]. Bei diesem Stressmodell handelt es sich um einen akuten physikalischen Stressor. Den Versuchstieren wird unter Anästhesie eine Bauchoperation zugefügt, die aus einer Längslaparotomie mit nachfolgender Darmpalpation besteht [24, 192]. Dies führt zu einer Aktivierung typischer, an der Stressantwort beteiligter endokriner Marker bei den Versuchstieren und auch beim Menschen [31, 115, 141]. Wir konnten zeigen, dass abdominale Chirurgie Nesfatin-1-immunreaktive Neurone im Rattengehirn aktiviert [192]. Nesfatin-1 (Precursor Nucleobindin2, Nucb2) ist ein erst kürzlich entdecktes Peptid mit nahrungsregulatorischer und stressmodulierender Funktion [66, 69, 144, 189].

### **1.2.3 Injektion von Lipopolysaccharid**

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und ruft als akuter systemischer Stressor nach peripherer Injektion in Versuchstieren eine Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse hervor, welche mit einer Freisetzung von hypothalamischem CRF und hypophysärem Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) einhergeht [19, 213]. Unsere Gruppe konnte kürzlich zeigen, dass die intraperitoneale Injektion niedriger LPS-Dosen bei Ratten nach sechs Stunden



nicht nur im Gehirn sondern auch im Darm zu einer Hochregulation der CRF mRNS-Expression und CRF-Immunreaktivität führte [233]. Des Weiteren war die Produktion von Nucleobrainin-1 im Magen und dessen Freisetzung in die Zirkulation nach LPS-Gabe erhöht [184], während die Spiegel von Ghrelin, dem wichtigsten peripheren Hungerhormon, erniedrigt waren [188], passend zu den anorexigenen Effekten von LPS.

#### **1.2.4 Tail Pinch**

Bereits 1975 beschrieben Antelman et al., dass akuter leichter ‚Tail Pinch‘ (englisch: „in den Schwanz kneifen“) die Nahrungsaufnahme bei nicht-gefasteten Ratten hervorruft [7]. Bei diesem gemischten psychologischen und physikalischen Stressor, der akut und chronisch ausgeübt werden kann, wird mithilfe einer Klammer oder Klemme für einen kurzen definierten Zeitraum ein konstanter nicht-schmerzhafter Druck auf einen kleinen Bereich des Rattenschwanzes ausgeübt. Dies führt umgehend zu einer Reaktion: Ist Nahrung verfügbar, vollzieht die Ratte eine der normalen Nahrungsaufnahme ähnliche Sequenz bestehend aus Knabbern, Lecken und Fressverhalten [5, 7, 74, 104, 162, 167, 181]. Levine und Morley konnten zeigen, dass auch milder Pinch an anderen Körperregionen zu ähnlichem Verhalten führt, jedoch ist der Tail Pinch das am häufigsten untersuchte Modell und lässt sich auch auf Mäuse übertragen [105].

Die Mediationswege von Tail Pinch-Verhalten sind vielfach, insbesondere in den 70er und 80er Jahren, erforscht worden. So gibt es Hinweise dafür, dass Dopamin [7, 8], Opiate [139], Glukagon, Bombesin, Thyrotropin-Releasing-Hormon oder Cholecystokinin die durch Tail Pinch induzierte Nahrungsaufnahme reduzieren können [103, 140, 142], was eine Involvierung unterschiedlicher neuronaler Mediationswege nahelegt.

#### **1.2.5 Transgenes Mausmodell mit Überexpression von CRF**

Ein Tiermodell, welches dauerhaft erhöhte Kortikosteronspiegel aufweist, wäre ideal zur Erforschung der Mechanismen chronischer stressinduzierter Veränderungen. Dieses Prinzip wurde in der genetisch veränderten CRF-überexprimierenden (CRF-ÜE) Maus verwirklicht [41, 197]. Bei der CRF-ÜE Maus kommt es zu einer dauerhaft

erhöhten Produktion zentralen CRFs verbunden mit erhöhten peripheren Kortikosteronspiegeln [197]. Der Phänotyp dieser Mäuse ähnelt einem Morbus Cushing mit stammbetonter Adipositas, peripherer Muskel- und Hautatrophie sowie Haarausfall [197]. Wir haben kürzlich das Fressverhalten dieser Tiere charakterisiert und konnten zeigen, dass die konstante Überexpression von hypothalamischem CRF unter Fastenbedingungen eine Aktivierung des wichtigen nahrungsregulatorischen Nukleus arkuatus blockiert und die Tiere aufgrund dessen deutlich weniger fressen [187]. Andererseits zeigte sich eine hohe Aktivierung des dorsalen Vaguskerne, passend zu der bei diesen Tieren beobachteten beschleunigten Magenentleerung unter basalen Bedingungen [187]. Weiterhin zeigen diese genetisch veränderten Mäuse eine Lernschwäche, erhöhtes Angstverhalten sowie eine erhöhte Stressanfälligkeit [49, 76, 132, 218].

### **1.3 Auswirkungen von akutem Stress auf gastrointestinale Funktionen**

Akuter und chronischer Stress wirkt sich auf die Funktionen des Gastrointestinaltrakts aus. Wir konnten beschreiben, dass akute physikalische Stressoren wie intraperitoneale LPS-Injektion oder abdominelle Chirurgie aber auch psychologische Stressparadigmen wie Restraint Stress zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Ratten führen [16, 164, 185]. Es ist bekannt, dass diese Stressoren die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden(HHN)-Achse und somit in erster Linie den CRF-Signaltransduktionsweg aktivieren, was zu einer Erhöhung der Effektorhormone ACTH und Kortikosteron bei Nagetieren führt [67, 233]. Die Aktivierung auf neuronaler Ebene konnten wir mithilfe immunhistochemischer Methoden und dem Aktivitätsmarker Fos herausarbeiten [68, 192, 220]. Auch die Injektion der Stresshormone CRF, Ucn1 und Ucn2 führt über die Aktivierung zentraler CRF<sub>1</sub>- und CRF<sub>2</sub>- sowie peripherer CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren bei Ratten eine Reduktion der Nahrungsaufnahme herbei [170, 222, 238], während im Gegensatz dazu diese durch eine CRF-Rezeptor-Blockade durch spezifische Antagonisten aufgehoben wird [35, 92, 170, 178].

Zu einer bei Stress oftmals auftretenden Verminderung der Nahrungsaufnahme und Völlegefühl trägt die durch akuten Stress induzierte CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängige Hemmung der Magenmotilität und -entleerung [121] und Steigerung der

Kolonmotilität durch CRF<sub>1</sub>-Rezeptoren [123] wesentlich bei. Die zentrale Injektion von CRF oder CRF-ähnlichen Peptiden führt zu einer Hemmung der festen und flüssigen Magenentleerung und Magenmotilität in vielen Spezies. Da dieser Effekt durch die Gabe von spezifischen CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-, nicht jedoch CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden kann, muss die stressinduzierte Hemmung der Magenmotilität durch den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor mediiert sein [15, 40, 121, 122, 125, 203]. Auf zentraler Ebene wird dieser Effekt durch den dorsalen Motornukleus des Nervus Vagus sowie den hypothalamischen paraventriculären Nukleus (PVN) vermittelt [78, 106, 135], Hirnregionen, in denen sich CRF und CRF<sub>2</sub>-Rezeptoren nachweisen lassen [21, 220]. Ein intaktes autonomes Nervensystem ist Voraussetzung für die stressbedingte CRF-vermittelte Änderung der Magenfunktion, da diese sowohl Nervus Vagus- als auch Sympathikus-, jedoch unabhängig von der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse vermittelt ist [43]. Interessanterweise scheint der CRF-Signaltransduktionsweg unter physiologischen basalen oder postprandialen Bedingungen keine wesentliche regulatorische Rolle bei der Magenfunktion zu spielen [174, 206].

Die zentralen CRF-vermittelten Effekte auf die Dünndarmmotilität sind bislang unzureichend untersucht, und die Datenlage ist kontrovers. So ist bekannt, dass die Dünndarmmotilität, durch psychologische Stressoren oder zentrale CRF-Injektion, unabhängig von der HHN-Achse bei Ratten und Hunden gehemmt wird [101, 102, 226], jedoch in geringerer Ausprägung im Vergleich zu den Effekten auf die Magenmotilität [30, 71, 86, 87, 102, 227]. Dies ist vermutlich auf den von oral nach anal abnehmenden Einfluss des Nervus Vagus zurückzuführen. Welcher der CRF-Rezeptoren auf zentraler Ebene involviert ist, bleibt bisher unbekannt.

Zahlreiche Stressoren (u.a. Angst, Trier Social Stress Test, Exposition gegenüber eiskaltem Wasser) steigern die Kolonmotilität bei freiwilligen Probanden [206]. Auch bei Versuchstieren konnte man die propulsive motorische Kolonfunktion und fäkale Pelletexkretion (FPE) durch zentrale Injektion von Ucn1 und CRF sowie durch laute Geräusche, Restraint Stress und ‚Water Avoidance Stress‘, Kälteexposition oder zentrale Interleukin-1-Injektion steigern [26, 72, 82, 125, 137, 206, 225]. Dieser Effekt ist, ähnlich wie die Magenmotilität, nur unter Stress, jedoch nicht unter basalen oder postprandialen Bedingungen CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelt [124, 207]. Dies ist in vielen Studien belegt worden. So hemmt die zentrale oder periphere Gabe selektiver CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten die durch verschiedene Stressoren induzierte

Beschleunigung der Kolontransitzeit bei Nagetieren [120, 125, 133]. CRF<sub>1</sub>-Knockout-Mäuse zeigen eine wesentlich geringere Defäkationsrate im ‚Open-Field-Test‘ als die Kontrollmäuse [13].

Die zentral CRF<sub>1</sub>-vermittelte Stimulation der Kolonfunktion ist unabhängig von der HHN-Achse [72, 101] und wird parasymphatisch über vagale zöliakale Nervengeflechte, die das proximale Kolon, sowie sakrale parasymphatische Nervenfasern, die das distale Kolon und Rektum innervieren, vermittelt [131, 135, 136]. Auf zentraler Ebene wird die stressinduzierte CRF-medierte Steigerung der Kolonfunktion über den PVN und Lokus coeruleus/Barrington'schen Nukleus vermittelt, Hirnregionen, die untereinander, jedoch auch direkte transsynaptische Kontakte zum Kolon und die das Kolon descendens innervierenden Teile des Rückenmarks haben [154, 215, 216].

Die periphere Injektion (intravenös, iv oder intraperitoneal, ip) von CRF und Ucn1 bei Versuchstieren und Probanden hemmt die Magenentleerung, verzögert die Dünndarm- und steigert die Kolonmotilität und Defäkationsrate mit ähnlicher Potenz wie die zentrale Injektion [58, 120, 126, 128]. Auch auf der peripheren Ebene sind die hemmenden Effekte auf den Magen CRF<sub>2</sub>-vermittelt, während die stimulierenden Effekte auf das Kolon CRF<sub>1</sub>-vermittelt sind. Das passt zum Expressionsmuster des CRF<sub>2</sub>-Rezeptors, welcher vorwiegend im oberen Gastrointestinaltrakt im Ösophagus und an gastralen myenterischen Neuronen auf der Gen- und Proteinebene lokalisiert werden konnte [152, 229].

Die Gabe von CRF und Ucn1 kann typische Symptome herbeiführen, wie man sie bei Patienten mit einem Reizdarmsyndrom mit Diarrhöprädominanz sieht. Dazu gehören eine erhöhte Angstbereitschaft, viszerale Hypersensitivität, vermehrte Schleimproduktion im Kolon, Diarrhö sowie eine durch Mastzellaktivierung hervorgerufene Erhöhung der Kolonepithelzellpermeabilität, was die bakterielle Translokation begünstigt [57, 97, 124, 195, 208].

Auch eine chronische Stressexposition führt zu Veränderungen am Gastrointestinaltrakt. Einerseits kann chronischer Stress die Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme vermindern [149], andererseits sind jedoch auch eine gesteigerte Kalorienaufnahme und Entwicklung von Adipositas beschrieben [44, 117, 150]. Chronischer, wiederholter Tail Pinch steigerte oder verringerte die Nahrungsaufnahme bei Ratten [103, 162]. Bei einem chronischen Stressmodell, der

genetischen CRF-ÜE Maus zeigte sich eine geringere Nahrungsaufnahme unter Fasten-, jedoch beschleunigte Magenentleerung unter basalen Bedingungen [187].

## 1.4 Optimierung der experimentellen Rahmenbedingungen

Hohe experimentelle Präzision ist eine Grundvoraussetzung für gute wissenschaftliche Praxis. Bei verhaltensbiologischen Experimenten müssen Stresseffekte vermieden werden. Es ist wichtig, die Euthanasie von Versuchstieren kurz und schmerzlos durchzuführen, da Veränderungen in der Genexpression auf mRNA-Ebene bereits nach kurzer Zeit nachweisbar sind. Neuronale Aktivität kann man Minuten nach Stressexposition mittels Messung von „extracellular signal-regulated kinases“ (ERK) nachweisen, während die Induktion des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos erst 30-60 min nach einer Stressexposition beginnt und ihren Höhepunkt zwischen 60-120 min erreicht [9, 36, 80, 134, 175]. Das Protein ist dann mit immunhistochemischen Methoden nachweisbar und markiert stressresponsive Regionen.

