

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur zentralen appetitregulatorischen Wirkung von
Cholecystokinin mit Schwerpunkt auf der Interaktion mit anderen
Neuropeptiden

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Frommelt

aus Wiesbaden

Datum der Promotion: 05. Juni 2016

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	3
1.1	ABSTRACT	3
1.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1.3	EINLEITUNG	7
1.4	ZIELSTELLUNG	10
1.5	METHODIK	11
1.5.1	<i>Genehmigung</i>	11
1.5.2	<i>Publikation 1: Untersuchungen zur Auswirkung einer Antagonisierung des CCK₂-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme von Ratten</i>	11
1.5.3	<i>Publikation 2: Die Auswirkung von peripher injiziertem CCK-8S auf phospho-mTOR-positive Neurone des Hypothalamus</i>	13
1.5.4	<i>Publikation 3: Die Auswirkung von peripherem CCK-8S auf die Serotoninkonzentration von Nervenfasern im Hirnstamm von Ratten</i>	16
1.6	ERGEBNISSE	18
1.6.1	<i>Publikation 1: Untersuchungen zur Auswirkung einer Antagonisierung des CCK₂-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme von Ratten</i>	18
1.6.2	<i>Publikation 2: Die Auswirkung von peripher injiziertem CCK-8S auf phospho-mTOR-positive Neurone des Hypothalamus</i>	19
1.6.3	<i>Publikation 3: Die Auswirkung von peripherem CCK-8S auf die Serotoninkonzentration von Nervenfasern im Hirnstamm von Ratten</i>	20
1.7	DISKUSSION	21
1.8	LITERATURVERZEICHNIS	25
2	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG / ANTEILSERKLÄRUNG	33
3	DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	35
3.1	THE CCKB ANTAGONIST CI988 REDUCES FOOD INTAKE IN FASTED RATS AFTER VIA A DOPAMINE MEDIATED PATHWAY	35
3.2	SULFATED CHOLECYSTOKININ-8 ACTIVATES PHOSPHO-MTOR IMMUNOREACTIVE NEURONS OF THE PARAVENTRICULAR NUCLEUS IN RATS	44
3.3	PERIPHERAL INJECTED CHOLECYSTOKININ-8S MODULATES THE CONCENTRATION OF SEROTONIN IN NERVE FIBERS OF THE RAT BRAINSTEM	51
4	LEBENS LAUF	61
5	VOLLSTÄNDIGE PUBLIKATIONS LISTE	63
6	DANKSAGUNG	64

1 Zusammenfassung

1.1 Abstract

Hintergrund: Cholecystokin (CCK) ist ein im Gastrointestinaltrakt und Gehirn synthetisiertes Peptidhormon mit sättigender Wirkung. Bislang ist unklar, ob das zentrale CCK₂-Rezeptorsystem im Gehirn einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme ausübt.

Es wird eine Beteiligung der Serin/Threonin-Kinase mammilian Target of rapamycin (mTor) an der neuronalen Integration verschiedener Sättigungssignale im Gehirn vermutet. Ein Zusammenspiel von mTor und peripherem CCK scheint möglich.

Serotonin und CCK zeigen einen ähnlichen Effekt auf die Nahrungsaufnahme. In der dritten Studie wird der Frage nach einer möglichen Interaktion von Serotonin und peripherem CCK nachgegangen.

Methodik: Für die erste Studie erhielten männliche Ratten nach einer Fastenperiode eine intrazerebroventrikuläre (izv)-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 in Kombination mit einer izv-Injektion des Corticotropin Releasing Factor ₁ (CRF₁)-Rezeptorantagonisten CP 376395 oder des CRF₂-Rezeptorantagonisten K 41498. Eine weitere Versuchsgruppe erhielt eine izv-Injektion von CI988 in Kombination mit einer intraperitonealen (ip)-Injektion des Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol. Im Anschluss an die Injektionen wurde die Nahrungsaufnahme der Tiere quantitativ bestimmt.

Für die zweite Studie erhielt eine Gruppe *ad libitum* gefütterter männlicher Ratten eine ip-Injektion CCK-8S. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenzhistologie die Anzahl der c-Fos positiven Neuronen im PVN und Nucleus arcuatus (ARC) des Hypothalamus sowie im Nucleus tractus solitarii (NTS) des Hirnstammes bestimmt. Des Weiteren wurde eine Doppelfärbung von c-Fos und phospho-mTor sowie eine Dreifachfärbung zur Darstellung von c-Fos, phospho-mTor und Oxytocin im Bereich des PVN durchgeführt, um eventuelle Kolokalisationen dieser Peptide zeigen zu können.

In der dritten Studie erhielten *ad libitum* gefütterte männliche Ratten eine ip-Injektion von CCK-8S. In der Immunfluoreszenzhistologie wurde die c-Fos-Immunreaktivität und die Intensität der Fluoreszenz von Serotonin in Nervenfasern des PVN, ARC, NTS und Nucleus dorsalis nervi vagi (DMV) bestimmt.

Ergebnisse: Die izv-Injektion von CI988 führte zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme. Diese wurde durch die Kombination mit dem Dopamin-Rezeptorantagonist Flupentixol

aufgehoben. Der CRF₁- und der CRF₂-Rezeptorantagonist zeigten keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme der Tiere.

Eine ip-Injektion von CCK-8S führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der neuronalen Aktivität von phospho-mTor-positiven Neuronen im PVN, die zum Teil mit Oxytocin-Neuronen kolokalisiert waren.

Die ip-Injektion von CCK-8S führte zu einer Steigerung der Aktivität von phospho-mTor-positiven Neuronen des NTS und des PVN, die zum Teil mit Oxytocin kolokalisiert waren.

Nach der ip-Injektion von CCK-8S kam es zu einer Reduktion der Serotonin-Immunreaktivität im NTS und DMV.

Schlussfolgerung: CCK₂ ist nach einer Fastenperiode unter Umständen an der zentralen Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Möglicherweise vermittelt peripheres CCK seine Wirkung im PVN über eine mTor-abhängige Signalkaskade.

Serotonin scheint eine Rolle bei der zentralen Signalvermittlung von peripherem CCK zu spielen.

Background: Cholecystokinin (CCK) is an anorexigenic peptide synthesized in the gastrointestinal tract and brain. It remains to be established whether the central CCK₂-receptorsystem is involved in the regulation of food intake.

It is suggested that the serin/threonin-kinase, mammalian target of rapamycin (mTor) plays a role in the integration of satiety signals in the brain. The aim of the second study was to elucidate, whether mTor plays a role in the mediation of CCK-8S's anorexigenic effects.

Serotonin and CCK have similar effects on food intake. Therefore, we investigated a possible interaction of peripheral CCK and Serotonin in several brain feeding-regulatory nuclei.

Methods: For the first study male Sprague-Dawley rats were fasted for 24 h and received an intracerebroventricular (ICV) injection of the CCK₂ receptor antagonist CI988 alone or followed by a second consecutive ICV injection consisting of a CRF₁ or CRF₂ receptor antagonist. Another group received an IP injection of the dopamine receptor antagonist flupentixol alone or in combination with an ICV injection of CI988. Finally cumulative food intake was quantified.

For the second study *ad libitum* fed rats received an IP injection of CCK-8S at two different doses. Subsequently the number of c-Fos-immunoreactive (IR) neurons, neurons that were positive for c-Fos and phospho-mTor and neurons IR for c-Fos, phospho-mTor and oxytocin were assessed in the PVN, ARC and NTS.

For the third study *ad libitum* fed rats received an IP injection of CCK-8S at two different doses. Neuronal activity and the fluorescence of serotonin in nerve fibers in the PVN, ARC, NTS and dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) were assessed by means of immunohistochemistry.

Results: The CCK₂ receptor antagonist CI988 injected ICV reduced food intake in rodents after a fasting period significantly. The dopamine receptor antagonist flupentixol injected IP abolished this effect. However the CRF₁ and CRF₂ receptor antagonists showed no effect.

Immunohistochemistry showed an increase of activated phospho-mTor neurons in the PVN after an IP injection of CCK-8S, which were partly co-localized with oxytocin.

In the NTS we detected an increase of neuronal activity after IP injection of CCK-8S and a decrease of serotonin-IR in the NTS and DMV.

Conclusion: Our results suggest, that the CCK₂ receptor system is involved in the regulation of food intake in rats. Phospho-mTor seems to be part of the neuronal circuits mediating the effects of peripheral CCK-8S on food intake.

Serotonin might be involved in the mediation of CCK-8S's effects in the brainstem.

