

---

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Historischer Überblick

Das Verständnis von den Regulationsmechanismen zur Steuerung der Nahrungsaufnahme hat in den vergangenen Dekaden einen erheblichen Zuwachs erfahren. Während der letzten Jahrzehnte wurde angenommen, dass der Beginn der Nahrungsaufnahme unmittelbar von Faktoren beeinflusst wird, welche den Energiehaushalt kontrollieren (S. C. Woods 2004). Eine der bekanntesten Theorien, die Glukostatische Theorie, postulierte, dass Sensorzellen im Hypothalamus einen Glukoseabfall registrieren und ein Gefühl von Hunger vermitteln, bzw. die Wahrscheinlichkeit der Nahrungsaufnahme erhöhen (Mayer J. 1955). Die Nahrungsaufnahme selbst sollte die Glukosenutzung steigern, ein Gefühl von Sättigkeit vermitteln und den Akt des Essens beenden (Mayer J. 1955). Andere Hypothesen zur Nahrungsregulation orientierten sich an Körperwärme, Fettverbrauch der Leber oder an Nutzung und Herstellung Energie reicher Moleküle (W. Langhans, E. Scharrer 1990). Die meisten Hypothesen wurden im Laufe der Jahre widerlegt oder genühten nicht mehr den Ansprüchen, größtenteils deshalb, weil neue, endogene Substanzen entdeckt wurden, die viel wahrscheinlicher eine Rolle in der Regulation von Hunger und Sättigkeit spielen (S. C. Woods 2004).

Das Verständnis von Energieverbrauch und Nahrungsaufnahme hat in den letzten Jahrzehnten bedeutend zugenommen. Heute geht man davon aus, dass nervale und humorale Faktoren das Gleichgewicht von Hunger und Sättigung, Aktivierungs- und Ruhephasen bestimmen und über die sogenannte Brain-Gut-Achse wirken (S. J. Konturek *et al.* 2004). Nervale Schaltkreise sowie zentrale und periphere Substanzen sind zu einem Netzwerk verknüpft, das sowohl das Gehirn als auch den Gastrointestinaltrakt mit einbezieht (S. J. Konturek *et al.* 2004) (Abbildung 1.1). Es zeigte sich, dass Botenstoffe existieren, die entweder Hunger oder Sättigkeit vermitteln. Gängige Theorien gehen davon aus, dass es drei verschiedene Kategorien von Signaltypen gibt, die Effekte vermitteln (S. C. Woods 2004). Diese Signaltypen können unterteilt werden in Sättigungsfaktoren, Adipositasfaktoren und zentrale Effektoren (S. C. Woods 2004). Sättigungsfaktoren werden diejenigen Substanzen genannt, welche während der Mahlzeit vom Verdauungstrakt freigesetzt werden und über den N. Vagus, spinale Afferenzen oder die Blutbahn Neurone im Hirnstamm erreichen und aktivieren (S. C. Woods 2004). Amylin, Bombesin und Cholecystokinin (CCK) zählen zu den Sättigungsfaktoren. (S. C. Woods 2004). Adipositasignale hingegen werden abhängig vom gespeicherten Körperfett direkt in das Blut sezerniert (S. C. Woods, R. J. Seeley 2000). Zu ihnen gehören Insulin und Leptin (S. C. Woods,

R. J. Seeley 2000). Die dritte Gruppe der zentralen Effektoren umfasst Neurotransmitter, die Signale von Adipositas- und Sättigungsfaktoren im Gehirn integrieren und in Bezug setzen zu Gefühlen, Gedächtnis, Stress und sozialen Gegebenheiten (S. C. Woods *et al.* 2001). Das zentrale Effektorsystem kann unterteilt werden in ein anaboles und ein kataboles System, wobei das katabole System den Energieverbrauch erhöht, Sättigung vermittelt und nach einiger Zeit zu einer Gewichtsabnahme führt (S. C. Woods 2004). Das anabole System hingegen vermittelt die entgegen gesetzten Effekte und induziert Hunger (S. C. Woods 2004). Die einzige peripher produzierte und zentral wirksame Substanz, die orexigen wirkt, ist Ghrelin (M. Tschöp *et al.* 2000; A. M. Wren *et al.* 2000).

Abbildung 1.1

| <u>Pankreas</u> | <u>Magen</u>  | <u>Darm</u>       | <u>Fettgewebe</u> | <u>Gehirn</u>  |
|-----------------|---------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Amylin (\$)     | Ghrelin (#)   | CCK (\$)          | Leptin (\$)       | Ghrelin (#)    |
| Insulin (\$)    | Bombesin (\$) | GLP-1 (\$)        |                   | Orexin (#)     |
| Glukagon (\$)   | GRP (\$)      | Peptid YY (\$)    |                   | NPY (#)        |
|                 |               | Enterostatin (\$) |                   | AgRP (#)       |
|                 |               |                   |                   | CRF (\$)       |
|                 |               |                   |                   | MSH (\$)       |
|                 |               |                   |                   | Serotonin (\$) |
|                 |               |                   |                   | POMC (\$)      |

Abbildung 1.1: Zusammenfassung nahrungsregulatorischer Substanzen

Der fördernde oder hemmende Einfluss der Substanzen auf die Nahrungsaufnahme ist mit entsprechenden Pfeilsymbolen gekennzeichnet. Die Abbildung orientiert sich an Arbeiten von Hillebrand, Halford und Woods (J. C. Halford 2001; J. J. Hillebrand *et al.* 2002; S. C. Woods 2004).

Das Thema der vorliegenden Arbeit befasst sich hauptsächlich mit dem Zusammenspiel und der Wirkungsweise von vier dieser nahrungsregulatorischen Mediatoren, nämlich Amylin, Bombesin, Corticotropin Releasing Factor (CRF) und Ghrelin. Diese sollen im folgenden

vorgestellt werden. Während Amylin, Bombesin und CRF zu den anorexigenen Substanzen zählen, stimuliert Ghrelin die Nahrungsaufnahme.

## 1.2 Amylin

1987 entdeckte die Gruppe um Westermark das Islet Amyloid Polypeptide (IAPP) (P. Westermark *et al.* 1987), welches heute vorrangig Amylin genannt wird. Amylin ist ein 37 Aminosäuren langes Peptid (Abbildung 1.2), das in Langerhanszellen der Bauchspeicheldrüse produziert wird (B. Gedulin *et al.* 1991). Sowohl bei Ratten (S. E. Kahn *et al.* 1991) als auch bei Menschen (T. Mitsukawa *et al.* 1990) konnte gezeigt werden, dass Amylin zu Beginn der Nahrungsaufnahme endokrin gemeinsam mit Insulin sezerniert wird. Ob die Amylin- und Insulinsekretion über die gleichen Mechanismen ausgelöst wird, ist noch nicht abschließend geklärt (T. D. O'Brien *et al.* 1991; M. Stridsberg *et al.* 1993).