In verhaltensbiologischen Experimenten, welche z.B. die Messung der Nahrungsaufnahme beinhalten, sollten die Tiere zunächst an den Untersucher gewöhnt werden und auch Injektionen vorher simuliert werden. Auch sollte die Interaktion des Untersuchers mit dem Tier während des Experiments minimiert werden. Die Intervalle bei der Messung der Nahrungsaufnahme sollten gut gewählt werden, um Effekte nicht zu verpassen. Ratten sind nachtaktiv und verzehren den Großteil ihrer Nahrung in der Dunkelperiode. Will man die physiologische Nahrungsaufnahme messen, benötigt man eine Lichtquelle, die die Nager ablenken kann. Um diese Problematik zu umgehen, haben wir ein automatisches Nahrungsaufnahmemesssystem bei Mäusen und Ratten etabliert, das diese Interferenzen ausschließt [62, 190, 196, 222].

Bei der Messung von Peptidhormonen in Gewebe und Zirkulation müssen biologische Prozesse, wie enzymatische Degradierung, Denaturierung und Bindung an andere Proteine beachtet werden. In Kenntnis dieser zahlreichen Interferenzfaktoren haben wir kürzlich die RAPID-Methode entwickelt [193]. RAPID ist ein Akronym für reduzierte Temperaturen, Azidifikation, Proteaseinhibition, exogene Kontrollisotope und Dilution. Bei der Verarbeitung von Blut wurde dieses

permanent bei 4 °C gehalten und 1:10 in Säurepuffer mit Proteaseninhibitorencocktail verdünnt. Mithilfe radioaktiv markierter Kontrollpeptide wurde vor den *in vivo* Experimenten die Ausbeute *in vitro* kontrolliert. In unserer Studie verglichen wir die Ausbeute wichtiger gastrointestinaler Hormone aus dem Blut, wenn es entweder unter Standardbedingungen oder mit der RAPID-Methode verarbeitet wurde [193]. Nach Standardbedingungen, wie sie größtenteils in Laboren durchgeführt werden, kam es zu einem relevanten Verlust von Cholecystokin-58 (CCK-58) und Calcitonin-gene-related Peptid (80%), Amylin, Insulin, Peptid YY und Somatostatin (>35%) im Blut. Mit der RAPID-Methode konnte die Ausbeute bei 11/12 radioaktiv markierten gastrointestinalen Peptiden signifikant verbessert werden [193]. Hochleistungsflüssigkeitchromatographie (HPLC) konnte zeigen, dass sich bei der Standardmethode aufgrund von Degradationsprozessen veränderte molekulare Formen von CCK-58, Gastrin-Releasing Peptid, Somatostatin und Ghrelin fanden [193]. Durch Benutzung der RAPID-Methode bei der Blutverarbeitung veränderte sich die Ratio von Acyl- zu Total-Ghrelin im Blut von in der Literatur vorbeschriebenen 1:19 zu 1:5 aufgrund der höheren Ausbeute von Acyl-Ghrelin, einem proteaseanfälligen nahrungsregulatorischen Hormon [193]. Die RAPID-Methode sollte deshalb stets bei der Blutverarbeitung zur Messung von Peptiden angewendet werden, da sie die Ausbeute der Peptide signifikant erhöht.

Biologisch wirksame Dosen von Peptiden befinden sich oft im Mikrogrammbereich. Wechselwirkungen der Peptide mit Oberflächen können zu einem Verlust derselben führen. Deshalb werden Trägersubstanzen und Lösungsmittel bei der Zubereitung von Injektionslösungen für verhaltensbiologische Experimente eingesetzt. Wie hoch der Verlust von biologisch wirksamen Substanzen an Oberflächen ist, war bisher noch nicht bekannt.

## 2. EIGENE ARBEITEN

Akkurates und sauberes Arbeiten ist der Grundstein einer jeden wissenschaftlichen Untersuchung. In der Forschung mit Proteinen und Peptiden wird oft mit nano- und mikromolaren Mengen gearbeitet. Kleinste Verunreinigungen oder Verluste des biologisch aktiven Moleküls können eine große Varianz der experimentellen Effekte nach sich ziehen.

### 2.1 Die Bedeutung der optimalen Plastik- und Glasoberflächen in der Peptidforschung

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Aufgrund ihrer Amphiphilie neigen Peptide und Proteine dazu, an zahlreiche Oberflächen zu binden [118]. Bei der Quantifizierung von Peptiden aus biologischen Flüssigkeiten und Geweben kann diese Eigenschaft zu Falschmessungen und Verlust führen. Um dies zu vermeiden, kann man das Binden von Peptiden an Oberflächen unter Hinzunahme von z.B. Tween-20, hohen Salzkonzentrationen [55, 111, 180], oder Beschichtung von Teströhrchen mit Polyethylenglykol [93] oder silikonisierenden Substanzen herabsetzen [200]. Während des experimentellen Prozesses werden jedoch auch zahlreiche unterschiedliche Teströhrchen aus verschiedenen Materialien verwendet. Auch hier muss eine Bindung des Peptids an die Oberfläche vermieden werden. Um die hohe Variabilität der Peptidausbeute von unterschiedlichen, jedoch häufig benutzten Oberflächen zu demonstrieren, untersuchten wir mithilfe von  $^{125}\text{I}$ -markierten endokrinen Peptiden die Ausbeute unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptide Ghrelin, sulfatiertes CCK8, CRF, Glucagon-like Peptid-1 (GLP-1), Insulin, Leptin, Nesfatin-1 und Peptid YY mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften in Ladung, Größe, Endgruppen oder anderen Modifikationen wurden für 48 Stunden in Glas- oder Plastikröhrchen mit oder ohne Silikonbeschichtung inkubiert. Die für die Peptidausbeute günstigsten Oberflächen wurden ausgewählt und die  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptide erneut inkubiert, diesmal unter Hinzunahme von bovinem Serumalbumin

(BSA 1%) mit oder ohne nachfolgender Lyophilisierung. Die radioaktive Ausbeute wurde mittels Gammazähler ermittelt. Wir konnten zeigen, dass es zahlreiche Unterschiede in den Bindungskapazitäten der  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptide an die Testoberflächen gibt. Eine Silikonbeschichtung verringerte die Ausbeute der Peptide, während die Hinzunahme von BSA diese erhöhte. Die Lyophilisierung von gelösten  $^{125}\text{I}$ -markierten Peptiden und BSA in wenig affinen Teströhrchen erbrachte mehr als 89% Ausbeute für alle getesteten Peptide. Dies zeigt, wie wichtig bereits die Auswahl des experimentellen Gefäßes zur Vermeidung starker Wechselwirkungen der Peptide mit den Oberflächen sowie den dadurch bedingten Peptidverlusten und Falschmessungen ist.



Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.02.009>

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.



Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Taché Y, Reeve J.R. Jr. The importance of using the optimal plastic and glassware in studies involving peptides. *Analytical Biochemistry* 414; 38-46, 2011.

Die Kombination des richtigen experimentellen Containers mit der RAPID-Methode ermöglicht die Ausweitung der Messung auf Peptide und Hormone, die zuvor schwierig zu detektieren waren, wie z.B. das Stresshormon CRF. Unter Annahme, dass Stress den CRF-Gehalt erhöhen sollte, injizierten wir den immunologischen Stressor Lipopolysaccharid.

## **2.2 Lipopolysaccharid steigert die Plasmaspiegel von Corticotropin-Releasing-Hormon bei Ratten**

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Es war bereits bekannt, dass die intestinale CRF-mRNS-Expression sechs Stunden nach der ip Gabe von LPS steigt [233]. Ob durch die LPS-Injektion auch die CRF- und ACTH-Plasmaspiegel ansteigen, war bisher noch nicht bekannt. In dieser Studie erhielten die Ratten eine ip LPS-Injektion (100 µg/kg). Ihr Blut wurde hiernach auf CRF untersucht. Hierzu bedienten wir uns der kürzlich etablierten RAPID-Methode [193] und verglichen diese mit herkömmlichen Plasmaproteinextraktionsmethoden (EDTA-Blut mit oder ohne Methanolextraktion) [4, 52, 108, 146, 228, 231]. Die Hormonspiegel wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) gemessen. Die RAPID-Methode verbesserte die Ausbeute von radioaktiv markiertem CRF *in vitro* im Vergleich zur Plasmaproteinextraktion aus EDTA-Blut ohne und mit konsekutiver Methanolextraktion (90,8 *versus* 66,9 *versus* 47,5%;). Der basale CRF-Plasmaspiegel nach RAPID-Plasmaproteingewinnung lag bei  $28.9 \pm 2.8$  pg/ml, während dieser nach den anderen beiden Blutverarbeitungsmethoden unterhalb der RIA-Detektionsgrenze lag ( $< 10$  pg/ml). Drei und vier Stunden nach LPS-Injektion veränderten sich die CRF-Plasmaspiegel nicht, jedoch stiegen diese nach sechs Stunden um das 2,9-fache an, während der CRF-Gehalt im proximalen Kolon leicht sank ( $-27,6\%$ ). Die ACTH-Plasmaspiegel stiegen im Vergleich zu Kontrollratten (135,3 *versus* 101,4 pg/ml) 30 min nach dem initialen CRF-Anstieg, während drei und sechs Stunden nach LPS-Gabe keine Veränderung zu verzeichnen war. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die ip LPS-Gabe einen verzögerten Plasma-CRF-Anstieg induziert, der nach 30 min zu einer Plasma-ACTH-Erhöhung

führt. Dies lässt vermuten, dass der immunmodulatorische Stressor LPS peripheres CRF freisetzen kann, welches zur hypophysären Aktivierung unter diesen Stressbedingungen beiträgt.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1159/000322590>

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.



Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Stengel A, Wang L, Reeve J.R. Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide (LPS) increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone (CRH) in rats. *Neuroendocrinology* 93; 165-73, 2011.

Obwohl Mäuse vielfach in tierexperimentellen verhaltensbiologischen Studien zur Erforschung von Stress verwendet werden, war bisher nur wenig über das Verteilungsmuster des wichtigsten Stresshormons CRF im Mausgehirn bekannt.

### **2.3 Vergleichende Untersuchung des Verteilungsmusters CRF-immunreaktiver Neurone im Maus- versus Rattengehirn und selektive Fos-Aktivierung CRF-positiver Neurone nach abdominalen Chirurgie**

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Wir entwickelten einen neuen Ratten-/Maus-CRF polyklonalen Antikörper (CURE ab 200101), mit dem wir die zentrale Verteilung der CRF-Immunreaktivität in den Gehirnen von colchicinvorbehandelten Mäusen und Ratten zunächst beschrieben, miteinander verglichen und deren Aktivierung nach einem physikalischen Stressor, der abdominalen Chirurgie, bei Ratten darstellten.

CRF-immunreaktive Neurone konnten bei naiven Ratten im Kortex, Nucleus striae terminalis, zentraler Amygdala, hypothalamischen PVN, Nucleus Barrington und Area tegmentalis dorsolateralis visualisiert werden. Im Gegensatz dazu waren CRF-immunreaktive Neurone bei der Maus nur nach Colchicinvorbehandlung detektierbar. Das Verteilungsmuster entsprach jedoch weitestgehend dem der Ratte mit wenigen Ausnahmen: Bei der Maus waren die CRF-Signale insgesamt schwächer und weniger ausgeprägt, ausgenommen das laterale Septum und der externe Subnucleus des Nucleus parabrachialis lateralis, Areale, die mehr CRF-immunreaktive Signale aufwiesen und im dorsalen Vagus Kern, welcher nur bei der Maus CRF-Immunreaktivität zeigte.

Der Stressor abdominalen Chirurgie induzierte den neuronalen Aktivitätsmarker Fos um das 7,7-fache und in 30% der CRF-immunreaktiven Neurone im PVN im Vergleich zu Kontrollratten (nur Anästhesie). Der CRF-Gehalt im PVN von gestressten Tieren war um 25% geringer als bei Kontrolltieren, was auf eine

Freisetzung von hypothalamischem CRF schließen lässt. In anderen aktivierten Hirnarealen war keine Koexpression von Fos und CRF nachweisbar.

Diese Daten zeigen, dass die Verteilung der CRF-Immunreaktivität bei Mäusen und Ratten bis auf wenige Ausnahmen, die möglicherweise auch leichte Unterschiede bei der Stressantwort dieser beiden Spezies erklären können, ähnlich ist. Die abdominale Chirurgie aktiviert selektiv CRF-immunreaktive Neurone im paraventriculären Nucleus der Ratte, was eine Rekrutierung und Freisetzung von hypothalamischem CRF in der Vermittlung dieses physikalischen Stressors nahelegt.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.024>

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.



Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.



Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Verweis auf Volltext:

Wang L\*, **Goebel-Stengel M\***, Stengel A, Wu V, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Research* 1415; 34-46, 2011.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Modellen ist akuter Tail Pinch ein Stressmodell, welches die Nahrungsaufnahme bei Versuchstieren induziert [7, 167]. Obwohl NPY-Y<sub>1</sub>-Rezeptoren und Somatostatin-2-Rezeptoren [191] an der Mediation einer gesteigerten Nahrungsaufnahme beteiligt sind, wurde ein möglicher Zusammenhang zu der durch Tail Pinch vermittelten orexigenen Antwort noch nicht untersucht.

## **2.4 Die orexigenen Effekte von Tail Pinch: Die Rolle von Neuropeptid Y<sub>1</sub>- und Corticotropin-Releasing-Hormon-Rezeptoren**

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Bei dem Stressmodell Tail Pinch erhält die Ratte einen unangenehmen, jedoch nicht schmerzhaften zeitlich begrenzten Druck auf die Schwanzspitze. Dies stimuliert die kurzfristige Nahrungsaufnahme [7]. In dieser Studie haben wir die neuronale Mediation dieses Verhaltens charakterisiert und den Einfluss eines chronischen Tail Pinch-Modells. Ratten erhielten einen akuten (fünf Minuten) oder wiederholten (fünf Minuten pro Tag über 14 Tage) Tail Pinch. Der akute Tail Pinch steigerte die Nahrungsaufnahme während der ersten fünf Minuten nach Stimulation im Vergleich zu Kontrolltieren (kein Tail Pinch) (0,92 *versus* 0,03 g). Nach vorheriger *izv* Injektion eines NPY<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wurde dieser Effekt um 76% reduziert, während die *izv* Gabe eines CRF-Rezeptor-Antagonisten diesen Effekt um 48% steigerte. Die Gabe eines Somatostatin-2-Rezeptor-Antagonisten modulierte den Effekt nicht. Eine fünfminütige Tail Pinch-Behandlung führte zu einem Anstieg des Blutzuckers um 21%, während Plasma-Acyl-Ghrelin (+41%) und ACTH (+37%) nicht signifikant erhöht waren. Zwei Tail Pinch-Behandlungen im Intervall von 45 min aktivierten catecholaminerge Neurone in der Pons und im Hirnstamm sowie hypothalamische CRF-Neurone im PVN. Eine 14-tägige tägliche Tail Pinch-Applikation änderte die

fünfminütige Nahrungsaufnahme direkt nach dem Stimulus während der Tage 2-11 nicht, jedoch danach um -50%. Gleichzeitig ermittelten wir die fäkale Pelletexkretion (FPE) als einen Marker für chronischen Stress. Die FPE war während der letzten fünf Tage verglichen mit den ersten fünf Tagen um 58% gesteigert. Am 14. Tag war die Körpergewichtszunahme um 22% reduziert. Diese Daten zeigen, dass der orexigene Effekt, der durch Tail Pinch ausgelöst wird, den zentralen NPY<sub>1</sub>-Rezeptor Signaltransduktionsweg aktiviert, während der CRF-Signaltransduktionsweg die akute Reaktion eher dämpft, jedoch eine Rolle bei der chronischen Tail Pinch-Antwort spielt und somit zu einer erhöhten Defäkationsrate und verminderten Körpergewichtszunahme führt.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00335.2013>

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.



Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.

Verweis auf Volltext:

**Goebel-Stengel M**, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY<sub>1</sub> and corticotropin releasing factor receptors. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Feb;306(3):R164-74, 2014.



Ein akuter Stressor (LPS) führt zur Erhöhung von zirkulierendem CRF. In Tierexperimenten führten chronische Stressmodelle oder die Gabe von Kortikosteron zu einer Atrophie hippocampaler Dendriten [28, 59, 182]. Ein verkleinerter Hippocampus zeigte sich auch bei Patienten mit Morbus Cushing oder posttraumatischer Belastungsstörung [28, 129, 176, 183].

Welche Auswirkungen eine dauerhafte Erhöhung von CRF im Tiermodell auf die Körperfunktionen und Hirnmorphologie hat, soll in der folgenden Arbeit dargestellt werden.

## **2.5 CRF-überexprimierende Mäuse zeigen eine Hirnatrophie und Motordysfunktion**

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

Zunächst konnten wir beobachten, dass CRF-ÜE Mäuse makroskopisch kleinere Gehirne als Wildtyptiere haben. Auf das Gewicht bezogen, zeigte sich, dass adulte männliche und weibliche CRF-ÜE Mäuse signifikant leichtere Groß- und Kleinhirne im Vergleich zu Wildtyptieren aufwiesen (347,7 *versus* 460,1 mg und 36,3 *versus* 50,0 mg). Der epididymale beziehungsweise parametrale Fettgehalt war bei CRF-ÜE Mäusen deutlich höher. Das Gehirngewicht korrelierte invers mit dem epididymalen/parametralen Fettgehalt, jedoch nicht mit dem Körpergewicht. Auf der mikroskopischen Ebene zeigte sich in Nissl-gefärbten Hirnschnitten weiblicher Mäuse, dass der anteriore cinguläre und der sensorimotorische Kortex der CRF-ÜE Mäuse deutlich schwächer ausgeprägt und die Volumina von Hippocampus, PVN und Amygdala im Vergleich zu den Wildtypmäusen deutlich kleiner waren, während der Locus coeruleus leicht vergrößert war. Die motorischen Fertigkeiten wurden mittels Beam crossing und Schrittanalyse untersucht. Hierbei zeigte sich, dass CRF-ÜE Mäuse deutlich mehr Zeit und auch Schritte brauchten (bei vermindertem Schrittabstand), um einen Balken zu überqueren und dabei auch mehr Fehler machten als ihre Wildtypartgenossen.

Diese Daten belegen, dass CRF-ÜE Mäuse kleinere Gehirne als Wildtypmäuse haben und dies mit Veränderungen der motorischen Koordination sowie erhöhter

viszeraler Fettmasse einhergeht. Mit dem transgenen CRF-ÜE-Mausmodell lassen sich die Auswirkungen chronischer Stressbedingungen mit erhöhten zentralen CRF- und peripheren Glukokortikoidspiegeln auf das Verhalten sowie die Organgröße und -funktion untersuchen.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.068>

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

Verweis auf Volltext:

**Goebel M**, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neuroscience Letters* 473; 11-15, 2010.

### 3. DISKUSSION

Das Interesse an den Auswirkungen von Stress auf die Gesundheit und dessen Rolle in der Entstehung von Krankheiten ist in den letzten Jahren gestiegen. Zuviel Stress wird für die Zunahme emotionaler Belastungssituationen (posttraumatische Belastungsreaktion), bei Problemen mit Bezug auf Schwierigkeiten bei der Lebensbewältigung (Burnout und Zustand der totalen Erschöpfung), von hypo- sowie hyperrektischen Essstörungen sowie für die Exazerbation des Reizdarmsyndroms verantwortlich gemacht. Um diese Zusammenhänge zu erfassen, ist ein tieferes Verständnis der Physiologie der Stressreaktion notwendig. Hierzu wurden verschiedene tierexperimentelle Stressmodelle entwickelt. Mithilfe dieser kann die Stressreaktion auf neuronaler Ebene erforscht werden.

Wenn Experimente in verschiedenen Laboren durchgeführt werden, kommt es oft zu diskrepanten Ergebnissen. Eine Vereinheitlichung der experimentellen Methoden und Minimierung von Störfaktoren erscheint deshalb von großer Bedeutung. Allein die Benutzung der RAPID-Methode veränderte die Ratio von Acyl:Total-Ghrelin im Plasma signifikant [193]. Dies hat Auswirkungen auf die Beurteilung funktioneller Studien. Selbst die Wahl des Probencontainers kann den Ausgang des Experiments verändern. Jedes Peptid hat einzigartige Eigenschaften, die zu unterschiedlichen Bindungen an Oberflächen führen. Der Peptidverlust an Oberflächen könnte diskrepante Ergebnisse bei der Messung und beim Resultat funktioneller Studien in verschiedenen Laboren erklären. In unserer Studie benutzten wir iodinierte Peptide als Modell für die natürlich vorkommenden Peptide. Iodinierte Peptide könnten in ihren biochemischen Eigenschaften von den natürlichen abweichen und somit die Ergebnisse verfälschen. Die Ausbeute verschiedener iodinierter Peptide variierte jedoch stark, so dass allein die Iodinierung nicht als Erklärung ausreicht, sondern vielmehr die biochemischen Peptideigenschaften eine Rolle spielen [61]. Insgesamt waren sowohl Borosilikatglas als auch Polypropylen anderen Materialien überlegen, jedoch ist eine theoretische Vorhersage, ob ein Plastik- oder Glasröhrchen besser geeignet wäre, nicht möglich [61]. Auch bestätigte sich, dass die Addition von Albumin hilfreich ist, jedoch kann dieses bei massenspektrometrischen Analysen von Proteinen nicht eingesetzt werden. Bei der Testung von iodiniertem CRF stellte sich heraus, dass alle getesteten Röhrchen CRF zu 40-50% binden, was bedeutet, dass



bei jedem Experiment bereits die Hälfte des CRF aufgrund der Oberflächenadhäsionen verloren ist. Andererseits wurden zahlreiche CRF-Analoga entwickelt, welche höchstwahrscheinlich andere Eigenschaften als CRF selbst aufweisen [70]. Diese wurden in unserer Studie nicht getestet. Vor Beginn eines Experiments sollten die individuellen Bindungseigenschaften von Peptidhormonen jedoch untersucht werden.

Diese Ergebnisse zugrunde legend, war es möglich, für die Messung des Stresshormons CRF im Blut und Gewebe von Ratten optimale Untersuchungsbedingungen zu schaffen. Es ist bekannt, dass CRF labil und aufgrund seiner starken Bindung zum CRF-Binding-Protein schwer messbar ist [18, 224]. Aus diesem Grund benutzten wir den immunologischen Stressor Lipopolysaccharid, um den CRF-Gehalt im Blut von Ratten zu erhöhen [67]. In durch Zentrifugation gewonnenem Blutplasma mit oder ohne Methanolextraktion waren die CRF-Plasmaspiegel unterhalb der Detektionsgrenze des RIA-Kits. Aus diesem Grund bestimmten wir zunächst die Ausbeute von iodiniertem CRF, welches Vollblut zugesetzt wurde, nach Blutverarbeitung mit der RAPID-Methode, normaler Plasmagewinnung durch alleinige Zentrifugation und Plasmagewinnung gefolgt von Methanolextraktion. Die RAPID-Methode erbrachte eine Ausbeute von  $^{125}\text{I}$ -CRF von 91%, während diese nach normaler Plasmagewinnung bei 67% und nach zusätzlicher Methanolextraktion bei 47% lag. Andere Studien zeigten jedoch, dass die Ausbeute des synthetischen CRF-Peptids, welches Blutplasma zugesetzt wurde, das danach mit Methanol extrahiert wurde, 94-100% betrug [24]. Diese diskrepanten Ergebnisse können zum einen auf unterschiedliche Eigenschaften von synthetischem und iodiniertem CRF zurückzuführen sein. In unserer vorhergehenden Studie reichte jedoch die Iodinierung allein nicht aus, um die unterschiedlichen Ergebnisse zu erklären [61]. Andererseits ist es naheliegend, dass das Zufügen des Kontrollpeptids zu Vollblut im Gegensatz zu Plasma unterschiedliche Effekte hat. Auch ist nicht bekannt, wie stark die Bindungseigenschaften des CRF-Binding-Proteins an nativem, synthetischen oder iodinierten CRF ausfallen. Dies ist von Relevanz, da anzunehmen ist, dass das CRF-Binding-Protein während der Zentrifugation zur Plasmagewinnung aus dem Überstand entfernt wird. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass es uns mit der RAPID-Methode möglich war, die basalen Plasmalevel von CRF bei Ratten, auch ohne LPS-Stimulation mit einem