1.2 Abkürzungsverzeichnis

ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex
ANOVA	Varianzanalyse
ARC	Nucleus arcuatus
BSA	Bovines Serumalbumin
CCK	Cholecystokinin
CCK-8S	sulfatiertes CCK-8
c-Fos	Transkriptionsfaktor
CRF	Corticotropinreleasinghormon
DABCO	1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Nucleus dorsalis nervi vagi
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IgG	Immunglobulin G
ip	intraperitoneal
izv	intraazerebroventrikulär
mNTS	medialer Nucleus tractus solitarii
mTor	Serin/Threonin-Kinase mammilian Target of rapamycin
n	Anzahl
NAcc	Nucleus accumbens
NTS	Nucleus tractus solitarii
P	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PVN	Nucleus paraventricularis
SEM	standard error of the mean
w/v	Masse pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.3 Einleitung

Die Steuerung der Nahrungsaufnahme unterliegt einem komplexen Zusammenspiel zwischen zahlreichen Neuropeptiden, Hormonen und nutritiven Signalen. Es besteht eine Wechselwirkung zwischen Substanzen aus verschiedenen peripheren Strukturen, wie zum Beispiel dem Gastrointestinaltrakt und dem Fettgewebe und Strukturen des zentralen Nervensystem (ZNS). Man spricht bei dem Zusammenspiel von Gastrointestinaltrakt und ZNS von der *brain-gut-axis* (Hirn-Darm-Achse) (1).

Cholecystokin (CCK) ist ein Peptidhormon mit anorexigener Wirkung (2). Es wird in den I-Zellen des Dünndarms synthetisiert (3). Aus dem Präkursormolekül (präpro-CCK) entstehen nach posttranslationaler Modifikation unterschiedlich lange Fragmente des ursprünglichen Moleküls (4). Biologisch aktive Formen des CCK sind CCK-12, CCK-8 und CCK-4 (4).

CCK vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptorsubtypen, den CCK₁- (CCK_A-) und den CCK₂- (CCK_B-) Rezeptor. Man geht davon aus, dass peripheres CCK über den CCK₁-Rezeptor eine Hemmung der Nahrungsaufnahme bewirkt (5). Bei einem Reiz bindet CCK an CCK₁-Rezeptoren auf vagalen Afferenzen (6, 7). Das Signal erreicht anschließend über Nervenfasern des Nervus vagus den Nucleus tractus solitarii (NTS) im Hirnstamm, wo es zu einer Aktivierung von katecholaminergen A2-Zellen kommt (8). Anschließend projizieren diese Zellen zu verschiedenen hypothalamischen Kerngebieten wie dem Nucleus paraventricularis (PVN) und dem Nucleus supraopticus (8-10). Im Gehirn dominiert der CCK₂-Rezeptor (11). Der CCK₂-Rezeptor ist an der Integration verschiedener kognitiver Leistungen und Emotionen wie Schmerz, Angst, Sexualverhalten, Lernen und Gedächtnis involviert (11). Man geht heute auch von einer Beteiligung an den Regulationskreisläufen zur Steuerung der Nahrungsaufnahme aus. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht geklärt. In einer Studie von Corp et al. kam es nach einer *izv*-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten L365,260 zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme von Ratten (12). In einer Studie an Mäusen mit einem defekten CCK₂-Rezeptor wurde eine signifikante Steigerung der Nahrungsaufnahme (13-15), sowie Zeichen von Adipositas (15) und ein Anstieg des Plasmalevels von Leptin und Insulin beobachtet (13). Kopin et al. kamen dagegen bei Versuchen mit Mäusen mit dem gleichen Defekt zu konträren Ergebnissen. Sie konnten keine Änderung des Fressverhaltens verzeichnen und auch phänotypisch blieben diese Tiere unauffällig (16). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in den der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Studien die Rolle des CCK₂-Rezeptorsystems mit Hilfe des selektiven CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 in Bezug auf die Steuerung der Nahrungsaufnahme genauer untersucht.

Immunhistochemische Studien am ZNS von Ratten zeigen eine Kollokalisierung von CCK mit den Neuropeptiden Corticotropin-releasing-factor (CRF) und Dopamin in Kerngebieten des Hypothalamus (17, 18). Eine Interaktion dieser Neuropeptide mit dem CCK₂-Rezeptorsystem ist denkbar, vor allem vor dem Hintergrund, dass sowohl CRF als auch Dopamin hemmend auf die Nahrungsaufnahme wirken (19, 20).

Die Serin/Threonin-Kinase Mammalian Target of Rapamycin (mTor) ist Teil einer intrazellulären Signalkaskade. In Abhängigkeit vom Energiestatus der Zelle führt die phosphorylierte aktivierte Form (phospho-mTor) zu einer gesteigerten Transkription und Translation von Proteinen (21, 22). Tierexperimentelle Studien zeigten eine Reduktion der Nahrungsaufnahme von Ratten in Folge eines Anstiegs der intrazellulären mTor-Aktivität (23). mTor ist im ZNS weit verbreitet, besonders hoch ist die Konzentration im Nucleus arcuatus (ARC) und PVN des Hypothalamus (23). Bislang ist unklar, inwieweit peripheres sulfatiertes CCK-8 (CCK-8S) und mTor im PVN bei der Sättigungsregulation interagieren.

Die periphere Injektion von CCK-8S führt unter anderem zu einer neuronalen Aktivitätssteigerung im PVN (24), gezeigt als Zunahme der Anzahl c-Fos-positiver Neuronen (25). Ein Großteil der durch CCK-8S aktivierten Neuronen des PVN ist positiv für eine Reihe verschiedener Peptidhormone (CRF, Oxytocin, Nesfatin-1 und Cocain-amphetamine-regulated Transcript) (26-28). Eine besondere Bedeutung spielt der Neurotransmitter Oxytocin, welcher nach einer izv-Injektion zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (29). In einer Studie von Olson et al. konnte der sättigende Effekt einer ip-Injektion von CCK-8S, durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mit einer izv-Injektion eines Oxytocin-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden (30).

Wie oben ausgeführt, führt peripheres CCK-8S im ZNS zu der Aktivierung eines komplexen Systems, in das unter anderem Kerne des Hypothalamus und Hirnstamms und verschiedene Neurotransmitter involviert sind. Das Ergebnis dieser Aktivierung ist eine Hemmung der Nahrungsaufnahme. Auch der Neurotransmitter Serotonin ist möglicherweise ein Teil dieses Systems. In der Literatur finden sich einige Studien, die für ein Zusammenspiel von Serotonin und CCK sprechen (31-35). Serotonin wird in den Raphekernen des Hirnstamms gebildet (36). Bei intraluminaler Anwesenheit von Nahrung kommt es zu einer Sekretion des Neurotransmitters aus enterochromaffinen Zellen des Dün- und Dickdarms (37, 38). Über Rezeptoren an Afferenzen des Nervus vagus in der Mucosa vermittelt Serotonin seine Wirkung auf das ZNS (39). Es resultieren eine verzögerte Magenentleerung und eine Hemmung der

Nahrungsaufnahme (40, 41). Im NTS, der Area postrema und dem Nucleus dorsalis nervi vagi (DMV) ist die Dichte von Serotoninrezeptoren sehr hoch (39).

Serotonin und CCK haben einen sättigenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme (2, 41). Außerdem wirken beide Neuropeptide über Afferenzen des Nervus vagus (6, 40) und beeinflussen teilweise die gleichen Hirnkerne (8, 39). In einer Studie von Hayes et al. zur Interaktion von Serotonin und CCK wurde die von Ratten aufgenommene Menge an Sucroslösung gemessen (34). Versuchstiere, die eine Mikroinjektion des selektiven Serotonin Typ-3 Rezeptorantagonisten Odansetron in den medialen NTS erhalten hatten, nahmen eine gesteigerte Menge der Zuckerlösung zu sich. Eine weitere Versuchsgruppe erhielt eine periphere CCK-Injektion, was in einer reduzierten Aufnahme der Zuckerlösung resultierte. Dieser Effekt konnte durch die Kombination mit einer Odansetron Mikroinjektion abgeschwächt werden (34). Mikroinjiziert man Ratten beide Peptide unilateral in den PVN, kommt es zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme in der frühen Dunkelphase (35). Zusätzlich konnte eine gesteigerte Dopaminfreisetzung aus Neuronen des PVN der behandelten Tiere detektiert werden. Nach alleiniger Injektion von CCK oder Serotonin war die Dopaminfreisetzung in geringerem Maße gesteigert (35). Entsprechend der genannten Ergebnisse ist zu vermuten, dass es bei der Hemmung der Nahrungsaufnahme zu einem Zusammenspiel von CCK und Serotonin kommt. Der NTS des Hirnstamms und der PVN des Hypothalamus scheinen dabei eine Rolle zu spielen.

1.4 Zielstellung

Ziel der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studien war es, die Wirkung und Interaktion des Sättigungshormons Cholecystokinin mit verschiedenen Neuropeptiden zu untersuchen.

In den Studien der ersten Arbeit wurde unter Zuhilfenahme des selektiven CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988, die Rolle des zentralen CCK₂-Rezeptorsystems bei der Regulation der Nahrungsaufnahme untersucht. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, in wie weit Dopamin und CRF in die durch CCK vermittelten Effekt auf die Nahrungsaufnahme involviert sind und diese möglicherweise beeinflussen.

Ziel der zweiten Studie war es zu untersuchen inwiefern mTor und Oxytocin an dem durch peripheres CCK-8S im PVN hervorgerufenen Regelkreis involviert sind.