Abbildung 1.2

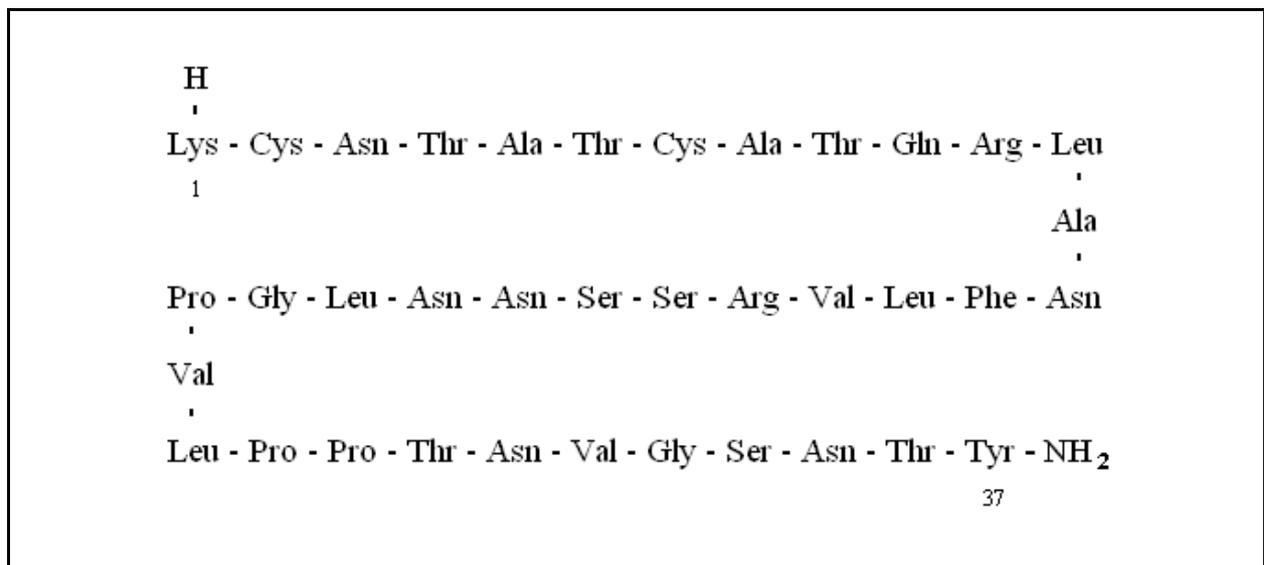


Abbildung 1.2: Aminosäuresequenz von Amylin der Ratte (J. J. Hillebrand *et al.* 2002)

Zentral und peripher appliziertes Amylin hemmt die Nahrungsaufnahme bei gesättigten und ungesättigten Mäusen (J. E. Morley, J. F. Flood 1991). Hohe Amylinrezeptordichten konnten in verschiedenen Organen der Ratte nachgewiesen werden (R. Bhogal *et al.* 1992). Dazu gehören der Magenfundus und diverse Gehirnregionen (R. Bhogal *et al.* 1992). Besonders hohe

Rezeptordichten fanden sich im Dorsalen Vagalen Komplex des Hirnstamms, wozu die Area Postrema (AP) und der Nucleus Tractus Solitarii (NTS) gehören, sowie in Teilen des Hypothalamus (P. M. Sexton *et al.* 1994). Diese Gehirnregionen sind an der Beeinflussung der Magenmotilität beteiligt. Es ist demnach möglich, dass der sättigende Effekt von Amylin bei Mäusen und Ratten über eine Verzögerung der Magenentleerung bewirkt wird. (R. D. Reidelberger *et al.* 2001). Andererseits wäre denkbar, dass die durch Amylin verursachte Sättigung direkt über die Area Postrema und den Nucleus Tractus Solitarii des Hirnstamms vermittelt wird (T. A. Lutz *et al.* 1998b). Riediger und Rowland konnten zeigen, dass peripheres Amylin die Expression des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos in der AP und im NTS stimuliert (N. E. Rowland *et al.* 1997; T. Riediger *et al.* 2004). Nach einer Läsion der AP war die Fos-Induktion weder in der AP noch im NTS nachweisbar (T. Riediger *et al.* 2004). Die Thermoablation von aufsteigenden Nervenfasern zu AP und NTS führt zu einer Reduktion der anorexigenen Effekte von Amylin (T. A. Lutz *et al.* 1998b).

Bei Mäusen hat eine Vagotomie keinen Einfluss auf die von Amylin reduzierte Nahrungsaufnahme (J. E. Morley *et al.* 1994). Auch bei Ratten fand sich nach einer subdiaphragmatischen Vagotomie keine Hemmung der nahrungsinhibitorischen Wirkung von peripherem Amylin (T. A. Lutz *et al.* 1994; T. A. Lutz *et al.* 1995a). Eine Capsaicin-Vorbehandlung der Nerven im Splanchnicusgebiet zeigte eine unveränderte Hemmung der Nahrungsaufnahme nach intraperitonealer Amylininjektion (T. A. Lutz *et al.* 1998a). Die Versuche mit vagotomierten und Capsaicin vorbehandelten Ratten lassen darauf schließen, dass Amylin über zentrale Mechanismen wirkt und nicht über Afferenzen des N. Vagus (T. A. Lutz *et al.* 1994; T. A. Lutz *et al.* 1995a; T. A. Lutz *et al.* 1998a).

Die zentrale intraventrikuläre (icv.) Infusion von Amylin hemmt die 24-Stunden-Nahrungsaufnahme bei Ratten um 30%. (P. A. Rushing *et al.* 2000a; P. A. Rushing *et al.* 2001). Körpergewicht und retroperitoneales Fettgewebe der Ratten waren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (P. A. Rushing *et al.* 2000a). Die kontinuierliche Infusion des Amylinrezeptorblockers AC-187 in den 3. Ventrikel des Rattengehirns über zwei Wochen führte zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme, einer Zunahme des Körperfetts um 30% und einer Erhöhung des Insulinspiegels (P. A. Rushing *et al.* 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass auch Monoamine eine nahrungsregulatorische Funktion besitzen (W. T. Chance *et al.* 1992; T. A. Lutz *et al.* 2001; A. Mollet *et al.* 2001). Intrahypothalamische Injektionen von Amylin führten zu einem gesteigerten Transport des Serotoninprecursors Tryptophan und von Tyrosin in das Rattengehirn (W. T. Chance *et al.* 1992). Der Umsatz von Serotonin war damit gesteigert (W. T. Chance *et al.* 1992). Serotonin hat einen sättigenden

Effekt im Paraventriculären Nucleus (PVN) (S. F. Leibowitz, G. Shor-Posner 1986). Amylin könnte also über eine Erhöhung von Serotonin anorexigen wirken (W. T. Chance *et al.* 1992). Lutz *et al.* konnten an Ratten zeigen, dass die anorexigene Wirkung von intraperitonealem Amylin bei gleichzeitiger Gabe eines Dopamin-2-Rezeptor-Antagonisten abgeschwächt war (T. A. Lutz *et al.* 2001). Mollet *et al.* zeigten, dass bei transgenen Mäusen, denen der Histamin-1-Rezeptor fehlte, die sättigende Wirkung von Amylin vermindert war (A. Mollet *et al.* 2001). Somit scheint auch das histaminerge und dopaminerge System an der Mediation der Amylineffekte beteiligt zu sein (T. A. Lutz *et al.* 2001; A. Mollet *et al.* 2001).

