
2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

Peptide

Amylin	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland
Bombesin	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland
Ghrelin	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland

Antisera

Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
FITC-goat anti-rabbit IgG	Sigma, St. Louis, USA
Guinea pig anti-CRF Protein	Biotrend, Köln, Deutschland
Normal goat serum (NGS)	Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA
Normal rabbit serum (RbNS)	Sigma, St. Louis, USA
rabbit anti-rat-c-Fos	Oncogene Research Products, Boston, USA
TRITC-rabbit-anti-guinea pig IgG	Sigma, St. Louis, USA

Medikamente

Ketamin (Ketanest [®])	Curamed, Karlsruhe, Deutschland
Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Braun, Melsungen, Deutschland
Liquemin [®]	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Longasteril [®] 70	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Rompun [®] 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Chemikalien

1,4-Diazabicyclo-(2.2.2)-oktan (DABCO)	Sigma, St. Louis, USA
4'-6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, St. Louis, USA
Einbettmedium (Tissue freezing medium [®])	Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Flüssigstickstoff	AGA GesmbH, Schwechat, Österreich
Glutardialdehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumazid (NaN_3)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumborhydrid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
n-Hexan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oberflächendesinfektionsmittel (Softasept N)	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma, St. Louis, USA
Pikrinsäure	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland
<u>Geräte</u>	
Gefrierschrank (Liebherr Premium $-20\text{ }^\circ\text{C}$)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (Ultra low freezer $-85\text{ }^\circ\text{C}$)	New Brunswick Scientific, New Brunswick, Kanada
Horizontalschüttler (HS 250 Basic)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM 510)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryotom (HM 500 OM)	Mikrom Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Kühlschrank (Liebherr Premium)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Perfusionsmaschine	Technische Forschungslabore der Charité, Berlin, Deutschland
<u>Verschiedenes</u>	
Deckglas (24x46 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Faltenfilter	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren Deutschland
Glaspipette (stumpf)	Pasteur Capillary Pipette, 150 mm, WU Mainz, Deutschland

Käfigeinstreu (Lignocel [®] Hygienic Animal Bedding)	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland
Kanüle (BD Microlance [®] 0,4 mm x 19 mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ III	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ IV	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Messer für Kryotom (16 cm)	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Objektträger (Super Frost)	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Plastikgefäß (Blue Max [®])	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Plexiglas-Gehirnmatrix	Technische Forschungslabore der Charité, Berlin, Deutschland
Skalpell (Feather [®] Nummer 21)	Medizin AG Köln, Deutschland
Spritze (BD Plastipak [®])	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Standard-Rattenfutter (Altromin [®])	Lage, Deutschland
Zellkulturplatten (Multiwell [®] 24 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

Nicht aufgeführte Chemikalien sind in *pro analysi* Qualität von der Firma Merck (Merck, Darmstadt, Deutschland) bezogen worden.

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague Dawley-Ratten der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet.

2.1.1 Versuchslösungen

2.1.1.1 Phosphatpuffer

Die Herstellung von 1000 ml 0,1 molarem (0,1 M) Phosphatpuffer (PBS) erforderte 80 g Natriumchlorid (NaCl), 2 g Kaliumchlorid (KCl), 14 g Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), 2 g Natriumhydroxid (NaOH) und 2g Natriumazid (NaN_3), die in 800 ml *aqua bidest.* gelöst wurden. Nach der Einstellung des pH-Werts auf 6,81 wurde die Lösung mit *aqua bidest.* auf 1000 ml aufgefüllt. Bei einer Abweichung vom pH-Wert 6,81 wurde dieser auf den Sollwert korrigiert. Um die Endkonzentration von 0,1 M PBS zu erreichen, wurde ein Teil dieser Lösung mit neun Teilen *aqua bidest.* gemischt.

2.1.1.2 Saccharoselösungen

In den Experimenten wurden Saccharoselösungen in drei verschiedenen Konzentrationen verwendet (5%, 15%, 27,3%).

Zur Herstellung 5%iger Saccharoselösung wurden 50 g Saccharose und 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml *aqua bidest.* gelöst. Nach der pH-Wert-Einstellung auf 7,4 erfolgten das Auffüllen der Lösung auf 1000 ml und die Filtrierung durch einen Faltenfilter (Durchmesser 27 cm). Die Lagerung der Saccharoselösung fand im Kühlschrank bei 4 °Celsius statt.

Für die Herstellung von 15%iger Saccharoselösung wurden 150 g Saccharose in 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml *aqua bidest.* gelöst. Das weitere Vorgehen wurde analog dem für 5%ige Saccharoselösung durchgeführt.

Für eine Konzentration der Saccharoselösung von 27,3% wurden 273,84 g Saccharose und 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 500 ml *aqua bidest.* gelöst und analog den oben beschriebenen Vorgängen verarbeitet.

2.1.1.3 Fixierungslösung PgPik

Um 2000 ml Fixierungslösung (PgPik) herzustellen, wurden 80 g Paraformaldehyd in 1500 ml *aqua bidest.* gelöst und auf 60 °Celsius erhitzt. 300 µl 10 M NaOH wurden hinzugefügt, um die Lösung aufzuklären. Nach dem Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurden 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 4 ml Glutaraldehyd und 333 ml gesättigte Pikrinsäure hinzugefügt und die

Lösung mit *aqua bidest.* auf 2000 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 eingestellt und die Lösung filtriert. Die Lagerung erfolgte licht geschützt bei 4 °Celsius.

