Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie & Interdisziplinäres Stoffwechselzentrum: Endokrinologie, Diabetes und Stoffwechsel der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

# DISSERTATION

# Untersuchung zur zentralen Appetitregulation durch die Neuropeptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

> von Anna-Sophia Wisser aus Berlin

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

- 2. Prof. Dr. med. T. Wedel
- 3. Priv.-Doz. Dr. med. M. Kreis

Datum der Promotion: 16.05.2010

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung		1
1.1 Ghrelin		4
1.2 Desacyl-Ghrelin		8
1.3 Obestatin		11
1.4 Ziele der Untersuchungen zu Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin		14
2. Material und Methoden		17
2.1 Material		17
2.1.1.1 Peptide	17	
2.1.1.2 Antisera	17	
2.1.1.3 Medikamente	17	
2.1.1.4 Chemikalien	18	
2.1.1.5 Geräte	18	
2.1.1.6 Verschiedene Materialien	19	
2.1.2 Versuchslösungen	20	
2.1.2.1 Herstellung der Peptidlösungen	20	
2.1.2.2 Narkosemittel	20	
2.1.2.3 Fixierungslösung	20	
2.1.2.4 Saccharoselösungen	21	
2.1.2.5 Phosphatpuffer	21	
2.1.2.6 Sörensen-Puffer	21	
2.1.3 Versuchstiere	21	
2.2 Methoden		22
2.2.1 Verhaltensbiologische Untersuchung der Nahrungsaufnahme	22	
2.2.1.1 Studie zur Appetitregulation durch desacyl-Ghrelin	23	
2.2.1.2 Einfluss von Obestatin auf die Nahrungsaufnahme	23	
2.2.2 Studie zur Körpergewichtsentwicklung unter desacyl-Ghrelin-Gabe	24	
2.2.3 Immunhistochemische Untersuchung der Fos-Expression	25	
2.2.3.1 Fos als Marker der neuronalen Aktivität	25	
2.2.3.2 Applikation der Peptide	25	
2.2.3.3 Durchführung der transkardialen Perfusion	27	

## Inhaltsverzeichnis

2.2.3.4 Präparation der Gehirne	28
2.2.3.5 Herstellung der Gehirnschnitte am Kryotom	28
2.2.3.6 Prinzip der immunhistochemischen Färbungen	28
2.2.3.7 Protokoll 1 zur Darstellung von Fos	30
2.2.3.8 Protokoll 2 zur Darstellung von Fos und NPY bzw. AgRP	30
2.2.3.9 Protokoll 3 zur Darstellung von NPY und AgRP	31
2.2.3.10 Mikroskopische Auswertung	32
2.2.4 Statistische Auswertung	33
2.2.4.1 Auswertung der verhaltensbiologischen Versuche	33
2.2.4.2 Auswertung der Studie zur Körpergewichtsentwicklung	33
2.2.4.3 Auswertung der immunhistochemischen Experimente	33

3. Ergebnisse		34
3.1 Ghrelin		34
3.1.1 Beeinflussung der Fos-Expression durch Ghrelin	34	
3.1.2 Phänotypisierung intrahypothalamischer Projektionsfasern	39	
3.2 Desacyl-Ghrelin		43
3.2.1 Wirkung von desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	43	
3.2.2 Effekt von desacyl-Ghrelin auf die Körpergewichtsentwicklung	45	
3.2.3 Beeinflussung der Fos-Expression durch desacyl-Ghrelin	47	
3.2.3.1 Fos-Expression im Nucleus paraventricularis (PVN)	47	
3.2.3.2 Fos-Expression im Nucleus arcuatus (ARC)	50	
3.2.3.3 Fos-Expression im dorsomedialen Hypothalamus (DMH)	53	
3.2.3.4 Fos-Expression im Nucleus tractus solitarius (NTS)	56	
3.2.3.5 Fos-Expression in der Area postrema (AP)	59	
3.2.3.6 Gesamtbetrachtung des Fos-Expressionsmusters nach		
desacyl-Ghrelin-Injektion	61	
3.3 Obestatin		62
3.3.1 Wirkung von Obestatin auf die Nahrungsaufnahme	62	
3.3.1.1 Studie an ad libitum-gefütterten Tieren in der Dunkelphase	62	
3.3.1.2 Studie an ad libitum-gefütterten Tieren in der Lichtphase	64	
3.3.1.3 Studie an 16 Stunden gefasteten Tieren in der Dunkelphase	65	
3.3.1.4 Studie an 16 Stunden gefasteten Tieren in der Lichtphase	67	
3.3.2 Beeinflussung der Fos-Expression durch Obestatin	69	

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	76
4. Diskussion	77
4.1 Peripheres Ghrelin induziert über Projektionen aus dem Nucleus arcuatus	
eine Steigerung der Fos-Expression im dorsomedialen Hypothalamus	77
4.2 Desacyl-Ghrelin hemmt die Nahrungsaufnahme sowie die Körpergewichts-	
zunahme und moduliert die neuronale Aktivität in Zucker-Ratten	83
4.3 Obestatin beeinflusst in Ratten weder die Nahrungsaufnahme noch die	
neuronale Aktivität in Hypothalamus und Hirnstamm	90
4.4 Resümee	97
5. Zusammenfassung	101
6. Literatur	103
6.1 Referenzliste	103
6.2 Eigene Publikationen	112
7. Anhang	114
7.1 Abkürzungsverzeichnis	114
7.2 Erklärung der Selbstständigkeit	116
7.3 Lebenslauf	117
7.4 Danksagung	118

Für die Aufrechterhaltung lebenswichtiger Funktionen eines Organismus ist eine adäquate Nahrungsaufnahme unabdingbar. Zur Steuerung von Hunger und Sättigung hat sich im Laufe der Evolution ein hoch differenziertes System entwickelt, das sowohl die Nahrungsaufnahme als auch den Energieverbrauch dem aktuellen Bedarf anpasst und dadurch eine ausgeglichene Kalorienbilanz sichert. Störungen der Appetitregulation und damit der Energiehomöostase führen indes zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie Adipositas oder Kachexie. Da insbesondere die Überernährung und assoziierte Folgeerkrankungen weltweit epidemische Ausmaße annehmen (WHO 2004), sind die Mechanismen der Appetitregulation Gegenstand intensiver Forschung.

Nach derzeitigem Kenntnisstand erfolgt die Steuerung der Nahrungsaufnahme durch das komplexe Zusammenwirken zahlreicher humoraler Komponenten, die als Indikator der aktuellen Stoffwechsellage des Organismus dienen. Eine etablierte Hypothese zur Appetitregulation basiert auf der glukostatischen Theorie, wonach für die kurzfristige Sicherung der Energiehomöostase das Angebot bestimmter Stoffwechselsubstrate, beispielsweise der Blutglukose-Spiegel, von Bedeutung ist (Mayer, 1953). Auch die vermutete langfristige Regulierung der Nahrungsaufnahme durch Energiespeicher-assoziierte Signale (Kennedy, 1953) wurde durch die Entdeckung des Hormons Leptin bestätigt (Zhang et al., 1994).

Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurden diese Theorien durch die Entdeckung weiterer wichtiger Mechanismen zur Sicherung der Energiehomöostase ergänzt. Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass insbesondere viele nahrungsabhängig sezernierte gastrointestinale Peptide maßgeblich an der Steuerung von Hunger und Sättigung beteiligt sind (Konturek et al., 2004). Der Hypothalamus fungiert in diesem Zusammenhang als wichtigste Schnittstelle zwischen Endokrinium und Nervensystem, da in diesem Areal die humoral vermittelten Informationen registriert und integriert werden (Konturek et al., 2004).

Diese Interaktion zwischen dem zentralen Nervensystem und den Verdauungsorganen über peptiderge Mediatoren sowie über neuronale Schaltkreise wird als *brain-gut-axis* (Hirn-Darm-Achse) zusammengefasst (Konturek et al., 2004). Zahlreiche gastrointestinale Neuropeptide wie beispielsweise Cholecystokinin (CCK), *Glucagone-like Peptide 1* (GLP-1), Peptid YY (PYY) und andere sind als humorale Komponenten der *brain-gut-axis* maßgeblich an der kurzfristigen Appetitregulation beteiligt.

Die Abbildung 1.1 zeigt eine Übersicht der Syntheseorte sowie der Wirkung dieser peptidergen Faktoren, die in die Steuerung von Hunger und Sättigung involviert sind.



Abbildung 1.1: Bildungsorte peripherer und zentraler Peptide, die durch die Inhibition (↓) oder die Stimulation (↑) der Nahrungsaufnahme an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind (modifiziert nach Arora und Anubhuti, 2006).

Die meisten gastrointestinalen Mediatoren wirken anorexinogen (vgl. Abb. 1.1) und werden während des Essens sezerniert, um die Nahrungsaufnahme zu begrenzen beziehungsweise zu beenden (Druce et al., 2004; Konturek et al., 2004; Woods, 2004).

Eine Ausnahme bildet in diesem Kontext das erst 1999 entdeckte Ghrelin, das als einziges bislang bekanntes peripheres Neuropeptid einen orexinogenen Effekt aufweist (Kojima et al., 1999). Aktuelle Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass das Ghrelin-System in die Adipositas-Entwicklung bei hochkalorischer Ernährung involviert ist (Wortley et al., 2005; Zigman et al., 2005) und einen potentiellen Angriffspunkt zur therapeutischen Modulation der Nahrungaufnahme und der Körpergewichtsentwicklung darstellt (Kobelt et al., 2006a; Zigman

und Elmquist, 2006; Zorrilla et al., 2006). Eine Voraussetzung der gezielten pharmakologischen Beeinflussung ist jedoch ein fundiertes Wissen bezüglich der Wirkweise des Peptids. In diesem Zusammenhang untersucht die vorliegende Studie die zentralen Mechanismen, die der Stimulation der Nahrungsaufnahme durch Ghrelin zugrunde liegen.

Auch die Ghrelin-verwandten Peptide desacyl-Ghrelin und Obestatin finden in der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion große Beachtung, da sie eventuell als anorexinogene Mediatoren ebenfalls in die Appetitregulation involviert sind (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005; Zhang et al., 2005).

Interessanterweise sind desacyl-Ghrelin und Obestatin, trotz der vermuteten antagonistischen Wirkung, auf genetischer und molekularbiologischer Ebene mit Ghrelin assoziiert, da diese drei Peptide, wie in Abb. 1.2 dargestellt, durch unterschiedliche posttranslationale Prozessierung aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein Präproghrelin entstehen (Zhang et al., 2005).



#### Abbildung 1.2: Posttranslationale Prozessierung des Präproghrelins (Zhang et al., 2005)

Durch Proteolyse (Zhu et al., 2006) und Acylierung (Yang et al., 2008) entstehen die Derivate Ghrelin und desacyl-Ghrelin (Peptidkette jeweils rot) sowie Obestatin (grün) mit jeweils unterschiedlichen Wirkungen. (AS = Aminosäuren; C8:0 = Oktanoyl-Rest)

Bislang liegen nur bezüglich der appetitregulatorischen Effekte von Ghrelin fundierte und vielfach validierte Erkenntnisse vor, wobei jedoch die zugrunde liegende Signaltransduktion nur teilweise verstanden ist. Diese Aspekte sind hingegen sowohl bei desacyl-Ghrelin als auch bei Obestatin weitgehend ungeklärt und werden in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert. Somit ergibt sich aus der momentanen Datenlage die Frage nach der zentralen Vermittlung der Ghrelin-Wirkung sowie nach den physiologischen Effekten von desacyl-Ghrelin und Obestatin.

Um die hierauf basierende Thematik dieser Studie zu erläutern, wird im Folgenden der aktuelle Kenntnisstand zur physiologischen Rolle der untersuchten Substanzen zusammengefasst und anschließend die daraus resultierenden Fragestellungen dieser Arbeit zur appetitregulatorischen Wirkung der Peptide erläutert.

#### 1.1 Ghrelin

Ghrelin besteht aus 28 Aminosäuren und weist eine kovalente Bindung des Serin-Rests an Position drei (vgl. hierzu Abb. 1.3) mit einer Oktanoylkette auf (Kojima et al., 1999). Diese Veresterung wird durch die Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) katalysiert und überführt das Peptid in die biologisch aktive Form (Yang et al., 2008). Überdies ermöglicht die Acylkette den gerichteten Transport durch die Blut-Hirn-Schranke (Banks et al., 2002).

Humanes Ghrelin im Vergleich zum Ghrelin der Ratte

Abbildung 1.3: Aminosäuresequenz des humanen Ghrelins im Vergleich zum Ghrelin der Ratte (Kojima et al., 1999)

Ghrelin wird überwiegend in den mukosalen X/A-Zellen des Magenfundus synthetisiert und endokrin sezerniert (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000). Auch in anderen Organen wie im Pankreas, Duodenum, Jejunum, Ileum und Zökum sowie in Herz und Aorta wird Ghrelin in geringerem Umfang produziert (Date et al., 2000; Hosoda et al., 2000). Weitere Syntheseorte dieses Peptids sind im Gehirn lokalisiert. Ghrelin-enthaltende Neurone konnten sowohl in der Hypophyse als auch im Nucleus arcuatus des Hypothalamus identifiziert werden (Korbonits et al., 2001; Mondal et al., 2005). Zudem wurde eine Ghrelin-positive Neuronengruppe in einem hypothalamischen Gebiet in der Nähe des dritten Ventrikels entdeckt (Cowley et al., 2003).

Der Name Ghrelin ist an die protoindoeuropäischen Bezeichnungen *ghre* für "wachsen" und *relin*, das übersetzt "freigeben" bedeutet, angelehnt und beschreibt die Induktion der hypophysären GH-Sekretion als eine der Hauptwirkungen dieses Peptids (Kojima et al., 1999). Des Weiteren stimuliert exogen zugeführtes Ghrelin die Nahrungsaufnahme sowohl in Nagern (Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2000; Nakazato et al., 2001; Wren et al., 2001b; Date et al., 2002a; Wang et al., 2002) als auch bei Menschen (Wren et al., 2001a). Eine im Rahmen des Prader-Willi-Syndroms erhöhte Plasmakonzentration endogenen Ghrelins resultiert ebenfalls in einer ausgeprägten Hyperphagie (DelParigi et al., 2002).

Neben der Beeinflussung der Energiehomöostase ist Ghrelin auch in die Steuerung diverser anderer intestinaler und extraintestinaler Prozesse involviert. Die Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht über die zahlreichen weiteren Effekte dieses Peptids, die für die vorliegende Untersuchung jedoch von untergeordneter Bedeutung sind.

Referenz	Physiologische Effekte von Ghrelin
Masuda et al., 2000; Dornonville et al., 2004	Erhöhung der gastrointestinalen Motilität
Masuda et al., 2000; Date et al., 2001	Beeinflussung der Magensäuresekretion
Lee et al., 2002	Stimulation der Insulinsekretion
Nagaya et al., 2001	Senkung des arteriellen Blutdrucks
Baldanzi et al., 2002	Apoptosehemmung in Kardiomyozyten
Cassoni et al., 2001	Proliferationshemmung in Mamma-Karzinomen
Weikel et al., 2003	Verlängerung der slow-wave-Schlaf-Dauer
Asakawa et al., 2001a; Carlini et al., 2002	Anxiogenese und Gedächtniskonsolidierung

Tab. 1.1: Zusammenfassung der physiologischen Effekte von Ghrelin

Sowohl die Ghrelin-bedingte Stimulation der Nahrungsaufnahme als auch die Induktion der GH-Sekretion wird durch die Interaktion des Peptids mit dem G-Protein-gekoppelten *Growth Hormone Secretagogue Receptor-1a* (GHS-R1a) vermittelt (Sun et al., 2004). Folglich führt die zentrale Gabe von GHS-R1a-Antagonisten zu einer Inhibition des Fressverhaltens sowie zu einer Reduktion der Ghrelin-induzierten GH-Ausschüttung (Asakawa et al., 2003). Unterstrichen wird diese Erkenntnis durch die Beobachtung, dass Ghrelin in GHS-Rezeptor-defizienten Mäusen keine Stimulation der Nahrungsaufnahme bewirkt (Sun et al., 2004; Zigman et al., 2005).

Die Regulation der endogenen Ghrelin-Synthese ist eng mit der aktuellen metabolischen Situation verbunden. Eine Erhöhung des Plasmaspiegels ist im gefasteten Zustand, nach Gewichtsverlust, vor erwarteten Mahlzeiten sowie nach Leptin-Applikation zu beobachten (Tschöp et al., 2000; Cummings et al., 2001; Toshinai et al., 2001; Lee et al., 2002). Hingegen führt die Aufnahme kalorienreicher Nahrung, eine Gastrektomie oder die Injektion von GH zu einer Reduktion der Ghrelin-Konzentration im Blut (Ariyasu et al., 2001; Lee et al., 2002; Shiiya et al., 2002; Bang et al., 2007).

Im Kontext der humanen Körpergewichtsregulation und des Metabolismus zeigten verschiedene Studien, dass zwischen der Ghrelin-Konzentration im Plasma und dem *body mass index* (BMI) eine starke negative Korrelation besteht (Ariyasu et al., 2001; Tschöp et al., 2001; Shiiya et al., 2002). So weisen adipöse Menschen deutlich geringere Ghrelinspiegel auf als schlanke oder gar anorektische Individuen (Tschöp et al., 2001; Shiiya et al., 2002). Zudem sind bestimmte Mutationen des Ghrelingens mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines metabolischen Syndroms assoziiert (Steinle et al., 2005).

Gegenstand der aktuellen Forschung sind daher insbesondere jene Mechanismen, die der Vermittlung der orexinogenen Wirkung von Ghrelin zugrunde liegen. Die Initiation sowie die Beendigung der Nahrungsaufnahme werden, wie einleitend beschrieben, durch zentralnervöse Strukturen kontrolliert. Insbesondere hypothalamische Kerngebiete wie der Nucleus arcuatus (ARC), der Nucleus paraventricularis (PVN), der ventromediale Hypothalamus (VMH), der dorsomediale Hypothalamus (DMH) sowie laterale hypothalamische Areale (LHA) sind in die Appetitregulation involviert. Darüber hinaus sind auch der im Hirnstamm befindliche Nucleus tractus solitarius (NTS) und die Area postrema (AP) an der Steuerung der Nahrungsaufnahme beteiligt.

In diesem Zusammenhang untersuchten zahlreiche Studien die zentralen Effekte von exogenem Ghrelin. Als Ergebnis dieser Forschung zeigte sich, dass die intrazerebroventrikuläre (i.c.v.)

Ghrelin-Applikation eine gesteigerte neuronale Aktivität im ARC, im PVN, im DMH, in den LHA, im NTS sowie in der AP induziert (Hewson und Dickson, 2000; Lawrence et al., 2002).

Hingegen liegen bezüglich der zentralen Wirkung von peripher injiziertem Ghrelin widersprüchliche Resultate vor. Die intraperitoneale (i.p.) Gabe von Ghrelin bewirkt eine Steigerung der neuronalen Aktivität im ARC und PVN, während im NTS und in der AP keine Beeinflussung derselben zu beobachten ist (Traebert et al., 2002; Rüter et al., 2003). Neuere Untersuchungen zeigten demgegenüber nach intravenöser (i.v.) Ghrelin-Applikation einen Anstieg der neuronalen Aktivität im ARC, im PVN, im NTS sowie in der AP (Hashimoto et al., 2007) oder aber nur eine gesteigerte neuronale Aktivität im ARC, NTS und der AP jedoch keine Veränderung im PVN und DMH (Takayama et al., 2007).

Damit mehren sich einerseits die Hinweise, dass verschiedene zentrale Strukturen an der Verarbeitung des Ghrelin-Stimulus beteiligt sind, andererseits ergibt sich jedoch ein sehr uneinheitliches Bild bezüglich der zentralnervösen Effekte von peripher injiziertem Ghrelin.

Auch die sekundären Mechanismen, die die zentrale Wirkung des Peptids vermitteln, sind bislang nur unvollständig verstanden. Ausführliche Untersuchungen zur Klärung der zugrunde liegenden Signaltransduktion befassen sich primär mit dem ARC, der nach Ghrelin-Injektion in sämtlichen bisherigen Studien übereinstimmend eine gesteigerte neuronale Aktivität aufwies (Hewson und Dickson, 2000; Traebert et al., 2002; Wang et al., 2002; Rüter et al., 2003; Chen et al., 2005; Takayama et al., 2007; Hashimoto et al., 2007). Zahlreiche Untersuchungen belegten, dass die zentrale oder periphere Administration von Ghrelin zu einer gesteigerten Expression der orexinogenen Neuromodulatoren *Agouti-related Peptide* (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY) in diesem hypothalamischen Kern führt (Asakawa et al., 2001; Kamegai et al., 2001; Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001; Chen et al., 2004a).