In den Versuchen der dritten Studie wurde der Frage nachgegangen, inwieweit peripher injiziertes CCK-8S die Konzentration von Serotonin in verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus und des Hirnstamms moduliert.

1.5 Methodik

1.5.1 Genehmigung

Die Tierversuche wurden durch die Tierschutzkommission beim Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierschutznummer G0053/06 und G0127/09, sowie ggf. entsprechende Erweiterungsanträge).

Versuchstiere

Für sämtliche Experimente der Studien wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 170-300 g der Firma Harlan Winkelmann verwendet. Die Ratten wurden in Gruppen von maximal 4 Tieren in Makrolon-Käfigen Typ IV gehalten. Der Licht-Dunkel-Zyklus wurde automatisiert geregelt. Die Lichtphase dauerte von 6.30 Uhr bis 18.30 Uhr. Nach Ankunft der Tiere in der Tierhaltung wurde ihnen sieben Tage für die Eingewöhnung gewährt. Zur Vorbereitung der ip- und izv-Injektionen absolvierten die Ratten anschließend für einen Zeitraum von 14 Tagen ein tägliches Training. Entsprechend der Körperposition für die ip-Injektionen wurden die Tiere in Rücken- und gleichzeitiger Kopftieflage gehalten. Um die izv-Injektion zu simulieren, wurden die Tiere mit beiden Händen für 20 Sekunden umschlossen. Das Training diente der Gewöhnung an die bevorstehenden Injektionen und sollte eine übermäßige Stressinduktion während der Experimente verhindern. Außerdem wurden die Tiere schrittweise an die Haltung in Einzelkäfigen gewöhnt. In der Zeit vor den Experimenten wurden die Tiere unter *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Standard-Rattenfutter (Altromin®) gehalten.

1.5.2 Publikation 1: Untersuchungen zur Auswirkung einer Antagonisierung des CCK₂-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme von Ratten

1.5.2.1 Versuchsaufbau

Für die izv-Injektionen wurde den narkotisierten Tieren eine Führungskanüle (22-Gauge, Plastics One, Roanoke, USA) mit Hilfe eines stereotaktischen Apparates in den rechten lateralen Ventrikel implantiert (Bregma: 0,8 mm posterior, 1,5 mm lateral rechts und 3,5 mm ventral). Für die Platzierung der Kanüle wurden die Daten aus dem Atlas von Paxinos und Watson verwendet (42). Nach der Operation wurden die Tiere für eine Erholungsphase von sieben Tagen in Einzelkäfigen gehalten.

Für die izv-Injektionen wurde eine 28-Gauge-Kanüle über einen Plastikschlauch mit einer 25 µl Hamiltonspritze verbunden und 10 µl der jeweiligen Versuchslösung injiziert.

1.5.2.2 Die Auswirkungen eines CCK₂-, CRF₁-, CRF₂- und Dopamin- Rezeptorantagonisten auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Ratten

Den Versuchstieren wurde bei freiem Zugang zur Trinkmenge für 24 Stunden die Nahrung entzogen. Die izv-Injektionen wurden 30 Minuten vor Beginn der Lichtphase nach dem in Tabelle 1 gezeigten Muster durchgeführt.

Tabelle 1

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

Nach den Injektionen wurden die Tiere in Einzelkäfige gesetzt. Kurz vor Beginn der Lichtphase erhielten die Ratten Zugang zu einer zuvor abgewogenen Menge Futter. Anschließend wurde die Nahrungsaufnahme der Tiere zu den Zeitpunkten ½, 1, 2, 3, 4, 5 und 11 Stunden *post injectionem* bestimmt.

1.5.2.3 Die Auswirkung einer Blockade des CCK₂-Rezeptors auf die Nahrungsaufnahme von *ad libitum* gefütterten Ratten während der Dunkelphase

30 Minuten vor Beginn der Dunkelphase erhielten *ad libitum* gefütterte Ratten (n = 12) eine izv-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 (49 nmol). Nach der Injektion wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Unmittelbar vor Beginn der Dunkelphase wurde den Tieren freier Zugang zum Futter gewährt. Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde anschließend für ein Zeitintervall von 11 Stunden gemessen.

1.5.2.4 Die Auswirkung einer intraperitonealen Injektion von CI988 auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Ratten

Für 24 Stunden gefastete Ratten wurde 30 Minuten vor Beginn der Lichtphase der CCK₂-Rezeptorantagonist CI988 in zwei unterschiedlichen Dosierungen ip injiziert (488 nmol Körpergewicht, n = 6; 1626 nmol/kg Körpergewicht, n = 6). Die Kontrollgruppe erhielt eine ip-Injektion der Vehikellösung (DMSO; n = 6). Nach der Injektion wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Unter freiem Zugang zum Futter wurde die kumulative Nahrungsaufnahme für 11 Stunden gemessen.

1.5.2.5 Statistische Auswertung der Daten

Die kumulative Nahrungsaufnahme der Tiere wurde nach den izv-Injektionen als Futteraufnahme in g/Ratte und nach den ip-Injektionen als g/kg Körpergewicht angegeben. Die Messwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler ($x \pm$ standard error of the mean (SEM)) dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA). Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der Fisher LSD Methode analysiert. Die Evaluation der während der Dunkelphase gemessenen Nahrungsaufnahme der *ad libitum* gefütterten Ratten erfolgte mittels t-Test. Für beide Verfahren wurde eine statistische Signifikanz von $P < 0,05$ definiert.

1.5.3 Publikation 2: Die Auswirkung von peripher injiziertem CCK-8S auf phospho-mTOR-positive Neurone des Hypothalamus

1.5.3.1 Peptide

In den meisten Studien zur Wirkung von CCK auf das Verhalten von Versuchstieren wird sulfatiertes CCK-8 verwendet (43, 44). Auch in den Experimenten der vorliegenden Studien 2 und 3 wurde den Versuchstieren aufgrund der Vergleichbarkeit mit anderen Studien CCK-8S injiziert. CCK-8S wurde in 1 ml *Aqua ad iniectabilia* zusammen mit 1% Ammoniumhydroxid (NH₄OH) gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Versuchsbeginn wurde die finale Konzentration der Peptidlösung von 5,2 nmol/kg und 8,7 nmol/kg Körpergewicht (6 µg/kg und 10 µg/kg) durch weitere Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung als Trägerlösung erreicht. In der Zeit zwischen Verdünnung und Beginn der Injektion wurde die Peptidlösung auf Eis gelagert. Die Dosierungen für CCK-8S wurden wie in früheren Studien beschrieben verwendet (26, 27).

1.5.3.2 Versuchsaufbau

Die *ad libitum* gefütterten Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt ($n = 4$ / Gruppe). Die Versuchsgruppen erhielten entweder 5,2 oder 8,7 nmol/kg Körpergewicht CCK-8S als ip-Injektion. Der Kontrollgruppe wurde 500 μ l isotone Kochsalzlösung als Vehikellösung injiziert. 90 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere durch zwei weitere ip-Injektionen mit Ketamin (100 μ g/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 μ g/kg Körpergewicht) narkotisiert und mit 2500 IU Liquemin® (Hoffmann-La Roche, Grenach-Wheyley, Germany) heparinisiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte die transkardiale Perfusion nach dem von Kobelt et al. 2005 beschriebenen Protokoll (44). Für die Asservation wurden die Gewebeschnitte dehydriert, kryokonserviert und bei -80° C gelagert. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten an 25 μ m dicken Gewebeschnitten. Für die mikroskopische Auswertung wurden alle Gehirnschnitte nach den immunhistochemischen Färbungen auf Objektträger aufgezogen und in 8 μ l der Antifading-Lösung DABCO (100 mg/ml 1,4-Diazabicyclo [2.2.2] octane, Sigma, St.Louis, USA; in 90% v/v Glycerin, 10 % v/v PBS, pH 4) eingebettet.

1.5.3.3 Immunhistochemie

1.5.3.3.1 Immunhistochemische Darstellung von c-Fos im Nucleus arcuatus und Nucleus tractus solitarii

Die Hirnschnitte wurden nach der „free-floating“-Methode in üblicher Vorgehensweise für die immunhistochemischen Färbungen vorbereitet (26, 45). Darauf folgend wurde der Primärantikörper anti-c-Fos (rabbit anti-c-Fos, Oncogene Research Products, Boston, USA), in einer Verdünnung von 1:3000 gelöst in 1 % v/v BSA und 0,3 % v/v Triton X-100, für 24 Stunden bei Raumtemperatur auf die Gewebeschnitte gegeben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Goat Biotin-SP-conjugated anti-Rabbit IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA; 1:1000 in 1 % w/v BSA in PBS). Nach Ablauf der Inkubationszeit von 12 Stunden wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC; 1:1000 in PBS; Vector Laboratories, UK) für sechs Stunden auf die Hirnschnitte gegeben. Als nächster Schritt folgte die Amplifizierung mittels TSA™ Tetramethyl Fluorescein Tyramide 1:150 in Amplifikationspuffer (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA) für 15 Minuten. Um das Kernchromatin der Neuronen darzustellen und so die Orientierung im histologischen Präparat zu erleichtern, erfolgte zuletzt die 15-minütige Gegenfärbung mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI).