2.1.1.4 Plasmaexpander

Zur Austreibung des Blutes aus dem Gefäßsystem wurde der Plasmaexpander Longasteril® mit Elektrolyten verwendet.

2.1.2 Peptide

2.1.2.1 Vorbereitung von Ghrelin, Bombesin und Amylin

Ghrelin (1 mg) der Ratte und Bombesin (1 mg) wurden in *aqua bidest.* in Lösung gebracht. Amylin (1 mg) der Ratte wurde in 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA) gelöst. Die Lagerung der Peptide erfolgte bei -20 °Celsius im Gefrierschrank.

Unmittelbar vor dem Experiment erfolgte die Verdünnung der Substanzen in 0,15 M steriler Kochsalzlösung (0,9%), um die finalen Konzentrationen von 13 µg/kg KG Ghrelin (4 nmol/kg KG), 4 oder 8 µg/kg KG Bombesin (2,5 oder 5 nmol/kg KG) und 1 oder 5 µg/kg KG Amylin (0,3 oder 1,5 nmol/kg KG) zu erreichen.

Für die Dauer des Experiments wurden die Lösungen auf Eis aufbewahrt.

2.1.3 Versuchstiere

Alle Tierversuche waren durch die Tierschutzkommission beim Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer 0089/03, 01.04.2003).

Männliche Sprague Dawley-Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 180-200 g wurden von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Die Haltung in Gruppen von vier Tieren fand bei *ad libitum* Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter in Makrolon-Käfigen Typ IV unter kontrollierten Umweltbedingungen statt. Als Einstreu diente Lignocel® Hygienic Animal Bedding.

Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °Celsius. Die Luftfeuchtigkeit lag bei 60%. Der Tag-Nacht-Rhythmus war durch eine Zeitschaltuhr geregelt, wobei die Tag-Phase von 06.30 Uhr bis 18.30 Uhr andauerte.

Die Ratten wurden in der Regel drei Wochen vor dem Experiment bezogen und an ihre Umgebung gewöhnt. In den ersten sieben Tagen wurden die Tiere im Käfig belassen. In den folgenden zwei Wochen wurden die Ratten täglich den Versuchsbedingungen ausgesetzt, um eine Gewöhnung an den Untersucher und die experimentelle Vorgehensweise zu erreichen. Dazu gehörte eine Separierung der Ratten in Individualkäfige (Makrolon Typ III) über einen Zeitraum von maximal zwei Stunden und das sogenannte Handling. Dabei wurden die Tiere mit den Händen berührt und in verschiedene Körperpositionen bewegt, u.a. in die Rückenlage. Die Rückenlage war die Position, in der die intraperitoneale Injektion verabreicht wurde. Durch die Gewöhnungsphase und das Handling sollten die Versuchsbedingungen optimiert und der Stress für die Tiere minimiert werden. Zum Zeitpunkt des Experiments hatten die Ratten ein Gewicht von 250-300 g.

2.2 Methoden

2.2.1 Durchführung der verhaltensbiologischen Experimente

2.2.1.1 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Nahrungsaufnahme

Die verhaltensbiologischen Experimente zur Bestimmung der kumulativen Nahrungsaufnahme über zwei Stunden begannen zwischen 08.00 und 11.00 Uhr. Zu dieser Tageszeit zeigen gesättigte Ratten ihr niedrigstes Nahrungsaufnahmeverhalten.

Alle Injektionen hatten ein Volumen von 0,5 ml und wurden intraperitoneal (ip.) vorgenommen.

Die gesättigten Tiere wurden in sechs Versuchsgruppen unterteilt. Appliziert wurden Ghrelin (13 µg/kg KG), Bombesin (4 oder 8 µg/kg KG), Ghrelin (13 µg/kg KG) und Bombesin (4 oder 8 µg/kg KG) oder Vehikel (0,15 M NaCl) (Tabelle 2.1).

Nach der Gewichtskontrolle der Ratten erfolgte die ip. Injektion. Danach wurden die Tiere für den Messzeitraum von zwei Stunden in Käfige vereinzelt. Die Versuchstiere erhielten eine definierte Menge an Standardrattenfutter und *ad libitum* Zugang zu Wasser. Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde aus der Differenz zur vorher bereit gestellten Nahrungsmenge ermittelt und als g/kg KG angegeben. Die Messungen erfolgten 30 Minuten, eine Stunde und zwei Stunden nach der Injektion.