kommerziellen RIA-Kit zu messen, welches zuvor nur für die Messung hoher CRF-Werte aus hypothalamischen Extrakten oder Zellkulturen genutzt wurde [48, 84, 178]. Die LPS-Stimulation steigerte die CRF-Spiegel nach sechs Stunden um das 2,9-fache im Vergleich zu einer intraperitonealen Vehikelinjektion [67]. Zu den früheren Messzeitpunkten von drei und vier Stunden zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Über den Ursprung der gesteigerten zirkulierenden CRF-Spiegel sechs Stunden nach LPS-Injektion kann nur spekuliert werden. Es gibt jedoch Hinweise dafür, dass eine Freisetzung aus Darm- oder Immunzellen wahrscheinlicher ist als aus dem Hypothalamus. Dafür spricht der zeitliche Verlauf der Plasma-CRF-Erhöhung nach LPS-Injektion im Vergleich zu der ACTH-Erhöhung als Ausdruck der HHN-Achsen-Aktivierung. Aus unserer und anderen Studien geht hervor, dass die Freisetzung von sowohl ACTH als auch Kortikosteron nach der Injektion einer ähnlichen LPS-Dosis wie wir sie benutzten, schon ein bis zwei Stunden nach LPS-Injektion zu verzeichnen war [67, 100, 210], also zu einem Zeitpunkt, zu welchem noch keine Erhöhung der Plasma-CRF-Spiegel vorlag. Jedoch wurden in unserer Studie die ACTH-Spiegel nicht zu solch einem frühen Zeitpunkt gemessen. Des Weiteren konnten wir in einer anderen Studie, welche die gleiche LPS-Dosis und Injektionsart benutzte, zeigen, dass es sechs Stunden nach LPS-Injektion nicht nur zu einer Erhöhung von Plasma-CRF kommt, sondern auch zu einer temporären 2,5-fachen Hochregulation von CRF mRNA im proximalen Kolon [233]. Auch war eine gesteigerte CRF-Immunreaktivität in myenterischen Neuronen nachweisbar [233]. Dies konnten wir auf Proteinebene nicht bestätigen. Der CRF-Proteingehalt im proximalen und distalen Kolon unterschied sich nicht nach Vehikel- oder LPS-Injektion, obwohl ein Trend zur Reduktion von CRF im proximalen Kolon sichtbar war [67]. Auch für intestinale Immunzellen wurde gezeigt, dass Eosinophile, Makrophagen und T-Zellen CRF exprimieren und dieses unter Stressbedingungen freisetzen [235]. Auch wenn anzunehmen ist, dass sechs Stunden nach LPS-Injektion CRF aus dem proximalen Kolon freigesetzt wird und zu einer Erhöhung der CRF-Plasmaspiegel führt, kann eine andere CRF-Quelle, z.B. aus extraintestinalen Immunzellen, nicht ganz ausgeschlossen werden. Insbesondere in Thymus, Milz und zirkulierenden Immunzellen konnte CRF gemessen werden [1, 37, 94]. Somit ist es auch möglich, dass periphere Immunzellen nach LPS-Stimulation CRF in die Zirkulation freisetzen und eine weitere CRF-Quelle darstellen. Der späten zirkulierenden CRF-Erhöhung könnte auch zunächst eine LPS-Zytokin-induzierte

Erhöhung der CRF-Genexpression, vermittelt durch den Toll-like-Rezeptor-4 als Hauptmediator der Makrophagenantwort auf LPS, vorausgehen [3, 60]. Eine Interaktion von CRF und LPS wurde kürzlich bei Mausmakrophagen beschrieben. CRF erhöht über den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor die LPS-induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine [212]. Somit ist es auch denkbar, dass die späte CRF-Erhöhung im Plasma mit der Makrophagenaktivität nach Immunstimulation durch LPS in Verbindung steht.

Dass die späte CRF-Plasmaerhöhung nach LPS-Injektion von physiologischer Relevanz ist, zeigt sich auch an der circa 30 Minuten später messbaren ACTH-Erhöhung. Die zeitliche Verbindung von CRF- und ACTH-Erhöhung ist vorbeschrieben [157], und sowohl drei als auch sechs Stunden nach LPS-Injektion war keine ACTH-Erhöhung mehr messbar. Somit ist anzunehmen, dass das erhöhte zirkulierende CRF Einfluss auf die Hypophyse hat und zusätzlich zur frühen ACTH-Antwort nach ca. einer Stunde wie sie nach LPS-Injektion bekannt ist [100, 156, 210], zu einer zweiten, späten ACTH-Erhöhung führt. Es kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden, dass das ACTH extrahypophysären Ursprungs ist und z.B. aus Leukozyten freigesetzt wird [179].

Die ip Gabe von LPS erhöhte auch die Nucleob2/Nesfatin-1-Konzentration im Blut [184], während Ghrelin vermindert war [16, 188]. Diese Daten belegen eine differenzielle Regulation von CRF und Nucleob2/Nesfatin-1 im Gegensatz zu Ghrelin, wenn eine akute Entzündung mit dem Zellwandtoxin gramnegativer Bakterien, Lipopolysaccharid, simuliert wird. Dies ist vor dem Hintergrund interessant, dass alle drei Hormone auf den Gastrointestinaltrakt wirken und Ghrelin die Nahrungsaufnahme und die Magenmotilität steigert [89, 221], während CRF und Nucleob2/Nesfatin-1 die Nahrungsaufnahme und Magenentleerung hemmen [189, 222]. Auch ein akuter zweimaliger Tail Pinch-Stress erhöht die Nahrungsaufnahme, jedoch scheint hier der orexigene Stimulator NPY ausschlaggebend zu sein, während die neuronale Aktivierung von CRF-immunreaktiven Neuronen im PVN die Reaktion eher dämpft. Es ist zu bemerken, dass CRF und NPY im PVN interagieren [75]. Dass CRF-Neurone nach Tail Pinch aktiviert werden, zeigt sich auch an der bereits nach fünf Minuten beginnenden Erhöhung der plasmatischen ACTH-Spiegel. Ob auch Nesfatin-1-immunreaktive Neurone aktiviert werden und sich die Plasmaspiegel nach Tail Pinch-Stress verändern, wurde bisher noch nicht untersucht. Die intravenöse Koinjektion des CRF-Antagonisten Astressin-B erhöhte die Tail Pinch-induzierte

Nahrungsaufnahme sogar weiter [63], und die Koinjektion des CRF-Antagonisten helical CRF<sub>(9-41)</sub> und NPY verlängerte die Dauer der Nahrungsaufnahme nach fünf Minuten Tail Pinch [74]. Passend zur erhöhten Nahrungsaufnahme steigen die Ghrelinspiegel nach akutem Tail Pinch leicht an, während sie nach Kälte- und Restraint Stress signifikant erhöht sind [68, 143]. Im Gegensatz dazu sind die Ghrelinspiegel nach abdomineller Chirurgie reduziert [186]. Es zeigt sich also, dass unterschiedliche Stressoren entgegengesetzte Wirkungen auf die Ghrelinspiegel haben können. Ob diese Stressoren auch Nucleob2/Nesfatin-1 und CRF verändern können oder dies nur ein Charakteristikum des immunologischen Stressors ist, muss weiter untersucht werden. Dass Nucleob2/Nesfatin-1 und CRF interagieren, konnte in vielen Studien belegt werden und zeigt sich auch in deren Kolo-kalisation im Hypothalamus [64]. Des Weiteren ist es möglich, sowohl CRF- als auch Nesfatin-1-immunreaktive Neurone im Rattengehirn durch Exposition der Tiere gegenüber verschiedenen Stressoren wie z. B. Restraint Stress [68, 90, 230, 232], abdominelle Chirurgie [192, 220] oder LPS-Injektion [27] zu aktivieren.

In unserer vergleichenden Studie zur Expression von CRF-Immunreaktivität im Mäuse- und Rattengehirn zeigte sich ein weitestgehend ähnliches Verteilungsmuster, jedoch mit kleinen Abweichungen, so dass anzunehmen ist, dass dieses auch beim Menschen abweicht. So waren CRF-immunreaktive Neurone bei der Maus nur nach Colchicinvorbehandlung detektierbar. Auch waren die CRF-Signale insgesamt schwächer und bis auf wenige Ausnahmen weniger ausgeprägt. Das ubiquitäre Verteilungsmuster von CRF im Gehirn lässt darauf schließen, dass möglicherweise eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen Peptiden der CRF-Familie vorliegt, obwohl der Antikörper im Dot Blot keine Immunreaktivität mit Peptiden der CRF-Familie und im Radioimmunoassay lediglich eine Kreuzreaktivität mit Urotensin-I aufwies [220]. In unseren immunhistochemischen Studien zeigte sich jedoch eine Kreuzreaktivität mit Urotensin-I und teilweise mit Ratten-Urocortin 1 sowie Ratten- und Maus-Urocortin 2 [220]. Auch färbten sich Neurone im Edinger-Westphal Nukleus, einem Gehirnkern, in welchem bisher nur Urocortin 1 nachgewiesen wurde [10, 22, 91]. Auch ein anderer CRF-Antikörper führte zu Signalen im Edinger-Westphal Nukleus [38, 42, 138], so dass auch dieser Antikörper eine Kreuzreaktivität mit Urocortin 1 haben muss. Diese Resultate belegen, dass Ergebnisse stets unter Zuhilfenahme einer zweiten Methode validiert werden sollten. Die Unterschiede in der neuronalen CRF-Expression können auch durch Speziesunterschiede begründet

sein oder die Zuhilfenahme von Colchicin, welches die immunhistochemische Detektierbarkeit von CRF in Perikarya verstärkt, indem es den axonalen Transport hemmt. Um Stresseffekte des Zellgifts auf die Tiere zu reduzieren, verwendeten wir eine geringere Dosis von 20 µg/Tier bei Ratten und Mäusen (in der Literatur sind Dosierungen zwischen 40-200 µg/Tier vorbeschrieben). Die Colchicinvorbehandlung intensivierte die CRF-Immunreaktivität in Rattenneuronen. Bei Mäusen war trotz Colchicinvorbehandlung die CRF-Immunreaktivität schwächer ausgeprägt als bei Ratten. Dies kann an einer geringeren CRF-Synthese oder einem schnelleren axonalen Transport bei Mäusen im Vergleich zu Ratten liegen. Über die Unterschiede zum humanen Gehirn kann noch keine Aussage gemacht werden, da die Datenlage nicht ausreicht. Auch eine Colchicinvorbehandlung beim Menschen ist nicht möglich. Eine komplette Extrapolation tierexperimenteller Daten auf den Menschen sollte vermieden werden. Was die zentrale Lokalisation des CRF<sub>1</sub>-Rezeptors betrifft, gibt es bisher nur Studien an Nagetier- und Affengehirnen. Es wurden bereits CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Radioliganden zur Nutzung für die Positronenemissionstomographie identifiziert, jedoch waren diese bisher nicht selektiv genug, den CRF<sub>1</sub>-Rezeptor im Affengehirn darzustellen [112]. Es besteht somit noch Bedarf, die Expression des CRF-CRF-Rezeptor-Systems im Gehirn und auch in der Peripherie beim Menschen zu charakterisieren.

Die izv Injektion von Nesfatin-1 führte zu einer Erhöhung von ACTH- und Kortikosteron-Plasmaspiegeln bei Ratten [90]. Auf funktioneller Ebene konnten wir zeigen, dass die nächtliche physiologische Nahrungsaufnahme von Ratten nach izv Nesfatin-1-Injektion CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-vermittelt gehemmt wird [189]. Weitere Erkenntnisse werden folgen, sobald der Nucleob2/Nesfatin-1 Rezeptor bekannt wird. Auch dies wäre mit der Entwicklung spezifischer Rezeptorliganden, ähnlich dem CRF<sub>1</sub>-Rezeptor, zu verwirklichen. Die Daten belegen jedoch bereits eine Interaktion von Nucleob2/Nesfatin-1 und CRF bei der Regulation gastrointestinaler Funktionen vermittelt durch die Stress-Brain-Gut-Achse.