Weiterführende Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass Ghrelin in NPY-/AgRP-defizienten Mäusen keinen orexinogenen Effekt aufweist (Chen et al., 2004a). Diese Beobachtungen und die Kolokalisation des Neuropeptids NPY mit dem Ghrelin-Rezeptor GHS-R1a in Neuronen des ARC legen nahe, dass NPY- und AgRP-positive Neurone die Voraussetzung für die orexinogene Wirkung von Ghrelin darstellen (Kamegai et al., 2001; Mondal et al., 2005).

Insgesamt beschränken sich die detaillierten Informationen zur zentralen Wirkung von Ghrelin somit bislang weitgehend auf den ARC. Die in früheren Studien nach Ghrelin-Applikation beobachtete neuronale Aktivierung zusätzlicher hypothalamischer und medullärer Kerngebiete (Rüter et al., 2003; Chen et al., 2005; Takayama et al., 2007; Hashimoto et al., 2007) sowie das

Vorkommen des GHS-R1a in vielen weiteren Bereichen des Gehirns (Guan et al., 1997) wirft jedoch die Frage auf, welche Hirnareale neben dem ARC an der Vermittlung des orexinogenen Effekts von Ghrelin beteiligt sind.

Aufgrund der aktuellen Datenlage erscheint es somit sinnvoll, die bisherigen Erkenntnisse bezüglich der zentralnervösen Mechanismen, die der Ghrelin-Wirkung zugrunde liegen, durch weitere Untersuchungen zu ergänzen.

#### **1.2 Desacyl-Ghrelin**

Das Peptid desacyl-Ghrelin weist die identische Aminosäuresequenz wie Ghrelin auf (vgl. Abb. 1.3 und 1.4), ist jedoch im Gegensatz zu diesem nicht über den Serin-Rest an Position drei mit einer Oktanoylgruppe verestert (Kojima et al., 1999).

Humanes desacyl-Ghrelin im Vergleich zum desacyl-Ghrelin d	ler Ratte
H – Gly – Ser – Ser – Phe – Leu – Ser – Pro – Glu – His – Gln	Ratte:
l Arg	l Lvs
Pro – Lys – Lys – Ser – Glu – Lys – Arg – Gln – Gln – Val	-Ala
	1111
l I	
$Ala - Lys - Leu - Gln - Pro - Arg - NH_2$	

# Abbildung 1.4: Aminosäuresequenz des humanen desacyl-Ghrelins im Vergleich zum desacyl-Ghrelin der Ratte (Kojima et al., 1999)

Da der Ghrelin-spezifische Acylrest für die Bindung an den GHS-R1a essentiell ist, interagiert desacyl-Ghrelin, anders als Ghrelin, nicht mit diesem Rezeptor (Kojima et al., 1999). Aufgrund dieser Beobachtung wurde desacyl-Ghrelin zunächst nicht weitergehend untersucht, sondern lediglich als Abbauprodukt der Ghrelin-Degradierung angesehen (Kojima et al., 1999).

Tatsächlich entsteht desacyl-Ghrelin sowohl im Magen als auch im Plasma durch die Deacylierung von Ghrelin, die unter anderem durch die Butyrylcholinesterase und die Lysophospholipase I katalysiert wird (De Vriese et al., 2004; Shanado et al., 2004). Bislang ist

jedoch nicht belegt, ob desacyl-Ghrelin ausschließlich auf diesem Wege entsteht oder auch direkt aus dem Vorläuferprotein Präproghrelin prozessiert wird (s. hierzu auch Abb. 1.2) (Zhu et al., 2006; Yang et al., 2008). Der ungeklärte Syntheseweg lässt somit keine exakte Aussage zum Produktionsort zu. Die Existenz von desacyl-Ghrelin wurde jedoch in vielen Regionen des Gastrointestinaltrakts, im Plasma sowie im Hypothalamus und in der Hypophyse nachgewiesen (Kojima et al., 1999; Date et al., 2000; Hosoda et al., 2000; Ariyasu et al., 2001; Korbonits et al., 2001; Date et al., 2002b; Sato et al., 2005).

Desacyl-Ghrelin kommt im Organismus in wesentlich größerem Umfang vor als acyliertes Ghrelin. Der Anteil der nicht-acylierten Form des Peptids an intrazellulär gespeichertem Gesamtghrelin im Gastrointestinaltrakt liegt zwischen 50 und 60%, während er im Plasma sogar 80 bis 98% beträgt (Date et al., 2000; Hosoda et al., 2000; Toshinai et al., 2001; Lucidi et al., 2004; Sato et al., 2005). Diese Beobachtung ist vermutlich auf die längere Plasmahalbwertszeit von desacyl-Ghrelin von 27 bis 31 Minuten im Vergleich zu jener von Ghrelin mit neun bis 13 Minuten zurückzuführen (Akamizu et al., 2004) und wird durch die einleitend beschriebene Deacylierung von Ghrelin zu desacyl-Ghrelin sowie durch die Elimination von Ghrelin aus der systemischen Zirkulation durch die Bindung an GHS-Rezeptoren bedingt (De Vriese et al., 2004; Shanado et al., 2004).

Auch bezüglich der Regulation der desacyl-Ghrelin-Synthese liegen bislang nur limitierte Erkenntnisse vor. In Ratten wurde im gefasteten Zustand eine Reduktion der hypothalamischen desacyl-Ghrelin-Freisetzung sowie eine Abnahme des Plasmaspiegels bei einer katabolen Stoffwechsellage beobachtet (Sato et al., 2005). Im Mausmodell korrelierte die physiologische desacyl-Ghrelin-Konzentration im Plasma hingegen negativ mit der täglichen Nahrungsaufnahme und dem Körpergewicht der Tiere (Nonogaki et al., 2006).

Obwohl diese Beobachtungen auf einen Einfluss des Peptids auf die Nahrungsaufnahme und die Energiehomöostase hindeuten, liegen trotz der zeitgleichen Entdeckung von desacyl-Ghrelin und Ghrelin nur spärliche Erkenntnisse bezüglich der appetitregulatorischen Wirkung von desacyl-Ghrelin vor (Kojima et al., 1999). Die wenigen bislang in diesem Zusammenhang durchgeführten verhaltensbiologischen Studien kamen zudem zu unterschiedlichen Ergebnissen. In zwei Untersuchungen bewirkte die intraperitoneale Injektion von desacyl-Ghrelin in Nagern eine Reduktion der Nahrungsaufnahme (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005), während in anderen Versuchsreihen keine Änderung des Fressverhaltens nach der i.p.-Applikation des Peptids zu beobachten war (Neary et al., 2006; Toshinai et al., 2006).

Gestützt werden die Resultate jener verhaltensbiologischen Studien, die einen anorexinogenen Effekt des Peptids zeigten, durch ergänzende Untersuchungen an transgenen Versuchstieren. Mäuse mit einer genetisch bedingten Erhöhung der endogenen desacyl-Ghrelin-Produktion zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Nahrungsaufnahme und entwickeln ein geringeres Körpergewicht (Ariyasu et al., 2005; Asakawa et al., 2005). Zudem wurde bei den desacyl-Ghrelin-überexprimierenden Tieren ein geringeres Längenwachstum, ein niedrigerer Körperfettanteil und eine Inhibition der Magenmotorik festgestellt, wohingegen Werte metabolischer Funktionen der Tiere, wie die Körpertemperatur und der Sauerstoffverbrauch, denen des Wildtyps entsprechen (Asakawa et al., 2005). Diese Beobachtungen legen nahe, dass das niedrigere Körpergewicht vor allem auf die geringere Nahrungszufuhr und nicht auf einen erhöhten Energieumsatz zurückzuführen ist (Asakawa et al., 2005).

Bisherige Versuchsergebnisse zur desacyl-Ghrelin-induzierten Modulation der Nahrungsaufnahme sprechen zudem für eine Vermittlung über zentrale Mechanismen (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005). Verschiedene Studien beschrieben, dass das Peptid die Blut-Hirn-Schranke durch transmembranäre Diffusion passiert, eine Steigerung der neuronalen Aktivität im Nucleus arcuatus (ARC) sowie im Nucleus paraventricularis (PVN) induziert und die Synthese der anorexinogen wirkenden Mediatoren Urocortin sowie *Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript* (CART) im Hypothalamus stimuliert (Banks et al., 2002; Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005).

Insgesamt stützen diese Resultate die Vermutung eines appetithemmenden Effekts von desacyl-Ghrelin und sprechen damit für einen Einfluss auf die Regulation der Energiehomöostase. Zudem unterstreichen auch zahlreiche weitere Untersuchungen, die verschiedene extraintestinale Effekte von desacyl-Ghrelin beschreiben (vgl. Tab. 1.2), eine biologische Relevanz des Peptids.

Referenz	Physiologische Effekte von desacyl-Ghrelin
Cassoni et al., 2001	Inhibition der Proliferation von Mamma-Karzinom-Zellen
Baldanzi et al., 2002	Zytoprotektive Wirkung in Kardiomyozyten und Endothelzellen
Bedendi et al., 2003	Reduktion der Spannung des kardialen Papillarmuskels
Cassoni et al., 2004	Hemmung des Zellwachstums in Prostata-Karzinomen
Thompson et al., 2004	Steigerung der medullären Adipogenese in Röhrenknochen
Gauna et al., 2007	Regulation des Glukosemetabolismus und der Insulinsekretion

In Anbetracht der aktuellen Datenlage sind somit weder die physiologische Wirkung im Kontext der Appetitregulation noch die zugrunde liegenden Wirkmechanismen ausreichend aufgeklärt. Um die biologische Bedeutung von desacyl-Ghrelin umfassend zu untersuchen, erscheint es daher sinnvoll, die Wirkung dieses Peptids auf die Nahrungsaufnahme, die Körpergewichtsentwicklung sowie die neuronale Aktivierung in Hypothalamus und Hirnstamm weitergehend zu erforschen.

#### 1.3 Obestatin

Obestatin wurde im Jahre 2005 im Rahmen bioinformatischer Untersuchungen der Forschungsgruppe um Zhang entdeckt (Zhang et al., 2005). Durch den Vergleich der Aminosäuresequenz des Präproghrelins verschiedener Spezies konnte neben der für Ghrelin kodierenden Nterminalen Sequenz (rote Peptidkette in Abb. 1.5) eine weitere hochkonservierte Region des Ghrelin-Gens ermittelt werden (Zhang et al., 2005). Diese kodiert für jenen C-terminalen Abschnitt des Präproghrelins, aus dem durch posttranslationale Modifikation das 23 Aminosäuren umfassende Peptid Obestatin (grüne Peptidkette in Abb. 1.5) entsteht (Zhang et al., 2005).



Abbildung 1.5: Posttranslationale Prozessierung von Präproghrelin zu Obestatin sowie die Aminosäuresequenz des humanen Obestatins im Vergleich zum Obestatin der Ratte (Zhang et al., 2005). (AS = Aminosäuren)

Obestatin wurde initial aus Zellen des Magens isoliert (Zhang et al., 2005), neuere Untersuchungen zeigten zudem auch eine Synthese des Peptids in weiten Teilen der gastrointestinalen Mukosa, in Zellen des Plexus myentericus sowie in den Leydigzellen des Hodens (Dun et al., 2006).

Die Annahme, dass Obestatin ein eigenständiger, physiologisch relevanter Mediator und nicht ein Nebenprodukt der Ghrelin-Synthese ist, basiert nicht nur auf der ausgeprägten Sequenzhomologie des kodierenden Genabschnitts in vielen Säugetierspezies, sondern wird zudem durch die differierenden Sekretionsmuster beider Peptide gestützt (Zizzari et al., 2007). Sowohl Obestatin als auch Ghrelin werden pulsatil in einem ultradianem Rhythmus sezerniert, allerdings unduliert die Obestatin-Ausschüttung niederfrequenter als die Ghrelin-Freisetzung, sodass die plasmatische Obestatinkonzentration nicht mit dem Ghrelinspiegel korreliert (Zizzari et al., 2007). Auch die Regulation der Freisetzung bei metabolischer Stimulation unterscheidet die beiden Peptide. Während die Obestatin-Plasmakonzentration bei längerer Nahrungskarenz je nach Studie sank oder keine Veränderung zeigte, stieg der Ghrelinspiegel unter diesen Bedingungen stets an (Tschöp et al., 2000; Zhang et al., 2005; Zizzari et al., 2007).

Trotz dieser Indizien, die für eine physiologische Bedeutung von Obestatin sprechen, gibt es jedoch auch Befunde, die eine biologische Relevanz des Peptids fragwürdig erscheinen lassen. So weist etwa das Präproghrelin einiger Affenspezies eine Aminosäuresequenz auf, die eine Entstehung von Obestatin aus dem Vorläuferprotein durch proteolytische Spaltung in diesen Arten unwahrscheinlich macht (Garg, 2007). Auch der direkte Nachweis einer *in vivo*-Synthese von Obestatin steht noch aus (Garg, 2007). Zudem zeigten aktuelle methodische Untersuchungen von Bang et al. in diesem Kontext, dass die bisherigen Assays andere Nebenprodukte der Ghrelin-Synthese anstelle des Obestatin-Spiegels erfasst haben könnten (Bang et al., 2007). Des Weiteren lassen sehr unterschiedliche Messwerte der plasmatischen Obestatin-Konzentration bei vergleichbaren Populationen auf eine fehlende Standardisierung und Genauigkeit dieser Tests schließen (Garg, 2007).

Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass der hochkonservierte C-Terminus des Präproghrelins nicht für das separate, biologisch aktive Peptid Obestatin kodiert, sondern lediglich im Rahmen der Ghrelin-Synthese an der Veresterung des Proghrelins mit einem Oktanoylrest durch die Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) beteiligt sein könnte (Yang et al., 2008).

Neben der widersprüchlichen Datenlage bezüglich der Synthese und der Sekretion von Obestatin umfasst die wissenschaftliche Kontroverse auch die Frage nach den physiologischen Effekten des Peptids und den zugrunde liegenden Wirkmechanismen.

Der Name Obestatin verweist auf den initial von Zhang et al. postulierten anorexinogenen Effekt dieses Mediators und setzt sich aus den Wortteilen *obedere*, dem lateinischen Ausdruck für "verschlingen", sowie dem Suffix *-statin*, bezeichnend für eine inhibitorische Wirkung, zusammen (Zhang et al., 2005). Allerdings zeigten die zahlreichen, seit der Entdeckung des Peptids im Jahre 2005 durchgeführten verhaltensbiologischen Studien zur appetitregulatorischen Wirkung von Obestatin unterschiedliche Resultate.

So bewirkte die Applikation des Peptids in Nagern entweder eine signifikante Inhibition (Zhang et al., 2005; Bresciani et al., 2006; Green et al., 2007; Lagaud et al., 2007), lediglich eine tendenzielle Reduktion (Holst et al., 2006; Samson et al., 2006; Sibilia et al., 2006) oder aber gar keine Modulation der Nahrungsaufnahme (Gourcerol et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; Seoane et al., 2006; De Smet et al., 2007; Zizzari et al., 2007).

Auch im Kontext einer eventuellen Gewichtsregulation durch exogenes Obestatin liegen widersprüchliche Resultate vor. Während einige Studien eine Abnahme des Körpergewichts nach Obestatin-Applikation zeigten (Zhang et al., 2005; Samson et al., 2006; Lagaud et al., 2007), wurde in anderen Untersuchungen kein Einfluss auf die Gewichtsentwicklung festgestellt (Nogueiras et al., 2006; Sibilia et al., 2006).

Die Beeinflussung der gastralen und jejunalen Motorik durch Obestatin ist ebenfalls umstritten. In diesem Zusammenhang deuteten erste *in vitro*-Experimente eine inhibitorische Wirkung auf die Magenentleerung an (Zhang et al., 2005), während weitere Untersuchungen weder *in vivo* noch *in vitro* einen Effekt auf die gastrointestinale Motilität zeigten (Gourcerol et al., 2006; De Smet et al., 2007; Bassil et al., 2007).

Zizzari et al. postulierten zudem eine Ghrelin-antagonistische Wirkung von Obestatin am GHS-R1a *in vivo*, nicht aber *in vitro* (Zizzari et al., 2007), während weitere Studien keine derartigen Effekte (Zhang et al., 2005; Bresciani et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; Samson et al., 2006; Seoane et al., 2006) und auch keinen Einfluss von Obestatin auf die Sekretion anderer Peptidhormonen feststellten (Yamamoto et al., 2007). Somit lässt sich konstatieren, dass anhand der bislang durchgeführten Studien zu Obestatin keine eindeutige Aussage bezüglich der biologischen Relevanz des Peptids im Kontext der Appetitregulation getroffen werden kann.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die differierenden Untersuchungsergebnisse bietet jedoch die Beobachtung von Samson et al., dass die zentrale Applikation von Obestatin die Angiotensin-II-induzierte Wasseraufnahme bei Ratten dosisabhängig senkt (Samson et al., 2006). Somit könnte der in einigen Untersuchungen beschriebene appetithemmende Effekt von Obestatin sekundär durch die verminderte Wasseraufnahme verursacht sein, bedingt durch ein Phänomen, das als Dehydratations-Anorexie bezeichnet wird (Watts et al., 1999).

Dennoch ist bislang nicht geklärt, über welchen Rezeptor die eventuelle Modulation des Trinkverhaltens, der Nahrungsaufnahme und des Schlafrhythmus (Szentirmai und Krueger, 2006) vermittelt wird. Zhang et al. postulierten zunächst, dass Obestatin mit hoher Affinität an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 39 (GPR-39) bindet und über diesen Mechanismus zu einer verzögerten Magenentleerung führt (Zhang et al., 2005). Auch in anderen Organen, wie zum Beispiel in Duodenum, Ileum, Leber, Hypophyse und Hypothalamus, wiesen Zhang et al. die Expression der GPR-39-Rezeptor-mRNA mittels *real-time* RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) nach (Zhang et al., 2005). In weiteren Studien konnte jedoch mittels *in situ*-Hybridisierung und *real-time* PCR keine GPR-39-mRNA im Hypothalamus, also dem Ort der zentralen Appetitregulation, nachgewiesen werden (Nogueiras et al., 2006; Jackson et al., 2006).

Inzwischen wurde die Hypothese der Interaktion von Obestatin mit dem GPR-39-Rezeptor vollends verworfen, da weder andere Arbeitsgruppen (Holst et al., 2006; Lauwers et al., 2006; Chartrel et al., 2007) noch Zhang et al. selbst (Zhang et al., 2007) die spezifische Bindung von Obestatin an den Rezeptor reproduzieren konnten. Somit ist weiterhin unklar, über welchen Rezeptor Obestatin seine Wirkungen vermittelt und auch bezüglich der zentralen Wirkung von Obestatin liegen derzeit noch keine Erkenntnisse vor.

Zusammenfassend liefern die bisherigen Publikationen zur appetitregulatorischen Wirkung von Obestatin somit kein schlüssiges Konzept hinsichtlich der physiologischen Rolle dieses Peptids, da in diesem Zusammenhang weder die verhaltensbiologischen Effekte noch die zugrunde liegenden Mechanismen ausreichend erforscht sind. Hieraus ergibt sich für die vorliegende Studie die Fragestellung, ob Obestatin einen modulierenden Effekt auf das Fressverhalten von Ratten aufweist und inwiefern das Peptid die neuronale Aktivität appetitregulatorischer Kernegebiete in Hypothalamus und Hirnstamm beeinflusst.

#### 1.4 Ziele der Untersuchungen zu Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin

Das komplexe System humoraler Faktoren, die in die Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energiehömoostase involviert sind, ist aufgrund der rasant zunehmenden Zahl übergewichtiger Menschen von enormem wissenschaftlichen Interesse. In diesem Zusammenhang stehen insbesondere peptiderge Mediatoren, die im Rahmen der *brain-gut-axis* an der Appetitregulation beteiligt sind, im Fokus der aktuellen Forschung.