Tabelle 2.1: Versuchsgruppen der Ghrelin/Bombesin-Studie

Versuchsgruppe	Simultane Injektionen		Anzahl (n)
Gruppe 1	Vehikel (0,15 M NaCl)	Vehikel (0,15 M NaCl)	n = 20
Gruppe 2	Vehikel(0,15 M NaCl)	Bombesin (4 µg/kg KG)	n = 15
Gruppe 3	Vehikel (0,15 M NaCl)	Bombesin (8 µg/kg KG)	n = 15
Gruppe 4	Vehikel(0,15 M NaCl)	Ghrelin (13 µg/kg KG)	n = 20
Gruppe 5	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Bombesin (4 µg/kg KG)	n = 15
Gruppe 6	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Bombesin (8 µg/kg KG)	n = 15

2.2.1.2 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Amylin auf die Nahrungsaufnahme

Dieses Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie unter 2.2.1.1 beschrieben. Analog der verhaltensbiologischen Studie zu Ghrelin und Bombesin wurde auch hier ein Volumen von 0,5 ml intraperitoneal (ip.) appliziert (Tabelle 2.2). Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde nach 30 Minuten, ein und zwei Stunden bestimmt über die Ermittlung der Differenz zur unmittelbar nach der Injektion bereit gestellten Nahrungsmenge.

Tabelle 2.2: Versuchsgruppen der Ghrelin/Amylin-Studie

Versuchsgruppe	Simultane Injektionen		Anzahl (n)
Gruppe 1	Vehikel (0,15 M NaCl)	Vehikel (0,15 M NaCl)	n = 10
Gruppe 2	Vehikel (0,15 M NaCl)	Amylin (1 µg/kg KG)	n = 10
Gruppe 3	Vehikel (0,15 M NaCl)	Amylin (5 µg/kg KG)	n = 10
Gruppe 4	Vehikel(0,15 M NaCl)	Ghrelin (13 µg/kg KG)	n = 10
Gruppe 5	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Amylin (1 µg/kg KG)	n = 10
Gruppe 6	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Amylin (5 µg/kg KG)	n = 10

Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt, um die hemmende Wirkung von Amylin (5 µg/kg KG) auf die Nahrungsaufnahme bei nicht gefasteten Ratten zu Beginn der Dunkelphase nachzuweisen. Die gesättigten Tiere erhielten zehn Minuten vor Beginn der Nachtphase intraperitoneale Injektionen von entweder Vehikellösung oder Amylin (5 µg/kg KG) mit einem Volumen von 0,5 ml (Tabelle 2.3). Unmittelbar nach der Injektion wurden die Versuchstiere in Käfige vereinzelt, erhielten eine definierte Menge an Standardrattenfutter und hatten *ad libitum*

Zugang zu Wasser. Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde aus der Differenz zur vorher bereit gestellten Nahrungsmenge ermittelt und in g/kg KG angegeben. Die Messungen erfolgten 30 Minuten und eine Stunde nach der Injektion.

Tabelle 2.3: Versuchsgruppen des Kontrollexperiments

Versuchsgruppe	Injektionen	Anzahl (n)
Gruppe 1	Amylin (5 µg/kg KG)	n = 9
Gruppe 2	Vehikel (0,15 M NaCl)	n = 9

2.2.2 Durchführung der immunhistologischen Experimente

2.2.2.1 Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Bombesin auf die Fos-Expression in Hypothalamus und Hirnstamm

Die Versuche begannen zwischen 08.00 Uhr und 11.00 Uhr, um die Ergebnisse möglichst konstant zu halten. Gesättigte Sprague Dawley-Ratten erhielten intraperitoneale (ip.) Injektionen (0,5 ml) von entweder Ghrelin, Bombesin oder Vehikel (Tabelle 2.4).

Unmittelbar nach der Injektion hatten die Tiere keinen weiteren Zugang zu Nahrung, jedoch *ad libitum* Zugang zu Wasser. Die Nahrungskarenz diente dazu, die Freisetzung endogener Botenstoffe so gering wie möglich zu halten, um eine Beeinflussung des Experiments zu vermeiden. 90 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere anästhesiert mit einer ebenfalls ip. applizierten Lösung aus Ketamin (100 mg/kg KG) und Rompun (10 mg/kg KG). Um eine Thrombenbildung in Hirngefäßen zu vermeiden, erhielten die Tiere zusätzlich 2500 IE Liquemin intraperitoneal injiziert. Im Anschluss erfolgte die transkardiale Perfusion.

Tabelle 2.4: Versuchsgruppen der immunhistologischen Studie

Versuchsgruppe	Simultane Injektionen		Anzahl (n)
Gruppe 1	Vehikel (0,15 M NaCl)	Vehikel (0,15 M NaCl)	n = 5
Gruppe 2	Vehikel(0,15 M NaCl)	Bombesin (4 µg/kg KG)	n = 5
Gruppe 3	Vehikel (0,15 M NaCl)	Bombesin (8 µg/kg KG)	n = 5
Gruppe 4	Vehikel(0,15 M NaCl)	Ghrelin (13 µg/kg KG)	n = 5
Gruppe 5	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Bombesin (4 µg/kg KG)	n = 5
Gruppe 6	Ghrelin (13 µg/kg KG)	Bombesin (8 µg/kg KG)	n = 5

2.2.2.2 Transkardiale Perfusion

Die transkardiale Perfusion wurde mit Hilfe einer Perfusionsmaschine (Abbildung 2.1) durchgeführt, der Ablauf der Perfusion war angelehnt an die Beschreibungen von Geisler *et al.* und Kobelt *et al.* (S. Geisler *et al.* 2002; P. Kobelt *et al.* 2004).