Rezidivierender Tail Pinch kann auch als chronisches Stress-Tiermodell gelten. Wurde dieser über 14 Tage täglich zur gleichen Zeit über fünf Minuten ausgeübt, reduzierte sich die Nahrungsaufnahme ab Tag elf um 50% und die Körpergewichtszunahme um 22%, während die fäkale Pelletexkretion innerhalb der letzten fünf Tage anstieg [63], was in einer negativen Korrelation der fünfminütigen Nahrungsaufnahme und der FPE resultierte. Das CRF-System spielt insbesondere

bei gastrointestinalen Reaktionen auf akute Stressoren eine Rolle und ist hier an der erhöhten Defäkationsrate [204], Hemmung der Nahrungsaufnahme [92, 170, 178] und Körpergewichtszunahme [35, 178] beteiligt. Es scheint jedoch auch die chronischen Effekte zu vermitteln und ist vermutlich für die gesteigerte FPE sowie die verminderte Körpergewichtszunahme verantwortlich. Auch andere chronische Stressmodelle induzieren keine Adipositas. So führte über fünf Wochen durchgeführter täglicher, kurzer Restraint Stress zu einer Körpergewichtsabnahme bei Wistar Ratten [95]. Auch die Exposition mit einem sozialen Stressor reduzierte das Körpergewicht und veränderte die Körperzusammensetzung in den gestressten Ratten [211]. Auch Tail Pinch verhindert insbesondere die Zunahme von Körperfett, wie wir in Magnetresonanztomographie-Studien darlegten. Auch Mäuse, die in überfüllten Käfigen gehalten werden, sind chronisch gestresst und nehmen selbst bei Fütterung hochkalorischer Nahrung nicht an Gewicht zu [56]. Ein chronisches Stressmodell führt also im Tierversuch nicht zwingend zu der Entwicklung von Adipositas, wie man aus Beobachtungen beim Menschen schließen könnte. Im Gegensatz dazu zeigt die CRF-ÜE-Maus als chronisches Stressmodell mit konstanter Erhöhung von Kortikosteron (entspricht Kortisol beim Menschen) eine stammbetonte Adipositas. Bei einer chronischen Erhöhung von CRF bei Mäusen entwickelt sich nicht nur ein Morbus Cushing sondern auch eine Hirnatrophie, insbesondere im Hippocampus, Cingulum, Amygdala, PVN, sensorischen Motorkortex und Zerebellum [65]. Auch bei Patienten mit Morbus Cushing, posttraumatischer Belastungsreaktion oder Depression konnte eine Verkleinerung des limbischen Systems und des präfrontalen Kortex nachgewiesen werden [28, 29, 148], so dass es möglich erscheint, dass ein erhöhtes Maß an Stress die CRF-Signalkaskade aktiviert, was zu einer Hirnatrophie in ausgewählten stressresponsiven Arealen führt und die Patienten anfälliger für die Entwicklung von posttraumatischen Belastungsstörungen oder Depression macht. Ob Reizdarmpatienten eine Atrophie ähnlicher Hirnareale haben, ist noch nicht bekannt. Insgesamt wurde das Reizdarmsyndrom bisher erst nach gründlichem Ausschluss anderer organischer gastrointestinaler Erkrankungen und mithilfe der Rom-Kriterien diagnostiziert. Aktuell sind international die Rom-III-Kriterien gültig [51]. Hiernach liegt ein Reizdarmsyndrom vor, wenn während der letzten drei Monate wiederholte gastrointestinale Beschwerden jeglicher Art an mindestens drei Tagen pro Monat vorlagen und dazu mindestens zwei der folgenden Kriterien zusätzlich vorhanden

waren: Besserung der Beschwerden nach der Defäkation und Beginn der Beschwerden mit einer Änderung der Stuhlfrequenz oder –konsistenz. Die deutsche S3-Leitlinie zum Reizdarmsyndrom weicht jedoch dahingehend von der internationalen Klassifikation ab, dass ein RDS mit Stuhlunregelmäßigkeiten einhergehen kann, jedoch nicht muss, die Symptome von Arzt und Patient auf den Gastrointestinaltrakt bezogen werden, die Lebensqualität der Patienten deutlich eingeschränkt ist und bei der Frau eine gynäkologische Untersuchung sowie generell der Ausschluss organischer Erkrankungen vor Diagnosestellung gefordert wird [98]. Es gibt jedoch eindeutige experimentelle Hinweise darauf, dass das RDS keine reine Ausschlussdiagnose mehr darstellt. Auf mikroskopischer Ebene zeigt sich, dass RDS-Patienten eine geringgradige intestinale Entzündungsreaktion aufweisen [127]. In der Kolonmukosa ist eine vermehrte Expression der Toll-like-Rezeptoren-2 und -4 nachweisbar [20]. Die proinflammatorischen Zytokine Interleukin-8 und Interleukin-1 $\beta$  waren erhöht [39, 223], während die antiinflammatorischen Zytokine Interleukin-10 und Tumorgrowth-Faktor- $\beta$  in Kolon- und Rektumbiopsien von Reizdarmpatienten erniedrigt waren [39, 119]. Im Plasma konnten bisher keine konsistenten Zytokinveränderungen gemessen werden. Ob CRF in Biopsien oder im Plasma von RDS-Patienten verändert ist, wurde noch nicht ausreichend erforscht, auch die Speichelkortisolspiegel, welche mit dem Blutkortisol korrelieren und einen guten, non-invasiv zu ermittelnden Indikator der Aktivierung der HPA-Achse darstellen [88, 209], wurden bei Reizdarmpatienten noch nicht gemessen. Es gibt jedoch bereits Hinweise, dass die CRF und Kortisolplasmaspiegel bei Patienten mit Depression erhöht sind [32]. Insofern wäre eine Messung von CRF im Blut, Speichel, Immunzellen und Kolonbiopsien bei RDS-Patienten unter basalen und Stressbedingungen interessant und würde Aufschluss über die Involvierung des CRF-CRF-Rezeptorsystems geben und somit zum Verständnis dieser Erkrankung beitragen. Hierfür haben wir mit unseren Experimenten im Tiermodell eine wichtige Vorarbeit geleistet.

Auch auf genetischer Ebene gibt es Hinweise auf Veränderungen bei RDS-Patienten. So zeigte sich eine Mutation der Serotoninrezeptor-3-Untereinheit bei Patienten mit Diarrhöprädominantem Reizdarmsyndrom [83]. Wie aus den oben genannten Studien hervorgeht, ist die Datenlage inkonsistent. Dies resultiert aus verschiedenen Gründen: Die Fallzahlen sind zu klein, und die Biopsien wurden aus verschiedenen gastrointestinalen Arealen gewonnen. Auch dürften die mRNA- und

Proteindegradation sowie die oftmals suboptimalen Blut- und Gewebeverarbeitungs- bzw. unterschiedlichen Messmethoden eine Rolle spielen. Um die bisher untersuchten Ergebnisse zu validieren, wäre eine länderübergreifende wissenschaftliche Initiative mit zentraler Biobank und Vereinheitlichung der experimentellen Protokolle und Auswertungen hilfreich.

Der Großteil der RDS-Patienten weist eine viszerale Hypersensitivität auf, die sich mit manometrischen Methoden messen lässt [6, 116]. Dies ist bisher das einzige Merkmal, welches auch in der Klinik zur Diagnosestellung des RDS herangezogen werden könnte. Auf experimenteller Ebene zeigten funktionelle MRT-Studien, dass RDS-Patienten eine veränderte Aktivität im präfrontalen Kortex und limbischen System aufweisen [2] sowie männliche RDS-Patienten in diesen Hirnregionen stärker auf Stimuli reagierten als weibliche [96]. Wurde bei RDS-Patienten experimentell Angst und depressives Verhalten ausgelöst, modulierte dies die zerebelläre Aktivität [161]. Es gibt also bereits einige Hinweise darauf, dass Hirnregionen, welche bei einem chronischen Stress-Tiermodell atrophiert sind, bei Reizdarmpatienten ein verändertes Aktivitätsmuster nach unangenehmer, stressauslösender Stimulation aufweisen. Diese Ergebnisse belegen eindrucksvoll, dass Tiermodelle, die akuten und chronischen Stress simulieren, bei der Erforschung humaner Erkrankungen von Nutzen sein können.



#### **4. ZUSAMMENFASSUNG**

Das CRF-CRF-Rezeptorsystem steht im Mittelpunkt der stressvermittelten gastrointestinalen Funktionen. Der Einfluss von Stress oder die exogene Zuführung von CRF können über eine Aktivierung des enterischen Nervensystems und von Mastzellen typische Symptome des Diarrhöprädominanten Reizdarmsyndroms herbeiführen, bestehend aus einer beschleunigten Kolontransitzeit mit Diarrhö, erhöhter intestinaler Permeabilität und viszeraler Hypersensitivität. Die Stresseffekte auf den Dickdarm sind CRF<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt, während der obere Verdauungstrakt durch den CRF<sub>2</sub>-Rezeptor kontrolliert wird. Die Grundlagen von Krankheiten und insbesondere diese Erkenntnisse konnten mithilfe tierexperimenteller Stressmodelle verstanden werden. Insbesondere bei der Erforschung des Reizdarmsyndroms, einer Erkrankung, bei welcher die Pathophysiologie unzureichend geklärt und nur eine symptomatische Behandlung möglich ist, spielen psychologische Stressparadigmen eine Rolle, jedoch lösen auch viszerale Stressoren Veränderungen an der Darmschleimhaut und in Versuchstieren aus, wie sie typisch für Reizdarmpatienten sind. Das Verständnis der Pathomechanismen des Reizdarmsyndroms ist Grundvoraussetzung für die Entwicklung neuer Therapiestrategien.

## 5. REFERENZLISTE

- [1] Aird F, Clevenger CV, Prystowsky MB, Redei E. Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7104-8.
- [2] Aizawa E, Sato Y, Kochiyama T, Saito N, Izumiyama M, Morishita J, et al. Altered cognitive function of prefrontal cortex during error feedback in patients with irritable bowel syndrome, based on fMRI and dynamic causal modeling. *Gastroenterology*. 2012;143:1188-98.
- [3] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-80.
- [4] Alexander SL, Irvine CH, Ellis MJ, Donald RA. The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. *Endocrinology*. 1991;128:65-72.
- [5] Amer A, Breu J, McDermott J, Wurtman RJ, Maher TJ. 5-Hydroxy-L-tryptophan suppresses food intake in food-deprived and stressed rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;77:137-43.
- [6] Andresen V. Visceral sensitivity testing. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2009;23:313-24.
- [7] Antelman SM, Szechtman H. Tail pinch induces eating in sated rats which appears to depend on nigrostriatal dopamine. *Science*. 1975;189:731-3.
- [8] Antelman SM, Szechtman H, Chin P, Fisher AE. Tail pinch-induced eating, gnawing and licking behavior in rats: dependence on the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*. 1975;99:319-37.
- [9] Arnold FJ, De Lucas Bueno M, Shiers H, Hancock DC, Evan GI, Herbert J. Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience*. 1992;51:377-90.
- [10] Bachtell RK, Tsivkovskaia NO, Ryabinin AE. Alcohol-induced c-Fos expression in the Edinger-Westphal nucleus: pharmacological and signal transduction mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;302:516-24.
- [11] Baigent SM, Lowry PJ. mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol*. 2000;25:43-52.
- [12] Baker C, Richards LJ, Dayan CM, Jessop DS. Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin. *J Neuroendocrinol*. 2003;15:1070-4.
- [13] Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci*. 2002;22:193-9.
- [14] Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:525-57.
- [15] Barquist E, Bonaz B, Martinez V, Rivier J, Zinner MJ, Taché Y. Neuronal pathways involved in abdominal surgery-induced gastric ileus in rats. *Am J Physiol*. 1996;270:R888-94.
- [16] Basa NR, Wang L, Arteaga JR, Heber D, Livingston EH, Taché Y. Bacterial lipopolysaccharide shifts fasted plasma ghrelin to postprandial levels in rats. *Neurosci Lett*. 2003;343:25-8.

- [17] Beaumont W. Experiments and Observations on the Gastric Juice and the Physiology of Digestion. South Bridge: Maclachlan & Stewart; 1838.
- [18] Behan DP, De Souza EB, Lowry PJ, Potter E, Sawchenko P, Vale WW. Corticotropin releasing factor (CRF) binding protein: a novel regulator of CRF and related peptides. *Front Neuroendocrinol.* 1995;16:362-82.
- [19] Beishuizen A, Thijs LG. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J Endotoxin Res.* 2003;9:3-24.
- [20] Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaele N, Antonietti M, Lecleire S, Zalar A, et al. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One.* 2012;7:e42777.
- [21] Bittencourt JC, Sawchenko PE. Do centrally administered neuropeptides access cognate receptors?: an analysis in the central corticotropin-releasing factor system. *J Neurosci.* 2000;20:1142-56.
- [22] Bittencourt JC, Vaughan J, Arias C, Rissman RA, Vale WW, Sawchenko PE. Urocortin expression in rat brain: evidence against a pervasive relationship of urocortin-containing projections with targets bearing type 2 CRF receptors. *J Comp Neurol.* 1999;415:285-312.
- [23] Bloom FE, Battenberg EL, Rivier J, Vale W. Corticotropin releasing factor (CRF): immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. *Regul Pept.* 1982;4:43-8.
- [24] Bonaz B, Plourde V, Taché Y. Abdominal surgery induces Fos immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol.* 1994;349:212-22.
- [25] Bonaz B, Taché Y. Induction of Fos immunoreactivity in the rat brain after cold-restraint induced gastric lesions and fecal excretion. *Brain Res.* 1994;652:56-64.
- [26] Bonaz B, Taché Y. Water-avoidance stress-induced c-fos expression in the rat brain and stimulation of fecal output: role of corticotropin-releasing factor. *Brain Res.* 1994;641:21-8.
- [27] Bonnet MS, Pecchi E, Trouslard J, Jean A, Dallaporta M, Troadec JD. Central nesfatin-1 expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J Neuroinflammation.* 2009;6:27.
- [28] Bremner JD. Stress and brain atrophy. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2006;5:503-12.
- [29] Brown ES, Varghese FP, McEwen BS. Association of depression with medical illness: does cortisol play a role? *Biol Psychiatry.* 2004;55:1-9.
- [30] Bueno L, Fioramonti J. Effects of corticotropin-releasing factor, corticotropin and cortisol on gastrointestinal motility in dogs. *Peptides.* 1986;7:73-7.
- [31] Calogero AE, Norton JA, Sheppard BC, Listwak SJ, Cromack DT, Wall R, et al. Pulsatile activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during major surgery. *Metabolism.* 1992;41:839-45.
- [32] Catalan R, Gallart JM, Castellanos JM, Galard R. Plasma corticotropin-releasing factor in depressive disorders. *Biol Psychiatry.* 1998;44:15-20.
- [33] Chen AM, Perrin MH, Digruccio MR, Vaughan JM, Brar BK, Arias CM, et al. A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:2620-5.
- [34] Chen C. Recent advances in small molecule antagonists of the corticotropin-releasing factor type-1 receptor-focus on pharmacology and pharmacokinetics. *Curr Med Chem.* 2006;13:1261-82.