Drei dieser gastrointestinalen Neuropeptide sind die Substanzen Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin, die durch eine jeweils unterschiedliche posttranslationale Prozessierung als Derivate des gemeinsamen Vorläuferproteins Präproghrelin entstehen.

Ghrelin ist das einzige bislang bekannte periphere Orexinogen. Während der stimulierende Effekt auf die Nahrungsaufnahme unumstritten ist, sind die Mechanismen, die der Vermittlung der Ghrelin-Wirkung zugrunde liegen, nur unvollständig verstanden. Verschiedene Studien zeigten, dass die Applikation von Ghrelin zu einer neuronalen Aktivierung in zentralen Kerngebieten der Appetitregulation in Hypothalamus und Hirnstamm führt und dass die orexinogene Wirkung des Peptids durch die Neuromodulatoren NPY und AgRP vermittelt wird. Hingegen ist nur teilweise bekannt, welche Interaktion bei der Verarbeitung des Ghrelin-Stimulus zwischen den verschiedenen appetitregulatorischen Hirnkernen stattfindet.

In dieser Studie wird deshalb die modulierende Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die neuronale Aktivität in Hirnstamm und Hypothalamus anhand des Fos-Expressionsmusters (vgl. hierzu Abschnitt 2.2.3.1) überprüft. Im Fokus steht hierbei insbesondere der dorsomediale Hypothalamus (DMH), dem zahlreiche Autoren eine wesentliche Bedeutung als Integrations-system der zentralen Appetitregulation zuschreiben (Elmquist et al., 1997; Dai et al., 1998; Elias et al., 2000; Kobelt et al., 2006b; Zhu et al., 2007). Zudem erfolgt die Phänotypisierung intrahypothalamischer Projektionsfasern mittels immunhistochemischer Detektion der Neuropeptide NPY und AgRP, da diese Transmitter für den orexinogenen Effekt von Ghrelin essentiell sind (Chen et al., 2004a) und ihre Lokalisation somit Aufschluss über die zentralen Wirkmechanismen des Peptids liefern könnte.

Die Datenlage bezüglich der physiologischen Wirkung von desacyl-Ghrelin ist indes weit weniger eindeutig. Zum einen wurden nur wenige Studien zu dieser Thematik durchgeführt, zum anderen differieren die Ergebnisse dieser Untersuchungen stark. Insgesamt weisen jedoch einige Anhaltspunkte auf einen appetitregulatorischen Effekt des Peptids hin.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wird in verhaltensbiologischen Experimenten die Wirkung von intraperitoneal injiziertem desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme und der Effekt einer regelmäßigen desacyl-Ghrelin-Applikation auf die Körpergewichtsentwicklung in männlichen adipösen Zucker-Ratten (fa-/fa-Ratten, s. Abschnitt 2.1.4) untersucht. Mögliche zentrale Effekte des Peptids werden in einer molekularmorphologischen Studie zur desacyl-Ghrelin-induzierten neuronalen Aktivierung in Hypothalamus und Hirnstamm im Verlauf der Dunkelphase, also dem Zeitraum der höchsten physiologischen Nahrungsaufnahme evaluiert.

Auch die inhibitorische Wirkung von Obestatin auf die Nahrungsaufnahme ist in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur umstritten. Ferner liegen widersprüchliche Resultate bezüglich der Biosynthese des Peptids, der Sekretion sowie anderweitiger physiologischer Effekte vor. Hierbei ist insbesondere unklar, ob das Peptid überhaupt eine biologische Relevanz besitzt und ob die kontroversen Ergebnisse bisheriger Untersuchungen aus den unterschiedlichen Versuchsbedingungen der verschiedenen Experimente resultierten. Darüber hinaus befasste sich bislang noch keine Studie mit der zentralen Wirkung von Obestatin.

In einer verhaltensbiologischen Versuchsreihe wird deshalb zu unterschiedlichen Tageszeiten und unter verschiedenen metabolischen Ausgangsbedingungen die beschriebene anorexinogenen Wirkung von Obestatin mit der Suppression der Nahrungsaufnahme durch Cholecystokinin (CCK) verglichen. Zudem wird in der vorliegenden Studie erstmals überprüft, welchen Einfluss die intraperitoneale Gabe des Peptids auf die neuronale Aktivität appetitregulatorischer Zentren in Hirnstamm und Hypothalamus ausübt. Untersucht wird hierbei die Obestatin-induzierte Neuronenaktivierung im Vergleich zur Aktivitätsänderung nach der Applikation von CCK oder Vehikellösung.

# 2. Material und Methoden

## 2.1 Materialien

# **2.1.1.1 Peptide**

Cholecystokinin (CCK)	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland
Desacyl-Ghrelin	Peptides International, Louisville, USA
Ghrelin	Tocris, Ellisville, usa
Obestatin	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland

## 2.1.1.2 Antisera

Biotin-SP-goat-anti-rabbit-IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
FITC-donkey-anti-goat-IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
FITC-donkey-anti-rabbit-IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
FITC-goat-anti-rabbit-IgG	Sigma, St. Louis, USA
Goat-anti-AgRP	Neuromics, Minnesota, USA
Guinea-pig-anti-NPY	Abcam, Cambridge, UK
Normal donkey serum (NDS)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Normal goat serum (NGS)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Rabbit-anti-rat-c-Fos	Oncogene Research Products, Boston, USA
TRITC-donkey-anti-goat-IgG	Molecular Probes, Eugene, USA
TRITC-rabbit-anti-guinea-pig-IgG	Sigma, St. Louis, USA

# 2.1.1.3 Medikamente

Dextran 75 (Longasteril®)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Heparin (Liquemin®)	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland
Ketamin	DeltaSelect, Dreieich, Deutschland
Natriumchloridlösung (NaCl 0,9%)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Xylazin (Rompun® 2%)	Bayer, Leverkusen, Deutschland

# 2.1.1.4 Chemikalien

1,4-Diazabizyklo-2,2,2-oktan (DABCO)	Sigma, St. Louis, USA	
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, St. Louis, USA	
Ammoniumhydroxid (NH4OH)	Sigma, St. Louis, USA	
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na	a2HPO4·2H2O) Merck, Darmstadt, Deutschland	
Einbettmedium (Tissue freezing medium®) Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland		
Fluoreszein-konjugiertes Avidin D	Vector Laboratories, Burlingame, USA	
Flüssigstickstoff (N <sub>2</sub> )	AGA GmbH, Schwechat, Österreich	
Glutardialdehyd (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Glycerol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland	
n-Hexan ( $C_8H_{18}$ )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Natriumborhydrid (NaBH <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland	
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH2PO4·H2O) Merck, Darmstadt, Deutschland		
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Paraformaldehyd (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Sigma, St. Louis, USA	
Pikrinsäure (Trinitrophenol)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz	
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA	
Saccharose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland	

# 2.1.1.5 Geräte

Binokulares Mikroskop	Zeiss Opton, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank (Liebherr Premium -20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (Ultra low freezer -80 °C)	New Brunswick Scientific, New Brunswick, Kanada
Heizplatte (Rec-G)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Horizontalschüttler (HS 250 Basic)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryotom (Typ HM 500 OM)	Mikrom GmbH, Walldorf, Deutschland

Kühlschrank (Liebherr Premium)
Perfusionsmaschine
pH-Meter (Mikroprozessor pH 537)
Pipetten
Shaker (Typ MS1)
Thermometer
Waage (Scout Pro SPU 402)

Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland Forschungslabore der Charité, Berlin, Deutschland WTW, Weilheim, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland Ohaus, Pine Brook, USA

### 2.1.1.6 Verschiedene Materialien

Deckgläser (24×46 mm)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Käfigeinstreu (Lignocel® 3/4)	ssniff, Soest, Deutschland
Kanülen (BD Microlance® 0,4×19 mm)	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Knochenzange	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ III	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ IV	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Messer für Kryotom (16 cm)	Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Pinsel	Pelikan, Hannover, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plastikgefäße (Blue Max®)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Plexiglas-Gehirnmatrix	Forschungslabore der Charité, Berlin, Deutschland
Präparationsbesteck	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Skalpelle (Feather® Nummer 21)	pmf Medizin AG, Köln, Deutschland
Spritzen (BD Plastipak®)	Becton Dickinson, Madrid, spanien
Standard-Rattenfutter (R/M-H Extrudat)	ssniff, Soest, Deutschland
Transferpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten	Sarstedt, Newton, USA

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

#### 2.1.2 Versuchslösungen

#### 2.1.2.1 Herstellung der Peptidlösungen

Die Peptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin wurden jeweils in einer Konzentration von 1 mg/ml in *aqua bidest.* gelöst. 1 mg sulfatiertes Cholecystokinin-Oktapeptid (CCK-8S) wurde in 1 ml 0,1% igem Ammoniumhydroxid in Lösung gebracht. Anschließend wurden diese Peptidlösungen in Fraktionen zu 50 µl aliquotiert, eingefroren und bis zur experimentellen Verwendung bei -20 °C gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn erfolgte die Verdünnung der Peptidlösungen mit 0,15 M steriler Kochsalzlösung, um die jeweils benötigten Endkonzentrationen zu erreichen. Bis zur Injektion wurden die Lösungen auf Eis aufbewahrt.

#### 2.1.2.2 Narkosemittel

Für die Anästhesie vor Beginn der Perfusion erhielt jedes Tier ein Narkosegemisch aus 100 mg Ketamin/kg KG kombiniert mit 10 mg Xylazin/kg KG intraperitoneal appliziert. Ketamin wirkt als NMDA-Rezeptor-Antagonist sowohl analgetisch als auch sedierend und auch der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonist Xylazin führt zu Sedation und Analgesie sowie zu Muskelrelaxation.

#### 2.1.2.3 Fixierungslösung

Als Fixiermittel zur Erhaltung der Gewebemorphologie wurde eine Lösung aus Formaldehyd, Glutaraldehyd und Pikrinsäure verwendet. Formaldehyd und Glutaraldehyd vernetzen zelleigene Proteine untereinander, Pikrinsäure bewirkt eine Ausfällung von Eiweissstoffen als Proteinpikrat. Auf diese Weise werden autolytische Prozesse unterbunden und eine Stabilisierung des Gewebes erreicht. Für die Herstellung von zwei Litern Fixierungslösung wurden 80 g Paraformaldehyd in 1500 ml *aqua bidest.* gelöst und anschließend auf 60 °C erwärmt. Die entstandene Suspension wurde durch die Zugabe von 300 µl 10 N Natriumhydroxid aufgeklart. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden der Lösung 27,6 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 4 ml Glutardialdehyd sowie 333 ml gesättigte Pikrinsäure hinzugefügt und mit *aqua bidest.* auf insgesamt 2000 ml aufgefüllt. Im Anschluss wurde der pH-Wert auf 7,4 titriert und die Lösung filtriert. Aufgrund der Entwicklung toxischer Dämpfe wurde die Fixierungslösung unter einer Dampfabzugseinrichtung hergestellt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

#### 2.1.2.4 Saccharoselösungen

Zur Dehydratation des Hirngewebes als Vorbereitung für die immunhistochemischen Färbungen wurden Saccharoselösungen in drei verschiedenen Konzentrationen (5%, 15% und 27,3%) verwendet. Zur Herstellung der Lösungen wurden jeweils 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und die entsprechenden Mengen Saccharose (50 g, 150 g oder 273 g) in 500 ml *aqua bidest.* gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung mit *aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml aufgefüllt. Nach der Filtrierung wurde die Lösung bei einer Temperatur von 4 °C im Kühlraum gelagert.

#### 2.1.2.5 Phosphatpuffer

Zur Herstellung eines Liters einmolaren Phosphatpuffers (PBS) wurden 80 g Natriumchlorid, 2 g Kaliumchlorid, 2 g Natriumhydroxid, 14 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 2 g Natriumazid in 800 ml *aqua bidest*. gelöst. Nach der Titration des pH-Werts auf 7,4 wurde die Lösung mit *aqua bidest*. auf 1000 ml aufgefüllt. Um die benötigte Endkonzentration von 0,1 M PBS zu erreichen, wurde die Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit *aqua bidest*. verdünnt.

#### 2.1.2.6 Sörensen-Puffer

Der Sörensen-Puffer wurde durch das Mischen der Stammlösung A aus 9,078 g Kaliumdihydrogenphosphat in 1000 ml *aqua bidest*. mit der Stammlösung B aus 11,876 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat in 1000 ml *aqua bidest*. hergestellt. Für einen pH-Wert des Puffers von 8,0 wurden 3,1 ml der Stammlösung A zu 96,9 ml der Stammlösung B hinzugefügt.

#### 2.1.3 Versuchstiere

Für die verhaltensbiologischen Experimente sowie für die immunhistochemischen Studien wurden männliche Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 200 g von der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen.

Die Experimente zu Ghrelin und Obestatin wurden an Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, während bei den Versuchen zu desacyl-Ghrelin Zucker-Ratten (*fa-/fa*-Ratten) verwendet wurden. Bei den als Adipositas-Modell dienenden Zucker-Ratten führt eine Spontanmutation im Leptinrezeptorgen in homozygoten Tieren zu einer massiven Beeinträchtigung der Leptinsensibilität

(Phillips et al., 1996). Das Ausbleiben des physiologischen anorexinogenen Effekts durch den relativen Leptinmangel beeinträchtigt die hypothalamische Sättigungsregulation im Sinne einer ausgeprägten Hyperphagie und führt zu einer Senkung des Energieumsatzes. Diese Konstellation resultiert in einer positiven Energiebilanz und damit in ausgeprägter Adipositas (Beck, 2000).

Die Unterbringung der Versuchstiere in Gruppen von drei bis vier Ratten erfolgte in Makrolon-Käfigen Typ IV mit Lignocel®-Einstreu. Den Zucker-Ratten wurde aus hygienischen Gründen eine normalgewichtige Putzer-Ratte pro Käfig hinzugefügt. Die Haltung fand bei *ad libitum*-Zugang zu Wasser und Standard-Rattenfutter (ssniff® R/M-H Extrudat) unter kontrollierten Umweltbedingungen statt. Die Raumtemperatur lag bei 22  $\pm$  2 °C und die Luftfeuchtigkeit betrug 60%. Der zirkadiane Rhythmus wurde durch eine kontrollierte Beleuchtung in Zwölf-Stunden-Intervallen vorgegeben, wobei die Lichtphase von 06:30 Uhr bis 18:30 Uhr andauerte.

Die Ratten wurden drei Wochen vor dem Experiment bezogen. Nach einer Akklimatisationsphase von sieben Tagen erfolgte eine vierzehntägige Gewöhnung der Tiere an die Experimentalbedingungen. Hierbei wurden die Tiere durch regelmäßiges Training (*Handling*) an die für die Injektion nötige dorsale Körperhaltung gewöhnt. Des Weiteren erfolgte eine soziale Vereinzelung der Tiere in Individualkäfigen (Makrolon Typ III), wobei die Dauer der Separierung schrittweise von vier auf 14 Stunden pro Tag gesteigert wurde. Diese Maßnahmen dienten der Reduktion des Versuchs-induzierten Stresses bei den Tieren. Zum Zeitpunkt des Experiments hatten die Sprague-Dawley-Ratten ein Körpergewicht von ca. 250-300 g erreicht, während die Zucker-Ratten 550-750 g wogen.

Die Versuche waren durch die Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer G0053/06 und G0089/03).

#### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Verhaltensbiologische Untersuchungen zur Nahrungsaufnahme

Die verhaltensbiologischen Studien hatten die Intention, den Effekt von intraperitoneal injiziertem desacyl-Ghrelin und Obestatin auf die Nahrungsaufnahme in Ratten zu untersuchen. Die Tiere wurden randomisiert auf die Versuchsgruppen verteilt und in Individualkäfigen (Makrolon Typ III) vereinzelt. Die Versuche in der Lichtphase umfassten den Zeitraum von 06:30 Uhr bis 18:30 Uhr, die Experimente in der Dunkelphase fanden in der Zeit zwischen 18:30 Uhr und 06:30 Uhr statt. Die Tiere hatten während der gesamten Versuchsdauer *ad libitum*-Zugang zu Trinkwasser und erhielten nach der Injektion der Versuchslösungen eine definierte

Menge Futter. Nach 30 und 60 Minuten sowie nach zwei, drei, vier, fünf und zwölf Stunden wurde durch das Wiegen der jeweils restlichen Futtermenge die verzehrte Nahrungsmenge als Differenz zwischen angebotenem und verbliebenem Futter ermittelt. Für die statistische Auswertung wurde die kumulative Nahrungsaufnahme der einzelnen Versuchsgruppen in g/kg Körpergewicht erfasst (Rüter et al., 2003).

#### 2.2.1.1 Studie zur Appetitregulation durch desacyl-Ghrelin in Zucker-Ratten

Die Untersuchung des Effekts von desacyl-Ghrelin auf das Fressverhalten männlicher Zucker-Ratten wurde in der Dunkelphase durchgeführt. Da in diesem Zeitraum physiologischerweise die größte Futtermenge aufgenommen wird, ist die Wirkung anorexinogener Mediatoren im Vergleich zur Vehikellösung hier am stärksten ausgeprägt (Zucker, 1971). Die Tiere hatten vor Versuchsbeginn *ad libitum*-Zugang zur Standard-Nahrung.

Für das Experiment wurden drei Gruppen gebildet. Zwei Verumgruppen mit je zwölf Tieren erhielten 1 bzw. 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Ratte appliziert. Der Kontrollgruppe (n = 22) wurde 0,15 M NaCl-Lösung verabreicht. Die Injektion erfolgte intraperitoneal, wobei die Peptid- und Vehikellösungen jeweils in Volumina von 500  $\mu$ l administriert wurden.

#### 2.2.1.2 Einfluss von Obestatin auf die Nahrungsaufnahme

Der Einfluss von intraperitoneal injiziertem Obestatin auf die Nahrungsaufnahme wurde an männlichen Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Die Tiere erhielten entweder Obestatin in einer Dosierung von 1 bzw. 5 µmol/kg KG oder physiologische Kochsalzlösung als Negativkontrolle. Zusätzlich wurden bei jedem Versuch vier Tiere als Positivkontrollen mitgeführt, denen 3,5 nmol CCK-8S/kg KG verabreicht wurden. Die intraperitoneale Applikation der Peptide sowie der Vehikellösung, jeweils in Volumina von 500 µl, erfolgte 15 Minuten vor Eintritt in die Lichtbzw. in die Dunkelphase.

Es wurden vier separate Versuche unter verschiedenen metabolischen Ausgangsbedingungen (*ad libitum*-gefütterte oder 16 Stunden gefastete Tiere) und zu unterschiedlichen Tageszeiten (Dunkel- oder Lichtphase) durchgeführt. Entsprechend umfasste die Versuchsreihe eine Untersuchung an *ad libitum*-gefütterten Tieren in der Dunkelphase, ein Experiment mit *ad libitum*-gefütterten Ratten in der Lichtphase, eine Studie mit 16 Stunden gefasteten Tieren in der Dunkelphase sowie einen Versuch mit 16 Stunden gefasteten Ratten in der Lichtphase (vgl. Tab. 2.1).

Versuch Zeitraum		Metabolische	Stichprobengröße (Tiere/Gruppe)				
	Zeitraum		NaCl	Obestatin		CCK-8S	
		Ausgangssituation	0,15 M	1 µmol	5 µmol	3,5 nmol	
1	Dunkelphase	ad libitum-gefüttert	14	14	14	4	
2	Lichtphase	ad libitum-gefüttert	10	10	10	4	
3	Dunkelphase	16 Std. gefastet	8	8	8	4	
4	Lichtphase	16 Std. gefastet	8	8	8	4	

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der Versuchgruppen zur vergleichenden Untersuchung derAppetitregulation durch Obestatin und CCK-8S

## 2.2.2 Studie zur Körpergewichtsentwicklung unter täglicher desacyl-Ghrelin-Gabe

Um die Wirkung von intraperitoneal appliziertem desacyl-Ghrelin auf die Gewichtsentwicklung in Leptinrezeptor-defizienten Zucker-Ratten zu evaluieren, wurden adulte Tiere mit einem Ausgangsgewicht von durchschnittlich  $650 \pm 80$  g verwendet. Die Ratten wurden wie zuvor beschrieben auf die Versuchsbedingungen vorbereitet und randomisiert auf zwei Gruppen mit jeweils acht Tieren verteilt (vgl. Tab. 2.2). Eine unbehandelte Kontrollgruppe (n = 4) wurde zusätzlich mitgeführt, um etwaige stressbedingte Reaktionen beurteilen zu können.