Nach der Fixierung der tief anästhesierten Ratten in Rückenlage begann die Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle über einen Medianschnitt. Nach der Fixierung des Herzens mittels einer Pinzette erfolgte die Eröffnung des linken Ventrikels an der Herzspitze. Über diese Inzision konnte die Perfusionskanüle bis in die aufsteigende Aorta vorgeschoben und fixiert werden. Der rechte Ventrikel wurde eröffnet, um das Abfließen der Perfusionslösungen zu gewährleisten. Die transkardiale Perfusion begann mit der Verabreichung von 100 ml Plasmaexpander über zehn Sekunden, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Danach schloss sich die 30 minütige Gabe von 1000 ml Perfusionslösung (PgPik) an, um die Gehirne zu fixieren (S. Geisler *et al.* 2003). Die darauf folgende Applikation von 500 ml 5%iger Saccharoselösung über fünf Minuten entfernte ungebundene Perfusionslösung und leitete die kryoprotektive Dehydratation ein (L. K. Barthel, P. A. Raymond 1990).

Nach der Perfusion erfolgten die Dekapitation, Freilegung und Entnahme der Gehirne zur weiteren Verarbeitung.

Abbildung 2.1

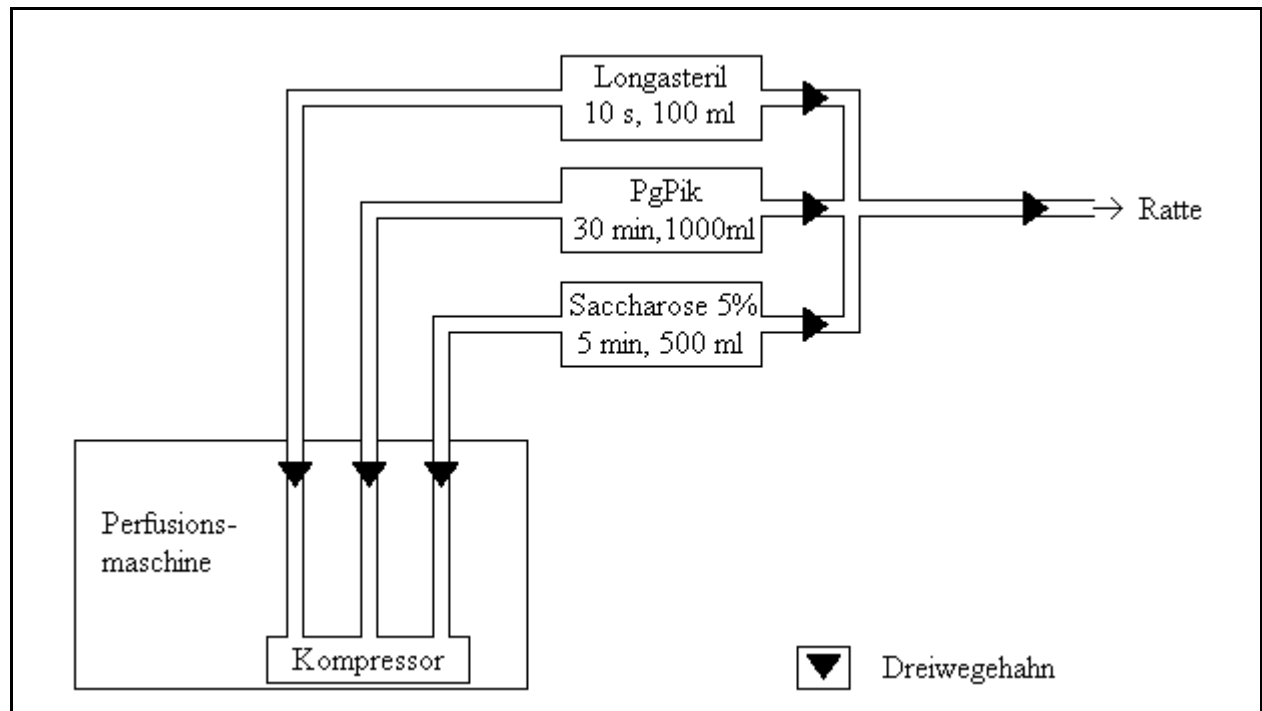


Abbildung 2.1: Perfusionsmaschine

2.2.2.3 Verarbeitung und Aufbewahrung der Gehirne

Die entnommenen Gehirne wurden in einer für diesen Zweck konstruierten Plexiglasmatrix in vier ca. 4 mm große Blöcke geteilt, die u. a. den Hirnstamm und den Hypothalamus enthielten. Zur Weiterführung der Dehydrationsreihe begann die Lagerung in 5%iger Saccharoselösung bei 4 °Celsius im Kühlschrank. Nach zwei Stunden erfolgte eine Umlagerung der Blöcke in 15%ige Saccharoselösung, um die Gehirne für weitere zwölf Stunden zu dehydrieren. Abschließend fand die letzte Stufe des Wasserentzugs in 27,3%iger Saccharoselösung für zwölf Stunden statt. Nach dieser Prozedur wurden die einzelnen Blöcke auf Korkscheiben in einem Einbettmedium fixiert, katalogisiert und in n-Hexan bei einer Temperatur von -70 °Celsius unter Kühlung durch Flüssigstickstoff schockgefroren. Im weiteren Verlauf lagerten die Hirnblöcke im Gefrierschrank bei -80 °Celsius in Plastikgefäßen, denen einige ml gefrorenes *aqua bidest.* zugesetzt waren, um eine Austrocknung des Hirngewebes zu vermeiden.