1.5.3.3.2 Immunhistochemische Doppelfärbung von c-Fos und phospho-mTor im Nucleus paraventricularis

Die Doppelfärbung zur Darstellung von c-Fos und phospho-mTor im PVN des Hypothalamus erfolgte zunächst nach dem oben beschriebenen Protokoll. An die 15-minütige Inkubation mit TSA™ Tetramethyl Fluorescein Tyramide 1:150 in Amplifikationspuffer schloss sich eine 24-stündige Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper gegen phospho-mTOR (rabbit anti-phospho-mTOR; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA;) 1:100 in PBS mit 1 % w/v BSA verdünnt an. Darauf folgend wurde der Biotin-markierte Sekundärantikörper (Goat Biotin-SP-conjugated anti-Rabbit IgG; 1:1000) für 12 Stunden auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Verstärkung des Fluoreszenzsignals erfolgte durch den ABC-Komplex (1:1000 in PBS) und TSA™ Tetramethyl Rhodamine Tyramide (1:150). Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit DAPI gegengefärbt.

1.5.3.3.3 Immunhistochemische Dreifachfärbung von c-Fos, phospho-mTor und Oxytocin im Nucleus paraventricularis

Für diese Dreifachfärbung wurde das oben beschriebene Protokoll mit leichten Änderungen verwendet. Die Darstellung des c-Fos-Proteins erfolgte hier mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes TSA™ Tetramethyl Rhodamine Tyramide und die Darstellung von phospho-mTor mit TSA™ Tetramethyl Fluorescein Tyramide.

Als dritter Primärantikörper diente ein monoklonaler Antikörper gegen Oxytocin (Mouse anti-oxytocin; Chemicon International, 1:6000 in 1 % w/v BSA und 0,1 % Natriumazid in PBS). Nach einer 24-stündigen Inkubation mit dem dritten Primärantikörper folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper goat anti-mouse IgG Antikörper, Alexa Fluor® 633 (Molecular Probes, Leiden, Niederlande), in einer Konzentration von 1:300 in 1 % w/v BSA. Auch hier schloss sich eine Gegenfärbung mit DAPI.

1.5.3.4 Mikroskopische und statistische Auswertung der Daten

Die mikroskopische Auswertung erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop der Firma Carl Zeiss (cLSM 510 Meta, Carl Zeiss, Germany). Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde die absolute Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen in jedem vierten Gewebeschnitt, jeweils bilateral im Bereich des PVN, ARC und NTS quantitativ bestimmt. Für die anatomische Orientierung an den Gehirnschnitten wurde der Atlas von Paxinos und Watson verwendet (42).

Für die Gewebeschnitte, an denen die Doppelfärbung durchgeführt wurde, wurde die absolute Anzahl von c-Fos-positiven Nervenzellen gezählt sowie die Neuronen bestimmt, die ein doppeltes Signal für c-Fos und phospho-mTor aufwiesen. Aus dem Ergebnis wurde der prozentuale Anteil der Neuronen mit doppeltem Fluoreszenzsignal für c-Fos und phospho-mTor berechnet. Zuletzt wurde der prozentuale Anteil der Neuronen bestimmt, die ein dreifaches Fluoreszenzsignal aufwiesen und somit positiv für c-Fos, phospho-mTor und Oxytocin waren. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM wiedergegeben und mittels ANOVA ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem Student-Newman-Keuls oder dem Fisher LSD Test berechnet, wobei ein $P < 0,05$ als signifikant definiert wurde.

1.5.4 Publikation 3: Die Auswirkung von peripherem CCK-8S auf die Serotoninkonzentration von Nervenfasern im Hirnstamm von Ratten

1.5.4.1 Peptide

CCK-8S wurde in der oben beschriebenen Weise (s. 1.5.3.1) für die Experimente vorbereitet.

1.5.4.2 Versuchsaufbau

Ad libitum gefütterten Ratten wurde eine ip-Injektion mit dem finalen Volumen von 500 μ l und einer Konzentration von CCK-8S von 5,2 nmol/kg bzw. 8,7 nmol/kg (6 μ g/kg bzw. 10 μ g/kg Körpergewicht) (n = 3/Gruppe) verabreicht. 90 Minuten nach der CCK-8S-Injektion wurden die Tiere wie unter 1.5.3.2 beschrieben transkardial perfundiert.

1.5.4.3 Immunhistochemie

1.5.4.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von c-Fos in Neuronen des Nucleus arcuatus, Nucleus paraventricularis, Nucleus tractus solitarii und dem Nucleus dorsalis nervi vagi

Die immunhistochemische Darstellung von c-Fos erfolgte in leicht modifizierter Weise nach dem in 1.5.3.3.1 beschriebenen Protokoll. Anstelle von TSATM Tetramethyl Fluorescein Tyramide wurde das Fluoreszenzsignal für c-Fos hier mit TSATM Tetramethyl Rhodamine Tyramide amplifiziert. Für die Färbung wurden Gewebeschnitte aus Bereichen des ARC, PVN, NTS und DMV verwendet.

1.5.4.3.2 Immunhistochemische Doppelfärbung zur Darstellung von c-Fos und Serotonin in Neuronen des Nucleus arcuatus, Nucleus paraventricularis, Nucleus tractus solitarii und dem Nucleus dorsalis nervi vagi

Zur Darstellung von c-Fos wurde das in 1.5.4.3.1 beschriebene Protokoll verwendet. Nach der Amplifikation des c-Fos-Signals mit TSATM Tetramethyl Rhodamine Tyramide, folgte die 24-stündige Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper gegen Serotonin in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS mit 1 % w/v BSA (rabbit anti-serotonin; Novus Biologicals; Littleton, CO, USA). Anschließend wurde der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG; Sigma Aldrich) in PBS für 12 Stunden auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Darstellung des Zellchromatins erfolgte durch eine Gegenfärbung mit DAPI.

1.5.4.3.3 Dreifachfärbung zur Darstellung von c-Fos, Serotonin und Tyrosinhydroxylase im Nucleus tractus solitarii

Für die Dreifachfärbung von c-Fos, Serotonin und Tyrosinhydroxylase wurde das in 1.5.4.3.2 beschriebene Protokoll verwendet. Ergänzt wurde das Protokoll durch eine Inkubation mit dem dritten Primärantikörper gegen Tyrosinhydroxylase (anti-tyrosine hydroxylase; Sigma-Aldrich; 1:6000 in 1 % w/v BSA und 0,1 % v/v Natriumazid in PBS) für 24 Stunden bei Raumtemperatur. Als sekundärer Antikörper wurde ein Antikörper aus der Ziege in einer Verdünnung von 1:400 in 1 % w/v BSA verwendet (goat anti-mouse IgG; Alexa Fluor® 633; Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Der Sekundärantikörper wurde über Nacht auf den Schnitten belassen. Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung mit DAPI.

1.5.4.4 Mikroskopische und statistische Auswertung der Daten

Neurone, die ein rotes Fluoreszenzsignal zeigten, wurden, entsprechend der immunhistochemischen Färbung von c-Fos mit dem Fluorochrom TSATM Tetramethyl Rhodamine Tyramide, als c-Fos-positiv gewertet. Die c-Fos-Immunreaktivität wurde in jedem dritten Gewebeschnitt jeweils bilateral im Bereich des PVN, ARC, NTS und DMV quantitativ bestimmt. An den übrigen Gewebeschnitten wurden die Doppel- und Dreifachfärbung durchgeführt. Für die semi-quantitative Analyse der Fluoreszenzintensität wurde das Programm ImageJ 1,47v verwendet. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde via Graustufenwert/pro Kernschnitt (px/Kern) gewertet.

Sämtliche Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM wiedergegeben und mittels ANOVA ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem Fisher LSD post hoc Test bestimmt. Ein P von $< 0,05$ wurde als signifikant definiert.

1.6 Ergebnisse

1.6.1 Publikation 1: Untersuchungen zur Auswirkung einer Antagonisierung des CCK₂-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme von Ratten

1.6.1.1 Der Effekt des CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 auf die Nahrungsaufnahme von Ratten

Nach einer Fastenperiode von 24 Stunden führte eine *izv*-Injektion von 49 nmol CI988 zu einer signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Ratten im Vergleich zu den Tieren, die die Vehikellösung erhalten hatten ($4,43 \pm 0,64$ g/Ratte vs. $6,4 \pm 0,61$ g/Ratte, $P < 0,05$). Die Verminderung der Nahrungsaufnahme begann zwei Stunden nach der Injektion und blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 11 Stunden verringert ($14,07 \pm 1,91$ vs. $18,38 \pm 0,99$, $P < 0,05$). Zudem konnte ein dosisabhängiger Effekt von CI988 auf die Reduktion der Nahrungsaufnahme gezeigt werden.