Es wäre auch annehmbar, dass Amylin und sein Homologes Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) die Effekte auf die Nahrungsaufnahme über die anorexigenen Peptide Bombesin und CCK vermitteln (T. A. Lutz *et al.* 1997).

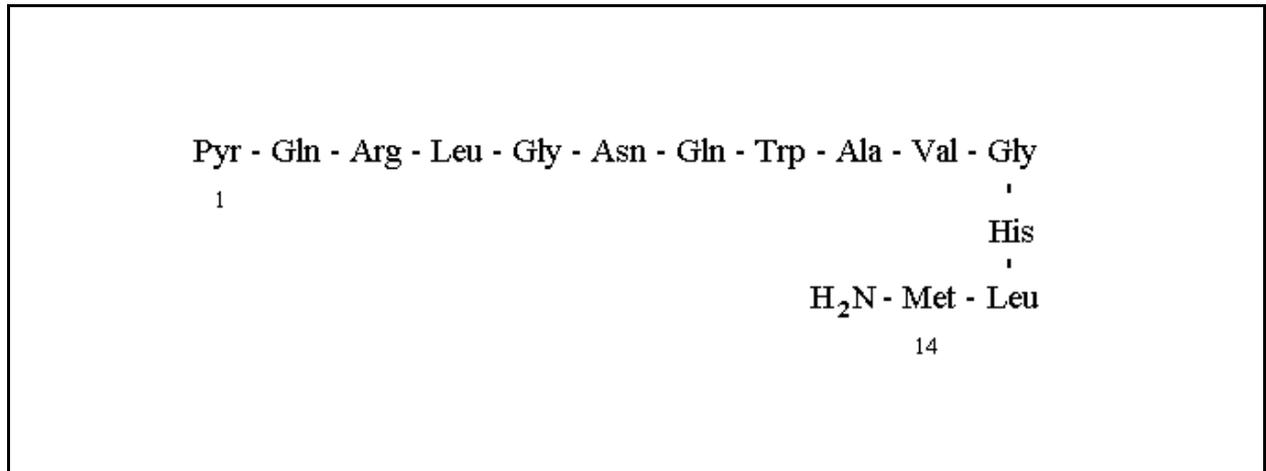
Neuropeptid Y (NPY) ist ein potenter Stimulator der Nahrungsaufnahme bei Ratten (B. G. Stanley, S. F. Leibowitz 1985). Die simultane icv. Infusion von NPY und Amylin führt zu einer dosis abhängigen Hemmung der NPY induzierten Nahrungsaufnahme bei Sprague Dawley-Ratten (M. J. Morris, T. Nguyen 2001). Weiterhin reduziert die chronische Gabe von Amylin über sechs Tage die Nahrungsaufnahme und senkt das Körpergewicht signifikant (M. J. Morris, T. Nguyen 2001). Dabei ist die NPY-Konzentration nicht erhöht, was eine Amylin spezifische Regulation vermuten lässt (M. J. Morris, T. Nguyen 2001). Eine physiologische Wechselwirkung von Amylin und NPY ist deshalb möglich (M. J. Morris, T. Nguyen 2001).

Somit zeigt sich, dass Amylin die Nahrungsaufnahme sowohl über zentrale als auch über periphere Mechanismen wie die Verzögerung der Magenentleerung reduzieren kann.

### 1.3 Bombesin

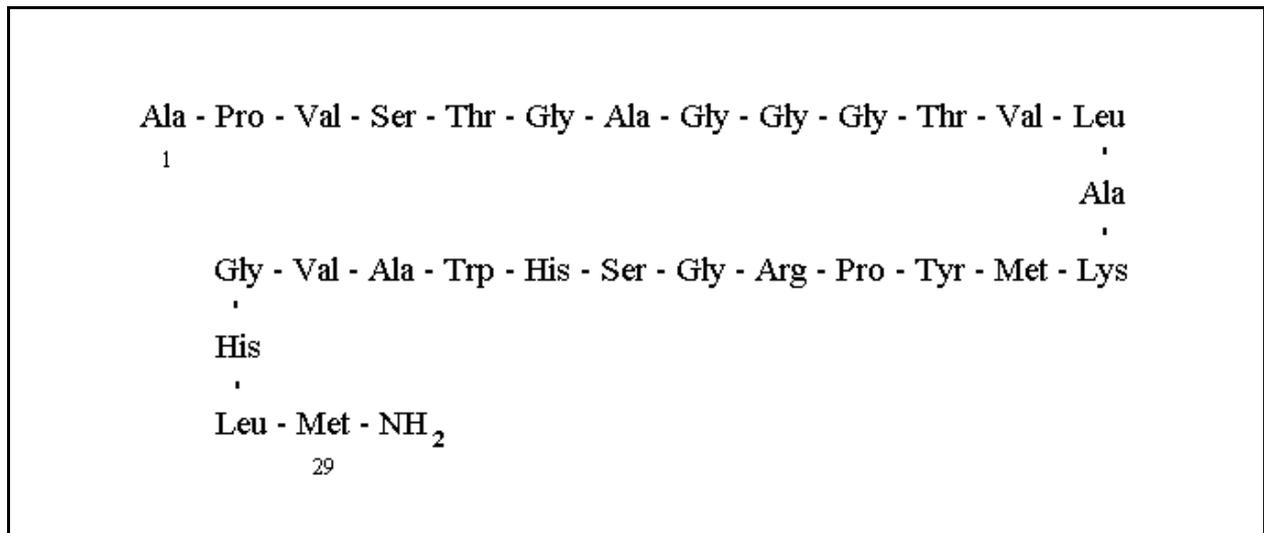
1970 konnte die Gruppe um Erspamer erstmalig ein Tetradekapeptid aus den Hautdrüsen der Rotbauchunke *Bombina bombina* isolieren (V. Erspamer *et al.* 1970; A. Anastasi *et al.* 1971) (Abbildung 1.3). Das Peptid erhielt, angelehnt an seinen Ursprung, den Namen Bombesin (V. Erspamer *et al.* 1970; A. Anastasi *et al.* 1971).

Abbildung 1.3

Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz von Bombesin (H. Ohki-Hamazaki *et al.* 2005)

Einige Jahre später gelang es, auch bei Säugetieren drei Bombesin verwandte Peptide zu identifizieren (T. J. McDonald *et al.* 1979; N. Minamino *et al.* 1983; N. Minamino *et al.* 1988). Mc Donald *et al.* entdeckten 1979 das Gastrin Releasing Peptide (GRP) im Magenantrum von Schweinen (T. J. McDonald *et al.* 1979). 1982 wies die Arbeitsgruppe um Panula mit Hilfe eines Antikörpers GRP in Anteilen des Paraventriculären Nucleus, Nucleus Tractus Solitarii und im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten nach (P. Panula *et al.* 1982). Der Name Gastrin Releasing Peptide (GRP) (Abbildung 1.4) leitet sich vom Haupteffekt ab, den dieses Bombesin ähnliche Peptid vermittelt, nämlich der Freisetzung des Hormons Gastrin (Q. H. Lu *et al.* 1986; S. Madaus *et al.* 1989).

