

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Bombesin, nicht aber Amylin, blockiert den orexigenen Effekt von
peripherem Ghrelin bei Ratten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Miriam Goebel
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Mönnikes

2. Priv.-Doz. Dr. M. Kreis

3. Prof. Dr. P. Holzer

Datum der Promotion: 15.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG -----	1
1.1 Historischer Überblick -----	1
1.2 Amylin -----	3
1.3 Bombesin -----	5
1.4 Corticotropin Releasing Factor (CRF) -----	10
1.5 Ghrelin -----	12
1.6 Der neuronale Marker Fos -----	15
1.7 Interaktionen nahrungsregulatorischer Peptide -----	17
1.8 Ziele der Studie -----	19
2. MATERIAL UND METHODEN -----	20
2.1 Materialien -----	20
<u>2.1.1 Versuchslösungen</u> -----	23
2.1.1.1 Phosphatpuffer-----	23
2.1.1.2 Saccharoselösungen-----	23
2.1.1.3 Fixierungslösung PgPik-----	23
2.1.1.4 Plasmaexpander-----	24
<u>2.1.2 Peptide</u> -----	24
2.1.2.1 Vorbereitung von Ghrelin, Bombesin und Amylin-----	24
<u>2.1.3 Versuchstiere</u> -----	24
2.2 Methoden -----	25
<u>2.2.1 Durchführung der verhaltensbiologischen Experimente</u> -----	25
2.2.1.1 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme--	25
2.2.1.2 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Amylin auf die Nahrungsaufnahme----	26
<u>2.2.2 Durchführung der immunhistologischen Experimente</u> -----	27
2.2.2.1 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Fos-Expression in Hypothalamus und Hirnstamm-----	27
2.2.2.2 Transkardiale Perfusion-----	28
2.2.2.3 Verarbeitung und Aufbewahrung der Gehirne-----	29
2.2.2.4 Kryotom-----	30
<u>2.2.3 Immunhistologische Färbung</u> -----	31
2.2.3.1 Allgemeines zu den Färbeprotokollen-----	31

2.2.3.2 Protokoll 1: Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid -----	32
2.2.3.3 Protokoll 2: Fos-Färbung, CRF-Phänotypisierung und Gegenfärbung mit DAPI ----	33
<u>2.2.4 Mikroskopische Auswertung</u> -----	35
2.2.4.1 Mikroskopische Auswertung des Färbeprotokolls 1 -----	35
2.2.4.2 Mikroskopische Auswertung des Färbeprotokolls 2 -----	36
<u>2.2.5 Statistische Auswertung</u> -----	36
2.2.5.1 Statistische Auswertung der verhaltensbiologischen Experimente -----	36
2.2.5.2 Statistische Auswertung der immunhistologischen Experimente -----	36
3. ERGEBNISSE -----	37
3.1 Ergebnisse der verhaltensbiologischen Experimente -----	37
<u>3.1.1 Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme</u> -----	37
<u>3.1.2 Effekte von Ghrelin und Amylin auf die Nahrungsaufnahme</u> -----	40
<u>3.1.3 Effekte von Amylin auf die Nahrungsaufnahme zu Beginn der Dunkelphase</u> -----	43
3.2 Ergebnisse der immunhistologischen Experimente -----	45
<u>3.2.1 Ziele der immunhistologischen Experimente</u> -----	45
<u>3.2.2 Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Fos-Expression im Nucleus Arcuatus</u> ----	45
<u>3.2.3 Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Fos-Expression</u> <u>im Nucleus Paraventricularis</u> -----	47
<u>3.2.4 Doppelfärbung für Fos und CRF im Nucleus Paraventricularis</u> -----	51
<u>3.2.5 Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Fos-Expression</u> <u>im Nucleus Tractus Solitarii</u> -----	57
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse -----	59
4. DISKUSSION -----	60
4.1 Einleitung -----	60
4.2 Wirkdauer von Ghrelin und Bombesin -----	60
4.3 Fehlender Einfluss von Amylin auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme ----	61
4.4 Fehlender Einfluss von Amylin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme nicht gefasteter Tiere -----	63
4.5 Einfluss der zirkadianen Rhythmik auf die Experimente -----	64
4.6 Wege der Transmission von Ghrelin und Bombesin -----	65
4.7 Einfluss von Bombesin und Ghrelin auf CRF-Neurone -----	66
4.8 Fazit -----	71