2.2.2.4 Kryotom

Orientierend am stereotaktischen Atlas von Paxinos & Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997) (Abbildung 2.2) wurden mit einem Kryotom vom Hirnstamm und Hypothalamus Gehirnschnitte angefertigt. Die Schnitte hatten eine Dicke von 25 μm . Sie lagerten bis zur Weiterverarbeitung in Multiwell[®]-Zellkulturplatten in 0,1 M PBS bei 4 °Celsius im Kühlschrank.

Abbildung 2.2

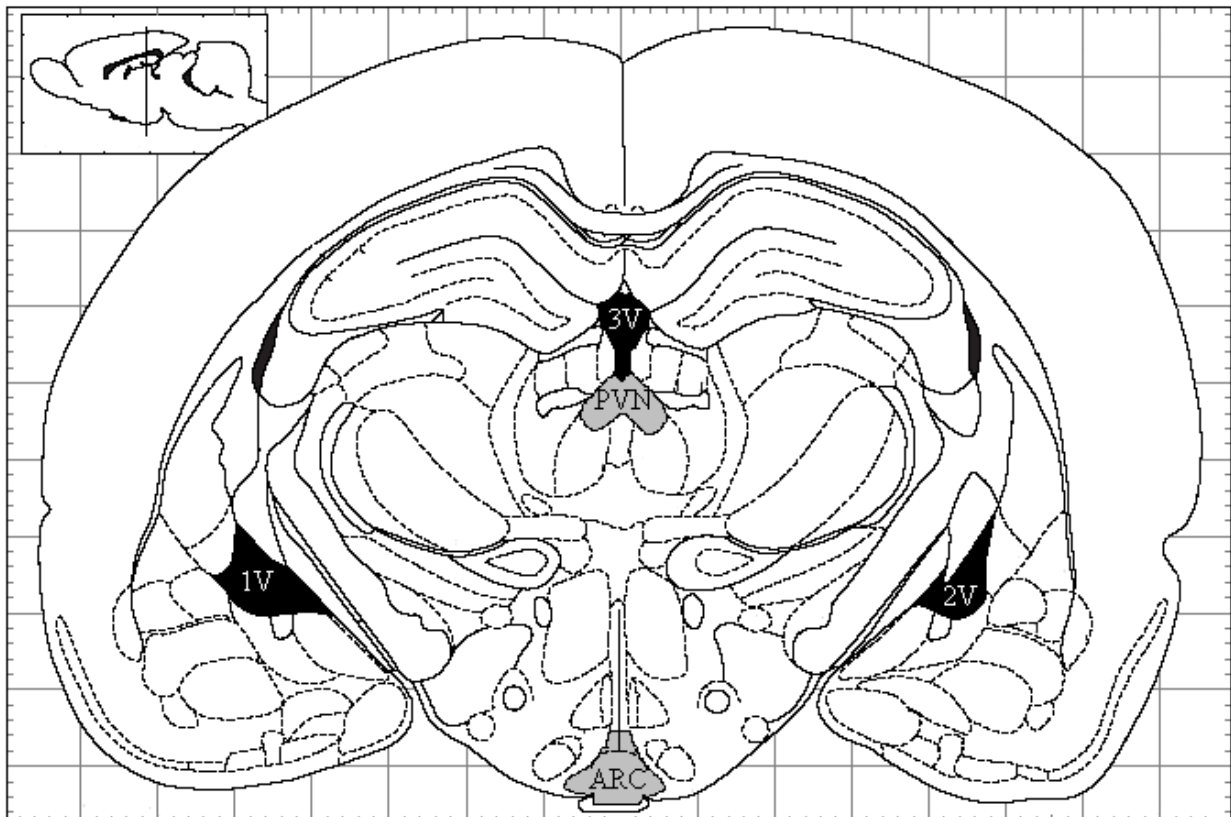


Abbildung 2.2: Koronarschnitt des Rattengehirns auf Höhe des Hypothalamus (Interaural 5,4 mm, Bregma -3,6 mm)

1V = Linker Seitenventrikel, 2V = Rechter Seitenventrikel, 3V = 3. Ventrikel, ARC = Nucleus Arcuatus, PVN = Nucleus Paraventricularis

(G. Paxinos, C. Watson 1997)