Bei *ad libitum* gefütterten Tieren zeigte eine *izv*-Injektion von 49 nmol CI988 30 Minuten vor Beginn der Dunkelperiode keinen Effekt auf die Menge der konsumierten Nahrung. Auch eine *ip*-Injektion von CI988 in einer Dosierung von 488 nmol/kg blieb ohne Effekt auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Versuchstieren. Nach einer Dosissteigerung auf 1626 nmol/kg CI988 konnte zu den Zeitpunkten 2, 4 und 5 Stunden *post injectionem* dagegen ein anorexigener Effekt im Vergleich zu den Vehikeltieren beobachtet werden.

1.6.1.2 Die Effekte einer Blockade des zentralen CRF₁- und CRF₂-Rezeptorsystems auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Ratten

Die *izv*-Injektion des CRF₁-Rezeptorantagonisten CP376395 und des CRF₂-Rezeptorantagonisten K41498 zeigten keinen Effekt auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Ratten. Die durch CI988 hervorgerufene Reduktion der Nahrungsaufnahme blieb durch die Kombination mit einer *ivz*-Injektion einer der beiden CRF-Rezeptorantagonisten unbeeinflusst.

1.6.1.3 Der durch den Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol hervorgerufene Effekt auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Versuchstieren

Eine *ip*-Injektion von 197 und 493 nmol/kg Körpergewicht (KG) des Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol hatte keinen Effekt auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Ratten. Nach einer Vorbehandlung der Tiere mit 197 nmol/kg KG Flupentixol und nachfolgender *izv*-Injektion von 49 nmol CI988 blieb der durch CI988 hervorgerufene inhibitorische Effekt auf die Menge der konsumierten Nahrung der Versuchstiere unbeeinflusst.

Eine Vorbehandlung mit Flupentixol in einer Dosierung von 493 nmol/kg KG führte zu einer Kompensation des durch CI988 hervorgerufenen Effekts über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die Versuchstiere zeigten eine ähnlich hohe Nahrungsaufnahme wie die Vehikeltiere (Flupentixol + CI988: $16,06 \pm 0,95$ g/Ratte vs. Vehikel + CI988: $12,37 \pm 1,22$ g/Ratte nach 10 Stunden, $P < 0,05$).

1.6.2 Publikation 2: Die Auswirkung von peripher injiziertem CCK-8S auf phospho-mTOR-positive Neurone des Hypothalamus

Die ip-Injektion von CCK-8S in einer Dosierung von 5,2 und 8,7 nmol/kg Körpergewicht führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der Anzahl c-Fos-positiver PVN-Neuronen ($x \pm \text{SEM}$: 5,2 nmol/kg: 103 ± 13 und 8,7 nmol/kg: 165 ± 14 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,05$) im Vergleich zu der Vehikelgruppe (4 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt). Im ARC kam es zu keinem Anstieg der neuronalen Aktivität (5,2 nmol/kg: 1 ± 1 und 8,7 nmol/kg: 3 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt vs. Vehikelgruppe: 3 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,05$). Im NTS konnte dagegen ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl c-Fos-positiver Neurone beobachtet werden (5,2 nmol/kg: 51 ± 2 und 8,7 nmol/kg 155 ± 11 Neuronen/Hirnschnitt vs. Kontrolle: 2 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,05$).

Die immunhistochemische Färbung zur Darstellung von phospho-mTor an Gewebeschnitten im Bereich des NTS konnte keine phospho-mTor-positiven Neuronen nachweisen.

Die ip-Injektion von CCK-8S führte zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der neuronalen Aktivität von phospho-mTor immunreaktiven Neuronen im PVN. Das Ergebnis der Doppelfärbung zur Darstellung von c-Fos und phospho-mTor zeigte bei einer Dosierung von 5,2 nmol/kg KG eine Steigerung von 17 ± 2 %, eine Dosierung von 8,7 nmol/kg KG führte zu einer Steigerung von 24 ± 1 %. In der Vehikelgruppe konnten keine aktivierten phospho-mTor-positiven Neuronen nachgewiesen werden.

Die immunhistochemische Doppelfärbung zum Nachweis von phospho-mTor und Oxytocin zeigte keinen signifikanten Anstieg von phospho-mTor-positiven Oxytocin-Neuronen (5,2 nmol/kg: 62 ± 11 % und 8,7 nmol/kg: 64 ± 6 , Vehikelgruppe: 48 ± 5 %, $P > 0,5$).

Nach der Dreifachfärbung gegen c-Fos, phospho-mTor und Oxytocin zeigten $9,78 \pm 3,64$ % (5,2 nmol/kg) und $19,45 \pm 3,3$ % (8,7 nmol/kg) der Oxytocin-Neuronen ein zusätzliches Signal für c-Fos und phospho-mTor.

1.6.3 Publikation 3: Die Auswirkung von peripherem CCK-8S auf die Serotoninkonzentration von Nervenfasern im Hirnstamm von Ratten

Nach der ip-Injektion von CCK-8S (5,2 nmol/kg und 8,7 nmol/kg) kam es zu einer dosisabhängigen Steigerung von c-Fos-positiven Neuronen im Bereich des NTS (72 ± 4 und 112 ± 5 Neuronen/Hirnschnitt) im Vergleich zu der Vehikelgruppe (7 ± 2 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,05$). Im Bereich des DMV konnte keine signifikante Steigerung der c-Fos-positiven Neuronen gegenüber der Vehikelgruppe festgestellt werden (5,2 nmol/kg KG: 16 ± 4 Neuronen/Hirnschnitt und 8,7 nmol/kg KG: 15 ± 4 Neuronen/Hirnschnitt, Vehikelgruppe: 7 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt). 90 Minuten nach der ip-Injektion von CCK-8S konnte im Bereich des DMV und des NTS eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals für Serotonin im Vergleich zu der Vehikelgruppe (5,2 nmol/kg KG: 46 ± 2 px/Kern und 8,7 nmol/kg KG: 49 ± 8 px/Kern, Vehikelgruppe: 81 ± 8 px/Kern, $P < 0,01$) registriert werden. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Dosierungen von CCK-8S ($P = 0,81$).

Das Ergebnis der Doppelfärbung zur Markierung von c-Fos und Serotonin ergab einen Hinweis darauf, dass c-Fos-immunreaktive Neuronen in ein dichtes Netzwerk aus serotoninhaltigen Nervenfasern eingebettet sind. In der Dreifachfärbung an Gewebeschnitten des NTS konnte zusätzlich gezeigt werden, dass aktivierte Tyrosinhydroxylase-positive Neuronen von einem Netzwerk serotoninhaltiger Nervenfasern umgeben sind.

An Gehirnschnitten des PVN konnte eine dosisabhängige Steigerung der c-Fos-positiven Neuronen nach einer ip-Injektion von CCK-8S im Vergleich zur Vehikelgruppe gezeigt werden (5,2 nmol/kg: 128 ± 14 und 8,7 nmol/kg: 218 ± 15 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,002$, Vehikeltiere: 19 ± 5 Neuronen/Hirnschnitt, $P < 0,001$). Im ARC blieb die Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen nach der ip-Injektion von CCK-8S im Vergleich zur Vehikelgruppe unverändert (5,2 nmol/kg KG: 5 ± 3 und 8,7 nmol/kg KG: 8 ± 1 Neuronen/Hirnschnitt, Vehikelgruppe: 7 ± 1 , $P = 0,635$). Sowohl im Bereich des PVN als auch im Bereich des ARC blieb die Intensität des Fluoreszenzsignals für Serotonin nach der ip-Injektion von CCK-8S unverändert (PVN: 5,2 nmol/kg KG: 16 ± 1 px/Hirnschnitt und 8,7 nmol/kg KG: 15 ± 1 px/Hirnschnitt; ARC: 5,2 nmol/kg KG: 16 ± 2 px/Hirnschnitt und 8,7 nmol/kg KG: 16 ± 1 px/Hirnschnitt). Im Vergleich dazu zeigten die Tiere der Kontrollgruppe 14 ± 1 px/Hirnschnitt im Bereich des PVN ($P = 0,389$) und 20 ± 1 px/Hirnschnitt im ARC ($P = 0,850$).

1.7 Diskussion

Die Versuche der ersten Studie zeigen, dass der CCK₂-Rezeptorantagonist CI988 nach einer Fastenperiode von 24 Stunden zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme von Ratten führt. Dieser Effekt auf die Nahrungsaufnahme ließ sich durch eine Vorbehandlung der Tiere mit dem Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol aufheben.