Abbildung 1.4

Abbildung 1.4: Aminosäuresequenz von GRP der Ratte (H. Ohki-Hamazaki *et al.* 2005)

1983 wurde ein weiteres Bombesin homologes Peptid entdeckt, Neuromedin B (NMB) (N. Minamino *et al.* 1983; N. Minamino *et al.* 1988). Neuromedin B wurde aus dem Rückenmark von Schweinen isoliert und zeigt eine Sequenzhomologie zu Bombesin (N. Minamino *et al.* 1983). Ein Jahr später folgte die Entdeckung eines weiteren Neuromedins, Neuromedin C (NMC), ebenfalls aus dem Rückenmark des Schweins (N. Minamino *et al.* 1984). Neuromedin C zeigt eine komplette Übereinstimmung mit der aktiven carboxyterminalen Aminosäuresubsequenz (18-27) von GRP (N. Minamino *et al.* 1984; G. J. Schwartz *et al.* 1997). Neuromedin B und C sind Dekapeptide (N. Minamino *et al.* 1983; N. Minamino *et al.* 1988). Der Gruppe der Neuromedine wird eine Mediatorfunktion im komplexen neuronalen Netzwerk des Säugetiers zugeschrieben. (N. Minamino *et al.* 1983; N. Minamino *et al.* 1988). Insbesondere zeigen sie eine kontraktile Wirkung auf die glatte Muskulatur von Säugetieren (N. Minamino *et al.* 1983; N. Minamino *et al.* 1984).

Bombesin und seine Analoga wirken über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die sieben Transmembran-Domänen besitzen (Z. Fathi *et al.* 1993). Drei strukturell sehr ähnliche Rezeptoren konnten bisher identifiziert werden (E. R. Spindel *et al.* 1990b; E. Wada *et al.* 1991; V. Gorbulev *et al.* 1992). Alle drei werden von Bombesinagonisten aktiviert, besitzen jedoch verschiedene Affinitäten für GRP und NMB (Z. Fathi *et al.* 1996). Neuromedin B ist der Ligand des Bombesin-Rezeptors 1 (BB1-R) (E. Wada *et al.* 1991; H. Ohki-Hamazaki *et al.* 1997), während Gastrin Releasing Peptide und Bombesin an den Bombesin-2-Rezeptor (BB2-R) binden

(E. R. Spindel *et al.* 1990b; J. Battey *et al.* 1992). Der BB2-R, der die anorexigenen Effekte von Bombesin vermittelt, konnte vorrangig im PVN und NTS nachgewiesen werden (E. E. Ladenheim *et al.* 2002; T. W. Moody, Z. Merali 2004). Für den Bombesin-Rezeptor-Subtyp-3 (BRS-3) konnte bisher kein endogener Ligand gefunden werden (V. Gorbulev *et al.* 1992; H. Ohki-Hamazaki *et al.* 1997).

1979 untersuchten Gibbs *et al.* die Wirkung von exogenem Bombesin auf die Nahrungsaufnahme (J. Gibbs *et al.* 1979). Dabei zeigte sich, dass intraperitoneal (ip.) verabreichtes Bombesin die Nahrungsaufnahme bei Ratten hemmt (J. Gibbs *et al.* 1979). Auch für ip. appliziertes GRP sind sättigende Effekte bei Ratten beschrieben worden (L. J. Stein, S. C. Woods 1982). Bombesin und GRP zeigen ähnliche Dosiswirkungskurven, was darauf schließen lässt, dass das Gastrin Releasing Peptide ein potentes mammales Homologon zu Bombesin darstellt (L. J. Stein, S. C. Woods 1982; E. R. Spindel *et al.* 1990a). Auch die intracerebroventrikuläre (icv.) Injektion von Bombesin führt zu hemmenden Effekten auf die Nahrungsaufnahme bei Ratten (J. Gibbs *et al.* 1981). Die durch Bombesin vermittelten Effekte konnten sowohl nach peripherer als auch nach zentraler Applikation beobachtet werden (J. Gibbs *et al.* 1981; E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1988; E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Bei der Applikation von Bombesin in den Seitenventrikel konnte eine sättigende Wirkung gezeigt werden (J. Gibbs *et al.* 1981). Ebenfalls war eine Zunahme von Bewegungsdrang, Brunft- und Putzverhalten zu beobachten. (J. Gibbs *et al.* 1981). Bei der Applikation in den 4. Ventrikel genügten zur Vermittlung von Sättigung wesentlich geringere Dosen (1/100-1/1000) von Bombesin im Vergleich zur im Seitenventrikel notwendigen Dosis (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1988). Nach Injektion in den 4. Ventrikel konnten weder verstärkter Bewegungsdrang noch exzessives Paarungsverhalten beobachtet werden (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1988). Deshalb ist anzunehmen, dass der anorexigene Bombesineffekt vorrangig im Hirnstamm vermittelt wird (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1988; E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993).

Plötzlich ansteigende Glukosekonzentrationen im Perfusat führen zu höheren basalen Bombesinspiegeln im isoliert perfundierten Rattenmagen (V. Schusdziarra *et al.* 1986). Die Freisetzung von Bombesin mit Beginn der Nahrungsaufnahme ist deshalb anzunehmen.

Bei simultanen intraperitonealen Gaben der Peptide CCK-8 und Bombesin addieren sich die die Nahrungsaufnahme hemmenden Effekte bei Ratten (L. J. Stein, S. C. Woods 1981). Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass die Wirkungen von CCK und Bombesin über unterschiedliche Wege vermittelt werden (L. J. Stein, S. C. Woods 1981). Es konnte auch gezeigt werden, dass die sättigenden Effekte von Bombesin und CCK möglicherweise abhängig sind von der

Amylinfreisetzung aus pankreatischen Betazellen (T. A. Lutz *et al.* 1997). Dieser Wirkmechanismus bleibt bislang unklar (T. A. Lutz *et al.* 1997).

Eine komplette subdiaphragmatische Vagotomie bei Ratten hatte keinen Einfluss auf die Bombesin induzierte Hemmung der Nahrungsaufnahme (J. Gibbs 1985; J. Gibbs, G. P. Smith 1986). Um die Funktion des Hirnstamms bei der Regulation der Nahrungsaufnahme beurteilen zu können, wurden bei Ratten die Area Postrema (AP) und der Nucleus Tractus Solitarii (NTS) zerstört (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Die Versuchstiere, die lediglich eine AP-Läsion aufwiesen, reagierten auf den zentralen Bombesinstimulus nur schwach und zeigten ein geringeres Nahrungsaufnahmeverhalten (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Bei den Tieren, die simultane Defekte von AP und NTS aufwiesen, war die Wirkung von icv. appliziertem Bombesin auf die Nahrungsaufnahme komplett aufgehoben, d.h. Bombesin war nicht in der Lage, die Nahrungsaufnahme zu hemmen (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Nucleus Tractus Solitarii des Hirnstamms eine wichtige Rolle in der Integration des Effekts von zentralem Bombesin spielt (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993). Da in dieser Studie bei allen Versuchsgruppen eine Hemmung der Nahrungsaufnahme nach der Gabe von peripherem Bombesin beobachtet werden konnte, ist eine Vermittlung der Effekte über spinale Projektionen wahrscheinlich (E. E. Ladenheim, R. C. Ritter 1993).