Tabelle	2.2:	Versuchsgruppen	zur	Untersuchung	des	Effekts	von	intraperitonealem
desacyl-	Ghre	lin auf die Körperge	ewich	ntsentwicklung in	n mä	nnlichen	Zuck	er-Ratten

Gruppe	Behandlung	Stichprobengröße
1	2 mal täglich 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier	8 Versuchstiere
2	2 mal täglich 500 µl NaCl-Lösung (0,15 M)	8 Versuchstiere
3	unbehandelte Kontrolltiere	4 Versuchstiere

Durch tägliches Wiegen der Tiere zu einem festgesetzten Zeitpunkt (06:30 Uhr) wurde zunächst die Entwicklung des Körpergewichts vier Tage vor Versuchsbeginn aufgezeichnet. In der achttägigen Versuchsphase wurde den Tieren zweimal täglich 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Tier oder physiologische Kochsalzlösung, jeweils in einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l, intraperitoneal appliziert. Die Injektionen wurden stets unmittelbar vor Eintritt in die Licht-

sowie die Dunkelphase verabreicht. Zudem wurden die Tiere weiterhin täglich gewogen und die Gewichtsentwicklung dokumentiert. Während des Versuchs hatten die Tiere *ad libitum*-Zugang zu Futter und Trinkwasser. Nach Abschluss der Intervention wurde die Entwicklung des Körpergewichts über vier weitere Tage erfasst.

#### 2.2.3 Immunhistochemische Untersuchung der Fos-Expression

#### 2.2.3.1 Fos als Marker der neuronalen Aktivität

Das Proto-Onkogen c-Fos ist ein etablierter Marker zur Detektion der neuronalen Aktivität in Nagern (Hewson und Dickson, 2000; Date et al., 2001; Lawrence et al., 2002; Traebert et al., 2002; Wang et al., 2002). Das Protein gehört zur Gruppe der *"immediately early genes"* und wird in Neuronen auf basalem Niveau konstitutiv exprimiert (Dragunow und Faull, 1989). Die Aufgabe des intranukleären c-Fos-Proteins besteht in der Mitregulation der Transkriptionsrate von Genen des Zellmetabolismus und zellulärer Funktionen (Morgan und Curran, 1991).

Da die Fos-Synthese durch extrazelluläre Stimuli induziert wird, kann durch die immunhistochemische Detektion dieses Proteins eine Aktivierung primärer und sekundärer Neurone sowie von Neuronen höherer Ordnung infolge pharmakologischer, elektrischer oder physiologischer Reize nach entsprechender Intervention dargestellt werden (Hunt et al., 1987; Dragunow und Robertson, 1987; Morgan und Curran, 1991; Fraser und Davison, 1993; Lanteri-Minet et al., 1993; Mönnikes et al., 1997a; Mönnikes et al., 1997b; Mönnikes et al., 2003).

Damit bietet sich die Möglichkeit, die zentrale Wirkung peripher administrierter Peptide in distinkten Hirnregionen zu topographieren sowie die induzierte neuronale Aktivität zu quantifizieren (Kobelt et al., 2004). Beispielsweise führt die Injektion von CCK zu einer gesteigerten Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm (Fraser und Davison, 1992; Kobelt et al., 2006b) und auch die Ghrelin-induzierte neuronale Aktivierung in hypothalamischen Arealen äußert sich in einem veränderten Fos-Expressionsmuster (Hewson und Dickson, 2000; Lawrence et al., 2002).

#### 2.2.3.2 Applikation der Peptide

Die Ghrelin-induzierte Fos-Expression in Hypothalamus und Hirnstamm wurde in der Lichtphase an männlichen Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Zu dieser Tageszeit sind die Tiere physiologischerweise gesättigt, weshalb ein orexinogener Mediator wie Ghrelin hier die stärkste

Wirkung entfaltet (Zucker, 1971). Die intraperitoneale Injektion von 3 nmol Ghrelin pro Ratte oder 0,15 M NaCl-Lösung erfolgte am Anfang der Lichtphase jeweils 90 Minuten vor Beginn der Perfusion.

Tabelle 2.3: \	Versuchsgruppen	zur Messung der	Ghrelin-induzierten	neuronalen Aktivität

Behandlung	Zeitpunkt der Applikation	Untersuchungszeitraum	Anzahl
3 nmol Ghrelin/Tier	jeweils 90 Min. vor der Perfusion	Beginn der Lichtphase	n = 5
0,15 M NaCl	5		n = 5

Der Effekt von desacyl-Ghrelin auf die neuronale Aktivierung wurde an adulten Zucker-Ratten in der Dunkelphase evaluiert. Zu diesem Zeitpunkt wird physiologischerweise die größte Nahrungsmenge aufgenommen (Zucker, 1971), sodass ein Sättigungssignal unter diesen Bedingungen die stärkste Wirkung hat.

Den Versuchstieren wurden zu Beginn der Dunkelphase (18:30 Uhr) 5 nmol desacyl-Ghrelin oder physiologische NaCl-Lösung verabreicht. Um den zeitlichen Verlauf der Fos-Expression über zwölf Stunden zu untersuchen, wurden die Tiere nach 1½ Std., 4½ Std. bzw. 12½ Std. transkardial perfundiert.

Tabelle2.4:GruppenzusammenstellungundZeitkurszurUntersuchungderFos-Expression im Verlauf der Dunkelphase nach desacyl-Ghrelin-Gabe

Rohandlung	Zeitpunkt der	Untersuchungs-	Anzahl pro
Dellanulung	Applikation	zeitraum	Zeitpunkt
5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier	Beginn der	1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 4 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> , 12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	n = 3
0,15 M NaCl	Dunkelphase	nach Applikation	n = 3

Für die vergleichende Untersuchung der Fos-Expression nach Applikation von Obestatin und CCK-8S in der Dunkelphase wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Jeweils 90 Minuten vor Perfusionsbeginn wurde den Versuchstieren 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht, 1,75 nmol CCK-8S/kg Körpergewicht oder Vehikellösung injiziert.

Tabelle 2.5: Versuchsgruppen zur vergleichenden Untersuchung der Fos-Induktion durchdie intraperitoneale Applikation von Obestatin und CCK-8S

Behandlung	Zeitpunkt der Applikation	Untersuchungs- zeitraum	Anzahl der Tiere
5 µmol Obestatin/kg KG	ieweils 90 Min. vor	Beginn der	n = 4
1,75 nmol CCK-8S/kg KG	Beginn der Perfusion	Lichtphase	n = 4
0,15 M NaCl		, T	n = 4

Vor Beginn der Operation erhielten die Tiere neben der Narkose, bestehend aus Ketamin und Xylazin, 2500 I.E. Heparin intraperitoneal injiziert, um während der anschließenden Perfusion eine Thrombenbildung im kranialen Gefäßsystem zu verhindern.

#### 2.2.3.3 Durchführung der transkardialen Perfusion

Die transkardiale Perfusion wurde entsprechend der leicht modifizierten Protokolle von Geisler et al. und Kobelt et al. durchgeführt (Geisler et al., 2002; Kobelt et al., 2004). Bei ausreichender Narkosetiefe, gekennzeichnet durch eine fehlende Reaktion auf Schmerzreize, wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Brust- und Bauchhöhle wurden durch einen Medianschnitt eröffnet, wobei Haut, Faszien und Bauchmuskulatur von der Symphyse bis zur oberen Thoraxapertur durchtrennt wurden. Anschließend wurden das Diaphragma und die Rippen in Höhe der linken Medioklavikularlinie von kaudal durchtrennt und ein Wundspreizer angelegt, um den Thorax offen zu halten. Das nun freiliegende Herz wurde mit einer Pinzette fixiert und der linke Ventrikel im Bereich des *Apex cordis* eröffnet. Über diese Inzision wurde die Perfusionskanüle durch den linken Ventrikel vorgeschoben, in der *Aorta ascendens* platziert und mit einer feinen Gefäßklemme fixiert. Eine weitere Inzision im rechten Atrium diente dem Abfluss der Perfusionslösung nach der Passage des großen Kreislaufs.

Die Perfusion wurde mittels einer speziellen, durch Luftkompression gesteuerten Perfusionsmaschine durchgeführt. Zur Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem wurden die Tiere über zehn Sekunden mit einem Druck von 210 mmHg mit 100 ml Plasmaexpander perfundiert. Im Anschluss wurde ein Liter Fixierlösung mit einem Perfusionsdruck von 210 mmHg für fünf Minuten und mit 20 mmHg über weitere 20 Minuten verabreicht, um die Zellstrukturen des Gehirngewebe zu erhalten (Geisler et al., 2003). Die folgende Gabe von 500 ml 5% iger Saccharoselösung über fünf Minuten mit einem Druck von 100 mmHg diente der Entfernung verbliebener Perfusionslösung und der Einleitung der Dehydratation des Gewebes (Barthel und Raymond, 1990).

#### 2.2.3.4 Präparation der Gehirne

Nach Abschluss der Perfusion erfolgte die Dekapitation oberhalb der Scapulae mit Hilfe eines Skalpells und die Freilegung des Gehirns durch Trepanation mittels einer Knochenzange. Die Dura mater wurde entfernt und das komplette Gehirn vom rostralen Pol bis zum oberen Zervikalmark aus dem Schädelknochen herausgelöst. In einer speziell zu diesem Zweck konstruierten Plexiglas-Gehirnmatrix wurden die Gehirne durch Koronarschnitte in vier Blöcke (Frontalhirn, Dienzephalon inklusive Hypothalamus, Mesenzephalon und Rhombenzephalon mitsamt zervikalem Rückenmark) geteilt. Zur Dehydratation des Gewebes wurden diese Blöcke in einer aufsteigenden Saccharosereihe der Konzentrationen 5%, 15% sowie abschließend 27,3% jeweils etwa zwölf Stunden aufbewahrt (Barthel und Raymond, 1990; Romijn et al., 1999). Nach dieser Prozedur wurden die einzelnen Blöcke in einem Einbettmedium auf Korkscheiben fixiert, katalogisiert und unter Kühlung durch Flüssigstickstoff bei einer Temperatur von -70 °C in n-Hexan schockgefroren. Die Lagerung der Hirnblöcke erfolgte im Gefrierschrank bei -80 °C in Plastikgefäßen, denen einige Milliliter gefrorenes *aqua bidest.* zugesetzt waren, um eine Austrocknung des Hirngewebes zu vermeiden.

#### 2.2.3.5 Herstellung der Gehirnschnitte am Kryotom

Mit dem Kryotom wurden 25  $\mu$ m dicke Gehirnschnitte von Hypothalamus und Hirnstamm angefertigt. Zur Orientierung diente hierbei der stereotaktische Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Die Gehirnschnitte lagerten bis zur Weiterverarbeitung in Multiwell®-Zellkulturplatten in 0,1 M PBS bei 4 °C im Kühlraum.

#### 2.2.3.6 Prinzip der immunhistochemischen Färbungen

Zur Darstellung der Proteine Fos, NPY und AgRP wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung genutzt. Hierbei wurde zunächst ein gegen das zu detektierende Antigen gerichteter IgG-Primärantikörper verwendet. Nachfolgend wurde dieser Primärantikörper mit

einem Fluoreszenz-konjugierten speziesspezifischen Anti-IgG-Sekundärantikörper markiert (vgl. Abb. 2.1).



# Abbildung 2.1: Prinzip der immunhistochemischen Färbung verschiedener Antigene durch die Verwendung unterschiedlicher Primär- und Sekundärantikörper

Um ein optimales Ergebnis zu erzielen, wurden alle Färbeschritte der folgenden Protokolle in Zellkulturplatten an frei im jeweiligen Medium schwimmenden Gehirnschnitten vorgenommen (*free-floating*-Technik). Dadurch wirkten die Antikörper und Seren an einer großen Oberfläche und diffundierten von allen Seiten in das Gewebe (Kobelt et al., 2004).

Zudem konnten viele Gehirnschnitte gleichzeitig und weitgehend verlustfrei gefärbt werden, ohne bei längeren Inkubationszeiten auszutrocknen (Sofroniew und Schrell, 1982). Sämtliche Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Während der Wasch- und Inkubationsschritte wurden die Gehirnschnitte auf einem Horizontalschüttler aufbewahrt.

Nach Beendigung aller Färbeschritte wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die Schnitte mit 100 mg DABCO pro Milliliter in 90% Glycerol für die Fluoreszenzmikroskopie und 10% Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4) eingedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Aufbewahrung der gefärbten Hirnschnitte erfolgte bis zur Auswertung am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM) im Gefrierschrank bei -20 °C.

#### 2.2.3.7 Protokoll 1 zur Darstellung von Fos

Nach der Entfernung des zur Aufbewahrung verwendeten Phosphatpuffers wurden die Gehirnschnitte für 15 Minuten in 1% igem Natriumborhydrid inkubiert, um die durch Aldehyde wie Formaldehyd und Glutaraldehyd induzierte Fluoreszenz des Gewebes zu reduzieren (Clancy und Cauller, 1998). Anschließend wurden drei Waschgänge mit PBS durchgeführt, um das Natriumborhydrid wieder zu entfernen. Die folgende Inkubation in 5% Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) versetzt mit 0,2% Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) und 0,3% Triton X-100 in PBS für 60 Minuten diente der Blockierung möglicher unspezifischer Bindung der Antikörper an Gewebestrukturen und zur Verbesserung der Membranpermeabilität.

Der Primärantikörper zum Nachweis des Proteins Fos (*Rabbit-anti-rat-cFos*) wurde in einer Verdünnung von 1:4.000 in 5% BSA in PBS gelöst, mit 0,2% Natriumazid versetzt und für 42 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Folgenden wurde wiederum für zwei Stunden mit einer Lösung aus 5% BSA und 0,2% Natriumazid in PBS blockiert. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde ein Fluoreszein-Isothiocyanat-(FITC-)konjugierter Sekundärantikörper (*Goat-anti-rabbit-IgG*) verwendet, der in einer Verdünnung von 1:600 in 5% BSA in PBS gelöst war und für zwölf Stunden einwirkte. Nach dreimaligem Spülen mit PBS folgte die Gegenfärbung mit dem Fluorochrom Propidiumjodid (2,5  $\mu$ g/ml in PBS) für 15 Minuten. Diese interkalierende Substanz dient der Anfärbung des Zellchromatins und ermöglicht dadurch die topographische Orientierung bei der mikroskopischen Auswertung der relevanten Kerngebiete. Nach der Inkubation in Propidiumjodid erfolgte letztmalig eine Spülung der Gehirnschnitte mit PBS, um ungebundene Färbechemikalien zu entfernen. Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte wie beschrieben auf Objektträger aufgezogen, mit *anti-fading*-Substanz eingedeckt und im Gefrierschrank bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.3.8 Protokoll 2 zur Darstellung von Fos und NPY bzw. Fos und AgRP

Analog zu dem unter 2.2.3.7 erläuterten Vorgehen wurden die Gehirnschnitte wiederum in Natriumborhydrid inkubiert, unspezifische Bindungsstellen mit 5% igem Affenserum (*normal donkey serum*, NDS) blockiert und anschließend mit dem Anti-Fos-Primärantikörper (*Rabbit-anti-rat-cFos*) in 5% NDS mit 0,2% Natriumazid in PBS versetzt. Zudem wurde der Lösung entweder ein Anti-NPY-Primärantikörper (*Goat-anti-NPY*, Verdünnung 1:200) oder ein Anti-

AgRP-Primärantikörper (*Goat-anti-AgRP*, Verdünnung 1:500) zugefügt und für 42 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Blockierung mit 5% NDS. Zur Darstellung der gegen NPY bzw. AgRP gerichteten Primärantikörper aus der Ziege wurde ein Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-(TRITC-)markierter Sekundärantikörper (*Donkey-antigoat-IgG*, Verdünnung 1:200) in 5% NDS mit 0,2% NaN<sub>3</sub> in PBS gelöst und für 12 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Gehirnschnitte erneut gewaschen und mit NGS blockiert. Zur Detektion des Anti-Fos-Primärantikörpers wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt: I) Bei der Färbung gegen Fos und NPY wurde ein FITC-konjugierter Sekundärantikörper (*Goatanti-rabbit-IgG*, Verdünnung 1:600, Inkubationszeit 12 Std.) verwendet und anschließend mit PBS gewaschen.

II) Bei der Darstellung von Fos und AgRP diente ein Biotin-SP-konjugierter Sekundärantikörper (*Goat-anti-rabbit-IgG*, Verdünnung 1:1.000) in 3% NGS mit 0,2% NaN<sub>3</sub> zur Markierung des Anti-Fos-Primärantikörpers. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls zwölf Stunden. Nach drei Spülvorgängen mit PBS wurden die Schnitte zunächst für eine Stunde in Sörensen-Puffer (pH 8,0) und anschließend für fünf Stunden in Sörensen-Puffer (pH 8,0) mit Fluoreszein-konjugiertem Avidin D (20  $\mu$ g/ml) inkubiert und nachfolgend dreimal in Sörensen-Puffer (pH 8,0) gewaschen.

Abschließend erfolgte jeweils eine Gegenfärbung mit DAPI (2 µg/ml in PBS) zur Darstellung der Zellkerne. Nach drei weiteren Waschgängen wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen und im Gefrierschrank aufbewahrt.

#### 2.2.3.9 Protokoll 3 zur Darstellung von NPY und AgRP

Die Gehirnschnitte wurden, wie beschrieben, mit Natriumborhydrid behandelt, gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation mit 5% igem NDS, versetzt mit Natriumazid und Triton X-100 in PBS blockiert. Anschließend wurden die Primärantikörper gegen NPY (*Guinea-pig-anti-NPY*, 1:500) und AgRP (*Goat-anti-AgRP*, 1:500) in 5% NDS mit 0,2% Natriumazid in PBS gelöst und für 42 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit PBS wurden nicht-gebundene Antikörper entfernt. Mit einer Lösung aus 5% NDS und 0,2% Natriumazid in PBS wurde wiederum für zwei Stunden blockiert. Zur Darstellung des gegen NPY gerichteten Primärantikörpers wurde ein TRITC-markierter Sekundärantikörper (*Donkey-anti-guinea-pig-IgG*) verwendet, während die Detektion des Anti-AgRP-Primäranti-körpers mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper (*Donkey-anti-goat-IgG*) erfolgte. Die Sekundärantikörper waren, jeweils 1:200 verdünnt, in 5% NDS mit 0,2% NaN<sub>3</sub> in PBS gelöst
und wirkten für 12 Stunden ein. Dem dreimaligen Waschen in PBS folgte die Gegenfärbung mit DAPI (2 µg/ml in PBS) zur Darstellung der Zellkerne. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Gehirnschnitte letztmalig in PBS gespült, um überschüssige Färbechemikalien zu entfernen. Im Anschluss wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen, mit *anti-fading*-Substanz eingedeckt und bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

# 2.2.3.10 Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Auswertung wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM 510 Meta) verwendet. Die Laser-, Filter- und Blenden-Einstellungen des cLSM zur Anregung sowie zur Signaldetektion der einzelnen Fluorochrome sind in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6	: Einstellungen	des cLSM zur	<b>Detektion der</b>	verwendeten	Fluorochrome
	0				

Fluorochrom	Exzitations- wellenlänge	Emissions- wellenlänge	Filter	Bündelspalt
DAPI	345 nm	455 nm	FT 395	BP 365/12
FITC	488 nm	519 nm	BP 505-550	HFT UV/488/543/633
Propidiumjodid	543 nm	617 nm	BP 560-615	HFT UV/488/543/633
TRITC	547 nm	572 nm	BP 560-615	HFT 488/543

Die Fos-Signale (Fos-Immunreaktivität) wurden semiquantitativ beurteilt. Bei den nach Protokoll 1 und 2 gefärbten Schnitten galten die Zellen, die ein grünes Fluoreszenzsignal im Zellkern zeigten, als Fos-positiv. Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid oder DAPI erzeugte ein rotes bzw. blaues Fluoreszenzsignal im Zellkern und ermöglichte so die genaue Abgrenzung der untersuchten Gehirnkerne (ARC, PVN, VMH, DMH, NTS sowie AP) von benachbarten Gehirnstrukturen. Als anatomische Orientierung dienten die Abbildungen aus dem Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Für jeden Gehirnschnitt wurde so die Anzahl der im jeweiligen Gehirnkern lokalisierten Fos-positiven Neurone bestimmt. Sowohl die Begutachtung am Mikroskop als auch die anschließende Auszählung am Computer erfolgte verblindet, um einen möglichen Einfluss auf das Ergebnis zu vermeiden.