- [35] Chotiawat C, Harris RB. Antagonism of specific corticotropin-releasing factor receptor subtypes selectively modifies weight loss in restrained rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1762-73.
- [36] Chowdhury GM, Fujioka T, Nakamura S. Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Res Bull*. 2000;52:171-82.
- [37] Chowdrey HS, Lightman SL, Harbuz MS, Larsen PJ, Jessop DS. Contents of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin immunoreactivity in the spleen and thymus during a chronic inflammatory stress. *J Neuroimmunol*. 1994;53:17-21.
- [38] Chung RY, Mason P, Strassman A, Maciewicz R. Edinger-Westphal nucleus: cells that project to spinal cord contain corticotropin-releasing factor. *Neurosci Lett*. 1987;83:13-9.
- [39] Coeffier M, Gloro R, Boukhettala N, Aziz M, Lecleire S, Vandaele N, et al. Increased proteasome-mediated degradation of occludin in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2010;105:1181-8.
- [40] Coskun T, Bozkurt A, Alican I, Ozkutlu U, Kurtel H, Yegen BC. Pathways mediating CRF-induced inhibition of gastric emptying in rats. *Regul Pept*. 1997;69:113-20.
- [41] Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP. Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides*. 2001;22:733-41.
- [42] Cummings S, Elde R, Ells J, Lindall A. Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study. *J Neurosci*. 1983;3:1355-68.
- [43] Czimmer J, Million M, Taché Y. Urocortin 2 acts centrally to delay gastric emptying through sympathetic pathways while CRF and urocortin 1 inhibitory actions are vagal dependent in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G511-8.
- [44] Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21:159-65.
- [45] Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*. 2001;14:1143-52.
- [46] Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci*. 1999;11:2312-22.
- [47] Dayas CV, Buller KM, Day TA. Medullary neurones regulate hypothalamic corticotropin-releasing factor cell responses to an emotional stressor. *Neuroscience*. 2001;105:707-19.
- [48] Dijkstra I, Tilders FJ, Aguilera G, Kiss A, Rabadan-Diehl C, Barden N, et al. Reduced activity of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice with impaired glucocorticoid receptor function. *J Neurosci*. 1998;18:3909-18.
- [49] Dirks A, Groenink L, Bouwknecht JA, Hijzen TH, Van Der Gugten J, Ronken E, et al. Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations. *Eur J Neurosci*. 2002;16:1751-60.
- [50] Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods*. 1989;29:261-5.

- [51] Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*. 2006;130:1377-90.
- [52] Ellis MJ, Livesey JH, Donald RA. Circulating plasma corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity. *J Endocrinol*. 1988;117:299-307.
- [53] Farrokhi CB, Tovote P, Blanchard RJ, Blanchard DC, Litvin Y, Spiess J. Cortagine: behavioral and autonomic function of the selective CRF receptor subtype 1 agonist. *CNS Drug Rev*. 2007;13:423-43.
- [54] Fekete EM, Zorrilla EP. Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol*. 2007;28:1-27.
- [55] Felgner PL, Wilson JE. Hexokinase binding to polypropylene test tubes. Artifactual activity losses from protein binding to disposable plastics. *Anal Biochem*. 1976;74:631-5.
- [56] Finger BC, Dinan TG, Cryan JF. The temporal impact of chronic intermittent psychosocial stress on high-fat diet-induced alterations in body weight. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:729-41.
- [57] Fukudo S. Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J Gastroenterol*. 2007;42 Suppl 17:48-51.
- [58] Fukudo S, Nomura T, Hongo M. Impact of corticotropin-releasing hormone on gastrointestinal motility and adrenocorticotrophic hormone in normal controls and patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 1998;42:845-9.
- [59] Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. *Neuroscience*. 1997;81:689-97.
- [60] Givalois L, Dornand J, Mekaouche M, Solier MD, Bristow AF, Ixart G, et al. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol*. 1994;267:R164-70.
- [61] Goebel-Stengel M, Stengel A, Taché Y, Reeve JR, Jr. The importance of using the optimal plasticware and glassware in studies involving peptides. *Anal Biochem*. 2011;414:38-46.
- [62] Goebel-Stengel M, Stengel A, Wang L, Ohning G, Taché Y, Reeve JR, Jr. CCK-8 and CCK-58 differ in their effects on nocturnal solid meal pattern in undisturbed rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;303:R850-60.
- [63] Goebel-Stengel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Orexigenic response to tail pinch: role of brain NPY(1) and corticotropin releasing factor receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014;306:R164-74.
- [64] Goebel-Stengel M, Wang L. Central and peripheral expression and distribution of NUCB2/nesfatin-1. *Curr Pharm Des*. 2013;19:6935-40.
- [65] Goebel M, Fleming SM, Million M, Stengel A, Taché Y, Wang L. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neurosci Lett*. 2010;473:11-5.
- [66] Goebel M, Stengel A, Wang L, Lambrecht NW, Taché Y. Nesfatin-1 immunoreactivity in rat brain and spinal cord autonomic nuclei. *Neurosci Lett*. 2009;452:241-6.
- [67] Goebel M, Stengel A, Wang L, Reeve J, Jr., Taché Y. Lipopolysaccharide increases plasma levels of corticotropin-releasing hormone in rats. *Neuroendocrinology*. 2011;93:165-73.
- [68] Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res*. 2009;1300:114-24.

- [69] Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Central nesfatin-1 reduces the nocturnal food intake in mice by reducing meal size and increasing inter-meal intervals. *Peptides*. 2011;32:36-43.
- [70] Grace CR, Perrin MH, Cantle JP, Vale WW, Rivier JE, Riek R. Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. *J Am Chem Soc*. 2007;129:16102-14.
- [71] Gue M, Fioramonti J, Frexinos J, Alvinerie M, Bueno L. Influence of acoustic stress by noise on gastrointestinal motility in dogs. *Dig Dis Sci*. 1987;32:1411-7.
- [72] Gue M, Junien JL, Bueno L. Conditioned emotional response in rats enhances colonic motility through the central release of corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology*. 1991;100:964-70.
- [73] Hauger RL, Grigoriadis DE, Dallman MF, Plotsky PM, Vale WW, Dautzenberg FM. International Union of Pharmacology. XXXVI. Current status of the nomenclature for receptors for corticotropin-releasing factor and their ligands. *Pharmacol Rev*. 2003;55:21-6.
- [74] Heinrichs SC, Cole BJ, Pich EM, Menzaghi F, Koob GF, Hauger RL. Endogenous corticotropin-releasing factor modulates feeding induced by neuropeptide Y or a tail-pinch stressor. *Peptides*. 1992;13:879-84.
- [75] Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res*. 1993;611:18-24.
- [76] Heinrichs SC, Stenzel-Poore MP, Gold LH, Battenberg E, Bloom FE, Koob GF, et al. Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience*. 1996;74:303-11.
- [77] Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 1997;20:78-84.
- [78] Heymann-Mönnikes I, Taché Y, Trauner M, Weiner H, Garrick T. CRF microinjected into the dorsal vagal complex inhibits TRH analog- and kainic acid-stimulated gastric contractility in rats. *Brain Res*. 1991;554:139-44.
- [79] Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006;27:260-86.
- [80] Imbe H, Murakami S, Okamoto K, Iwai-Liao Y, Senba E. The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain*. 2004;112:361-71.
- [81] Ising M, Zimmermann US, Kunzel HE, Uhr M, Foster AC, Learned-Coughlin SM, et al. High-affinity CRF1 receptor antagonist NBI-34041: preclinical and clinical data suggest safety and efficacy in attenuating elevated stress response. *Neuropsychopharmacology*. 2007;32:1941-9.
- [82] Jimenez M, Bueno L. Inhibitory effects of neuropeptide Y (NPY) on CRF and stress-induced cecal motor response in rats. *Life Sci*. 1990;47:205-11.
- [83] Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Moller D, Bonisch H, et al. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *Hum Mol Genet*. 2008;17:2967-77.
- [84] Kappeler L, Zizzari P, Grouselle D, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Plasma and hypothalamic peptide-hormone levels regulating somatotroph function and energy balance in fed and fasted states: a comparative study in four strains of rats. *J Neuroendocrinol*. 2004;16:980-8.

- [85] Kawahito Y, Sano H, Kawata M, Yuri K, Mukai S, Yamamura Y, et al. Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon. *Gastroenterology*. 1994;106:859-65.
- [86] Kellow JE, Langeluddecke PM, Eckersley GM, Jones MP, Tennant CC. Effects of acute psychologic stress on small-intestinal motility in health and the irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol*. 1992;27:53-8.
- [87] Kihara N, Fujimura M, Yamamoto I, Itoh E, Inui A, Fujimiya M. Effects of central and peripheral urocortin on fed and fasted gastroduodenal motor activity in conscious rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001;280:G406-19.
- [88] Kirschbaum C, Hellhammer DH. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*. 1994;19:313-33.
- [89] Kobelt P, Goebel M, Stengel A, Schmidtman M, van der Voort IR, Tebbe JJ, et al. Bombesin, but not amylin, blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291:R903-13.
- [90] Konczol K, Bodnar I, Zelena D, Pinter O, Papp RS, Palkovits M, et al. Nesfatin-1/NUCB2 may participate in the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Neurochem Int*. 2010;57:189-97.
- [91] Kozicz T, Yanaihara H, Arimura A. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1998;391:1-10.
- [92] Krahn DD, Gosnell BA, Grace M, Levine AS. CRF antagonist partially reverses CRF- and stress-induced effects on feeding. *Brain Res Bull*. 1986;17:285-9.
- [93] Kramer KJ, Dunn PE, Peterson RC, Seballos HL, Sanburg LL, Law JH. Purification and characterization of the carrier protein for juvenile hormone from the hemolymph of the tobacco hornworm *Manduca sexta* Johannson (Lepidoptera: Sphingidae). *J Biol Chem*. 1976;251:4979-85.
- [94] Kravchenko IV, Furalev VA. Secretion of immunoreactive corticotropin releasing factor and adrenocorticotrophic hormone by T- and B-lymphocytes in response to cellular stress factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;204:828-34.
- [95] Krügel U, Fischer J, Radicke S, Sack U, Himmerich H. Antidepressant effect of TNF- $\alpha$  blockade in an animal model of depression. *J Psychiatr Res*. 2013;47:611-6.
- [96] Labus JS, Gupta A, Coveleskie K, Tillisch K, Kilpatrick L, Jarcho J, et al. Sex differences in emotion-related cognitive processes in irritable bowel syndrome and healthy control subjects. *Pain*. 2013;154:2088-99.
- [97] Larauche MH, Gourcerol G, Wang L, Pambukchian K, Brunnhuber S, Adelson DW, Rivier JE, Million M, Taché Y. Cortagine: a CRF1 agonist induces stress-like alterations of colonic function and visceral hypersensitivity in rodents primarily through peripheral pathways. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;297:G215-27.
- [98] Layer P, Andresen V, Pehl C, Allescher H, Bischoff SC, Classen M, et al. [Irritable bowel syndrome: German consensus guidelines on definition, pathophysiology and management]. *Z Gastroenterol*. 2011;49:237-93.
- [99] Lembo T, Plourde V, Shui Z, Fullerton S, Mertz H, Taché Y, et al. Effects of the corticotropin-releasing factor (CRF) on rectal afferent nerves in humans. *Neurogastroenterol Motil*. 1996;8:9-18.