Die Regulation von GRP geschieht über verschiedene Mechanismen (V. Schusdziarra *et al.* 1983; V. Schusdziarra *et al.* 1984; M. Matsuno *et al.* 1997). So konnte an isoliert perfundierten Rattenmägen nachgewiesen werden, dass die GRP-Freisetzung sowohl von verschiedenen Hormonen und Neurotransmittern moduliert werden kann als auch vom Magen-pH-Wert beeinflusst wird (V. Schusdziarra *et al.* 1983; V. Schusdziarra *et al.* 1984). 1997 beobachteten Matsuno *et al.*, dass die Gastrinfreisetzung nicht nur über Acetylcholin vermittelt wird, sondern auch über injiziertes Bombesin. (M. Matsuno *et al.* 1997). Die Applikation von Bombesin löste die Gastrinfreisetzung selbst bei einem sauren pH-Wert im isoliert perfundierten Rattenmagen aus (M. Matsuno *et al.* 1997).

Zahlreiche weitere physiologische Bombesineffekte konnten beschrieben werden. Die Injektion von Bombesin in die Substantia nigra (S. B. Calisher, D. D. Avery 1984) und auch eine icv. Injektion (M. Brown *et al.* 1977) lösen bei Ratten eine Hypothermie aus. Wird Bombesin zentral administriert, so verstärkt sich nicht nur der Bewegungsdrang bei Ratten, sondern auch das Putz- und Kratzverhalten (D. W. Schulz *et al.* 1984; S. Itoh *et al.* 1994). Bei Hunden führt die iv. Gabe von Bombesin zur Freisetzung von Gastrin, CCK und Substanz P (Q. H. Lu *et al.* 1986). Die Infusion von Bombesin in die Area Preoptica bei gesättigten Ratten führt zur Erhöhung von Corticosteron und freien Fettsäuren (A. M. Babcock *et al.* 1992). 1997 konnte bei Schafen

---

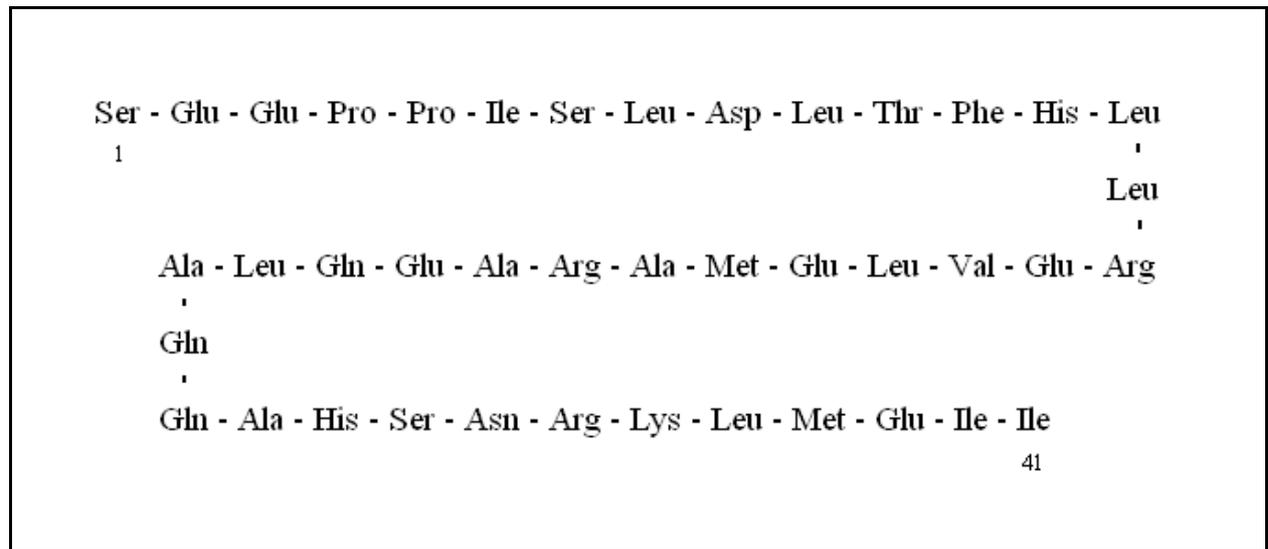
gezeigt werden, dass das Bombesin-homologe GRP die Freisetzung von Corticotropin Releasing Factor (CRF) bewirkt (C. L. Au *et al.* 1997). CRF ist nicht nur als Regulator von Corticosteronen bekannt, sondern auch als potentes anorexigenes Peptid (S. C. Heinrichs, G. F. Koob 1992). Somit wäre vorstellbar, dass Bombesin die Sättigung auch über eine Freisetzung von CRF bewirkt.

In der Zusammenfassung zeigt sich, dass sowohl die zentrale als auch die periphere Applikation von Bombesin oder GRP die Nahrungsaufnahme bei Nagetieren und auch Menschen reduziert. Diese Hemmung wird wahrscheinlich über den Nucleus Tractus Solitarius des Hirnstamms vermittelt.

#### **1.4 Corticotropin Releasing Factor (CRF)**

CRF ist ein 41 Aminosäuren langes Peptid (Abbildung 1.5), das erstmals im Hypothalamus von Schafen beschrieben wurde (A. P. Dhariwal *et al.* 1966). CRF setzt über die Hypophysen-Hypothalamus-Achse Adrenocorticotrophes Hormon (ACTH) frei (D. T. Chalmers *et al.* 1996). Bei Nagetieren integriert CRF die Antwort auf Stress (S. C. Heinrichs *et al.* 1992b; H. Mönnikes *et al.* 1992b), setzt soziale Interaktionen herab (H. Mönnikes *et al.* 1992a; S. C. Heinrichs *et al.* 1997b) und beeinflusst die Magen-Darm-Motilität (H. Mönnikes *et al.* 1992b; H. Mönnikes *et al.* 2000). Eine der Hauptfunktionen, die CRF zugeschrieben werden, liegt in der Verringerung der durch Neuropeptid Y (NPY) induzierten Nahrungsaufnahme bei Ratten (S. C. Heinrichs *et al.* 1992a; S. C. Heinrichs *et al.* 1993). Auch Bombesin vermittelt vermutlich seine anorexigene Wirkung über eine Freisetzung von CRF (H. Plamondon, Z. Merali 1997).

Abbildung 1.5

Abbildung 1.5: Aminosäuresequenz von CRF der Ratte (T. M. Reyes *et al.* 2001)

CRF positive Neurone konnten in verschiedenen Hirnregionen detektiert werden (T. S. Gray, D. J. Magnuson 1987; D. L. Tempel *et al.* 1993). Dazu gehört zum einen die Amygdala, ein Hirnkern, der vor allem bei der Antwort auf Angst und Stress eine Rolle spielt (T. S. Gray, D. J. Magnuson 1987; T. S. Gray 1993). CRF-Neurone der Amygdala haben zahlreiche direkte Verbindungen zum Hypothalamus, Hirnstamm und zum vagalen Komplex (M. Sakanaka *et al.* 1986; T. S. Gray, D. J. Magnuson 1987; T. S. Gray 1993). Zum anderen konnten CRF- und Corticosteron-Rezeptoren im PVN des Hypothalamus beobachtet werden (T. S. Gray, D. J. Magnuson 1987; T. S. Gray 1993). Für den PVN konnte gezeigt werden, dass er die Antwort auf Hunger und Sättigkeit beeinflusst (D. L. Tempel *et al.* 1993; C. M. Kotz *et al.* 1998).