# 2.2.4 Statistische Auswertung

Sämtliche statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm SigmaStat® (Version 3.1).

## 2.2.4.1 Statistische Auswertung der verhaltensbiologischen Versuche

Die Daten zur Modulation der Nahrungsaufnahme durch desacyl-Ghrelin und Obestatin wurden als Mittelwert der Nahrungsaufnahme  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (*standard error of mean*, SEM) in g/kg Körpergewicht erfasst und mittels der Varianzanalyse ANOVA (*analysis of variance*) ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Fisher-LSD-Test (*least significant difference test*) evaluiert, wobei p < 0,05 als signifikant galt.

# 2.2.4.2 Statistische Auswertung der Studie zur Körpergewichtsentwicklung

Die durchschnittliche Körpergewichtszunahme in Gramm wurde in den verschiedenen Gruppen als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben und mittels der Varianzanalyse ANOVA untersucht. Mit dem Fisher-LSD-Test wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ermittelt, wobei ein Signifikanzniveau von p < 0,05 gewählt wurde.

## 2.2.4.3 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Experimente

Die immunhistochemisch gefärbten Gehirnschnitte wurden mit Hilfe des Programms *Image J*® ausgewertet, wobei bilateral jeweils 10 Schnitte des PVN (Bregma -1,30 bis -2,12 mm) sowie des DMH (Bregma -2,56 bis -3,60 mm), je 20 Schnitte des ARC (Bregma -2,12 bis -3,60 mm) und des VMH (Bregma -2,12 bis -3,60 mm) und jeweils 15 Schnitte des NTS (Bregma -13,24 bis -14,30 mm) sowie unilateral 6 Schnitte der AP (Bregma -13,68 bis -14,08 mm) ausgezählt wurden. Als Orientierung diente der stereotaktische Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Die Daten wurden als durchschnittliche Anzahl Fos-positiver Neurone pro Schnitt in jeder Versuchsgruppe  $\pm$  SEM erfasst und mittels Varianzanalyse die Normalverteilung der Messwerte überprüft. Differenzen zwischen den Gruppen wurde in der Ghrelin-Studie mithilfe des Student-t-Tests, bei der Untersuchung zu desacyl-Ghrelin unter Verwendung des Mann-Whitney-Tests sowie bei den Obestatin-Versuchen mit dem Fisher-LSD-Test ausgewertet, wobei jeweils p < 0,05 als signifikant galt.

### 3.1 Ghrelin

#### 3.1.1 Beeinflussung der Fos-Expression in Hypothalamus und Hirnstamm durch Ghrelin

Ziel dieses Experiments war es, zu untersuchen, ob neben der bekannten Ghrelin-induzierten neuronalen Aktivierung im Nucleus arcuatus (ARC) und im Nucleus paraventricularis (PVN) auch in anderen appetitregulatorischen Kerngebieten wie dem ventromedialen Hypothalamus (VMH), dem dorsomedialen Hypothalamus (DMH), dem Nucleus tractus solitarius (NTS) oder der Area postrema (AP) eine Modulation der Fos-Expression nach peripherer Ghrelin-Gabe nachzuweisen ist. Hierzu erhielten männliche Sprague-Dawley-Ratten in der Lichtphase Ghrelin in einer Dosis von 3 nmol/Tier (n = 5) oder Vehikellösung (n = 5) intraperitoneal injiziert. Nach der anschließenden transkardialen Perfusion erfolgte die immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne. Für die Beurteilung der neuronalen Aktivierung appetitregulatorischer Zentren im Hypothalamus sowie im Hirnstamm wurde der metabolische Marker Fos detektiert.

Nach der Injektion von Ghrelin konnte im Vergleich zur Behandlung mit Vehikellösung eine signifikant erhöhte Fos-Expression im PVN nachgewiesen werden (Mittelwert Fos-positiver Neurone pro Schnitt  $\pm$  SEM: 69,10  $\pm$  5,26 *vs*. 34,03  $\pm$  2,87 Neurone/Schnitt, p = 0,001; Abb. 3.1 und 3.2). Im ARC war die neuronale Aktivität nach Ghrelin-Gabe verglichen mit der Applikation von NaCl-Lösung ebenfalls gesteigert (49,00  $\pm$  1,87 *vs*. 22,85  $\pm$  1,64 Neurone/Schnitt, p = 0,001; Abb. 3.1 und 3.2).

Auch im DMH induzierte die intraperitoneale Injektion von 3 nmol Ghrelin pro Tier eine signifikante Steigerung der Fos-Expression ( $141,63 \pm 5,19 vs. 82,72 \pm 4,87$  Neurone/Schnitt, p < 0,001; Abb. 3.1 und 3.3). Die durch die Ghrelin-Gabe aktivierten Neurone waren überwiegend im ventralen sowie im dorsalen Subnukleus des DMH lokalisiert, während im kompakten Anteil des Kerns wenige Neurone Fos exprimierten (Abb. 3.3 und 3.4).

Im VMH war hingegen keine Modulation des Fos-Expressionsmusters zu beobachten (53,49  $\pm$  2,97 *vs.* 48,02  $\pm$  2,72 Neurone/Schnitt, p = 0,177; Abb. 3.1 und 3.2). Im Hirnstamm bewirkte die periphere Administration von Ghrelin ebenfalls keine Modulation der neuronalen Aktivität im NTS (42,04  $\pm$  2,31 *vs.* 40,2  $\pm$  2,70 Neurone/Schnitt, p = 0,603; Abb. 3.1 und 3.2) und auch in der AP hatte das Peptid keinen Einfluss auf die Fos-Expression (7,17  $\pm$  0,77 *vs.* 5,28  $\pm$  0,82 Neurone/Schnitt, p = 0,096; Abb. 3.1).



# Abbildung 3.1: Fos-Expression appetitregulatorischer Kerngebiete in Hypothalamus und Hirnstamm nach peripherer Ghrelin-Injektion

Die intraperitoneale Applikation von 3 nmol Ghrelin pro Tier induzierte im Vergleich zur Gabe der Vehikellösung 90 Minuten nach Injektion eine signifikante Erhöhung der neuronalen Aktivität im Nucleus paraventricularis (PVN), im Nucleus arcuatus (ARC) sowie im dorsomedialen Hypothalamus (DMH). Die Fos-Expression im ventromedialen Hypothalamus (VMH), im Nucleus tractus solitarius (NTS) und in der Area postrema (AP) wurde hingegen nicht beeinflusst.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Schnitt aus je fünf Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) der einzelnen Kerngebiete angegeben (i.p. = intraperitoneal).

\*<sup>1</sup>: 3 nmol Ghrelin/Tier vs. NaCl-Lösung: p = 0,001

\*<sup>2</sup>: 3 nmol Ghrelin/Tier vs. NaCl-Lösung: p = 0,001

\*<sup>3</sup>: 3 nmol Ghrelin/Tier vs. NaCl-Lösung: p < 0,001



# Abbildung 3.2: Repräsentative Gehirnschnitte hypothalamischer und medullärer Kerngebiete nach peripherer Ghrelin-Applikation

Intraperitoneal administriertes Ghrelin induzierte im Vergleich zu der Behandlung mit NaCl-Lösung (A, E, I, M) einen Anstieg der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) im PVN (B) sowie im ARC (F), nicht aber im VMH (J) und im NTS (N).

Die Gegenfärbung der Zellkerne mit Propidiumjodid (rotes Fluoreszenzsignal) sowohl bei der Verumgruppe (D, H, L, P) als auch bei den Vehikeltieren (C, G, K, O) diente der Lokalisation der untersuchten Hirnkerne.

Die weißen Linien geben die Ausdehnung der untersuchten Hirnkerne PVN, ARC, VMH und NTS an (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht jeweils 100  $\mu$ m. (3V = dritter Ventrikel, EM = Eminentia mediana)



# Abbildung 3.3: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im dorsomedialen Hypothalamus (DMH)

Im DMH war gegenüber der Applikation von NaCl-Lösung (A) die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) 1½ Stunden nach der Gabe von 3 nmol Ghrelin/Tier (B) signifikant erhöht. Insbesondere im ventralen Anteil des Kerns zeigte sich eine forcierte neuronale Aktivierung.

Zur Lokalisation des DMH wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Vehikeltieren  $(A_1)$  als auch in der Verumgruppe  $(B_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid gegengefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie gibt die Ausdehnung des DMH an, der lateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist und sich in einen kompakten (DMHC), einen ventralen (DMHV) und einen dorsalen (DMHD) Subnukleus untergliedern lässt (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken repräsentiert 100 µm.





# Abbildung 3.4: Fos-Expression in den Subnuklei des dorsomedialen Hypothalamus nach peripherer Ghrelin-Injektion

Die intraperitoneale Applikation von 3 nmol Ghrelin pro Tier induzierte im Vergleich zur Gabe von physiologischer NaCl-Lösung 90 Minuten nach der Injektion eine signifikante Steigerung der neuronalen Aktivität im DMH, wobei die Fos-exprimierenden Neurone vor allem im ventralen (DMHV) und in geringerem Umfang auch im dorsalen (DMHD) Subnukleus des DMH lokalisiert waren. Im kompakten Anteil des DMH (DMHC) war die Anzahl der aktivierten Neurone hingegen gering.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone der einzelnen Subnuklei  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) angegeben, wobei die untersuchte Stichprobe fünf Tiere umfasste.

# 3.1.2 Phänotypisierung intrahypothalamischer Projektionsfasern

Zur Phänotypisierung der in den DMH projizierenden Fasern aus anderen hypothalamischen Kerngebieten dienten verschiedene Kombinationen von Färbungen zur Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos sowie der Neuromodulatoren Neuropeptid Y (NPY) und *Agouti Related Peptide* (AgRP).

Die Darstellung der Proteine Fos und NPY zeigte, dass die nach Ghrelin-Gabe Fosexprimierenden Neurone vor allem im ventralen Subnukleus des DMH lokalisiert und von NPYpositiven Fasern umgeben sind (vgl. hierzu Abb. 3.5).

Die Doppelfärbung gegen Fos und AgRP ergab, dass auch dieser Neuromodulator in den Projektionsfasern, die den DMH erreichen, nachweisbar ist. Durch die konfokale Laser Scanning Mikroskopie war zudem eine dreidimensionale Rekonstruktion der Gehirnschnitte möglich. Diese räumliche Darstellung verdeutlichte, dass die AgRP-positiven Projektionsfasern jene Neurone, die nach peripherer Ghrelin-Gabe Fos exprimieren, als dichtes Netzwerk umgeben (s. Abb. 3.6).

Die simultane Detektion von NPY und AgRP in einer Färbung zeigte eine ausgeprägte Kolokalisation dieser beiden Neuromodulatoren in Projektionsfasern, die den DMH erreichen (vgl. Abb. 3.7).

In den Abbildungen 3.5 bis 3.7 sind repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung von Fos und NPY (Abb. 3.5), Fos und AgRP (Abb. 3.6) beziehungsweise NPY und AgRP (Abb. 3.7) im DMH dargestellt.



Abbildung 3.5: Repräsentativer Gehirnschnitt der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos und des Peptids NPY im dorsomedialen Hypothalamus Nach der Gabe von 3 nmol Ghrelin pro Tier war insbesondere im ventralen Subnukleus des DMH eine gesteigerte Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) erkennbar. Zudem stellte sich ein Netzwerk NPY-positiver Fasern (rotes Fluoreszenzsignal) dar, das die Perikarya der Fos-exprimierenden Neurone umgab. Zur Lokalisation des DMH wurden die Zellkerne der Neurone mit DAPI gegengefärbt (blaues Signal).

Der DMH lässt sich in einen kompakten (DMHC), einen ventralen (DMHV) sowie einen dorsalen (nicht dargestellt) Subnukleus untergliedern (Paxinos und Watson, 1997).





# Abbildung 3.6: Darstellung von Fos und AgRP im DMH nach peripherer Ghrelin-Gabe

Die Doppelfärbung zeigt, dass die Fos-exprimierenden Neurone (grünes Fluoreszenzsignal in B-D) im DMH von AgRP-positiven Fasern (rotes Fluoreszenzsignal in A, C und D) umgeben sind. Die Aufnahme von optischen Serienschnitten in der x-y-Ebene mit dem cLSM ermöglicht eine

dreidimensionale Rekonstruktion des Präparats aus einem zweidimensionalen Datensatz. In der räumlichen Darstellung (D) ist ein Netzwerk AgRP-positiver Fasern (\* in D<sub>1</sub>) zu erkennen, die ein Fos-exprimierendes Neuron umgeben. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu$ m in A-C sowie 5  $\mu$ m in D. (DMHC = kompakter DMH; DMHV = ventraler DMH; 3V = dritter Ventrikel)



## Abbildung 3.7: Kolokalisation von AgRP und NPY in Fasern, die in den DMH projizieren

Bei starker Vergrößerung ist in der Doppelfärbung gegen AgRP (grünes Fluoreszenzsignal in A und C) und NPY (rotes Fluoreszenzsignal in B und C) in Fasern, die in den DMH projizieren, eine starke Kolokalisation (C) dieser beiden Neuromodulatoren zu erkennen. Der weiße Balken repräsentiert jeweils 10 µm.

#### **3.2 Desacyl-Ghrelin**

### 3.2.1 Wirkung von desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme

In adulten Zucker-Ratten führte die intraperitoneale Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier im Vergleich zur Vehikelgruppe nach fünf Stunden zu einer signifikante Reduktion der verzehrten Futtermenge (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme in g/kg KG  $\pm$  SEM: 10,79  $\pm$ 0,74 vs. 14,18  $\pm$  0,88 g/kg, p = 0,016; Abb. 3.8A). Nach zwölf Stunden war die kumulative Nahrungsaufnahme sowohl gegenüber der NaCl-Gruppe (21,21  $\pm$  1,33 vs. 26,45  $\pm$  0,99 g/kg, p = 0,005) als auch gegenüber der mit 1 nmol desacyl-Ghrelin behandelten Gruppe (21,21  $\pm$  1,33 vs. 28,58  $\pm$  1,61 g/kg, p < 0,001; Abb. 3.8A) signifikant vermindert. Die Injektion von 1 nmol desacyl-Ghrelin/Tier bewirkte hingegen keine Modulation des Fressverhaltens.

Die Betrachtung der nicht-kumulativen Nahrungsaufnahme zeigte ab Beginn der vierten Stunde des Beobachtungszeitraums einen inhibitorischen Effekt des Peptids auf das Fressverhalten der Tiere (vgl. Abb. 3.8B).







# Abbildungen 3.8 A und B: Effekt von peripher injiziertem desacyl-Ghrelin auf die kumulative und nicht-kumulative Nahrungsaufnahme *ad libitum*-gefütterter Zucker-Ratten

Die intraperitoneale Gabe von 5 nmol desacyl-Ghrelin zu Beginn der Dunkelphase führte im Vergleich zur Applikation der NaCl-Lösung zu einer signifikanten Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme nach fünf und zwölf Stunden, während die Administration von 1 nmol desacyl-Ghrelin keine Modulation des Fressverhaltens induzierte (A).

Die Auswertung der nicht-kumulativen Nahrungsaufnahme zeigt, dass der inhibitorische Effekt von 5 nmol desacyl-Ghrelin auf das Fressverhalten der Tiere in der vierten Stunden nach der Injektion einsetzte und über den gesamten weiteren Beobachtungszeitraum hinweg persistierte (B).

Die Daten sind als Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Gramm pro Kilogramm Körpergewicht angegeben.

(i.p. = intraperitoneal, n = Stichprobengröße, KG = Körpergewicht)

\*<sup>1</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier vs. NaCl: p = 0,016

- \*<sup>2</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier vs. NaCl: p = 0,005
- •: 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier vs. 1 nmol desacyl-Ghrelin/Tier: p < 0,001

### 3.2.2 Effekte von desacyl-Ghrelin auf die Körpergewichtsentwicklung

Die Intention dieser Untersuchung war, zu prüfen, ob die beobachtete Suppression der Nahrungsaufnahme nach einmaliger desacyl-Ghrelin-Applikation bei täglicher Gabe des Peptids in einer Reduktion des Körpergewichtszuwachses resultiert. Adulte Zucker-Ratten erhielten über einen Zeitraum von acht Tagen zweimal täglich, jeweils zu Beginn der Licht- und der Dunkelphase, 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier (n = 8) oder physiologische Kochsalzlösung (n = 8) intraperitoneal injiziert. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe (n = 4) mitgeführt. Die Entwicklung des Körpergewichts der Versuchstiere wurde während des Experiments sowie je vier Tage vor und nach der Intervention durch tägliches Wiegen erfasst.

Der Körpergewichtszuwachs der Vehikeltiere entwickelte sich erwartungsgemäß entsprechend dem der unbehandelten Kontrolltiere (Abb. 3.9). Im Gegensatz dazu führte die Gabe von 5 nmol desacyl-Ghrelin ab dem sechsten Tag der Behandlung zu einer signifikanten Stagnation der Körpergewichtsentwicklung gegenüber der der Vehikeltiere (Körpergewichtszuwachs der desacyl-Ghrelin-behandelten Tiere *vs.* NaCl-Tiere in g als Mittelwert  $\pm$  SEM: Tag 6: 10,00  $\pm$  2,35 *vs.* 18,88  $\pm$  1,81 g, p = 0,009; Tag 7: 8,63  $\pm$  2,42 *vs.* 17,13  $\pm$  2,16 g, p = 0,018; Tag 8: 9,25  $\pm$  3,29 *vs.* 22,00  $\pm$  2,69 g, p = 0,006; Abb. 3.9). Auch im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe war eine signifikante Suppression der Körpergewichtszunahme durch desacyl-Ghrelin zu beobachten (Körpergewichtszuwachs der desacyl-Ghrelin-behandelten Tiere *vs.* Kontrolltiere in g als Mittelwert  $\pm$  SEM: Tag 6: 10,00  $\pm$  2,35 *vs.* 20,00  $\pm$  3,34 g, p = 0,016; Tag 7: 8,63  $\pm$  2,42 *vs.* 20,50  $\pm$  3,28 g, p = 0,008; Tag 8: 9,25  $\pm$  3,29 *vs.* 24,25  $\pm$  2,84 g, p = 0,007; Abb. 3.9).

Dieses Plateau in der Gewichtsentwicklung der Verumgruppe hielt bis zum Ende der Behandlung an. Anschließend verlief die Gewichtszunahme parallel zu jener der Kontrolltiere, sodass auch in der viertägigen Nachbeobachtungsphase keine Kompensation der entstandenen Gewichtsdifferenz stattfand (Körpergewichtszuwachs der desacyl-Ghrelin-behandelten Tiere *vs.* NaCl-Tiere als Mittelwert  $\pm$  SEM nach der Intervention: Tag N<sub>1</sub>: 12,50  $\pm$  2,97 *vs.* 23,25  $\pm$  1,64 g, p = 0,005; Tag N<sub>2</sub>: 13,00  $\pm$  3,30 *vs.* 24,00  $\pm$  1,55 g, p = 0,016; Abb. 3.9).





# Abbildung 3.9: Körpergewichtsentwicklung adulter Zucker-Ratten unter repetitiver peripherer desacyl-Ghrelin-Applikation

Die zweimal tägliche intraperitoneale Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier führte ab dem sechsten Tag der Intervention zu einer signifikanten Stagnation der Körpergewichtszunahme, sowohl im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren als auch verglichen mit den Vehikeltieren, denen physiologische Kochsalzlösung administriert wurde.