- [100] Lenczowski MJ, Van Dam AM, Poole S, Larrick JW, Tilders FJ. Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the ACTH and corticosterone response to intraperitoneal LPS. *Am J Physiol.* 1997;273:R1870-7.
- [101] Lenz HJ, Burlage M, Raedler A, Greten H. Central nervous system effects of corticotropin-releasing factor on gastrointestinal transit in the rat. *Gastroenterology.* 1988;94:598-602.
- [102] Lenz HJ, Raedler A, Greten H, Vale WW, Rivier JE. Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology.* 1988;95:1510-7.
- [103] Levine AS, Morley JE. Stress-induced eating in rats. *Am J Physiol.* 1981;241:R72-6.
- [104] Levine AS, Morley JE. Tail pinch-induced eating: is it the tail or the pinch? *Physiol Behav.* 1982;28:565-7.
- [105] Levine AS, Morley JE, Wilcox G, Brown DM, Handwerker BS. Tail pinch behavior and analgesia in diabetic mice. *Physiol Behav.* 1982;28:39-43.
- [106] Lewis MW, Hermann GE, Rogers RC, Travagli RA. In vitro and in vivo analysis of the effects of corticotropin releasing factor on rat dorsal vagal complex. *J Physiol.* 2002;543:135-46.
- [107] Linton EA, McLean C, Nieuwenhuyzen Kruseman AC, Tilders FJ, Van der Veen EA, Lowry PJ. Direct measurement of human plasma corticotropin-releasing hormone by "two-site" immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:1047-53.
- [108] Linton EA, Perkins AV, Hagan P, Poole S, Bristow AF, Tilders F, et al. Corticotrophin-releasing hormone (CRH)-binding protein interference with CRH antibody binding: implications for direct CRH immunoassay. *J Endocrinol.* 1995;146:45-53.
- [109] Linton EA, Wolfe CD, Behan DP, Lowry PJ. A specific carrier substance for human corticotrophin releasing factor in late gestational maternal plasma which could mask the ACTH-releasing activity. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1988;28:315-24.
- [110] Liu S, Gao N, Hu HZ, Wang X, Wang GD, Fang X, et al. Distribution and chemical coding of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the guinea pig enteric nervous system. *J Comp Neurol.* 2006;494:63-74.
- [111] Lloyd T, Walega MA. Purification of tyrosine hydroxylase by high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem.* 1981;116:559-63.
- [112] Lodge NJ, Li YW, Chin FT, Dischino DD, Zoghbi SS, Deskus JA, et al. Synthesis and evaluation of candidate PET radioligands for corticotropin-releasing factor type-1 receptors. *Nucl Med Biol.* 2014;41:524-35.
- [113] Lovejoy DA, Balment RJ. Evolution and physiology of the corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 1999;115:1-22.
- [114] Lovejoy DA, Rotzinger S, Barsyte-Lovejoy D. Evolution of complementary peptide systems: teneurin C-terminal-associated peptides and corticotropin-releasing factor superfamilies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1163:215-20.
- [115] Luckey A, Wang L, Jamieson PM, Basa NR, Million M, Czimmer J, et al. Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice do not develop postoperative gastric ileus. *Gastroenterology.* 2003;125:654-9.
- [116] Ludidi S, Mujagic Z, Jonkers D, Keszthelyi D, Hesselink M, Kruimel J, et al. Markers for visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2014.



- [117] Lutter M, Sakata I, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Anderson JG, Jung S, et al. The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat Neurosci.* 2008;11:752-3.
- [118] Macritchie F. Proteins at interfaces. *Adv Protein Chem.* 1978;32:283-326.
- [119] Macsharry J, O'Mahony L, Fanning A, Bairead E, Sherlock G, Tiesman J, et al. Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol.* 2008;43:1467-76.
- [120] Maillot C, Million M, Wei JY, Gauthier A, Taché Y. Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology.* 2000;119:1569-79.
- [121] Martinez V, Barquist E, Rivier J, Taché Y. Central CRF inhibits gastric emptying of a nutrient solid meal in rats: the role of CRF2 receptors. *Am J Physiol.* 1998;274:G965-70.
- [122] Martinez V, Rivier J, Wang L, Taché Y. Central injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks CRF- and stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997;280:754-60.
- [123] Martinez V, Taché Y. Role of CRF receptor 1 in central CRF-induced stimulation of colonic propulsion in rats. *Brain Res.* 2001;893:29-35.
- [124] Martinez V, Taché Y. CRF1 receptors as a therapeutic target for irritable bowel syndrome. *Curr Pharm Des.* 2006;12:4071-88.
- [125] Martinez V, Wang L, Rivier J, Grigoriadis D, Taché Y. Central CRF, urocortins and stress increase colonic transit via CRF1 receptors while activation of CRF2 receptors delays gastric transit in mice. *J Physiol.* 2004;556:221-34.
- [126] Martinez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Taché Y. Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301:611-7.
- [127] Matricon J, Meleine M, Gelot A, Piche T, Dapoigny M, Muller E, et al. Review article: Associations between immune activation, intestinal permeability and the irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012;36:1009-31.
- [128] Mayer EA, Sytnik B, Reddy NS, Van Deventer G, Taché Y. Corticotropin releasing factor (CRF) increases post-prandial duodenal motor activity in humans. *J Gastrointest Motil.* 1992;4:53-60.
- [129] McEwen BS. Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus. *Mol Psychiatry.* 1997;2:255-62.
- [130] Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat.* 1982;165:385-96.
- [131] Million M, Wang L, Martinez V, Taché Y. Differential Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, sacral parasympathetic nucleus and colonic motor response to water avoidance stress in Fischer and Lewis rats. *Brain Res.* 2000;877:345-53.
- [132] Million M, Wang L, Stenzel-Poore MP, Coste SC, Yuan PQ, Lamy C, et al. Enhanced pelvic responses to stressors in female CRF-overexpressing mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292:R1429-38.
- [133] Miyata K, Ito H, Fukudo S. Involvement of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in CRH-induced defecation in rats. *Am J Physiol.* 1998;274:G827-31.
- [134] Miyata S, Itoh T, Lin SH, Ishiyama M, Nakashima T, Kiyohara T. Temporal changes of c-fos expression in oxytocinergic magnocellular neuroendocrine

- cells of the rat hypothalamus with restraint stress. *Brain Res Bull.* 1995;37:391-5.
- [135] Mönnikes H, Schmidt BG, Raybould HE, Taché Y. CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic motor response to restraint stress. *Am J Physiol.* 1992;262:G137-43.
- [136] Mönnikes H, Schmidt BG, Taché Y. Psychological stress-induced accelerated colonic transit in rats involves hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology.* 1993;104:716-23.
- [137] Mönnikes H, Schmidt BG, Tebbe J, Bauer C, Taché Y. Microinfusion of corticotropin releasing factor into the locus coeruleus/subcoeruleus nuclei stimulates colonic motor function in rats. *Brain Res.* 1994;644:101-8.
- [138] Morin SM, Ling N, Liu XJ, Kahl SD, Gehlert DR. Differential distribution of urocortin- and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivities in the rat brain. *Neuroscience.* 1999;92:281-91.
- [139] Morley JE, Levine AS. Stress-induced eating is mediated through endogenous opiates. *Science.* 1980;209:1259-61.
- [140] Morley JE, Levine AS. Thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses stress induced eating. *Life Sci.* 1980;27:269-74.
- [141] Naito Y, Fukata J, Tamai S, Seo N, Nakai Y, Mori K, et al. Biphasic changes in hypothalamo-pituitary-adrenal function during the early recovery period after major abdominal surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:111-7.
- [142] Nemeroff CB, Osbahr AJ, 3rd, Bissette G, Jahnke G, Lipton MA, Prange AJ. Cholecystokinin inhibits tail pinch-induced eating in rats. *Science.* 1978;200:793-4.
- [143] Ochi M, Tominaga K, Tanaka F, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe T, et al. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci.* 2008;82:862-8.
- [144] Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006;443:709-12.
- [145] Olschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. The distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides.* 1982;3:995-1015.
- [146] Orth DN, Mount CD. Specific high-affinity binding protein for human corticotropin-releasing hormone in normal human plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;143:411-7.
- [147] Owens MJ, Nemeroff CB. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev.* 1991;43:425-73.
- [148] Patil CG, Lad SP, Katznelson L, Laws ER, Jr. Brain atrophy and cognitive deficits in Cushing's disease. *Neurosurg Focus.* 2007;23:E11.
- [149] Patterson ZR, Ducharme R, Anisman H, Abizaid A. Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci.* 2010;32:632-9.
- [150] Patterson ZR, Khazall R, Mackay H, Anisman H, Abizaid A. Central ghrelin signaling mediates the metabolic response of C57BL/6 male mice to chronic social defeat stress. *Endocrinology.* 2013;154:1080-91.
- [151] Petrusz P, Merchenthaler I, Maderdrut JL, Heitz PU. Central and peripheral distribution of corticotropin-releasing factor. *Fed Proc.* 1985;44:229-35.
- [152] Porcher C, Peinnequin A, Pellissier S, Meregnani J, Sinniger V, Canini F, et al. Endogenous expression and in vitro study of CRF-related peptides and CRF receptors in the rat gastric antrum. *Peptides.* 2006;27:1464-75.

- [153] Potter E, Behan DP, Linton EA, Lowry PJ, Sawchenko PE, Vale WW. The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:4192-6.
- [154] Reyes BA, Valentino RJ, Xu G, Van Bockstaele EJ. Hypothalamic projections to locus coeruleus neurons in rat brain. *Eur J Neurosci*. 2005;22:93-106.
- [155] Riedl A, Schmidtman M, Stengel A, Goebel M, Wisser AS, Klapp BF, et al. Somatic comorbidities of irritable bowel syndrome: a systematic analysis. *J Psychosom Res*. 2008;64:573-82.
- [156] Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology*. 1982;110:272-8.
- [157] Rivier CL, Plotsky PM. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu Rev Physiol*. 1986;48:475-94.
- [158] Rivier J, Gulyas J, Kirby D, Low W, Perrin MH, Kunitake K, et al. Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists. *J Med Chem*. 2002;45:4737-47.
- [159] Rivier J, Gulyas J, Kunitake K, DiGrucchio M, Cattle JP, Perrin MH, et al. Stressin1-A, a potent corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1)-selective peptide agonist. *J Med Chem*. 2007;50:1668-74.
- [160] Rivier JE, Kirby DA, Lahrichi SL, Corrigan A, Vale WW, Rivier CL. Constrained corticotropin releasing factor antagonists (astressin analogues) with long duration of action in the rat. *J Med Chem*. 1999;42:3175-82.
- [161] Rosenberger C, Thurling M, Forsting M, Elsenbruch S, Timmann D, Gizewski ER. Contributions of the cerebellum to disturbed central processing of visceral stimuli in irritable bowel syndrome. *Cerebellum*. 2013;12:194-8.
- [162] Rowland NE, Antelman SM. Stress-induced hyperphagia and obesity in rats: a possible model for understanding human obesity. *Science*. 1976;191:310-12.
- [163] Ruhmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J. Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:15264-9.
- [164] Rybkin, II, Zhou Y, Volaufova J, Smagin GN, Ryan DH, Harris RB. Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *Am J Physiol*. 1997;273:R1612-22.
- [165] Sagami Y, Shimada Y, Tayama J, Nomura T, Satake M, Endo Y, et al. Effect of a corticotropin releasing hormone receptor antagonist on colonic sensory and motor function in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*. 2004;53:958-64.
- [166] Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988;240:1328-31.
- [167] Samarghandian S, Ohata H, Yamauchi N, Shibasaki T. Corticotropin-releasing factor as well as opioid and dopamine are involved in tail-pinch-induced food intake of rats. *Neuroscience*. 2003;116:519-24.
- [168] Sawchenko PE, Imaki T, Potter E, Kovacs K, Imaki J, Vale W. The functional neuroanatomy of corticotropin-releasing factor. *Ciba Found Symp*. 1993;172:5-21.
- [169] Seasholtz AF, Bourbonais FJ, Harnden CE, Camper SA. Nucleotide sequence and expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Neurosci*. 1991;2:266-73.

- [170] Sekino A, Ohata H, Mano-Otagiri A, Arai K, Shibasaki T. Both corticotropin-releasing factor receptor type 1 and type 2 are involved in stress-induced inhibition of food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;176:30-8.
- [171] Selye H. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*. 1936;138.
- [172] Senba E, Ueyama T. Stress-induced expression of immediate early genes in the brain and peripheral organs of the rat. *Neurosci Res*. 1997;29:183-207.
- [173] Seymour PA, Schmidt AW, Schulz DW. The pharmacology of CP-154,526, a non-peptide antagonist of the CRH1 receptor: a review. *CNS Drug Rev*. 2003;9:57-96.
- [174] Sheldon RJ, Qi JA, Porreca F, Fisher LA. Gastrointestinal motor effects of corticotropin-releasing factor in mice. *Regul Pept*. 1990;28:137-51.
- [175] Shen CP, Tsimberg Y, Salvatore C, Meller E. Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions. *BMC Neurosci*. 2004;5:36.
- [176] Simmons NE, Do HM, Lipper MH, Laws ER, Jr. Cerebral atrophy in Cushing's disease. *Surg Neurol*. 2000;53:72-6.
- [177] Skofitsch G, Jacobowitz DM. Distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in the rat brain by immunohistochemistry and radioimmunoassay: comparison and characterization of ovine and rat/human CRF antisera. *Peptides*. 1985;6:319-36.
- [178] Smagin GN, Howell LA, Redmann S, Jr., Ryan DH, Harris RB. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. *Am J Physiol*. 1999;276:R1461-8.
- [179] Smith EM, Morrill AC, Meyer WJ, 3rd, Blalock JE. Corticotropin releasing factor induction of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature*. 1986;321:881-2.
- [180] Smith JA, Hurrell JG, Leach SJ. Elimination of nonspecific adsorption of serum proteins by Sepharose-bound antigens. *Anal Biochem*. 1978;87:299-305.
- [181] Smith WJ, Stewart J, Pfaus JG. Tail pinch induces fos immunoreactivity within several regions of the male rat brain: effects of age. *Physiol Behav*. 1997;61:717-23.
- [182] Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida OF. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Res Rev*. 2008;57:561-70.
- [183] Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Berent S, Schork MA, Scheingart DE. Decrease in cortisol reverses human hippocampal atrophy following treatment of Cushing's disease. *Biol Psychiatry*. 1999;46:1595-602.
- [184] Stengel A, Goebel-Stengel M, Jawien J, Kobelt P, Taché Y, Lambrecht NW. Lipopolysaccharide increases gastric and circulating NUCB2/nesfatin-1 concentrations in rats. *Peptides*. 2011;32:1942-7.
- [185] Stengel A, Goebel-Stengel M, Wang L, Luckey A, Hu E, Rivier J, et al. Central administration of pan-somatostatin agonist ODT8-SST prevents abdominal surgery-induced inhibition of circulating ghrelin, food intake and gastric emptying in rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23:e294-308.
- [186] Stengel A, Goebel-Stengel M, Wang L, Shaikh A, Lambrecht NW, Rivier JE, et al. Abdominal surgery inhibits circulating acyl ghrelin and ghrelin-O-acyltransferase levels in rats: role of the somatostatin receptor subtype 2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301:G239-48.
- [187] Stengel A, Goebel M, Million M, Stenzel-Poore MP, Kobelt P, Mönnikes H, et al. CRF over-expressing mice exhibit reduced neuronal activation in the