Zwei CRF-Rezeptoren können unterschieden werden. Während der CRF-1-Rezeptor (CRF-1-R) im Neokortex und im Cerebellum von Ratten gefunden wurde, befindet sich der CRF-2-Rezeptor (CRF-2-R) in der Amygdala, im Ventromedialen Hypothalamus (VMH) und im PVN (R. J. Primus *et al.* 1997). Die Hypophyse exprimiert den CRF-1-R (D. T. Chalmers *et al.* 1995; T. W. Lovenberg *et al.* 1995), der zur Antwort auf Angst beiträgt (S. C. Heinrichs *et al.* 1997a), jedoch nicht den CRF-2-R (D. T. Chalmers *et al.* 1995; T. W. Lovenberg *et al.* 1995).

Neben CRF existieren weitere endogene Struktur homologe Substanzen, die Urocortine. (J. Vaughan *et al.* 1995; T. M. Reyes *et al.* 2001; K. Lewis *et al.* 2001). Die Gruppe um Vaughan konnte Urocortin I im Rattengehirn identifizieren (J. Vaughan *et al.* 1995). Urocortin I ist ein 40

Aminosäuren langes Peptid, das an beide CRF-Rezeptoren bindet, jedoch eine höhere Affinität zum CRF-2-Rezeptor aufweist als CRF selbst (J. Vaughan *et al.* 1995). Zentrale und periphere Gaben von Urocortin I beeinflussen das Hungergefühl und sind potenter in der Reduktion der Nahrungsaufnahme als CRF, ohne dabei die CRF typischen Effekte auf motorische Aktivierung und Angst auszuüben (M. Spina *et al.* 1996).

Das aus 38 Aminosäuren bestehende Urocortin II bindet mit hoher Affinität an den CRF-2-Rezeptor und reduziert die nächtliche Nahrungsaufnahme bei Ratten, ohne den Bewegungsdrang zu verstärken (T. M. Reyes *et al.* 2001). Zellen, die Urocortin II aufweisen, konnten im PVN, Nucleus Arcuatus (NARC) und Locus Coeruleus identifiziert werden (T. M. Reyes *et al.* 2001).

Urocortin III konnte nicht nur im Gehirn, sondern auch im Dünndarm und in Hautzellen von Mäusen detektiert werden (K. Lewis *et al.* 2001). Urocortin III bindet an CRF-2-Rezeptoren (K. Lewis *et al.* 2001). Die physiologischen Effekte von Urocortin III sind noch nicht bekannt (K. Lewis *et al.* 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CRF und die Struktur homologen Substanzen anorexigen wirken und an der Stressantwort bei Nagetieren beteiligt sind.

## 1.5 Ghrelin

Im Jahr 1999 wurde Ghrelin von der Gruppe um Kojima im Magen von Ratten entdeckt (M. Kojima *et al.* 1999). Ghrelin ist der endogene Ligand des Growth Hormone Secretagogue Rezeptors (GHS-R) (M. Kojima *et al.* 1999). Ghrelin besteht aus 28 Aminosäuren (M. Kojima *et al.* 1999). Auffällig an der Ghrelinstruktur ist die kovalente Bindung mit einem Oktanylrest am Serin in dritter Position (M. Kojima *et al.* 1999). Diese lipophile Gruppe ist essenziell für die Bioaktivität von Ghrelin und für den gerichteten Transport des Moleküls durch die Blut-Hirn-Schranke (W. A. Banks *et al.* 2002). Das Wort Ghrelin hat einen protoindoeuropäischen Ursprung und beschreibt eine der Hauptfunktionen des Peptids, nämlich die Freisetzung von Wachstumshormon *in vivo* und *in vitro* (engl. release of growth hormone) (M. Kojima *et al.* 1999). Des Weiteren stimuliert Ghrelin die Kurzzeitznahrungsaufnahme bei Nagetieren und Menschen (M. Tschöp *et al.* 2000; A. M. Wren *et al.* 2001a). Ghrelin konnte sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen identifiziert werden, wobei die Sequenz von humanem Ghrelin nur in zwei Aminosäuren vom Rattenghrelin abweicht (M. Kojima *et al.* 1999) (Abbildung 1.6).



NPY-Expression im NARC führt (A. Asakawa *et al.* 2001b). NPY gilt als eine der zerebralen Hauptsustanzen, die die Nahrungsaufnahme stimulieren (F. B. Jolicœur *et al.* 1991).

Ghrelin induziert Adipositas bei Ratten (M. Tschöp *et al.* 2000). Die periphere tägliche Gabe von Ghrelin führt zu einer Gewichtszunahme durch reduzierte Nutzung von Fettreserven und durch eine gesteigerte Nahrungsaufnahme bei Mäusen und Ratten (M. Tschöp *et al.* 2000). Auch die zentrale Gabe von Ghrelin verursacht ein erhöhtes Körpergewicht der Tiere durch eine gesteigerte Nahrungsaufnahme (M. Tschöp *et al.* 2000). Der orexigene Effekt von icv. verabreichtem Ghrelin konnte sowohl bei gesättigten als auch bei ungesättigten Tieren beobachtet werden (A. M. Wren *et al.* 2000; A. M. Wren *et al.* 2001b). Tschöp *et al.* beobachteten, dass Versuchsratten im Fastenzustand erhöhte Ghrelinspiegel aufweisen, während die Applikation von Glukose erniedrigte Ghrelinspiegel verursacht (M. Tschöp *et al.* 2000). In Humanstudien zeigte sich, dass Ghrelin präprandial ansteigt und postprandial abfällt (D. E. Cummings *et al.* 2001). Vergleichende Studien zum nahrungsregulatorischen Effekt von icv. appliziertem NPY und Ghrelin ergaben, dass für den gleichen orexigenen Effekt bei Ratten 5 nmol NPY notwendig sind, jedoch nur 3 nmol Ghrelin (A. M. Wren *et al.* 2000). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Ghrelin möglicherweise die Nahrungsaufnahme wesentlich stärker stimuliert als NPY.

Die intraperitoneale Gabe von Ghrelin induziert die Expression des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos in Zellkörpern des NARC (A. K. Hewson, S. L. Dickson 2000; L. Wang *et al.* 2002) und des PVN (J. Rüter *et al.* 2003). Sowohl bei gefasteten als auch gesättigten Ratten konnte die systemische Gabe von Ghrelin Fos im NARC induzieren (A. K. Hewson, S. L. Dickson 2000). Der Ghrelin-Rezeptor (GHS-R) wird vor allem im NARC und PVN exprimiert (X. M. Guan *et al.* 1997). Die Arbeitsgruppe um Taché konnte zeigen, dass 90% der Fos aktivierten Neurone im NARC NPY positiv sind (L. Wang *et al.* 2002). Die simultane Anwendung von icv. appliziertem Ghrelin und speziellen Antagonisten gegen NPY und AgRP unterdrückt den orexigenen Ghrelineffekt (M. Nakazato *et al.* 2001). Eine Regulation der Ghrelin induzierten Kurzzeitnahrungsaufnahme über NPY/AgRP positive Neurone wird daher angenommen.