Peripheres CCK wirkt über einen auf dem CCK₁-Rezeptor basierenden Signalweg hemmend auf die Nahrungsaufnahme (46, 47). Die Wirkung von zentralem CCK auf die Nahrungsaufnahme wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In einer Studie von Corp et al. aus dem Jahr 1997 nahmen die Versuchstiere nach einer *izv*-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten L365,260 weniger Nahrung zu sich (12). Dorre et al. zeigten dagegen, dass eine *izv*-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten PD135158 zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme der Versuchstiere führt (48). Eine mögliche Ursache für die abweichenden Versuchsergebnisse dieser Studien könnte der als zu kurz einzuschätzende Beobachtungszeitraum von einer Stunde gewesen sein. Auch in unseren Experimenten blieb die Nahrungsaufnahme der Tiere innerhalb dieses Zeitraums unbeeinflusst. Zusätzlich finden sich in der Literatur Hinweise für die Existenz unterschiedlicher CCK₂-Rezeptorsubtypen im Gehirn. Beispielfhaft sei hier eine Studie von Ladurelle et al. genannt, in der es nach der Applikation von verschiedenen CCK₂-Rezeptorantagonisten zu konträren Auswirkungen auf das Putzverhalten von Versuchstieren kam (49). Im Gegensatz zu den bisher durchgeführten Experimenten wurden die Ratten vor unseren Versuchen für 24 Stunden gefastet. Während die Nahrungsaufnahme von *ad libitum* gehaltenen Tieren in der Dunkelphase unbeeinflusst blieb, wirkte sich die *izv*-Injektion von CI988 bei den gefasteten Tieren hemmend auf die Nahrungsaufnahme aus. Es ist zu vermuten, dass der metabolische Status der Versuchstiere einen Einfluss auf die pharmakologische Wirkungsweise von CI988 auf die Nahrungsaufnahme hat.

CRF und CCK sind im ZNS häufig kolokalisiert (17). CRF wirkt ebenfalls sättigend (50). Um einer möglichen Interaktion von CCK und CRF nachzugehen, erhielten unsere Versuchstiere vor der Applikation des CCK₂-Rezeptorantagonisten einen CRF₁- bzw. einen CRF₂-Rezeptorantagonisten. Keiner der beiden CRF-Rezeptorantagonisten war in der Lage, den durch CI988 hervorgerufenen Effekt auf die Nahrungsaufnahme der Versuchstiere zu beeinflussen. Eine Interaktion von zentralem CCK mit zentralen CRF-Schaltkreisen scheint damit unwahrscheinlich.

Auch der Neurotransmitter Dopamin wirkt appetithemmend (51). Eine Injektion des Dopamin-Rezeptorantagonisten Apomorphin führt zu einer Senkung der Nahrungsaufnahme (52). Durch eine

zusätzliche ip-Injektion des Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol wird dieser Effekt auf die Nahrungsaufnahme aufgehoben (52). Ausgehend von diesen Ergebnissen erhielten unsere Versuchstiere vor der CI988-izv-Injektion Flupentixol als ip-Injektion. Die Ergebnisse zeigen, dass der durch CI988 hervorgerufene inhibitorische Effekt auf die Nahrungsaufnahme von gefasteten Versuchstieren durch eine Vorbehandlung mit Flupentixol aufgehoben werden kann. Im lateralen Hypothalamus kommt es während der Nahrungsaufnahme zu einem Anstieg der Dopaminkonzentration und zu einer Normalisierung derselben nach Beendigung der Mahlzeit (53-55). Der Anstieg der Dopaminkonzentration wirkt hemmend auf den Appetit der Tiere (54-57). Ergänzend dazu kamen Corwin et al. in einer *in vivo* Mikrodialysestudie an Neuronen des Nucleus accumbens (NAcc) zu dem Ergebnis, dass es nach der izv-Injektion von CI988 zu einer Stimulation der Dopaminfreisetzung aus Neuronen des NAcc kommt (58). Diese Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass das zentrale CCK₂-Rezeptorsystem während einer Fastenperiode eine Hemmung der Dopaminfreisetzung aus Nervenzellen bewirkt. Es ist möglich, dass zentrales CCK über diesen Mechanismus zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führt (siehe Abbildungen 1 bis 3).

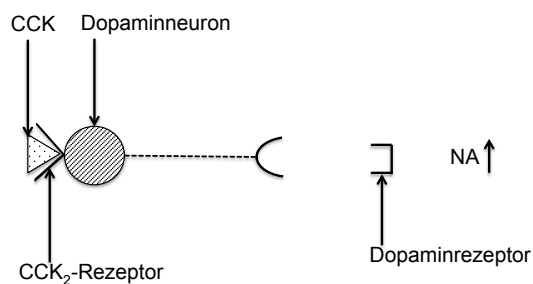


Abbildung 1: Während einer Fastenperiode hemmt das zentrale CCK₂-Rezeptorsystem die Freisetzung von Dopamin aus Dopaminneuronen und stimuliert so die Nahrungsaufnahme von Ratten.

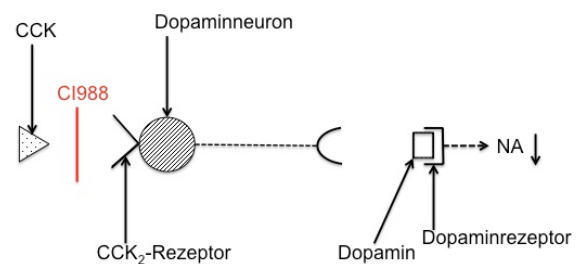


Abbildung 2: Nach einer izv-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 ist die Nahrungsaufnahme von Ratten verringert. Dieser Effekt wird durch eine Dopaminfreisetzung induziert.

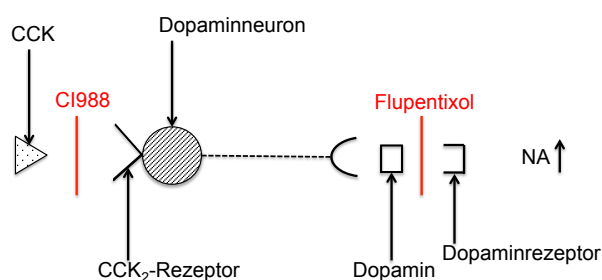


Abbildung 3: Eine izv-Injektion des CCK₂-Rezeptorantagonisten CI988 führt zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme. Dieser Effekt lässt sich durch eine Injektion des Dopamin-Rezeptorantagonisten Flupentixol aufheben. Die Nahrungsaufnahme ist in der Folge wieder gesteigert.

Die Ergebnisse der zweiten Studie zeigen, dass die ip-Injektion von CCK-8S zu einer dosisabhängigen Aktivierung von phospho-mTor-Neuronen im PVN führt. Hierbei waren einige der Neurone mit Oxytocin kolokalisiert. Dieses Ergebnis ist analog zu den Erkenntnissen älterer Studien, in denen die periphere Injektion von CCK-8S zu einer Steigerung der Aktivität von zahlreichen autonomen Hirnkernen im Hypothalamus und Hirnstamm führte (10, 26, 27, 59). Diese Neurone konnten als Oxytocin-, CRF- und Nesfatin-1-Neuronen detektiert werden (26-28). Auch von diesen Neuropeptiden ist ein inhibitorischer Effekt auf die Nahrungsaufnahme bekannt (60-62). Weiterführende Studien untersuchten ein mögliches Zusammenspiel von Oxytocin und CCK. In einem Experiment von Olson et al. blieb der durch CCK-8S hervorgerufene anorexigene Effekt auf die Nahrungsaufnahme nach der izv-Injektion eines Oxytocin-Rezeptorantagonisten aus (30). In den Versuchen der zweiten Studie waren 48 % der Oxytocin-Neuronen im magnozellulären Bereich des PVN mit phospho-mTor kolokalisiert. Bei den Tieren die eine CCK-8S-Injektion erhalten hatten, stieg diese Zahl dosisabhängig um weitere 14 bzw. 16 %. Ein Teil dieser Neurone war zusätzlich immunpositiv für c-Fos. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von phospho-mTor an der oxytocinergen Signaltransduktion im PVN nach einer CCK-8S-Injektion.

Phospho-mTor ist Teil einer intrazellulären Signalkaskade, die unter anderem an der Integration von verschiedenen Sättigungssignalen beteiligt ist (23, 63, 64). Aus immunhistochemischen Studien ist ein weites Verbreitungsmuster für phospho-mTor im ZNS mit höheren Konzentrationen im Bereich des PVN und des Nucleus arcuatus bekannt (23). Der PVN gehört zum autonomen Nervensystem und ist konstant an der Integration verschiedener Signale aus der Peripherie, unter anderem zum metabolischen Status, Stress, Reproduktion und Wachstum, involviert (65). Diese ständige Beteiligung an verschiedenen autonomen Funktionen könnte eine Erklärung dafür sein, dass nach der ip-Injektion von CCK-8S keine signifikante Steigerung der Anzahl phospho-mTor-positiver Neuronen detektiert werden konnte.

In der dritten Publikation wird gezeigt, dass eine ip-Injektion von CCK-8S zu einer signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität von serotoninergen Nervenfasen im NTS und DMV führte. Im NTS und PVN stieg nach der CCK-8S-Injektion zusätzlich die Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen älterer Studien (44, 66).

Die ip-Injektion von CCK-8S führt zu der Aktivierung eines komplexen neurohormonalen Systems im Hypothalamus und Hirnstamm, was in einer Hemmung der Nahrungsaufnahme resultiert (67, 68). Eine Beteiligung des Neurotransmitters Serotonin an diesem System ist möglich. Verschiedene Studien implizieren eine Interaktion von CCK und Serotonin (31-35).