- arcuate nucleus and food intake in response to fasting. *Endocrinology*. 2009;150:153-60.
- [188] Stengel A, Goebel M, Wang L, Reeve JR, Jr., Taché Y, Lambrecht NW. Lipopolysaccharide differentially decreases plasma acyl and desacyl ghrelin levels in rats: Potential role of the circulating ghrelin-acylating enzyme GOAT. *Peptides*. 2010;31:1689-96.
- [189] Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, et al. Central nesfatin-1 reduces dark-phase food intake and gastric emptying in rats: differential role of corticotropin-releasing factor2 receptor. *Endocrinology*. 2009;150:4911-9.
- [190] Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, et al. Activation of brain somatostatin(2) receptors stimulates feeding in mice: Analysis of food intake microstructure. *Physiol Behav*. 2010;101:614-22.
- [191] Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Mönnikes H, et al. Selective central activation of somatostatin2 receptor increases food intake, grooming behavior and rectal temperature in rats. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61:399-407.
- [192] Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y. Abdominal surgery activates nesfatin-1 immunoreactive brain nuclei in rats. *Peptides*. 2010;31:263-70.
- [193] Stengel A, Keire D, Goebel M, Evilevitch L, Wiggins B, Taché Y, et al. The RAPID method for blood processing yields new insight in plasma concentrations and molecular forms of circulating gut peptides. *Endocrinology*. 2009;150:5113-8.
- [194] Stengel A, Taché Y. Corticotropin-releasing factor signaling and visceral response to stress. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010;235:1168-78.
- [195] Stengel A, Taché Y. Neuroendocrine Control of the Gut During Stress: Corticotropin-Releasing Factor Signaling Pathways in the Spotlight. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:219-39.
- [196] Stengel A, Wang L, Goebel-Stengel M, Taché Y. Centrally injected kisspeptin reduces food intake by increasing meal intervals in mice. *Neuroreport*. 2011;22:253-7.
- [197] Stenzel-Poore MP, Cameron VA, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale W. Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology*. 1992;130:3378-86.
- [198] Suda T, Iwashita M, Ushiyama T, Tozawa F, Sumitomo T, Nakagami Y, et al. Responses to corticotropin-releasing hormone and its bound and free forms in pregnant and nonpregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989;69:38-42.
- [199] Suda T, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;57:225-6.
- [200] Suelter CH, DeLuca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. *Anal Biochem*. 1983;135:112-9.
- [201] Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology*. 1983;36:165-86.
- [202] Taché Y, Adelson D, Yang H. TRH/TRH-R1 Receptor Signaling in the Brain Medulla as a Pathway of Vagally Mediated Gut Responses During the Cephalic Phase. *Curr Pharm Des*. 2014;20:2725-30.
- [203] Taché Y, Barquist E, Stephens RL, Rivier J. Abdominal surgery- and trephination-induced delay in gastric emptying is prevented by intracisternal injection of CRF antagonist in the rat. *J Gastrointest Motil*. 1991;3:19-25.

- [204] Taché Y, Bonaz B. Corticotropin-releasing factor receptors and stress-related alterations of gut motor function. *J Clin Invest.* 2007;117:33-40.
- [205] Taché Y, Garrick T, Raybould H. Central nervous system action of peptides to influence gastrointestinal motor function. *Gastroenterology.* 1990;98:517-28.
- [206] Taché Y, Martinez V, Million M, Wang L. Stress and the gastrointestinal tract III. Stress-related alterations of gut motor function: role of brain corticotropin-releasing factor receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;280:G173-7.
- [207] Taché Y, Martinez V, Wang L, Million M. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol.* 2004;141:1321-30.
- [208] Taché Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16 Suppl 1:137-42.
- [209] Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y. Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch Oral Biol.* 2004;49:963-8.
- [210] Takemura T, Makino S, Takao T, Asaba K, Suemaru S, Hashimoto K. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses to single vs. repeated endotoxin lipopolysaccharide administration in the rat. *Brain Res.* 1997;767:181-91.
- [211] Tamashiro KL, Nguyen MM, Ostrander MM, Gardner SR, Ma LY, Woods SC, et al. Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293:R1864-74.
- [212] Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, et al. Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol.* 2006;176:1869-77.
- [213] Turnbull AV, Lee S, Rivier C. Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:434-43.
- [214] Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science.* 1981;213:1394-7.
- [215] Valentino RJ, Kosboth M, Colflesh M, Miselis RR. Transneuronal labeling from the rat distal colon: anatomic evidence for regulation of distal colon function by a pontine corticotropin-releasing factor system. *J Comp Neurol.* 2000;417:399-414.
- [216] Valentino RJ, Miselis RR, Pavcovich LA. Pontine regulation of pelvic viscera: pharmacological target for pelvic visceral dysfunctions. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20:253-60.
- [217] van den Wijngaard RM, Stanisor OI, van Diest SA, Welting O, Wouters MM, de Jonge WJ, et al. Peripheral alpha-helical CRF (9-41) does not reverse stress-induced mast cell dependent visceral hypersensitivity in maternally separated rats. *Neurogastroenterol Motil.* 2012;24:274-82, e111.
- [218] van Gaalen MM, Stenzel-Poore MP, Holsboer F, Steckler T. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur J Neurosci.* 2002;15:2007-15.

- [219] van Tol EA, Petrusz P, Lund PK, Yamauchi M, Sartor RB. Local production of corticotropin releasing hormone is increased in experimental intestinal inflammation in rats. *Gut*. 1996;39:385-92.
- [220] Wang L, Goebel-Stengel M, Stengel A, Wu SV, Ohning G, Taché Y. Comparison of CRF-immunoreactive neurons distribution in mouse and rat brains and selective induction of Fos in rat hypothalamic CRF neurons by abdominal surgery. *Brain Res*. 2011;1415:34-46.
- [221] Wang L, Mogami S, Karasawa H, Yamada C, Yakabi S, Yakabi K, et al. Preventive effect of rikkunshito on gastric motor function inhibited by L-dopa in rats. *Peptides*. 2014;55:136-44.
- [222] Wang L, Stengel A, Goebel M, Martinez V, Gourcerol G, Rivier J, et al. Peripheral activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits food intake and alters meal structures in mice. *Peptides*. 2011;32:51-9.
- [223] Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut*. 2004;53:1096-101.
- [224] Westphal NJ, Seasholtz AF. CRH-BP: the regulation and function of a phylogenetically conserved binding protein. *Front Biosci*. 2006;11:1878-91.
- [225] Williams CL, Peterson JM, Villar RG, Burks TF. Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress. *Am J Physiol*. 1987;253:G582-6.
- [226] Williams CL, Villar RG, Peterson JM, Burks TF. Stress-induced changes in intestinal transit in the rat: a model for irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 1988;94:611-21.
- [227] Wittmann T, Crenner F, Angel F, Hanusz L, Ringwald C, Grenier JF. Long-duration stress. Immediate and late effects on small and large bowel motility in rat. *Dig Dis Sci*. 1990;35:495-500.
- [228] Wolfe CD, Patel SP, Linton EA, Campbell EA, Anderson J, Dornhorst A, et al. Plasma corticotrophin-releasing factor (CRF) in abnormal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*. 1988;95:1003-6.
- [229] Wu SV, Yuan PQ, Wang L, Peng YL, Chen CY, Taché Y. Identification and characterization of multiple corticotropin-releasing factor type 2 receptor isoforms in the rat esophagus. *Endocrinology*. 2007;148:1675-87.
- [230] Xu L, Bloem B, Gaszner B, Roubos EW, Kozicz T. Stress-related changes in the activity of cocaine- and amphetamine-regulated transcript and nesfatin neurons in the midbrain non-preganglionic Edinger-Westphal nucleus in the rat. *Neuroscience*. 2010;170:478-88.
- [231] Yokoe T, Audhya T, Brown C, Hutchinson B, Passarelli J, Hollander CS. Corticotropin-releasing factor levels in the peripheral plasma and hypothalamus of the rat vary in parallel with changes in the pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*. 1988;123:1348-54.
- [232] Yoshida N, Maejima Y, Sedbazar U, Ando A, Kurita H, Damdindorj B, et al. Stressor-responsive central nesfatin-1 activates corticotropin-releasing hormone, noradrenaline and serotonin neurons and evokes hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Aging (Albany NY)*. 2010;2:775-84.
- [233] Yuan PQ, Wu SV, Wang L, Taché Y. Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin. *Peptides*. 2010;31:322-31.
- [234] Zeinali F, Stulberg JJ, Delaney CP. Pharmacological management of postoperative ileus. *Can J Surg*. 2009;52:153-7.
- [235] Zheng PY, Feng BS, Oluwole C, Struiksma S, Chen X, Li P, et al. Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine. *Gut*. 2009;58:1473-9.

- [236] Zorrilla EP, Koob GF. The therapeutic potential of CRF1 antagonists for anxiety. *Expert Opin Investig Drugs*. 2004;13:799-828.
- [237] Zorrilla EP, Koob GF. Progress in corticotropin-releasing factor-1 antagonist development. *Drug Discov Today*. 2010;15:371-83.
- [238] Zorrilla EP, Reinhardt LE, Valdez GR, Inoue K, Rivier JE, Vale WW, et al. Human urocortin 2, a corticotropin-releasing factor (CRF)2 agonist, and ovine CRF, a CRF1 agonist, differentially alter feeding and motor activity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310:1027-34.



## 6. DANKSAGUNG

Bei Frau Prof. Dr. Dr. h.c. Yvette Taché, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. George Sachs und Herrn Prof. Dr. Joseph Reeve, Jr. der CURE Laboratories, UCLA, Los Angeles, USA, bedanke ich mich herzlich für die außerordentliche Unterstützung und Förderung während meiner Zeit als Forschungsstipendiatin in Los Angeles.

Für die Funktion als Mentor und Unterstützer meiner wissenschaftlichen Laufbahn möchte ich Herrn Prof. Dr. Burghard F. Klapp, ehemaliger Direktor der Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, herzlich danken.

Bei meinem Doktorvater und langjährigen Mentor Herrn Prof. Dr. Dipl.-Psych. Hubert Mönnikes, Chefarzt der Klinik für Innere Medizin des Martin-Luther-Krankenhauses Berlin möchte ich mich für die mir nunmehr seit vielen Jahren zuteilwerdende Unterstützung und Freundschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Matthias Rose, Direktor der Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik der Charité-Universitätsmedizin Berlin sowie Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Gastroenterologie und Hepatologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin möchte ich für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Karriere danken.

Herrn Prof. Dr. Paul Enck, Forschungsleiter der Klinik für Psychosomatische Medizin & Psychotherapie am Universitätsklinikum Tübingen, danke ich für die Förderung und unkomplizierte Beratung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Kobelt, wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik der Charité-Universitätsmedizin Berlin und mein ehemaliger Laborbetreuer und nun geschätzter Kollege und Freund, möchte ich mich für die Vermittlung von Grundkenntnissen sowie die zahlreichen Kollaborationen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Lixin Wang, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Animal Core von CURE, UCLA, Los Angeles: ohne ihre grenzenlose Geduld wäre mir das Meistern zahlreicher Labormethoden nicht möglich gewesen.

Auch möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Nils Lambrecht, Herrn Dr. David Scott und Frau Prof. Dr. Olga Vagin aus dem Membrane Biology Laboratory, CURE, UCLA, Los Angeles, erwähnen, die mir meine molekularbiologischen Fertigkeiten vermittelt haben.

Ohne meinen Mann, Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Stengel wäre das Projekt Habilitation nicht zustande gekommen. Er motiviert mich, unterstützt mich und entlastet mich geduldig im Alltag, damit ich Zeit für wissenschaftliche Projekte habe.

## 7. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

13.07.2014

.....

Datum

.....

Dr. med. Miriam Stengel