5. ZUSAMMENFASSUNG	72
6. LITERATUR	75
6.1 Referenzliste	75
6.2 Eigene Publikationen	94
7. ANHANG	95
7.1 Abkürzungsverzeichnis	95
7.2 Erklärung	97
7.3 Lebenslauf	98
7.4 Danksagung	99

ABSTRACT

Nervale Mechanismen, periphere und zentrale Mediatoren sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt und zu einem Netzwerk verknüpft. Das Zusammenspiel von drei dieser die Nahrungsaufnahme beeinflussenden Substanzen wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Während Ghrelin das einzige bekannte Orexigen ist, hemmen Amylin, Bombesin und CRF die Nahrungsaufnahme. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von intraperitoneal appliziertem Amylin oder Bombesin auf die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme und Neuronenaktivierung, beurteilt mit Hilfe des neuronalen Markers Fos, bei gesättigten Ratten untersucht. Ghrelin (13 µg/kg, ip.) steigerte die Nahrungsaufnahme signifikant verglichen mit der Vehikelgruppe innerhalb der ersten 30 Minuten ($X \pm \text{SEM}$: $3,66 \pm 0,80$ g/kg KG vs. $1,68 \pm 0,42$ g/kg KG; $p < 0,0087$). Bei der simultanen ip. Injektion von Ghrelin und 8 µg Bombesin hemmte Bombesin die orexigenen Effekte von Ghrelin ($1,18 \pm 0,41$ g/kg KG; $p < 0,002$). Bombesin allein (4 und 8 µg/kg, ip.) führte zu einer dosis abhängigen statistisch nicht signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme ($1,08 \pm 0,44$ g/kg KG; $p > 0,45$ und $0,55 \pm 0,34$ g/kg KG; $p > 0,16$). Im Gegensatz dazu wurde die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme ($3,96 \pm 0,56$ g/kg KG vs. Vehikel $0,82 \pm 0,59$ g/kg KG; $p < 0,004$) nicht durch Amylin (1 und 5 µg/kg, ip.) beeinflusst ($4,37 \pm 1,12$ g/kg KG; $p > 0,69$ und $3,01 \pm 0,78$ g/kg KG; $p > 0,37$). Ghrelin steigerte die Anzahl der Fos positiven Neurone/Schnitt im Nucleus Arcuatus, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median: 42,35 Neurone/Schnitt vs. 19,0 Neurone/Schnitt; $p < 0,008$). Die ip. Gabe von Ghrelin in einer Dosis von 13 µg führte zu einem signifikanten Anstieg der Fos-Signale in Neuronen des Nucleus Paraventricularis (PVN) (44,77 Neurone/Schnitt vs. Vehikel 28,0 Neurone/Schnitt; $p < 0,008$). Die ip. Applikation von Bombesin allein in den verschiedenen Dosierungen (4 und 8 µg/kg) hatte keinen Effekt auf die Fos-Expression in Neuronen des PVN (30,66 Neurone/Schnitt; $p > 0,30$ und 32,87 Neurone/Schnitt; $p > 0,54$). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der simultanen ip. Gabe von 8 µg Bombesin und 13 µg Ghrelin ein vierfacher Anstieg der Fos-Expression in Neuronen des PVN, verglichen mit der Vehikelgruppe (113,0 Neurone/Schnitt; $p < 0,008$) und ein zweifacher Anstieg im Vergleich mit der Ghrelingruppe ($p < 0,0158$). Von den Fos aktiven Neuronen der 13 µg Ghrelin + 8 µg Bombesin-Gruppe waren ~60% auch CRF positiv. Weiterhin waren ~23% der CRF positiven Neurone auch positiv für Fos. Der orexigene Effekt von peripherem Ghrelin wird durch die simultane ip. Gabe von Bombesin, nicht aber Amylin gehemmt. Die simultane Applikation von 13 µg Ghrelin und 8 µg Bombesin führte zu einer signifikanten Steigerung der Fos-Expression in Neuronen des PVN. Fast 60% dieser Fos aktiven Neurone waren CRF positiv. Die Aktivierung von CRF positiven Neuronen könnte somit die Ursache für die Hemmung der Ghrelin induzierten Nahrungsaufnahme durch Bombesin sein.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