Abbildung 2.3

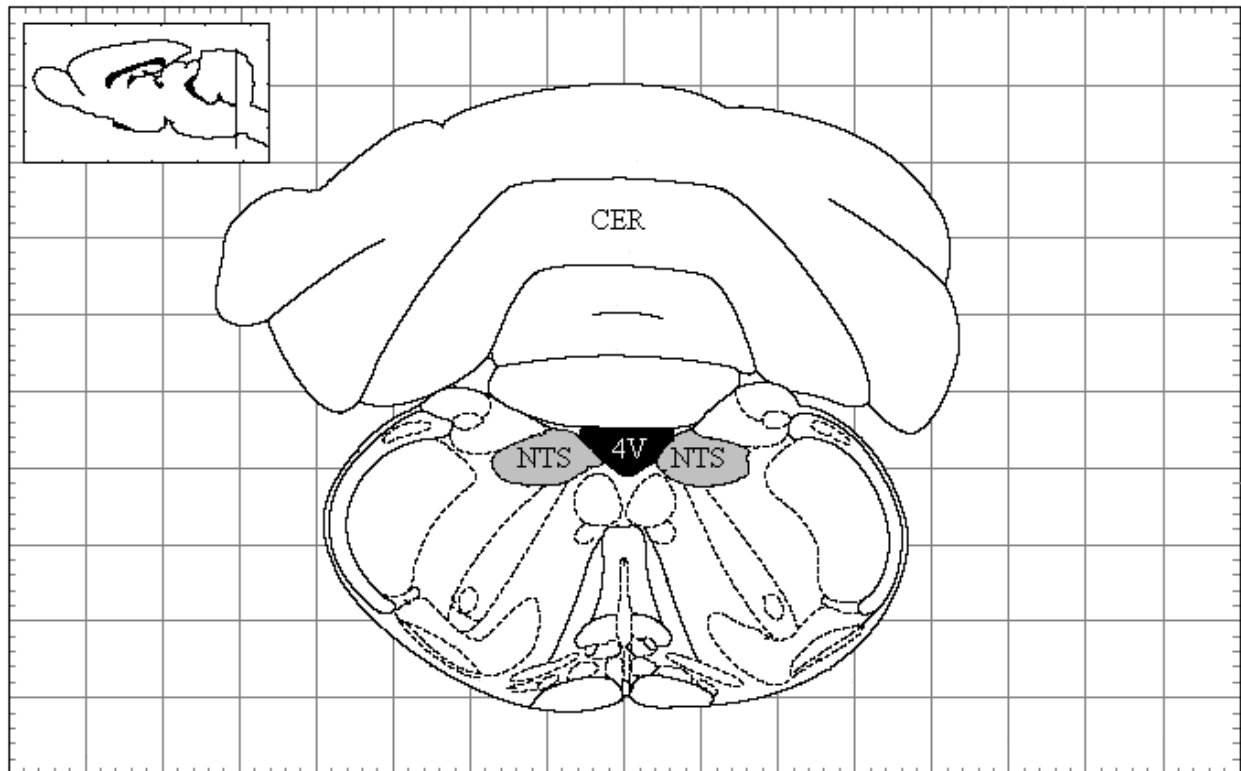


Abbildung 2.3: Koronarschnitt des Rattengehirns auf Höhe des Hirnstamms (Interaural -4,24 mm, Bregma -13,24 mm)

4V = 4. Ventrikel, CER = Cerebellum, NTS = Nucleus Tractus Solitarii

(G. Paxinos, C. Watson 1997)

2.2.3 Immunhistologische Färbung

2.2.3.1 Allgemeines zu den Färbeprotokollen

Alle Färbeschritte der folgenden Protokolle wurden in Multiwell[®]-Zellkulturplatten bei frei flottierenden Gehirnschnitten von 25 µm Dicke vorgenommen (free-floating-Technik). Diese Technik bot den Vorteil, dass Antikörper und Sera an einer großen Oberfläche wirken konnten (P. Kobelt *et al.* 2004), und eine große Anzahl von Gehirnschnitten simultan gefärbt werden konnte (M. V. Sofroniew, U. Schrell 1982). Die Färbung fand bei Raumtemperatur (21 °Celsius) statt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Stets wurde 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) verwendet. Nach Abschluss der Färbung wurden die

Gehirnschnitte auf Objektträger Falten frei aufgezogen und mit 11 μ l 1,4-Diazabicyklo-(2.2.2)-oktan (100 mg/ml in 90% Glycerol für die Fluoreszenzmikroskopie in 10% PBS, pH = 7,4) gegen das Ausbleichen eingedeckt.

Bis zur Begutachtung am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) erfolgte die Aufbewahrung der gefärbten Hirschnitte im Gefrierschrank bei -20 °Celsius.