Die ip-Injektion des Serotonin-Rezeptorantagonisten Odansetron bewirkt eine Abschwächung der CCK-induzierten Hemmung der Nahrungsaufnahme von Ratten (33). Eine direkte Mikroinjektion von Odansetron in den medialen NTS (mNTS) führt zu einer vollständigen Aufhebung des sättigenden Effekts von CCK (34). Auf Grundlage dieser Ergebnisse folgerten Hayes et al., dass Serotonin die CCK induzierte Sättigung im mNTS beeinflusst (34). Die Ergebnisse unserer Versuche bekräftigen die Hypothese, dass der NTS eine Rolle bei der Interaktion von Serotonin und CCK spielt. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität von serotoninergen Nervenfasern im NTS und DMV nach der ip-Injektion von CCK-8S könnte durch eine Serotoninfreisetzung aus Nervenfasern im Bereich dieser Hirnkerne erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass eine Bestätigung dieser Hypothese durch eine Bestimmung der extrazellulären Serotoninkonzentration an den für die Versuche verwendeten Gewebepräparaten nicht möglich ist, da das sezernierte Serotonin durch die transkardiale Perfusion und anschließende immunhistochemische Aufarbeitung des Gewebes vermutlich aus dem Extrazellulärraum gewaschen wurde. Zukünftige *in vitro* Studien sollten auf zellulärer Ebene versuchen, eine mögliche Serotoninsekretion direkt zu messen.

Afferenzen des Nervus vagus terminieren im Bereich des NTS (69). Huang et al. gelang es eine Serotoninsekretion von NTS-Neuronen nachzuweisen (70). In den Versuchen der dritten Publikation führte die periphere CCK-8S-Injektion zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung von Neuronen des NTS und einer simultanen Abnahme der Serotoninimmunreaktivität. Basierend auf den genannten Ergebnissen scheint möglich, dass peripheres CCK-8S über den Nervus vagus zu einer Serotoninfreisetzung aus Neuronen des NTS führt.

Das Ergebnis der Dreifachfärbung zur Markierung von c-Fos, Serotonin und Tyrosinhydroxylase zeigt, dass die ip-Injektion von CCK-8S zu einer Aktivierung von Tyrosinhydroxylase-positiven Neuronen des NTS führt. Diese Neuronen sind in ein Netzwerk aus serotoninhaltigen Nervenfasern eingebettet. Aus einer Studie von Rinaman et al. ist bekannt, dass die periphere Injektion von CCK-8S zu einer Aktivierung von katecholaminergen Neuronen des NTS mit Projektion zum PVN führt (8). In einem Versuch von Lam et al. kam es nach der intravenösen Injektion eines Serotoninagonisten zu einer Aktivierung katecholaminerger Neuronen des NTS (71). In Anbetracht dieser und der hier publizierten Ergebnisse ist denkbar, dass die CCK-8S-induzierte Aktivierung von NTS-Neuronen nachgeschaltet zu einer Aktivierung von Serotoninneuronen führt. Das Ergebnis dieser Interaktion könnte die für peripheres CCK-8S typische Hemmung der Nahrungsaufnahme sein. Es obliegt zukünftigen elektronenmikroskopischen Studien diese Hypothese auf zellulärer Ebene zu überprüfen.

1.8 Literaturverzeichnis

1. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55(1 Pt 2):137-54.
2. Gibbs J, Young RC, Smith GP. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol.* 1973;84(3):488-95.
3. Liddle RA. Regulation of cholecystokinin synthesis and secretion in rat intestine. *J Nutr.* 1994;124(8 Suppl):1308S-14S.
4. Rehfeld JF, Holst JJ, Jensen SL. The molecular nature of vascularly released cholecystokinin from the isolated perfused porcine duodenum. *Regul Pept.* 1982;3(1):15-28.
5. Miesner J, Smith GP, Gibbs J, Tyrka A. Intravenous infusion of CCKA-receptor antagonist increases food intake in rats. *Am J Physiol.* 1992;262(2 Pt 2):R216-9.
6. Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R, Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science.* 1981;213(4511):1036-7.
7. Ritter RC, Ladenheim EE. Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol.* 1985;248(4 Pt 2):R501-4.
8. Rinaman L, Hoffman GE, Dohanics J, Le WW, Stricker EM, Verbalis JG. Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol.* 1995;360(2):246-56.
9. Luckman SM. Fos-like immunoreactivity in the brainstem of the rat following peripheral administration of cholecystokinin. *J Neuroendocrinol.* 1992;4(2):149-52.
10. Day HE, McKnight AT, Poat JA, Hughes J. Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism. *Neuropharmacology.* 1994;33(6):719-27.
11. Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides.* 1994;15(4):731-55.
12. Corp ES, Curcio M, Gibbs J, Smith GP. The effect of centrally administered CCK-receptor antagonists on food intake in rats. *Physiol Behav.* 1997;61(6):823-7.
13. Clerc P, Coll Constans MG, Lulka H, Broussaud S, Guigne C, Leung-Theung-Long S, et al. Involvement of cholecystokinin 2 receptor in food intake regulation: hyperphagia and

- increased fat deposition in cholecystokinin 2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*. 2007;148(3):1039-49.
14. Miyasaka K, Ichikawa M, Ohta M, Kanai S, Yoshida Y, Masuda M, et al. Energy metabolism and turnover are increased in mice lacking the cholecystokinin-B receptor. *J Nutr*. 2002;132(4):739-41.
 15. Weiland TJ, Voudouris NJ, Kent S. The role of CCK2 receptors in energy homeostasis: insights from the CCK2 receptor-deficient mouse. *Physiol Behav*. 82. United States 2004. p. 471-6.
 16. Kopin AS, Mathes WF, McBride EW, Nguyen M, Al-Haider W, Schmitz F, et al. The cholecystokinin-A receptor mediates inhibition of food intake yet is not essential for the maintenance of body weight. *J Clin Invest*. 1999;103(3):383-91.
 17. Vanderhaeghen JJ, Goldman S, Lotstra F, Van Reeth O, Deschepper C, Rossier J, et al. Co-existence of cholecystokinin- or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;448:334-44.
 18. Hokfelt T, Rehfeld JF, Skirboll L, Ivemark B, Goldstein M, Markey K. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature*. 1980;285(5765):476-8.
 19. Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS. Feeding increases dopamine metabolism in the rat brain. *Science*. 1980;208(4448):1168-70.
 20. Shibasaki T, Yamauchi N, Kato Y, Masuda A, Imaki T, Hotta M, et al. Involvement of corticotropin-releasing factor in restraint stress-induced anorexia and reversion of the anorexia by somatostatin in the rat. *Life Sci*. 1988;43(14):1103-10.
 21. Barbet NC, Schneider U, Helliwell SB, Stansfield I, Tuite MF, Hall MN. TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell*. 1996;7(1):25-42.
 22. Cardenas ME, Cutler NS, Lorenz MC, Di Como CJ, Heitman J. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev*. 1999;13(24):3271-9.
 23. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, et al. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 2006;312(5775):927-30.
 24. Chen DY, Deutsch JA, Gonzalez MF, Gu Y. The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718. *Neurosci Lett*. 1993;149(1):91-4.

25. Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*. 1988;240(4857):1328-31.
26. Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, et al. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept*. 2009;157(1-3):84-91.
27. Peter L, Stengel A, Noetzel S, Inhoff T, Goebel M, Tache Y, et al. Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats. *Peptides*. 2010;31(6):1118-23.
28. Verbalis JG, Stricker EM, Robinson AG, Hoffman GE. Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol*. 1991;3(2):205-13.
29. Olson BR, Drutarosky MD, Chow MS, Hruby VJ, Stricker EM, Verbalis JG. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides*. 1991;12(1):113-8.
30. Olson BR, Drutarosky MD, Stricker EM, Verbalis JG. Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology*. 1991;129(2):785-91.
31. Daughters RS, Hofbauer RD, Grossman AW, Marshall AM, Brown EM, Hartman BK, et al. Ondansetron attenuates CCK induced satiety and c-fos labeling in the dorsal medulla. *Peptides*. 22. United States 2001. p. 1331-8.
32. Burton-Freeman B, Gietzen DW, Schneeman BO. Cholecystokinin and serotonin receptors in the regulation of fat-induced satiety in rats. *Am J Physiol*. 1999;276(2 Pt 2):R429-34.
33. Hayes MR, Moore RL, Shah SM, Covasa M. 5-HT₃ receptors participate in CCK-induced suppression of food intake by delaying gastric emptying. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287. United States 2004. p. R817-23.
34. Hayes MR, Covasa M. Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation. *Brain Res*. 2006;1103(1):99-107.
35. Helm KA, Rada P, Hoebel BG. Cholecystokinin combined with serotonin in the hypothalamus limits accumbens dopamine release while increasing acetylcholine: a possible satiation mechanism. *Brain Res*. 2003;963(1-2):290-7.