Die Daten sind als Mittelwert des kumulativen Körpergewichtszuwachses pro Gruppe in Gramm  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) während des Beobachtungszeitraums angegeben. (i.p. = intraperitoneal, V<sub>1-4</sub> = Tage vor der Intervention, N<sub>1-4</sub> = Tage nach der Intervention)

Signifikanzniveaus der Körpergewichtsentwicklung der desacyl-Ghrelin-Tiere gegenüber den Kontrollgruppen:

\*<sup>1</sup>: p = 0,009 vs. NaCl-Lösung und p = 0,023 vs. unbehandelte Kontrolltiere

\*<sup>2</sup>: p = 0,019 vs. NaCl-Lösung und p = 0,017 vs. unbehandelte Kontrolltiere

\*<sup>3</sup>: p = 0,005 vs. NaCl-Lösung und p = 0,007 vs. unbehandelte Kontrolltiere

\*<sup>4</sup>: p = 0,005 *vs*. NaCl-Lösung

\*<sup>5</sup>: p = 0,016 vs. NaCl-Lösung

## 3.2.3 Beeinflussung der neuronalen Aktivität durch desacyl-Ghrelin

Diese molekularmorphologische Studie befasste sich mit dem Effekt von peripher appliziertem desacyl-Ghrelin auf die neuronale Aktivität appetitregulatorischer Kerngebiete in Hypothalamus und Hirnstamm im Verlauf der Dunkelphase.

Männliche Zucker-Ratten erhielten dazu bei Eintritt in die Dunkelphase 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Tier oder physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Im Folgenden wurden die Tiere gemäß dem in 2.2.3.2 beschriebenen Zeitkurs transkardial perfundiert und die entnommenen Gehirne immunhistochemisch aufgearbeitet. Die Auswertung der desacyl-Ghrelin-induzierten Fos-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe diente als Maß für die neuronale Aktivierung appetitregulatorischer Kerngebiete. Pro Zeitpunkt wurde in beiden Gruppen jeweils ein Stichprobenumfang von drei Tieren untersucht.

### 3.2.3.1 Fos-Expression im Nucleus paraventricularis (PVN)

Die Quantifizierung der Fos-Expression im PVN zeigte bei den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Tieren eine auf niedrigem Niveau beginnende neuronale Aktivität, die im Versuchsverlauf kontinuierlich anstieg (Abb. 3.10). Nach desacyl-Ghrelin-Gabe hingegen war  $1\frac{1}{2}$  Std. nach der Injektion eine im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant erhöhte Fos-Expression zu verzeichnen (Fos-Ereignisse pro Schnitt als Mittelwert ± SEM, desacyl-Ghrelin *vs*. Vehikellösung: 127,05 ± 6,58 *vs*. 56,65 ± 4,96 Neurone/Schnitt, p < 0,001; Abb. 3.10 und 3.11), welche über den gesamten Beobachtungszeitraum auf einem recht konstantem Niveau blieb. Die neuronale Aktivität der Vehikelgruppe glich sich diesem im weiteren Verlauf an (112,75 ± 12,84 *vs*. 90,83 ± 6,97 Neurone/Schnitt 4½ Std. nach Applikation und 126,48 ± 8,51 *vs*. 111,29 ± 9,08 Neurone/Schnitt 12½ Std. nach Applikation; Abb. 3.10).

Die desacyl-Ghrelin-behandelten Tiere zeigten dementsprechend über den gesamten Beobachtungszeitraum einen nahezu konstanten Verlauf der Fos-Expression (127,05  $\pm$  6,58 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. vs. 126,48  $\pm$  8,51 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.10 und Tab. 3.1), während die neuronale Aktivität bei den Tieren der Vehikelgruppe im Verlauf der Dunkelphase signifikant anstieg (56,65  $\pm$  4,96 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. vs. 111,29  $\pm$  9,08 Neurone/Schnitt nach 12½ Std., p < 0,001; Abb. 3.10 und Tab. 3.1).





# Abbildung 3.10: Desacyl-Ghrelin-induzierte Fos-Expression im Nucleus paraventricularis (PVN) im Verlauf der Dunkelphase

Nach der intraperitonealen Applikation von 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Ratte bei Eintritt in die Dunkelphase war die neuronale Aktivität im PVN dieser Tiere im Vergleich zur Gabe von physiologischer Kochsalzlösung zu Beginn des Beobachtungszeitraums signifikant erhöht. Die Fos-Expression der Vehikeltiere erreichte indes erst im weiteren Verlauf der Dunkelphase annähernd die Werte der mit desacyl-Ghrelin behandelten Tiere.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus drei Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben.

- (i.p. = intraperitoneal)
- \* : 5 nmol desacyl-Ghrelin nach 1½ Std. vs. NaCl nach 1½ Std.: p < 0,001
- ▲: NaCl nach 1½ Std. vs. NaCl nach 12½ Std.: p < 0,001



# Abbildung 3.11: Repräsentative Gehirnschnitte der gesteigerten Expression des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im PVN nach peripherer desacyl-Ghrelin-Injektion

 $1\frac{1}{2}$  Stunden nach der intraperitonealen Applikation von 5 nmol desacyl-Ghrelin (B) war die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) im PVN deutlich höher als nach der Gabe der Vehikellösung (A). Zur Darstellung des PVN wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere (A<sub>1</sub>) als auch der Verumgruppe (B<sub>1</sub>) zusätzlich mit Propidiumjodid gegengefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie gibt die Ausdehnung des PVN an, der lateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.

#### **3.2.3.2 Fos-Expression im Nucleus arcuatus (ARC)**

Im ARC induzierten 5 nmol desacyl-Ghrelin im Vergleich zur Vehikelgruppe 1½ Stunden nach der Applikation ebenfalls eine signifikant erhöhte neuronale Aktivität (Fos-Ereignisse pro Schnitt als Mittelwert  $\pm$  SEM, desacyl-Ghrelin *vs.* NaCl-Lösung: 68,63  $\pm$  2,97 *vs.* 27,86  $\pm$  1,86 Neurone/Schnitt, p < 0,001; Abb. 3.12 und 3.13), die nach 4½ Std. absank, während die Anzahl Fos-positiver Neurone bei der Vehikelgruppe anstieg, sodass beide Versuchsgruppen ein vergleichbares Niveau erreichten (45,69  $\pm$  2,02 *vs.* 45,20  $\pm$  3,57 Neurone/Schnitt nach 4½ Std.; Abb. 3.12) und dieses bis zum Ende des Beobachtungszeitraums beibehielten (51,83  $\pm$  6,23 *vs.* 50,90  $\pm$  3,11 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.12).

Bei den mit desacyl-Ghrelin behandelten Tieren war somit im Versuchsverlauf eine signifikante Reduktion der neuronalen Aktivität zu beobachten (68,63  $\pm$  2,97 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. *vs.* 51,83  $\pm$  6,23 Neurone/Schnitt nach 12½ Std., p = 0,010; Abb. 3.12 und Tab. 3.1), während die Fos-Expression der NaCl-Gruppe signifikant anstieg (27,86  $\pm$  1,86 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. *vs.* 50,90  $\pm$  3,11 Neurone/Schnitt nach 12½ Std., p < 0,001; Abb. 3.12 und Tab. 3.1).





# Abbildung 3.12: Neuronale Aktivierung im Nucleus arcuatus (ARC) nach peripherer desacyl-Ghrelin-Applikation

Desacyl-Ghrelin induzierte 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. *post injectionem* eine signifikant erhöhte Fos-Expression im ARC, während 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> und 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Applikation des Peptids im Vergleich zu NaCl-Lösung keine Differenz zwischen den Gruppen bestand.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus drei Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. (i.p. = intraperitoneal)

- \* : 5 nmol desacyl-Ghrelin nach 1½ Std. vs. NaCl nach 1½ Std.: p < 0,001
- ▲<sup>1</sup>: Desacyl-Ghrelin nach  $1\frac{1}{2}$  Std. *vs.* desacyl-Ghrelin nach  $12\frac{1}{2}$  Std.: p = 0,010
- ▲<sup>2</sup>: NaCl nach 1½ Std. vs. NaCl nach 12½ Std.: p < 0,001



# Abbildung 3.13: Repräsentative Gehirnschnitte der Fos-Induktion im ARC durch die intraperitoneale Gabe von desacyl-Ghrelin

Im ARC war die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) eineinhalb Stunden nach der Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Tier (B) im Vergleich zur Gabe der Vehikellösung (A) signifikant gesteigert.

Zur Lokalisation des ARC wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Kontrollen  $(A_1)$  als auch der desacyl-Ghrelin-Gruppe  $(B_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid angefärbt (rotes Fluoreszenzsignal). Die weiße Linie markiert die Ausdehnung des ARC, der sich am Boden des dritten Ventrikels (3V) lateral der Eminentia mediana befindet.

Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.

#### **3.2.3.3** Fos-Expression im dorsomedialen Hypothalamus (DMH)

Im DMH war die neuronale Aktivität nach der intraperitonealen Applikation von 5 nmol desacyl-Ghrelin im Vergleich zur Gabe der Vehikellösung sowohl nach 1½ Std. als auch nach 4½ Std. signifikant erhöht (Anzahl Fos-positiver Neurone pro Schnitt als Mittelwert  $\pm$  SEM, desacyl-Ghrelin *vs.* NaCl-Lösung: 139,96  $\pm$  8,17 *vs.* 74,40  $\pm$  13,03 Neurone/Schnitt Std., p = 0,004 nach 1½ sowie 172,86  $\pm$  5,98 *vs.* 132,80  $\pm$  6,07 Neurone/Schnitt, p < 0,001, nach 4½ Std.; Abb. 3.14 und 3.15). Hingegen war am Ende der Dunkelphase kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr zu beobachten (126,43  $\pm$  8,71 *vs.* 133,50  $\pm$  12,07 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.14).

Der Vergleich der Fos-Expressionsmuster zu Beginn der Dunkelphase sowie am Ende des Beobachtungszeitraums zeigte weder nach desacyl-Ghrelin-Injektion (139,96  $\pm$  8,17 Neurone/ Schnitt nach 1½ Std. vs. 126,43  $\pm$  8,71 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.14 und Tab. 3.1) noch nach NaCl-Applikation (74,40  $\pm$  13,03 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. vs. 133,50  $\pm$  12,07 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.14 und Tab. 3.1) eine signifikante Veränderung der neuronalen Aktivität dieses Kerns im zeitlichen Verlauf.





# Abbildung 3.14: Fos-Expression im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) im Verlauf der Dunkelphase nach peripherer desacyl-Ghrelin-Applikation

Sowohl 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. als auch 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Tier war die neuronale Aktivität im DMH gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Am Ende des Beobachtungszeitraums stellte sich hingegen keine Differenz zwischen den beiden Gruppen dar. Innerhalb der einzelnen Gruppen war indes beim Vergleich der Werte 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. und 12<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Administration der Versuchslösungen keine signifikante Veränderung der Anzahl Fospositiver Neurone zu verzeichnen.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus drei Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben.

(i.p. = intraperitoneal)

\*<sup>1</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin nach 1½ Std. vs. NaCl nach 1½ Std.: p = 0,004

\*<sup>2</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin nach 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. vs. NaCl nach 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std.: p < 0,001



# Abbildung 3.15: Repräsentative Gehirnschnitte der Fos-Induktion im DMH durch die intraperitoneale Gabe von desacyl-Ghrelin

1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. sowie 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Injektion von desacyl-Ghrelin (B) war die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) im DMH im Vergleich zur Gabe von Vehikellösung (A) signifikant gesteigert. Die Zellkerne der Gehirnschnitte der Kontrollen (A<sub>1</sub>) sowie der desacyl-Ghrelin-Gruppe (B<sub>1</sub>) wurden zur Lokalisation des Kerns zusätzlich mit Propidiumjodid angefärbt (rotes Fluoreszenzsignal). Die weiße Linie markiert die Ausdehnung des DMH, der in einen ventralen (DMHV), einen kompakten (DMHC) und einen dorsalen (DMHD) Subnukleus gegliedert ist und sich lateral des dritten Ventrikels (3V) befindet. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken repräsentiert 100 μm.

#### **3.2.3.4** Fos-Expression im Nucleus tractus solitarius (NTS)

Im NTS führte die desacyl-Ghrelin-Applikation im Vergleich zur Gabe der Vehikellösung in der ersten Hälfte des Beobachtungszeitraums zu einer deutlichen Reduktion der Fos-Expression (Fos-Ereignisse pro Schnitt als Mittelwert  $\pm$  SEM, desacyl-Ghrelin *vs.* NaCl: 136,25  $\pm$  3,34 *vs.* 240,97  $\pm$  12,66 Neurone/Schnitt, p < 0,001 nach 1½ Std. und 167,00  $\pm$  4,68 *vs.* 184,90  $\pm$  4,96 Neurone/Schnitt, p = 0,010 nach 4½ Std.; Abb. 3.16 und 3.17). Im weiteren Verlauf war die neuronale Aktivität im NTS bei der desacyl-Ghrelin-Gruppe verglichen mit der Fos-Expression der Vehikeltiere hingegen nur noch tendenziell reduziert (182,06  $\pm$  11,39 *vs.* 214,64  $\pm$  19,88 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.16).

Über die gesamte Dunkelphase hinweg betrachtet, stieg die Anzahl Fos-exprimierender Neurone bei den desacyl-Ghrelin-Tieren signifikant an (136,25  $\pm$  3,34 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. *vs*. 182,06  $\pm$  11,39 Neurone/Schnitt nach 1½ Std., p < 0,001; Abb. 3.16 und Tab. 3.1), wohingegen sie in der Vehikelgruppe sank (240,97  $\pm$  12,66 Neurone/Schnitt nach 1½ Std. *vs*. 214,64  $\pm$  19,88 Neurone/Schnitt nach 1½ Std., p = 0,029; Abb. 3.16 und Tab. 3.1)





# Abbildung 3.16: Fos-Expression im Nucleus tractus solitarius (NTS) im Verlauf der Dunkelphase nach peripherer desacyl-Ghrelin-Gabe

Sowohl 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. als auch 4<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier war die neuronale Aktivität im NTS verglichen mit der Gabe der Vehikellösung signifikant reduziert. Im weiteren Verlauf der Dunkelphase kam es durch den kontinuierlichen Anstieg der Fos-Expression bei der desacyl-Ghrelin-Gruppe zu einer weitgehenden Annäherung der Werte beider Versuchsgruppen.

Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus je drei Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben.

- (i.p. = intraperitoneal)
- \*<sup>1</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin nach 1½ Std. vs. NaCl nach 1½ Std.: p < 0,001
- \*<sup>2</sup>: 5 nmol desacyl-Ghrelin nach  $4\frac{1}{2}$  Std. vs. NaCl nach  $4\frac{1}{2}$  Std.: p = 0,010
- ▲<sup>1</sup>: NaCl nach 1½ Std. vs. NaCl nach 12½ Std.: p = 0,029
- ▲<sup>2</sup>: Desacyl-Ghrelin nach 1½ Std. vs. desacyl-Ghrelin nach 12½ Std.: p < 0,001



# Abbildung 3.17: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Detektion des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im NTS

Die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) war im NTS  $1\frac{1}{2}$  Std. sowie  $4\frac{1}{2}$  Std. nach der Gabe von 5 nmol desacyl-Ghrelin (B) gegenüber der Applikation von NaCl-Lösung (A) deutlich reduziert. Zur Darstellung des NTS wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere (A<sub>1</sub>) als auch der Verumgruppe (B<sub>1</sub>) zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie beschreibt die Ausdehnung des im Hirnstamm beidseits dorsolateral des *Canalis centralis* (CC) lokalisierten NTS. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.

#### 3.2.3.5 Fos-Expression in der Area postrema (AP)

Die neuronale Aktivität der AP zeigte im gesamten Beobachtungszeitraum keine nennenswerten Differenzen zwischen der mit desacyl-Ghrelin behandelten Gruppe und den Vehikeltieren (Fos-Ereignisse pro Schnitt als Mittelwert  $\pm$  SEM, desacyl-Ghrelin *vs.* NaCl-Lösung: 33,75  $\pm$  1,70 *vs.* 28,43  $\pm$  3,16 Neurone/Schnitt nach 1½ Std.; 35,56  $\pm$  3,63 *vs.* 33,00  $\pm$  2,89 Neurone/Schnitt nach 4½ Std. und 40,72  $\pm$  4,70 *vs.* 33,18  $\pm$  3,87 Neurone/Schnitt nach 12½ Std.; Abb. 3.18).



# Abbildung 3.18: Peripheres desacyl-Ghrelin bewirkte keine Modulation des Fos-Expressionsmusters in der Area postrema (AP)

Die intraperitoneale Injektion von 5 nmol desacyl-Ghrelin pro Tier beeinflusste die neuronale Aktivität in der AP im Vergleich zur Behandlung mit physiologischer NaCl-Lösung nicht und auch im zeitlichen Verlauf zeigte sich keine signifikante Veränderung der Fos-Expression in diesem Kern. Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus drei Tieren pro Gruppe  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben. (i.p. = intraperitoneal)



# Abbildung 3.19: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Detektion des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos in der AP

In der AP bewirkte die Gabe von 5 nmol desacyl-Ghrelin (B) gegenüber der Applikation von NaCl-Lösung (A) keine Modulation der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal). Zur Darstellung der AP wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere (A<sub>1</sub>) als auch der Verumgruppe (B<sub>1</sub>) zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal). Die weiße Linie beschreibt die Ausdehnung der AP, die im Hirnstamm zwischen dem *Canalis centralis* (CC) und dem vierten Ventrikel (4V) lokalisiert ist.

Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken repräsentiert 100 µm.

## 3.2.3.6 Gesamtbetrachtung des Fos-Expressionsmusters nach desacyl-Ghrelin-Injektion

Die Synopsis der vorgestellten Ergebnisse zeigt bei den Vehikeltieren im Verlauf der Dunkelphase eine signifikante Zunahme der Fos-Expression im PVN (+96,45%), im ARC (+82,70%) sowie im DMH (+79,44%). Indes war die neuronale Aktivität dieser Kerne schon 1½ Std. nach der Injektion von desacyl-Ghrelin signifikant gesteigert und nahm im Verlauf der Dunkelphase sowohl im PVN (-0,45%) als auch im ARC (-24,48%) und im DMH (-9,67%) ab. Damit wiesen diese Kerngebiete bereits zu Beginn des Beobachtungszeitraums jene gesteigerte Fos-Expression auf, die bei den Vehikeltieren erst am Ende der Dunkelphase auftrat (s. Tab. 3.1). Im NTS war die neuronale Aktivität nach desacyl-Ghrelin-Gabe im gesamten Versuchszeitraum gegenüber der Vehikelgruppe reduziert, wobei sie im Verlauf anstieg (+33,62%), während sie nach NaCl-Injektion sank (-10,93%). In der AP veränderte sich die Fos-Expression weder durch die Injektion des Peptids noch im zeitlichen Verlauf signifikant (vgl. hierzu Tab. 3.1). In Tabelle 3 List eine Übersicht zur Beeinflussung des Fos-Expressionsmusters im Verlauf des

In Tabelle 3.1 ist eine Übersicht zur Beeinflussung des Fos-Expressionsmusters im Verlauf des Beobachtungszeitraums nach intraperitonealer desacyl-Ghrelin-Gabe dargestellt.

**Tabelle 3.1: Veränderung der Fos-Expression nach intraperitonealer Applikation von 5 nmol desacyl-Ghrelin/Tier oder physiologischer NaCl-Lösung im Verlauf der Dunkelphase** Die Daten sind als Mittelwert der Anzahl Fos-positiver Neurone/Gehirnschnitt aus drei Tieren pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Hirn-	Intraperitoneal	Fos-positive Ne	Zu- bzw.	n-Wort	
kern	injizierte Substanz	nach 1½ Std.	nach 12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Std.	Abnahme	p-weit
PVN	5 nmol desacyl-Ghrelin	$127,05 \pm 6,58$	$126,\!48 \pm 8,\!51$	- 0,45%	= 0,608
	0,15 M NaCl	56,65 ± 4,96	$111,29 \pm 9,08$	+ 96,45%	< 0,001
ARC	5 nmol desacyl-Ghrelin	$68,63 \pm 2,97$	$51,83 \pm 6,23$	- 24,48%	= 0,010
	0,15 M NaCl	$27,86 \pm 1,86$	$50,90 \pm 3,23$	+ 82,70%	< 0,001
DMH	5 nmol desacyl-Ghrelin	139,96 ± 8,17	$126,\!43\pm 8,\!71$	- 9,67%	= 0,953
	0,15 M NaCl	74,40 ± 13,03	$133,50 \pm 12,07$	+ 79,44%	= 0,014
NTS	5 nmol desacyl-Ghrelin	$136,25 \pm 3,34$	$182,06 \pm 11,36$	+ 33,62%	< 0,001
1110	0,15 M NaCl	240,97 ± 12,66	$214,64 \pm 19,88$	- 10,93%	= 0,029
AP	5 nmol desacyl-Ghrelin	33,75 ± 1,70	$40,72 \pm 4,70$	+ 20,65%	= 0,376
	0,15 M NaCl	28,43 ± 3,16	33,18 ± 3,87	+ 16,71%	= 0,423

## 3.3 Obestatin

#### 3.3.1 Wirkung von Obestatin auf die Nahrungsaufnahme

In diesem Experiment wurde der appetitregulatorische Effekt von intraperitoneal appliziertem Obestatin in Abhängigkeit von der zirkadianen Rhythmik unter verschiedenen metabolischen Ausgangsbedingungen mit der Wirkung von sulfatiertem Cholecystokinin (CCK-8S) auf die Nahrungsaufnahme verglichen.