1V -----	Linker Seitenventrikel
2V -----	Rechter Seitenventrikel
3V -----	III. Ventrikel
4V -----	IV. Ventrikel
AgRP -----	Agouti Related Peptide
ANOVA -----	Analysis of Variance
AP -----	Area Postrema
<i>aqua bidest.</i> -----	bidestilliertes Wasser
BB1-R -----	Bombesin-1-Rezeptor
BB2-R -----	Bombesin-2-Rezeptor
BRS-3 -----	Bombesin-Rezeptor-Subtyp-3
BSA -----	Bovines Serumalbumin
CCK -----	Cholecystokinin
CCK-R -----	Cholecystokinin-Rezeptor
CER -----	Cerebellum
cLSM -----	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CRF -----	Corticotropin Releasing Factor
CRF-1-R -----	Corticotropin Releasing Factor-1-Rezeptor
CRF-2-R -----	Corticotropin Releasing Factor-2-Rezeptor
DABCO -----	1,4-Diazabicyklo(2.2.2)oktan
DAPI -----	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
EM -----	Eminentia Mediana
<i>et al.</i> -----	<i>et alumni</i>
FITC -----	Fluoreszeinisothiocyanat
Fos-IR -----	Fos-Immunreaktivität
GABA -----	Gammaaminobuttersäure
GH -----	Growth Hormone
GHRH -----	Growth Hormone Releasing Hormone
GHS -----	Growth Hormone Secretagogue
GHS-R -----	Growth Hormone Secretagogue-Rezeptor

GLP-1	-----	Glucagon-like Peptide 1
GRP	-----	Gastrin Releasing Peptide
icv.	-----	intracerebroventriculär
I.E.	-----	Internationale Einheiten
ip.	-----	intraperitoneal
iv.	-----	intravenös
KCl	-----	Kaliumchlorid
KG	-----	Körpergewicht
LH	-----	Lateraler Hypothalamus
M	-----	Mol
MSH	-----	Melanozyten Stimulierendes Hormon
n	-----	Anzahl
NaCl	-----	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	-----	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
NaN ₃	-----	Natriumazid
NaOH	-----	Natriumhydroxid
NARC	-----	Nucleus Arcuatus
NGS	-----	Normal Goat Serum
NPY	-----	Neuropeptid Y
NPY-2-R	-----	NPY-2-Rezeptor
NTS	-----	Nucleus Tractus Solitarii
PBS	-----	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PGPik	-----	Paraformaldehyd-Glutardialdehyd-Pikrinsäure
POMC	-----	Proopiomelanocortin
PP	-----	Pankreatisches Polypeptid
PVN	-----	Nucleus Paraventricularis
PYY	-----	Peptid YY
RbNS	-----	Rabbit Normal Serum
SEM	-----	Standard Error of Mean
TFA	-----	Trifluoressigsäure
TRITC	-----	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TSH	-----	Thyroidea Stimulierendes Hormon
vs.	-----	<i>versus</i>
X	-----	Mittelwert

7.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Psych. H. Mönnikes für die Bereitstellung des Themas und Förderung des wissenschaftlichen Arbeitens. Er war jederzeit bereit, mit konstruktiver Kritik der Verwirklichung der Arbeit ein Stück näher zu kommen.

Herrn Dr. rer. nat. P. Kobelt danke ich für seine kontinuierliche Anwesenheit und Forcierung der Experimente. Mit seiner Erfahrung und Geduld bot er die Möglichkeit zum Erlernen der grundlegenden Arbeitsmethoden und zum selbständigen Arbeiten.

7.2 Erklärung

„Ich, Miriam Goebel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Bombesin, nicht aber Amylin, blockiert den orexigenen Effekt von peripherem Ghrelin bei Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 01.06.2006