Zusätzlich wies die Gruppe um Toshinai direkte Verbindungen von Ghrelin aktivierten Neuronen mit Orexinzellen nach (K. Toshinai *et al.* 2003). Orexin ist ein kürzlich entdeckter Botenstoff, der im lateralen und posterioren Hypothalamus detektiert wurde (T. Sakurai *et al.* 1998). Orexin ist wie Ghrelin an der Induktion von Hunger beteiligt (T. Sakurai *et al.* 1998). Die Orexinneurone im Hypothalamus erhalten wiederum afferente Signale von NPY/AgRP positiven Neuronen aus dem Hypothalamus (T. Sakurai 1999). Die icv. Gabe von Ghrelin induziert Fos in

Orexinzellen (K. Toshinai *et al.* 2003). Diese Fos-Induktion war auch bei Gabe von Anti-NPY-Immunglobulinen nachweisbar (K. Toshinai *et al.* 2003). Damit ist es möglich, dass Ghrelin auf zwei unterschiedlichen Wegen, nämlich zum einen über die Aktivierung von Orexinzellen und zum anderen über die Aktivierung von NPY/AgRP-Neuronen die Nahrungsaufnahme induziert.

Nach peripherer Applikation von Ghrelin war im Hirnstamm keine Neuronenaktivierung nachweisbar (L. Wang *et al.* 2002; J. Rüter *et al.* 2003). Eine andere Studie konnte jedoch nach einer hoch dosierten peripheren Applikation von Ghrelin eine Neuronenaktivierung in NTS und AP zeigen (Y. Li *et al.* 2006).

Der Ghrelin-Rezeptor konnte an vagalen afferenten Neuronen nachgewiesen werden (Y. Date *et al.* 2002). Bei Tieren, die entweder eine Vagotomie oder eine Behandlung mit Capsaicin, einem spezifischen Neurotoxin, erhielten, war die durch intravenös appliziertes Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme gehemmt (Y. Date *et al.* 2002). Des Weiteren führte die mechanische sowie chemische Durchtrennung des N. Vagus zu einer erniedrigten Freisetzung von Wachstumshormon (GH) und zu einer Verminderung von NPY produzierenden Neuronen im Gehirn (Y. Date *et al.* 2002). Deshalb ist eine Vermittlung der orexigenen Effekte von Ghrelin über den N. Vagus anzunehmen (Y. Date *et al.* 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ghrelin die Kurzzeitnahrungsaufnahme bei Nagetieren steigert und dieser Effekt über NPY/AgRP positive Neurone im NARC vermittelt wird.

## 1.6 Der neuronale Marker Fos

Fos ist ein Protein, das basal in Neuronen existiert (M. Dragunow, R. Faull 1989). Eine erhöhte Expression von Fos-m-RNA findet sich in einzelnen Neuronen, aber auch Neuronengruppen, nach unspezifischer Stimulation (M. Dragunow, R. Faull 1989; G. E. Hoffman *et al.* 1993). Die Detektion der Expression von immediate early gene-Produkten wie Fos oder Jun in einzelnen Zellkernen von Neuronen kann als Marker für Zellaktivierung genutzt werden (G. E. Hoffman *et al.* 1993). Die Bedeutung von Fos als Transkriptionsfaktor und funktioneller Marker von aktivierten Neuronen ist vielfach untersucht worden und von Wichtigkeit für immunhistochemische und neuroendokrine Studien (G. E. Hoffman *et al.* 1993; K. J. Kovacs 1998). Somit ist das immediate early gene-Produkt Fos ein Marker für neuronale Aktivität im Zentralen Nervensystem (P. Kobelt *et al.* 2004). Mit Hilfe von Fos kann die Erregung von polysynaptisch verknüpften Hirnregionen gemessen werden (S. M. Sagar *et al.* 1988). Deshalb besteht die Möglichkeit, die funktionelle Interaktion verschiedener Neuronengruppen zu erfassen

und zu interpretieren (S. M. Sagar *et al.* 1988). Aus diesem Grund spielt die Fos-Detektion eine wichtige Rolle in vielen experimentellen Studien (P. Kobelt *et al.* 2004).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Fos aktivierten Zellen durch Bestimmung der zytoplasmatisch gelegenen Substanzen zu phänotypisieren (G. E. Hoffman *et al.* 1993). Diese Bestimmung kann mit Hilfe von immunhistochemischen Doppelfärbungen erfolgen (G. E. Hoffman *et al.* 1993).

Nicht nur die mechanische, sondern auch die chemische Reizung von Neuronen kann eine Fos-Expression induzieren (M. Lanteri-Minet *et al.* 1993). Die periphere Injektion von Ghrelin, Bombesin und Amylin induziert neuronale Aktivität in verschiedenen Hirnregionen, die in die Regulation von Hunger und Sättigkeit involviert sind.

Die intraperitoneale Gabe von Ghrelin induziert eine Fos-Expression im NARC von Ratten und Mäusen (A. K. Hewson, S. L. Dickson 2000; L. Wang *et al.* 2002; P. Kobelt *et al.* 2005) und im PVN des Hypothalamus bei Ratten (J. Rüter *et al.* 2003; P. Kobelt *et al.* 2005). Eine Doppelfärbung zeigte, dass die von peripherem Ghrelin aktivierten Neurone im NARC die orexigenen Peptide NPY und AgRP enthalten (L. Wang *et al.* 2002).

Die periphere Applikation von Bombesin induziert Fos-Immunreaktivität im PVN, NTS und in der AP (B. Bonaz *et al.* 1993; B. H. Li, N. E. Rowland 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass Bombesin Einfluss auf den Corticotropin Releasing Factor (CRF) hat (C. L. Au *et al.* 1997). Eine der Hauptquellen für hypothalamisches CRF sind Neurone im PVN (D. L. Tempel *et al.* 1993). Die icv. Gabe von Bombesin erhöht die Expression von CRF im Hypothalamus (L. Olsen *et al.* 1992; P. Kent *et al.* 2001a; P. Kent *et al.* 2001b). Hypothalamisches CRF spielt zum einen eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung endokriner und verhaltensbiologischer Antworten auf Stressreize, zum anderen bei der Hemmung der Nahrungsaufnahme und Beeinflussung der Motilität im Gastrointestinaltrakt (T. Shibasaki *et al.* 1988; S. C. Heinrichs *et al.* 1992a; H. Mönnikes *et al.* 1992a; H. Mönnikes *et al.* 1992b).

Riediger und Rowland konnten zeigen, dass peripheres Amylin Fos in Hirnkernen induziert, die durch zahlreiche reziproke Projektionen interagieren (N. E. Rowland *et al.* 1997; T. Riediger *et al.* 2004). Dazu gehören die Area Postrema, der Nucleus Tractus Solitarii, die Amygdala und der Laterale Parabrachiale Nucleus (PBN) (N. E. Rowland *et al.* 1997; T. Riediger *et al.* 2004). Die Gruppe um Riediger zeigte außerdem, dass gefastete Ratten eine erhöhte Fos-Expression im lateralen Hypothalamus aufweisen (T. Riediger *et al.* 2004). Diese Fos-Aktivität konnte durch die Gabe von peripherem Amylin reduziert werden (T. Riediger *et al.* 2004).