2.2.3.2 Protokoll 1: Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid

Nach der Entfernung des Phosphatpuffers erfolgte die Behandlung mit Natriumborhydrid in PBS für 15 Minuten, um die Aldehyd induzierte Eigenfluoreszenz des Gewebes zu minimieren (B. Clancy, L. J. Cauller 1998). Danach wurden die Gehirnschnitte dreimal in PBS gewaschen. Die Waschschritte mit Phosphatpuffer (PBS) dienten jeweils der Entfernung vorher verwendeter Chemikalien. Um das unspezifische Binden von Antikörper zu blockieren, folgte die Applikation von Rinderserumalbumin (Bovines Serumalbumin, BSA) und Triton X-100 in PBS für 60 Minuten. Der Primärantikörper Anti-c-Fos (rabbit anti-c-Fos) wurde in einer Verdünnung von 1:4000 in einer Lösung aus BSA, Triton X-100 und Natriumazid für 36 Stunden aufgetragen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Sektionen mit PBS dreimal gewaschen, um nicht gebundene Antikörperreste aus dem Gewebe zu entfernen. Nochmals erfolgte eine Inkubation in BSA und Triton X-100 in PBS für zwei Stunden. Im Anschluss wurde der Fluoreszein-Isothiocyanat- (FITC)- konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:800 in BSA für zwölf Stunden aufgebracht. Nach dreimaligem Spülen mit PBS folgte die Gegenfärbung mit Propidiumjodid in PBS für 15 Minuten. Die Anwendung von Propidiumjodid diente der Anfärbung des Zellchromatins. Dadurch konnten die relevanten Gehirnareale bei der Beurteilung am Mikroskop besser lokalisiert und von anderen Hirnkernen abgegrenzt werden. Nach der Inkubation in Propidiumjodid erfolgte letztmalig eine Spülung der Gehirnschnitte in PBS, um ungebundene Färbechemikalien zu entfernen. Anschließend wurden die Gehirnschnitte wie oben beschrieben auf Objektträger aufgezogen, in einer Lösung gegen das Ausbleichen eingedeckt und im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

Protokoll 1 fasst die genauen Abläufe der Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid nochmals zusammen (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Protokoll 1

1. Phosphatpuffer entfernen
2. Inkubation der Gehirnschnitte in Natriumborhydrid (1% in PBS) für 15 Minuten
3. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach jeweils zwei, 20, 30 Minuten
4. Blockierung mit BSA (10%) und Triton X-100 (0,3%) in PBS für 60 Minuten
5. Inkubation mit Primärantikörper Anti-c-Fos (1:4000) in BSA (10%), Triton X-100 (0,3%), Natriumazid (0,1%) in PBS für 36 Stunden
6. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach zehn, 30, 40 Minuten
7. Blockierung mit BSA (10%) und Triton X-100 (0,3%) in PBS für 120 Minuten
8. Inkubation mit Sekundärantikörper FITC-Anti-Rabbit (1:800) in BSA (10%), Triton X-100 (0,3%), Natriumazid (0,1%) in PBS für 12 Stunden
9. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach zehn, 30, 40 Minuten
10. Inkubation in 2,5 µg/ml Propidiumjodid in PBS für 15 Minuten
11. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach jeweils zwei, 15, 30 Minuten

2.2.3.3 Protokoll 2: Fos-Färbung, CRF-Phänotypisierung und Gegenfärbung mit DAPI

Das zweite Färbeprotokoll begann mit der Entfernung des Phosphatpuffers aus den Zellkulturplatten. Nach der Inkubation mit Natriumborhydrid, das die Aldehyd induzierte Eigenfluoreszenz des Gewebes minimierte (B. Clancy, L. J. Cauller 1998), erfolgte das dreimalige Spülen der Gehirnschnitte mit Phosphatpuffer (PBS). Dadurch konnten vorher verwendete Chemikalien entfernt werden. Danach folgt die Applikation von Ziegen Serum (Normal Goat Serum, NGS) und Triton X-100 in PBS, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Die Primärantikörper Anti-c-Fos (1:4000) und Anti-CRF (1:200) wurden simultan gelöst in NGS, Triton X-100 und Natriumazid in PBS und für 24 Stunden aufgetragen. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte das dreimalige Spülen der Gehirnschnitte mit PBS, um ungebundene Antikörper aus dem Gewebe zu entfernen. Die anschließende Gabe von NGS und Triton X-100 blockierte unspezifische Bindungen. Nach der Applikation des FITC konjugierten Sekundärantikörpers (1:800) in NGS folgte die nächste Spülung des Gewebes mit PBS nach jeweils zehn, 30 und 40 Minuten. Erneut wurden die Gehirnschnitte für fünf Stunden in einer Lösung aus BSA, RbNS (Rabbit Normal Serum) und Triton X-100 inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Der Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) konjugierte Sekundärantikörper komplettierte den Färbezyklus. In einer Verdünnung von 1:200 in BSA,

RbNS, Triton X-100 und Natriumazid in PBS wurden die Gehirnschnitte darin für zwölf Stunden inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Sektionen erneut dreimal mit PBS gespült. Die Anwendung von 4'-6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 15 Minuten diente der Gegenfärbung des Zellchromatins. Dadurch konnten die Fos aktivierten und CRF positiven Neurone bei der Beurteilung am Mikroskop den Gehirnkernen besser zugeordnet werden. Die weitere Verarbeitung und Lagerung der Gehirnschnitte erfolgte wie bereits unter 2.2.3.1 beschrieben.