Die Versuche wurden sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase an *ad libitum*-gefütterten sowie an Nahrungs-deprivierten adulten männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Tiere erhielten entweder 1 bzw. 5 µmol Obestatin pro kg Körpergewicht, 3,5 nmol CCK-8S pro kg Körpergewicht als Positivkontrolle oder physiologische Kochsalzlösung als Negativkontrolle bei Eintritt in die Licht- bzw. in die Dunkelphase intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde die kumulative Nahrungsaufnahme der Tiere in g/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von zwölf Stunden erfasst.

### 3.3.1.1 Untersuchung an ad libitum-gefütterten Tieren in der Dunkelphase

In der Dunkelphase bewirkte intraperitoneales Obestatin in Tieren, die zuvor freien Zugang zum Futter hatten, während des gesamten Beobachtungszeitraums weder in einer Dosierungen von 1  $\mu$ mol/kg Körpergewicht noch nach der Injektion von 5  $\mu$ mol/kg Körpergewicht eine Modulation der Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Vehikelgruppe (vgl. hierzu Abb. 3.20).

Hingegen zeigte CCK-8S während der ersten halben Stunde des Beobachtungszeitraums einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf das Fressverhalten, sowohl gegenüber der Vehikelgruppe (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme in g/kg Körpergewicht  $\pm$  SEM: 2,07  $\pm$  0,68 *vs*. 9,00  $\pm$  0,81 g/kg, p = 0,017; Abb. 3.20) als auch verglichen mit den Tieren denen 1 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (2,07  $\pm$  0,68 *vs*. 10,03  $\pm$  0,95 g/kg, p = 0,005; Abb. 3.20) oder 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (2,07  $\pm$  0,68 *vs*. 11,23  $\pm$  0,93 g/kg, p = 0,001; Abb. 3.20) appliziert wurden.



# Abbildung 3.20: Wirkung von intraperitoneal injiziertem Obestatin und CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme *ad libitum*-gefütterter Ratten in der Dunkelphase

In der Dunkelphase wurde die kumulative Nahrungsaufnahme zuvor *ad libitum*-gefütterter Tiere durch die intraperitoneale Injektion von 1 bzw. 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht nicht beeinflusst. Die Applikation von 3,5 nmol CCK-8S/kg Körpergewicht hatte indes in der ersten halben Stunde des Beobachtungszeitraums einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf das Fressverhalten der Tiere.

Die Daten sind als Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Gramm pro kg Körpergewicht angegeben.

(i.p. = intraperitoneal, n = Stichprobengröße, KG = Körpergewicht)

Signifikanzniveaus zwischen den Versuchsgruppen:

\* : 3,5 nmol CCK-8S vs. NaCl: p = 0,017

- : 3,5 nmol CCK-8S vs. 1  $\mu$ mol Obestatin: p = 0,005
- ▲: 3,5 nmol CCK-8S vs. 5  $\mu$ mol Obestatin: p = 0,001

### 3.3.1.2 Studie an ad libitum-gefütterten Tieren in der Lichtphase

In der Lichtphase hatte die periphere Gabe von 1 respektive 5 µmol Obestatin/kg KG keinen Einfluss auf das Fressverhalten ungefasteter Tiere. Der CCK-8S-induzierte Sättigungseffekt erreichte ebenfalls kein signifikantes Niveau (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme in g/kg KG $\pm$  SEM: 0,10  $\pm$  0,10 vs. 3,32  $\pm$  1,34 g/kg nach 30 min.; 0,10  $\pm$  0,10 vs. 5,07  $\pm$  1,59 g/kg nach 60 min. und 0,67  $\pm$  0,55 vs. 5,68  $\pm$  1,54 g/kg nach 120 min.; Abb. 3.21).



# Abbildung 3.21: Einfluss von intraperitoneal appliziertem Obestatin und CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme in *ad libitum*-gefütterten Ratten in der Lichtphase

Die kumulative Nahrungsaufnahme *ad libitum*-gefütterter Tiere wurde in der Lichtphase durch die i.p.-Injektion von 1 bzw. 5  $\mu$ mol Obestatin/kg KG nicht beeinflusst. CCK-8S zeigte indes einen tendenziellen inhibitorischen Effekt auf das Fressverhalten der Tiere, der jedoch kein signifikantes Niveau erreichte. Die Daten sind als Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in g/kg KG angegeben. (i.p. = intraperitoneal, n = Stichprobengröße, n.s. = nicht signifikant, KG = Körpergewicht)

## 3.3.1.3 Versuche an 16 Stunden gefasteten Tieren in der Dunkelphase

Obestatin zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraums in beiden Dosierungen keinen Einfluss auf das Fressverhalten 16 Stunden gefasteter Tiere (vgl. hierzu Abb. 3.22). Indes hatte CCK-8S in der Dunkelphase eine inhibitorische Wirkung auf die Nahrungsaufnahme, die in den ersten 30 und 60 Minuten nach der intraperitonealen Injektion sowohl gegenüber den Vehikeltieren (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme in g/kg KG  $\pm$  SEM: 3,41  $\pm$  1,11 *vs.* 10,10  $\pm$  0,88 g/kg, p = 0,002 nach 30 Min. und 5,29  $\pm$  0,22 *vs.* 11,61  $\pm$  1,22 g/kg, p = 0,002 nach 60 Min.; Abb. 3.22), als auch im Vergleich zu den mit 1 µmol Obestatin/kg KG behandelten Tieren (3,41  $\pm$  1,11 *vs.* 11,72  $\pm$  1,22 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min. und 5,29  $\pm$  0,22 *vs.* 11,61  $\pm$  0,22 *vs.* 11,72  $\pm$  1,22 g/kg, p = 0,002 nach 60 Min.; Abb. 3.22) und der Gruppe, die 5 µmol Obestatin/kg KG erhalten hatte (3,41  $\pm$  1,11 *vs.* 10,86  $\pm$  0,51 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min. und 5,29  $\pm$  0,22 *vs.* 11,69  $\pm$  0,78 g/kg, p = 0,002 nach 60 Min.; Abb. 3.22), ein signifikantes Niveau erreichte.

Zwei Stunden nach der Injektion glich sich die kumulative Nahrungsaufnahme der mit CCK-8S behandelten Tiere wieder jener der Kontrolltiere an.



# Abbildung 3.22: Effekt von intraperitoneal administriertem Obestatin und CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme 16 Stunden gefasteter Tiere in der Dunkelphase

Die Injektion von 1 bzw. 5 µmol Obestatin/kg KG hatte keine Auswirkungen auf die kumulative Nahrungsaufnahme 16 Stunden gefasteter Tiere in der Dunkelphase, während die Gabe von 3,5 nmol CCK-8S/kg KG in der ersten Stunde des Beobachtungszeitraums in einer signifikanten Suppression des Fressverhaltens der Tiere resultierte.

Die Daten sind als Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme pro Gruppe ± Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Gramm pro Kilogramm Körpergewicht angegeben.

(i.p. = intraperitoneal, n = Stichprobengröße, KG = Körpergewicht)

- \*<sup>1</sup>: 3,5 nmol CCK-8S *vs.* NaCl: p = 0,002
- •<sup>1</sup>: 3,5 nmol CCK-8S vs. 1  $\mu$ mol Obestatin: p < 0,001
- ▲<sup>1</sup>: 3,5 nmol CCK-8S *vs.* 5  $\mu$ mol Obestatin: p < 0,001
- \*<sup>2</sup>: 3,5 nmol CCK-8S *vs.* NaCl: p = 0,002
- •<sup>2</sup>: 3,5 nmol CCK-8S vs. 1  $\mu$ mol Obestatin: p = 0,002
- ▲<sup>2</sup>: 3,5 nmol CCK-8S *vs.* 5  $\mu$ mol Obestatin: p = 0,002

#### 3.3.1.4 Untersuchung an 16 Stunden gefasteten Tieren in der Lichtphase

Die Applikation von 1 und 5 µmol Obestatin/kg KG bewirkte in der Lichtphase in gefasteten Versuchstieren während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Modulation der Nahrungsaufnahme (Abb. 3.23). Der inhibitorische Effekt von CCK-8S auf das Fressverhalten erreichte hingegen innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Applikation ein signifikantes Niveau. Die Reduktion der Nahrungsaufnahme war sowohl im Vergleich zu den Vehikeltieren (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme in g/kg KG  $\pm$  SEM: 5,50  $\pm$  0,91 *vs.* 16,53  $\pm$  1,30 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 23,57  $\pm$  2,02 g/kg, p = 0,005 nach 60 Min. und 17,16  $\pm$  2,76 *vs.* 30,04  $\pm$  1,26 g/kg, p = 0,002 nach 120 Min.; Abb. 3.23) als auch verglichen mit den mit 1 µmol Obestatin/kg KG behandelten Tieren (5,50  $\pm$  0,91 *vs.* 18,14  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 24,67  $\pm$  1,99 g/kg, p = 0,003 nach 60 Min. und 17,16  $\pm$  2,76 *vs.* 27,33  $\pm$  2,16 g/kg, p = 0,007 nach 120 Min.; Abb. 3.23) sowie den mit 5 µmol Obestatin/kg KG behandelten Tieren (5,50  $\pm$  0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 17,45  $\pm$  1,69 g/kg, p < 0,001 nach 30 Min.; 12,23  $\pm$  2,67 *vs.* 28,09  $\pm$  2,94 g/kg, p < 0,001 nach 60 Min. und 17,16  $\pm$  2,76 *vs.* 32,57  $\pm$  2,93 g/kg, p < 0,001 nach 120 Min.; Abb. 3.23) erkennbar.




# Abbildung 3.23: Wirkung von intraperitoneal injiziertem Obestatin und CCK-8S auf die Nahrungsaufnahme 16 Stunden gefasteter Ratten in der Lichtphase

Auch in der Lichtphase bewirkte die intraperitoneale Injektion von 1 bzw. 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht keine Veränderung des Fressverhaltens in 16 Stunden gefasteten Ratten. Hingegen führte CCK-8S in den ersten zwei Stunden des Beobachtungszeitraums zu einer signifikanten Inhibition der Nahrungsaufnahme dieser Tiere.

Die Daten sind als Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme pro Gruppe  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) in Gramm pro kg Körpergewicht angegeben.

(i.p. = intraperitoneal, n = Stichprobengröße, KG = Körpergewicht)

Statistischer Vergleich der kumulativen Nahrungsaufnahme der mit 3,5 nmol CCK-8S/kg KG behandelten Tiere mit dem Fressverhalten der anderen Versuchsgruppe:

\*<sup>1</sup>: p < 0,001 vs. NaCl; •<sup>1</sup>: p < 0,001 vs. 1 µmol Obestatin;  $\blacktriangle$ <sup>1</sup>: p < 0,001 vs. 5 µmol Obestatin \*<sup>2</sup>: p = 0,005 vs. NaCl; •<sup>2</sup>: p = 0,003 vs. 1 µmol Obestatin;  $\bigstar$ <sup>2</sup>: p < 0,001 vs. 5 µmol Obestatin \*<sup>3</sup>: p = 0,002 vs. NaCl; •<sup>3</sup>: p = 0,007 vs. 1 µmol Obestatin;  $\bigstar$ <sup>3</sup>: p < 0,001 vs. 5 µmol Obestatin

### 3.3.2 Beeinflussung der Fos-Expression durch Obestatin

Zur Untersuchung der Wirkung von Obestatin auf die neuronale Aktivität in Hypothalamus und Hirnstamm anhand des Fos-Expressionsmusters erhielten männliche Sprague-Dawley-Ratten 5 µmol Obestatin pro kg KG, 1,75 nmol CCK-8S pro kg KG oder 0,15 M NaCl-Lösung (n = 4 Tiere/Gruppe) intraperitoneal appliziert. 1½ Stunden nach der Injektion wurden die Tiere narkotisiert und transkardial perfundiert. Nach der immunhistochemischen Aufarbeitung der Gehirnschnitte erfolgte die Auswertung durch die Quantifizierung der Fos-Expression mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM).

Eine Obestatin-bedingte Modulation der Fos-Expression im Vergleich zu den Vehikeltieren war in keinem der untersuchten Kerne festzustellen. Weder im PVN (Mittelwert der Anzahl Fospositiver Neurone pro Schnitt  $\pm$  SEM: 44,16  $\pm$  12,97 vs. 39,75  $\pm$  6,75 Neurone/Schnitt, p = 0,748; Abb. 3.24 und 3.25) noch im ARC (15,82  $\pm$  1,04 vs. 21,52  $\pm$  3,65 Neurone/Schnitt, p = 0,690; Abb. 3.24 und 3.26), im VMH (38,19  $\pm$  8,99 vs. 35,94  $\pm$  2,78 Neurone/Schnitt, p = 0,875; Abb. 3.24 und 3.27), im DMH (67,61  $\pm$  22,58 vs. 67,85  $\pm$  9,36 Neurone/Schnitt, p = 0,991; Abb. 3.24 und 3.28) oder im NTS (67,78  $\pm$  16,47 vs. 60,16  $\pm$  6,98 Neurone/Schnitt, p = 0,619; Abb. 3.24 und 3.29) zeigte sich ein Einfluss des Peptids auf die neuronale Aktivität.

Hingegen induzierte die Gabe von 1,75 nmol CCK-8S/kg KG eine gegenüber den Vehikeltieren signifikant erhöhte Fos-Expression im PVN (136,66  $\pm$  7,20 *vs*. 39,75  $\pm$  6,75 Neurone/Schnitt, p < 0,001; Abb. 3.24 und 3.25). Im DMH war ebenfalls eine erhöhte neuronale Aktivität nach CCK-8S-Injektion zu beobachten (122,88  $\pm$  5,79 *vs*. 67,85  $\pm$  9,36 Neurone/Schnitt, p = 0,025; Abb. 3.24 und 3.28) und auch im NTS war nach der Applikation von CCK-8S eine deutliche Steigerung der Fos-Expression nachweisbar (135,07  $\pm$  10,11 *vs*. 60,16  $\pm$  6,98 Neurone/Schnitt, p = 0,002; Abb. 3.24 und 3.29).

Im ARC konnte hingegen keine Veränderung der neuronalen Aktivität nach CCK-8S-Gabe beobachtet werden (14,45  $\pm$  1,47 *vs.* 21,52  $\pm$  3,65 Neurone/Schnitt, p = 0,621; Abb. 3.24 und 3.26) und auch im VMH hatte das Peptid keinen modulierenden Effekt auf das Fos-Expressionsmuster (25,87  $\pm$  0,72 *vs.* 35,94  $\pm$  2,78 Neurone/Schnitt, p = 0,482; Abb. 3.24 und 3.27).



# Abbildung 3.24: Vergleich der Fos-Expressionsmuster hypothalamischer und medullärer Hirnkerne nach peripherer Gabe von Obestatin, CCK-8S sowie NaCl-Lösung

Die intraperitoneale Injektion von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht hatte keinen Einfluss auf die neuronale Aktivität in den untersuchten Kerngebieten in Hypothalamus und Hirnstamm, während die Gabe von 1,75 nmol CCK-8S/kg Körpergewicht eine signifikant erhöhte Fos-Expression im Nucleus paraventricularis (PVN), im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) sowie im Nucleus tractus solitarius (NTS) induzierte. Im Nucleus arcuatus (ARC) und im ventromedialen Hypothalamus (VMH) wurde die neuronale Aktivität durch die CCK-8S-Applikation hingegen nicht beeinflusst.

Die Daten sind als durchschnittliche Anzahl Fos-positiver Neurone pro Gehirnschnitt aus je vier Tieren pro Versuchsgruppe ± Standardabweichung des Mittelwertes angegeben.

(i.p. = intraperitoneal, n.s. = nicht signifikant)

\*<sup>1</sup>: 1,75 nmol CCK-8S: p < 0,001 vs. NaCl und p < 0,001 vs. 5 µmol Obestatin

\*<sup>2</sup>: 1,75 nmol CCK-8S: p = 0,025 vs. NaCl und p = 0,025 vs. 5 µmol Obestatin

\*<sup>3</sup>: 1,75 nmol CCK-8S: p = 0,002 vs. NaCl und p = 0,003 vs. 5 µmol Obestatin



# Abbildung 3.25: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im Nucleus paraventricularis (PVN)

Im Vergleich zur Gabe von 0,15 M NaCl-Lösung (A) war im PVN 90 Minuten nach der Applikation von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (B) keine Beeinflussung der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) zu beobachten. Indes induzierte CCK-8S in einer Dosis von 1,75 nmol/kg Körpergewicht (C) einen signifikanten Anstieg der neuronalen Aktivität in diesem Kern.

Zur Lokalisierung des PVN wurde das Chromatin der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere  $(A_1)$  als auch der Obestatin-  $(B_1)$  und der CCK-8S-Gruppe  $(C_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie markiert die Ausdehnung des PVN, der im Hypothalamus lateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.



# Abbildung 3.26: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im Nucleus arcuatus (ARC)

1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Std. nach der Applikation von 5 μmol Obestatin/kg Körpergewicht (B) war, verglichen mit der Gabe von 0,15 M NaCl-Lösung (A), im ARC keine Modulation der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) erkennbar. Auch die Gabe von 1,75 nmol CCK-8S/kg Körpergewicht (C) induzierte keine Änderung der neuronalen Aktivität dieses Kerns.

Das Chromatin der Neurone wurde zur Lokalisierung des ARC sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere  $(A_1)$  als auch der Obestatin-  $(B_1)$  und der CCK-8S-Gruppe  $(C_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie gibt die Ausdehnung des ARC an, der im Hypothalamus basolateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken repräsentiert 100 µm.



# Abbildung 3.27: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im ventromedialen Hypothalamus (VMH)

Im VMH zeigte sich, verglichen mit der Gabe von 0,15 M NaCl-Lösung (A), 90 Minuten nach der Applikation von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (B) keine Veränderung der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal). Auch CCK-8S in einer Dosis von 1,75 nmol/kg Körpergewicht (C) induzierte in diesem Kern keine Modulation der neuronalen Aktivität.

Sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere  $(A_1)$  als auch der Obestatin-  $(B_1)$  und der CCK-8S-Gruppe  $(C_1)$  wurde das Chromatin der Neurone zur Lokalisation des VMH zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie markiert die Ausdehnung des VMH, der lateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.



# Abbildung 3.28: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im dorsomedialen Hypothalamus (DMH)

Im Vergleich zur Gabe von 0,15 M NaCl-Lösung (A) war 1½ Stunden nach der Applikation von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (B) kein Einfluss auf die Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) im DMH zu beobachten. Im Gegensatz dazu bewirkte die Injektion von 1,75 nmol CCK-8S/kg Körpergewicht (C) einen signifikanten Anstieg der neuronalen Aktivität.

Zur Lokalisation des DMH wurden die Zellkerne der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere  $(A_1)$  als auch der Obestatin-  $(B_1)$  und der CCK-8S-Gruppe  $(C_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie gibt die Ausdehnung des dorsomedialen Hypothalamus an, welcher lateral des dritten Ventrikels (3V) lokalisiert ist und sich in einen kompakten (DMHC), einen ventralen (DMHV) sowie einen dorsalen (DMHD) Subnukleus untergliedern lässt. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken repräsentiert 100 µm.



## Abbildung 3.29: Repräsentative Gehirnschnitte der immunhistochemischen Darstellung des neuronalen Aktivitätsmarkers Fos im Nucleus tractus solitarius (NTS)

Verglichen mit der Applikation von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht (B) war 90 Minuten nach der Gabe von 0,15 M NaCl-Lösung (A) im NTS keine Beeinflussung der Fos-Expression (grünes Fluoreszenzsignal) zu erkennen. CCK-8S in einer Dosis von 1,75 nmol/kg Körpergewicht induzierte hingegen einen signifikanten Anstieg der neuronalen Aktivität (C).