36. Kapadia SE, de Lanerolle NC, LaMotte CC. Immunocytochemical and electron microscopic study of serotonin neuronal organization in the dorsal raphe nucleus of the monkey. *Neuroscience*. 1985;15(3):729-46.
37. Schwartz DH, Hernandez L, Hoebel BG. Serotonin release in lateral and medial hypothalamus during feeding and its anticipation. *Brain Res Bull*. 1990;25(6):797-802.
38. Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.
39. Palacios JM, Waeber C, Hoyer D, Mengod G. Distribution of serotonin receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;600:36-52.
40. Raybould HE, Glatzle J, Robin C, Meyer JH, Phan T, Wong H, et al. Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2003;284(3):G367-72.
41. Pollock JD, Rowland N. Peripherally administered serotonin decreases food intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1981;15(2):179-83.
42. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, USA: Academic Press; 1997.
43. Barrachina MD, Martinez V, Wang L, Wei JY, Tache Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10455-60.
44. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, et al. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(3):R751-8.
45. Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Bae HG, Ruter J, Klapp BF, et al. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2004;13(1):45-52.
46. Dourish CT, Ruckert AC, Tattersall FD, Iversen SD. Evidence that decreased feeding induced by systemic injection of cholecystokinin is mediated by CCK-A receptors. *Eur J Pharmacol*. 1989;173(2-3):233-4.
47. Moran TH, Ameglio PJ, Schwartz GJ, McHugh PR. Blockade of type A, not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK. *Am J Physiol*. 1992;262(1 Pt 2):R46-50.
48. Dorre D, Smith GP. CholecystokininB receptor antagonist increases food intake in rats. *Physiol Behav*. 1998;65(1):11-4.

49. Ladurelle N, Sebret A, Garbay C, Roques BP, Dauge V. Opposite effects of CCK(B) agonists in grooming behaviour in rats: further evidence for two CCK(B) subsites. *Br J Pharmacol.* 1998;124(6):1091-8.
50. Morley JE, Levine AS. Corticotrophin releasing factor, grooming and ingestive behavior. *Life Sci.* 1982;31(14):1459-64.
51. Sanghvi IS, Singer G, Friedman E, Gershon S. Anorexigenic effects of d-amphetamine and l-DOPA in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1975;3(1):81-6.
52. Bednar I, Forsberg G, Linden A, Qureshi GA, Sodersten P. Involvement of dopamine in inhibition of food intake by cholecystokinin octapeptide in male rats. *J Neuroendocrinol.* 3. England1991. p. 491-6.
53. Meguid MM, Yang ZJ, Montante A. Lateral hypothalamic dopaminergic neural activity in response to total parenteral nutrition. *Surgery.* 1993;114(2):400-5; discussion 5-6.
54. Yang ZJ, Koseki M, Meguid MM, Laviano A. Eating-related increase of dopamine concentration in the LHA with oronasal stimulation. *Am J Physiol.* 1996;270(2 Pt 2):R315-8.
55. Meguid MM, Yang ZJ, Koseki M. Eating induced rise in LHA-dopamine correlates with meal size in normal and bulbectomized rats. *Brain Res Bull.* 1995;36(5):487-90.
56. Leibowitz SF, Rossakis C. L-Dopa feeding suppression: effect on catecholamine neurons of the perifornical lateral hypothalamus. *Psychopharmacology (Berl).* 1979;61(3):273-80.
57. Leibowitz SF, Rossakis C. Pharmacological characterization of perifornical hypothalamic dopamine receptors mediating feeding inhibition in the rat. *Brain Res.* 1979;172(1):115-30.
58. Corwin RL, Jorn A, Hardy M, Crawley JN. The CCK-B antagonist CI-988 increases dopamine levels in microdialysate from the. *J Neurochem.* 1995;65(1):208-17.
59. Monnikes H, Lauer G, Arnold R. Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat. *Brain Res.* 1997;770(1-2):277-88.
60. Arletti R, Benelli A, Bertolini A. Oxytocin inhibits food and fluid intake in rats. *Physiol Behav.* 1990;48(6):825-30.

61. Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res.* 1988;443(1-2):63-9.
62. Stengel A, Goebel M, Wang L, Rivier J, Kobelt P, Monnikes 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(11):4911-9.
63. Cota D, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. The role of hypothalamic mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in diet-induced obesity. *J Neurosci.* 2008;28(28):7202-8.
64. Woods SC, Seeley RJ, Cota D. Regulation of food intake through hypothalamic signaling networks involving mTOR. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:295-311.
65. Ferguson AV, Latchford KJ, Samson WK. The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin Ther Targets.* 2008;12(6):717-27.
66. Fraser KA, Davison JS. Cholecystokinin-induced c-fos expression in the rat brain stem is influenced by vagal nerve integrity. *Exp Physiol.* 1992;77(1):225-8.
67. Raybould HE, Gayton RJ, Dockray GJ. Mechanisms of action of peripherally administered cholecystokinin octapeptide on brain stem neurons in the rat. *J Neurosci.* 1988;8(8):3018-24.
68. Glatzle J, Kreis ME, Kawano K, Raybould HE, Zittel TT. Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281(1):R222-9.
69. Sykes RM, Spyer KM, Izzo PN. Central distribution of substance P, calcitonin gene-related peptide and 5-hydroxytryptamine in vagal sensory afferents in the rat dorsal medulla. *Neuroscience.* 1994;59(1):195-210.
70. Huang J, Pickel VM. Serotonin transporters (SERTs) within the rat nucleus of the solitary tract: subcellular distribution and relation to 5HT2A receptors. *J Neurocytol.* 2002;31(8-9):667-79.
71. Lam DD, Zhou L, Vegge A, Xiu PY, Christensen BT, Osundiji MA, et al. Distribution and neurochemical characterization of neurons within the nucleus of the solitary tract responsive to serotonin agonist-induced hypophagia. *Behav Brain Res.* 2009;196(1):139-43.

2 Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

„Ich, Lisa Frommelt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchungen zur zentralen appetitregulatorischen Wirkung von Cholecystokinin mit Schwerpunkt auf der Interaktion mit anderen Neuropeptiden“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Berlin, den 26.08.2015

Lisa Frommelt

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Lisa Frommelt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Autoren:	Frommelt L* , Lembke V*, Hofmann T, Goebel-Stengel M, Mönnikes H, Wiedenmann B, Klapp BF, Stengel A, Kobelt P.
Titel:	The CCKB antagonist CI988 reduces food intake in fasted rats via a dopamine mediated pathway.
Erscheinungsjahr:	2013
Anteil:	60 %
Beitrag im Einzelnen:	Durchführung der Tierexperimente, Auswertung der gewonnenen Daten, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Publikation 2:

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

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

Erscheinungsjahr: 2011

Anteil: 30 %

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit an der Durchführung der Tierexperimente, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Mitarbeit am Manuskript

Publikation 3:

Autoren: Engster KM, **Frommelt L**, Hofmann T, Nolte S, Fischer F, Rose M, Stengel A, Kobelt P.

Titel: Peripheral injected cholecystokinin-8S modulates the concentration of serotonin in nerve fibers of the rat brainstem.

Erscheinungsjahr: 2014

Anteil: 20 %

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

3 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Die Druckexemplare der folgenden Publikationen tragen keine fortlaufenden Seitenzahlen. Die abgedruckten Seitenzahlen entsprechen der Zeitschriften, in denen sie als Originalarbeiten erschienen sind.

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

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

Peptides. 2013 Jan;39:111-8

Impact Faktor 2013: 2.522

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

*geteilte Erstautorenschaft

3.2 Sulfated cholecystinin-8 activates phospho-mTor immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats

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

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

Impact Faktor 2011: 2.434

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

* geteilte Erstautorenschaft

3.3 Peripheral injected cholecystokinin-8S modulates the concentration of serotonin in nerve fibers of the rat brainstem

Engster KM, **Frommelt L**, Hofmann T, Nolte S, Fischer F, Rose M, Stengel A, Kobelt P.

Peptides. 2014 Sep;59: 25-33

Impact Faktor 2014: 2.614

<http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2014.07.003>

4 Lebenslauf

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

5 Vollständige Publikationsliste

Publikationen

Geteilte Erstautorenschaften sind mit * gekennzeichnet.

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

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

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

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

Peripheral injected cholecystokinin-8S modulates the concentration of serotonin in nerve fibers of the rat brainstem.

Engster KM, **Frommelt L**, Hofmann T, Nolte S, Fischer F, Rose M, Stengel A, Kobelt P.
Peptides 2014 Sep;59:25-33

Vorträge

Die Anzahl von Ghrelin und Nesfatin-1 immunreaktiven Zellen in der menschlichen Magenmukosa von adipösen Patienten ist mit dem BMI korreliert.

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

6 Danksagung

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Kobelt. Lieber Peter, du hast mich in jeder Phase dieser Arbeit intensiv, professionell und mit viel Geduld begleitet. Dafür danke ich dir sehr.

Ich danke meiner Kollegin, Wegbegleiterin und guten Freundin Frau Dr. med. Vanessa Lembke für die produktive Zusammenarbeit. Liebe Vanessa, vielen Dank für deine gute Laune während der vielen gemeinsamen Stunden im Labor .

Unserem technischen Assistenten Herrn Reinhard Lommel danke ich für die Unterstützung und für die gute Kooperation im Labor.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern. Durch eure immer währende Unterstützung und Liebe ist es mir erst möglich gewesen diese Arbeit umzusetzen. Vielen, vielen Dank.