Das Protokoll 2 fasst den gesamten Ablauf der Fos-Färbung, CRF-Phänotypisierung und Gegenfärbung mit DAPI nochmals zusammen (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Protokoll 2

1. Phosphatpuffer entfernen
2. Inkubation der Gehirnschnitte in Natriumborhydrid (1% in PBS) für 15 Minuten
3. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach jeweils zwei, 20, 30 Minuten
4. Blockierung mit NGS (5%) und Triton X-100 (0,3%) in PBS für 60 Minuten
5. Inkubation mit Primärantikörper Anti-c-Fos (1:4000) und Anti-CRF-Protein (1:200) in NGS (5%), Triton X-100 (0,3%), Natriumazid (0,1%) in PBS für 24 Stunden
6. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach zehn, 30, 40 Minuten
7. Blockierung mit NGS (5%) und Triton X-100 (0,3%) in PBS für 120 Minuten
8. Inkubation mit Sekundärantikörper FITC-Anti-Rabbit (1:800) in NGS (5%) in PBS für 12 Stunden
9. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach zehn, 30, 40 Minuten
10. Inkubation in BSA (5%), RbNS (3%), Triton X-100 (0,3%) für fünf Stunden
11. Inkubation mit Sekundärantikörper TRITC-Anti-Guinea-Pig (1:200) in BSA (5%), RbNS (3%), Triton X-100 (0,3%), Natriumazid (0,1%) in PBS für zwölf Stunden
12. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach jeweils zwei, 15, 30 Minuten
13. Inkubation in 2,0 µg/ml DAPI in PBS für 15 Minuten
14. Dreimaliges Waschen der Sektionen in PBS nach jeweils zwei, 15, 30 Minuten

2.2.4 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (cLSM), wobei für die DAPI-Färbung (Emissionswellenlänge 455 nm, Exzitationswellenlänge 345 nm) das Filterset 01 (Bündelspalt FT 395, Filter BP 365/12) für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt wurde. Der Untersucher war bei der Auszählung am Mikroskop und am Computer verblindet. Die Einstellungen am cLSM zur Signaldetektion der einzelnen Fluorochrome sind in Tabelle 2.7 dargestellt.

Tabelle 2.7: Einstellungen am cLSM zur Detektion der einzelnen Fluorochrome

	FITC	Propidiumjodid	TRITC
Bündelspalt	HFT UV/488/543/633	HFT UV/488/543/633	HFT 488/543
Filter	BP 505-530	BP 560-615	BP 560-615
Emissionswellenlänge	519 nm	617 nm	572 nm
Exzitationswellenlänge	488 nm	543 nm	547 nm

2.2.4.1 Mikroskopische Auswertung des Färbeprotokolls 1

Die Fos-Signale (Fos-Immunreaktivität, Fos-IR) wurden semiquantitativ beurteilt. Fos positiv galten die Zellen, die ein grünes Fluoreszenzsignal im Zellkern zeigten. Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid erzeugte ein rotes Fluoreszenzsignal im Zellkern, verursacht durch eine Bindung an das Chromatin, und ermöglichte so die genaue Abgrenzung der zu untersuchenden Gehirnerkerne (PVN, NARC, NTS) zu benachbarten Gehirnstrukturen. Jeder zweite der 25 µm dicken Schnitte wurde konsekutiv bilateral im NARC, PVN und NTS ausgezählt, so dass jeweils 15 Sektionen im NARC und NTS und 10 Sektionen im PVN pro Rattengehirn ausgewertet werden konnten. Orientierung gab der stereotaktische Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997).

2.2.4.2 Mikroskopische Auswertung des Färbeprotokolls 2

Fos positive Neurone zeigten ein grünes, CRF positive Neurone ein rotes Fluoreszenzsignal. Die Gegenfärbung mit DAPI verursachte eine blaue Fluoreszenz der Zellkerne. Somit war es möglich, die Zellen sichtbar zu machen und zu unterscheiden. Bestimmt wurden alle Neurone, die entweder nur Fos positiv, nur CRF positiv oder gleichzeitig positiv für CRF und Fos waren. Danach konnte für jede Gruppe (n = 3/Gruppe) die Prozentzahl der Fos aktivierten CRF-Neurone und der CRF aktivierten Fos-Neurone im PVN ermittelt werden.

2.2.5 Statistische Auswertung

2.2.5.1 Statistische Auswertung der verhaltensbiologischen Experimente

Die Daten der Studie zur Interaktion von Ghrelin und Bombesin sowie Ghrelin und Amylin wurden als Mittelwert (\bar{X}) \pm Standardabweichung des Mittelwerts (standard error of mean, SEM) angegeben und mittels der Varianzanalyse ANOVA (analysis of variance) ausgewertet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem LSD-Test (least significant difference test, LSD) ermittelt, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant betrachtet wurde.

Die Daten des Kontrollexperimentes der Amylinwirkung zu Beginn der Dunkelphase wurden ebenfalls als Mittelwert (\bar{X}) \pm Standardabweichung des Mittelwerts angegeben und mittels der Varianzanalyse ANOVA ausgewertet. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's-t-Test ermittelt, ein $p < 0,05$ galt als signifikant.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm Statistica (Version 5).

2.2.5.2 Statistische Auswertung der immunhistologischen Experimente

Die Daten wurden als mittlere und interquartile Schwankungen von der durchschnittlichen Anzahl der Fos positiven Zellen pro Schnitt angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit der nicht-parametrischen Rangvarianzanalyse (Kruskal-Wallis-ANOVA Median-Test) und dem Mann-Whitney-U-Test ausgewertet, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant galt.