## 1.7 Interaktionen nahrungsregulatorischer Peptide

Zahlreiche Wechselwirkungen zwischen orexigenen und anorexigenen Substanzen konnten in der Vergangenheit bereits beschrieben werden.

Leptin, das im Fettgewebe produziert wird, ist ein Appetit hemmender Faktor, der Sättigungssignale von der Peripherie zum Gehirn vermittelt (J. M. Friedman 2002). CCK, das nach der Nahrungsaufnahme aus dem Dünndarm freigesetzt wird, spielt eine Rolle in der Beendigung der Nahrungsaufnahme (P. Kobelt *et al.* 2005). Die simultane ip. Gabe von CCK und Leptin senkte die Kalorienaufnahme bei Ratten signifikant im Vergleich zur Gruppe, die lediglich Leptin allein erhielt. Wurde zwei bis drei Stunden im Anschluss an eine icv. Injektion von Leptin CCK ip. appliziert, so konnten ein stärkerer hemmender Effekt auf die Nahrungsaufnahme und eine potentere Steigerung der Gewichtsabnahme über 48 Stunden nachgewiesen werden als bei einer alleinigen Leptininjektion (C. A. Matson, R. C. Ritter 1999). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass der CCK-1-Rezeptor an der Vermittlung des Leptineffekts beteiligt ist (M. Buyse *et al.* 2001; S. Guilmeau *et al.* 2002). Eine simultane Applikation von Leptin und einem CCK-1-Rezeptorantagonisten hemmt die stimulierende Wirkung von Leptin auf die exkretorische Pankreasfunktion bei Ratten (S. Guilmeau *et al.* 2002). Die zentrale Gabe von Leptin und CCK in den 3. Ventrikel von Ratten steigert die Fos-Expression sowohl in AP und NTS als auch im hypothalamischen PVN im Vergleich zur alleinigen Applikation der Peptide (M. Emond *et al.* 1999). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CCK und Leptin synergistische Effekte auf die Hemmung der Nahrungsaufnahme bei Ratten zeigen.

Auch für Ghrelin konnte eine Wechselwirkung mit Leptin gezeigt werden. NPY/AgRP positive Neurone im NARC scheinen in die Effekte von Ghrelin und Leptin involviert zu sein (M. Kojima, K. Kangawa 2005). Während Ghrelin NPY/AgRP-Neurone stimuliert, hemmt Leptin diese Neurone (M. Kojima, K. Kangawa 2005) und damit die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme (S. P. Kalra *et al.* 2005). Auch die Hemmung der Sekretion von Ghrelin aus dem Magen durch Leptin konnte beobachtet werden (S. P. Kalra *et al.* 2005). Somit kann Ghrelin als funktioneller Antagonist zu Leptin gesehen werden (M. Kojima, K. Kangawa 2005).

Bei der simultanen ip. Gabe von CCK und Ghrelin hemmt CCK die Ghrelin induzierte Nahrungsaufnahme bei Ratten sowie die Ghrelin induzierte Fos-Expression im NARC (P. Kobelt *et al.* 2005). Die Vermittlung des sättigenden Effekts von CCK erfolgt über den N. Vagus (G. P. Smith *et al.* 1981). CCK induziert eine Fos-Expression in Neuronen des PVN über Capsaicin sensitive vagale Afferenzen (H. Mönnikes *et al.* 1997). Auch die orexigene Wirkung von Ghrelin wird zum Teil über vagale Afferenzen vermittelt (Y. Date *et al.* 2002). Vor kurzem konnten Date

---

*et al.* zeigen, dass die iv. Injektion von CCK die Ghrelin induzierte Senkung der Aktivität gastraler vagaler Afferenzen hemmt (Y. Date *et al.* 2002). Ein hemmender Einfluss von CCK auf Ghrelin, der den Hypothalamus und vagale Projektionen zum Gehirn involviert, kann somit angenommen werden.

Das zur Familie der Pankreatischen Polypeptide (PP) gehörende Peptid YY (PYY) wird postprandial aus dem distalen Gastrointestinaltrakt frei gesetzt und bindet mit hoher Affinität an den NPY-2-Rezeptor (NPY-2-R) (R. L. Batterham, S. R. Bloom 2003; S. Koda *et al.* 2005). PYY hemmt die Nahrungsaufnahme bei Ratten und Menschen vermutlich über eine NPY-2-R vermittelte Senkung der elektrischen Aktivität von NPY haltigen Nervenfasern und Aktivierung von POMC-Neuronen im NARC (R. L. Batterham *et al.* 2002). Peripheres PYY induziert eine Fos-Expression in Neuronen des NARC und steigert die Depolarisationsrate des N. Vagus (R. L. Batterham *et al.* 2002; S. Koda *et al.* 2005). Eine Vagotomie hemmt die anorexigenen Effekte von peripherem PYY und die Fos-Expression im NARC (S. Koda *et al.* 2005). Auch peripher appliziertes Ghrelin wirkt über den N. Vagus und induziert den Marker Fos in NPY positiven Neuronen des NARC (L. Wang *et al.* 2002). Eine Interaktion von PYY und Ghrelin bei der Vermittlung von Effekten auf die Nahrungsaufnahme ist wahrscheinlich.

Aus den gezeigten Daten geht hervor, dass Ghrelin zahlreiche Beziehungen zu anderen, die Nahrungsaufnahme beeinflussende, Peptiden hat.

---

## 1.8 Ziele der Studie

Bombesin und Amylin zeigen gegenüber Ghrelin antagonistische Effekte bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Während Bombesin und Amylin die Nahrungsaufnahme hemmen, wird diese durch Ghrelin gesteigert. Alle drei Peptide führen zu einer Neuronenaktivierung im Bereich des Hirnstamms und in verschiedenen Regionen des Hypothalamus. All diese Nervenkerne sind beteiligt an der neuroendokrinen Regulation von Hunger und Sättigung.

Damit stellte sich die Frage, ob peripher appliziertes Bombesin oder Amylin modulierende Einflüsse auf die orexigenen und neurostimulatorischen Effekte von peripherem Ghrelin bei Ratten ausüben. Die Studie gliederte sich deshalb in einen verhaltensbiologischen und einen immunhistochemischen Teil.

Verhaltensbiologisch erfolgte die Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme bei frei gefütterten männlichen Ratten über einen Zeitraum von zwei Stunden nach intraperitonealer Gabe von entweder Bombesin und Ghrelin oder Amylin und Ghrelin.

Nach simultanen Injektionen von Ghrelin und Bombesin folgte im Anschluss an die transkardiale Perfusion und die immunhistochemische Aufarbeitung die Messung neuronaler Aktivität, mit Hilfe des Markers Fos, in Neuronen des NARC, PVN und NTS. Zusätzlich erfolgte die immunhistochemische Phänotypisierung von Fos aktivierten Neuronen im PVN.