Zur Lokalisierung des NTS wurde das Chromatin der Neurone sowohl bei den Gehirnschnitten der Vehikeltiere  $(A_1)$  als auch der Obestatin-  $(B_1)$  und der CCK-8S-Gruppe  $(C_1)$  zusätzlich mit Propidiumjodid gefärbt (rotes Fluoreszenzsignal).

Die weiße Linie markiert die Ausdehnung des NTS, der im Hirnstamm beidseits ventrolateral der Area postrema (AP) und dorsolateral des Canalis centralis (CC) lokalisiert ist. Die Angaben orientieren sich am stereotaktischen Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson, 1997). Der weiße Balken entspricht 100 µm.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

### Ghrelin

Die intraperitoneale Applikation von 3 nmol Ghrelin/Tier induzierte neben einer signifikant erhöhten Fos-Expression im Nucleus arcuatus (ARC) und Nucleus paraventricularis (PVN) auch eine Steigerung der neuronalen Aktivität im dorsomedialen Hypothalamus (DMH), nicht aber im ventromedialen Hypothalamus (VMH), im Nucleus tractus solitarius (NTS) sowie in der Area postrema (AP). Die nach Ghrelin-Injektion Fos-exprimierenden Neurone im DMH liegen vor allem im ventralen Subnukleus und sind von einem dichten Netzwerk NPY- sowie AgRPpositiver Projektionsfasern umgeben.

### **Desacyl-Ghrelin**

In verhaltensbiologischen Untersuchungen an adulten Zucker-Ratten konnte eine signifikante inhibitorische Wirkung von intraperitoneal appliziertem desacyl-Ghrelin (5 nmol/Tier) auf die kumulative Nahrungsaufnahme nach fünf und zwölf Stunden beobachtet werden. Zudem führte die repetitive desacyl-Ghrelin-Injektion (5 nmol/Tier zweimal täglich) über acht Tage zu einer signifikanten Stagnation des Körpergewichtszuwachses.

Im ARC, PVN und DMH induzierte die intraperitoneale Gabe von desacyl-Ghrelin zu Beginn der Dunkelphase eine signifikant erhöhte neuronale Aktivität. Im NTS hingegen führte die Applikation des Peptids zu einer Reduktion der Fos-Expression, während desacyl-Ghrelin in der AP keinen modulierenden Effekt auf die neuronale Aktivität hatte.

### Obestatin

Obestatin in einer Dosierung von 1 bzw. 5 µmol/kg Körpergewicht hatte, unabhängig von der metabolischen Ausgangssituation der Versuchstiere, weder in der Licht- noch in der Dunkelphase einen Effekt auf das Fressverhalten der Ratten. Hingegen war bei den mit 3,5 nmol CCK-8S behandelten Kontrolltieren eine signifikante Reduktion der aufgenommenen Futtermenge zu beobachten. Auch das Fos-Expressionsmuster appetitregulatorischer Kerngebiete in Hypothalamus und Hirnstamm wurde durch die Applikation von 5 µmol Obestatin/kg Körpergewicht nicht beeinflusst. Die Injektion von 1,75 nmol CCK-8S induzierte indes eine signifikante Steigerung der neuronalen Aktivität im PVN, im DMH und im NTS.

In der vorliegenden Studie wurden die drei durch das Ghrelin-Gen kodierten gastrointestinalen Peptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin bezüglich ihrer appetitregulatorischen Effekte sowie ihrer zentralnervösen Wirkung in Ratten untersucht. Als Parameter in den verhaltensbiologischen Experimenten dienten die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme und der Körpergewichtsentwicklung durch die intraperitoneale Injektion der Peptide. Zur Detektion der neuronalen Aktivierung durch Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin wurden immunhistochemische Untersuchungen der hypothalamischen und medullären Fos-Expression durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden zunächst für das jeweilige Peptid zusammengefasst und mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen. Im Anschluss werden die methodischen Aspekte der Studien diskutiert, die Resultate der Experimente in diesem Kontext bewertet sowie abschließend Schlussfolgerungen bezüglich möglicher Konsequenzen für weitere Forschungsfragestellungen gezogen.

## <u>4.1 Peripheres Ghrelin induziert über Projektionen aus dem Nucleus arcuatus (ARC) eine</u> Steigerung der neuronalen Aktivität im dorsomedialen Hypothalamus (DMH)

Die orexinogene Wirkung des Neuropeptids Ghrelin ist in der aktuellen wissenschaftlichen Literatur unumstritten. Die zugrunde liegenden zentralnervösen Mechanismen sind bislang jedoch nur bezüglich des Nucleus arcuatus (ARC) weitgehend aufgeklärt. Zielsetzung dieser Studie war es deshalb, anhand des hypothalamischen und medullären Fos-Expressionsmusters den Effekt von peripher injiziertem Ghrelin auf die neuronale Aktivität weiterer Kerne, die in die Regulation der Nahrungsaufnahme involviert sind, zu untersuchen.

Die hierzu durchgeführten Experimente zeigten, dass die intraperitoneale Applikation von Ghrelin in ungefasteten Ratten in einer gesteigerten Aktivität der Neurone im ARC, im Nucleus paraventricularis (PVN) und im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) resultierte. Hingegen war im ventromedialen Hypothalamus (VMH), im Nucleus tractus solitarius (NTS) sowie in der Area postrema (AP) keine Modulation der neuronalen Aktivität zu verzeichnen.

Der beobachtete signifikante Anstieg der Fos-Expression im ARC und im PVN nach intraperitonealer Ghrelin-Injektion bestätigt die Resultate früherer Studien (vgl. hierzu Tab. 4.1),

die nach der i.p.-Applikation des Peptids ebenfalls eine gesteigerte neuronale Aktivierung in diesen Kernen nachwiesen (Traebert et al., 2002; Rüter et al., 2003; Chen et al., 2005).

Überdies wurde in der vorliegenden Untersuchung erstmals eine neuronale Aktivierung im DMH nach der intraperitonealen Applikation von Ghrelin beobachtet (vgl. Tab. 4.1). Eine signifikant gesteigerte Aktivität dieses Kerns war bislang ausschließlich nach intrazerebroventrikulärer Ghrelin-Injektion nachgewiesen worden (Lawrence et al., 2002), während nach intravenöser Injektion nur ein derartiger Trend festgestellt wurde (Takayama et al., 2007). Eine weitere Studie zeigte indes nach i.p.-Gabe des Peptids in Mäusen keine Modulation des Fos-Expressionsmusters im DMH (Wang et al., 2002).

Die neuronale Aktivität des VMH sowie der im Hirnstamm lokalisierten Kerngebiete NTS und AP blieb in der vorliegenden Untersuchung nach intraperitonealer Ghrelin-Gabe unbeeinflusst. Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen früherer Experimente (s. Tab. 4.1) überein, in denen nach der i.p.-Injektion des Peptids keine Modulation der Neuronenaktivität in diesen Kernen zu beobachten war (Wang et al., 2002; Rüter et al., 2003; Chen et al., 2005).

Demgegenüber war nach intravenöser Ghrelin-Injektion in zwei aktuellen Untersuchungen keine Veränderung der neuronalen Aktivität im PVN, jedoch einen Anstieg der Fos-Expression im NTS sowie in der AP zu beobachten (Takayama et al., 2007; Hashimoto et al., 2007).

**Tabelle 4.1: Neuronale Aktivität verschiedener Kerngebiete nach peripherer Ghrelin-Gabe** Peptid-Applikation jeweils 90 Min. vor der Perfusion, Enzym(E)- oder Fluoreszenz(F)- Färbung, Wirkung in Ratten: + = signifikante Steigerung, (+) = tendenzielle Steigerung, o = kein Effekt (\* = Intervall zwischen Injektion und Perfusion 120 Min., verwendete Spezies: Maus)

Referenz	Dosis, Applikation	Färbung	Kerngebiet					
			ARC	PVN	VMH	DMH	NTS	AP
Eigene Ergebnisse	3 nmol i.p.	F	+	+	0	+	0	0
Hewson et al., 2000	~3 nmol i.v.	E	+					
Traebert et al., 2002	~80 nmol i.p	F	+					
Wang et al., 2002 *	~3 nmol i.p.	E	+	0	0	0	0	0
Rüter et al., 2003	1 nmol i.p.	F	+	+			0	0
Chen et al., 2005	5 nmol i.p.	E	+	+			0	
Hashimoto et al., 2007	10 nmol/kg i.v.	E	+	+			+	+
Takayama et al., 2007	6 nmol/kg i.v.	E	+	(+)		(+)	+	+

Die differierenden Resultate bezüglich der neuronalen Aktivität im NTS und in der AP sind vermutlich auf die unterschiedliche Applikationsart des Peptids in den verschiedenen Studien zurückzuführen. Bei intravenöser Administration gelangt Ghrelin in einer höheren Konzentration in den arteriellen Schenkel des mesenterialen Gefäßsystems, in dem es über GHS-R1aexprimierende vagale Afferenzen zu einer gesteigerten neuronalen Aktivität im NTS führt (Date et al., 2002a). Im Gegensatz dazu passiert das Peptid bei intraperitonealer Injektion vor Erreichen der systemischen Zirkulation zunächst das portalvenöse System. Dort unterliegt es dem hepatischen Abbau, da die Leber neben der Niere maßgeblich an der Degradierung im Rahmen des Ghrelinabbaus beteiligt ist (Wu et al., 2003).

Die von den bisherigen Versuchsergebnissen abweichende Beobachtung einer neuronalen Aktivierung im DMH in der vorliegenden Untersuchung könnte entweder auf die verwendete Versuchstier-Spezies oder aber auf die andersartige immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne in den verschiedenen Studien zurückzuführen sein.

Der Vergleich der Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Wang und Takayama mit eigenen Forschungsarbeiten legt nahe, dass für die Detektion der gesteigerten Fos-Expression im DMH offenbar die Verwendung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie nötig ist, da bei enzymatischen Färbungen keine (Wang et al., 2002) oder nur eine nicht-signifikante Steigerung (Takayama et al., 2007) der neuronalen Aktivität im DMH nachgewiesen wurde. Bei der Auswertung der Fluoreszenz-Färbungen mit dem cLSM werden umliegende Gewebebereiche nicht angeregt, wodurch unspezifische Signale durch die Autofluoreszenz des Gewebes minimiert werden. Der Vorteil gegenüber der enzymatischen Färbung liegt somit in der spezifischen Darstellung und der besseren Detektion schwacher Signale (Kobelt et al., 2004). Ferner erleichtert der höhere Kontrast eines farbigen Fluoreszenzfarbstoffs auf schwarzem Grund, verglichen mit dem braunen Farbstoff auf bräunlichem Hintergrund bei der enzymatische Diaminobenzidin-Färbung, die exakte Quantifizierung ganz erheblich (Kobelt et al., 2004).

Die Beobachtung einer Einbindung des DMH in die Vermittlung des orexinogenen Ghrelin-Effektes wird durch zahlreiche weitere Studien gestützt. Diese deuteten darauf hin, dass dieser Kern entscheidend in der Regulation der Energiehomöostase involviert ist (Elmquist et al., 1997; Elias et al., 2000; Zhu et al., 2007). Zusammen mit dem limbischen System ist der DMH jedoch auch in die zentrale Stressreaktion involviert (Asakawa et al., 2001a; DiMicco et al., 2002), sodass die Aktivierung des Kerns nach Ghrelin-Injektion auch die Beteiligung an der Steuerung des Angstverhaltens widerspiegeln könnte.

Dennoch deuten neueste Erkenntnisse auf die Relevanz des DMH bei der Appetitregulation, insbesondere hinsichtlich der zirkadianen Rhythmik der Nahrungsaufnahme hin. Beispielsweise wies der DMH in Studien von Gooley et al. eine erhöhte neuronale Aktivität vor erwarteten Mahlzeiten auf, während eine Läsion des Kerns die physiologische präprandiale Steigerung der Lokomotion bei Ratten signifikant verringerte (Gooley et al., 2006). Zhu et al. beobachteten darüber hinaus, dass unterschiedliche Neuronengruppen des DMH sowohl auf periphere Mediatoren als auch auf gastrale Vagusstimulation und den Plasma-Glukosespiegel reagieren und somit an der Integration der Kurz- und Langzeitregulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sein könnten (Zhu et al., 2007). Zudem induziert auch die intraperitoneale Injektion der anorexinogenen Peptide CCK-8S und Leptin eine signifikant gesteigerte Fos-Expression im DMH, was ebenfalls für eine Beteiligung an der Appetitregulation spricht (Elmquist et al., 1997; Elias et al., 2000; Kobelt et al., 2006b).

Folglich lässt die beobachtete neuronale Aktivierung im DMH durch peripheres Ghrelin im Einklang mit der Datenlage in der aktuellen Literatur eine wichtige Rolle dieses Kerngebiets bei der Verhaltensmodifikation im Kontext der Nahrungsaufnahme vermuten.

In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Interaktion verschiedener Kerne, die an der Appetitregulation beteiligt sind, von großer Bedeutung. Über zahlreiche intrahypothalamische Verbindungen sowie durch Projektionen in andere relevante Areale, wie den Hirnstamm, besteht ein komplexes System zur Integration peripherer Signale. In Abbildung 4.1 ist eine Übersicht der Projektionswege wichtiger appetitregulatorischer Kerngebiete dargestellt.



# Abbildung 4.1: Projektionswege ausgewählter hypothalamischer und medullärer Kerne, die in die Appetitregulation involviert sind

Der PVN projiziert in den ARC [1] und erhält Fasern aus diesem [2]. Zudem weist der ARC Projektionen in den DMH [3] und in die LHA [4] auf und auch zum NTS besteht eine reziproke Verbindung [5,6]. Der PVN projiziert ebenfalls in den NTS [7] und empfängt Efferenzen aus diesem [8]. Enge wechselseitige Verbindungen bestehen zwischen NTS und AP [9,10] und vom PVN in die AP [11]. (Bai et al., 1985; Chronwall, 1985; Sawchenko et al., 1985; Grijalva und Novin, 1990; Ferguson, 1991; Hay und Bishop, 1991; Magoul et al., 1993; Wang et al., 1997; Elmquist et al., 1998; Thompson und Swanson, 1998; Bell et al., 2000)

Um die Mechanismen zu erforschen, die der zentralen Verarbeitung des Ghrelin-Stimulus zugrunde liegen, wurden deshalb in weiterführenden Experimenten die neuronalen Netzwerke untersucht, die an der Vermittlung der Ghrelin-Wirkung beteiligt sind. Im Fokus standen hierbei die Neuromodulatoren Neuropeptid Y (NPY) und *Agouti-related Peptide* (AgRP), da frühere Studien belegten, dass die Ghrelin-stimulierte Nahrungsaufnahme über diese beiden Peptide induziert wird, während exogenes Ghrelin in transgenen Mäuse, die weder NPY noch AgRP

exprimieren, keine Stimulation der Nahrungsaufnahme bewirkt (Chen et al., 2004a). Auch Experimente in Wildtyp-Ratten zeigten, dass der orexinogene Effekt von Ghrelin durch die Vorbehandlung mit NPY-/AgRP-Antikörpern oder mit Antagonisten der NPY-Rezeptoren  $Y_1$  und  $Y_5$  aufgehoben wird (Nakazato et al., 2001; Lawrence et al., 2002).

NPY wird insbesondere in Neuronen des NTS und des ARC exprimiert, die in den DMH, den PVN, die LHA und weitere Hirnareale projizieren (McShane et al., 1994; Williams et al., 2001). Der Neuromodulator NPY führt bei zentraler Injektion zu Hyperphagie und konsekutiver Gewichtszunahme (Clark et al., 1984; Levine und Morley, 1984; Stanley et al., 1986). Die NPY-Synthese und -Freisetzung wird durch periphere Mediatoren wie Leptin und Insulin inhibiert und durch Glukokortikoide sowie durch eine katabole Stoffwechsellage gesteigert (Inui, 2000). Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die im DMH lokalisierten NPY-positiven Neurone an der Regulation der Körpergewichtshomöostase beteiligt sind (Bernardis und Bellinger, 1998; Bi et al., 2001; Chen et al., 2004b).

Auch das Peptid AgRP hat einen starken orexinogenen Effekt, da es als kompetitiver Antagonist des anorexinogenen  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -MSH) am Melanocortin-4-Rezeptor (MC<sub>4</sub>-R) wirkt (Ollmann et al., 1997; Rossi et al., 1998; Cowley et al., 1999). Der MC<sub>4</sub>-R wird von Neuronen des PVN und des DMH sowie anderer Hirnareale exprimiert (Mountjoy et al., 1994). Eine Mutation dieses Rezeptors induziert in Mäusen Adipositas, wohingegen die zentrale Gabe von MC<sub>4</sub>-R-Agonisten die Nahrungsaufnahme in Nagern hemmt (Huszar et al., 1997; Giraudo et al., 1998; Cowley et al., 1999).

Die Neuromodulatoren NPY und AgRP wirken somit synergistisch im Sinne einer Induktion der Nahrungsaufnahme. Zudem sind sie im Hypothalamus kolokalisiert, wobei etwa 95% der NPY-positiven ARC-Neurone AgRP koexprimieren (Broberger et al., 1998; Cowley et al., 1999). Umgekehrt wird AgRP ausschließlich von NPY-positiven Neuronen des ARC synthetisiert, die in andere hypothalamische Kerne wie den PVN, die LHA oder den DMH sowie in extrahypothalamische Gebiete projizieren (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998).

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass sich NPY und AgRP in ihrem orexinogenen Effekt ergänzen. So zeigen NPY-defiziente Mäuse eine kompensatorisch erhöhte AgRP-Synthese, weshalb die Stimulation der Nahrungsaufnahme durch Ghrelin-Agonisten in diesen Tieren nicht abgeschwächt ist (Tschöp et al., 2002). Demgegenüber wird das Fehlen von AgRP nicht vollständig durch eine Steigerung der NPY-Produktion kompensiert, sodass MC<sub>4</sub>-Rezeptor-defiziente Mäuse eine geringere Stimulation der Nahrungsaufnahme nach einer Ghrelin-Injektion aufweisen als der Wildtyp (Shaw et al., 2005).

82

In der vorliegenden Studie zeigte die immunhistochemische Detektion von NPY und AgRP im DMH, dass die nach peripherer Ghrelin-Applikation Fos-exprimierenden Neurone von einem dichten Netzwerk NPY- und AgRP-positiver Projektionsfasern umgeben sind. Dabei stimmte die beobachtete Verteilung der NPY-positiven Fasern mit einer vorwiegenden Lokalisation im ventralen Subnukleus des DMH mit früheren molekularmorphologischen Studien überein, die in diesem Bereich des Kerns ebenfalls ein Areal mit ausgeprägter NPY-Immunreaktivität nachwiesen (Bai et al., 1985; Broberger et al., 1998).

Neben den Fasern aus dem ARC erreichen den DMH auch Projektionen aus dem Hirnstamm über NPY-positive Nervenfasern (Sahu et al., 1988). Da der ARC jedoch der einzige Ort der AgRP-Synthese im Gehirn ist, stammen die detektierten NPY-/AgRP-positiven Fasersysteme offensichtlich aus diesem Kern (Broberger et al., 1998). Auch Tracing-Studien belegten, dass die in den DMH projizierenden NPY-/AgRP-positiven Nervenfasern ausschließlich aus Neuronen des ARC stammen (Broberger et al., 1998). Aufgrund dessen kann spekuliert werden, dass die nach Ghrelin-Applikation Fos-positiven Neurone des DMH über NPY-/AgRP-koexprimierende Fasern aus dem ARC aktiviert werden.

Hierbei ist anzunehmen, dass peripheres Ghrelin eine Freisetzung von NPY und AgRP aus ARCständigen Neuronen bewirkt, deren Nervenendigungen in den DMH projizieren. Im DMH wirken NPY und AgRP durch die Interaktion mit Y<sub>1</sub>- und Y<sub>5</sub>-Rezeptoren bzw. den kompetitiven Antagonismus am MC<sub>4</sub>-R orexinogen (Ollmann et al., 1997; Fekete et al., 2002). Gestützt wird dieses Erklärungsmodell auch durch Versuchsergebnisse, die nach der Mikroinjektion der Neuropeptide NPY und AgRP in den DMH eine Stimulation der Nahrungsaufnahme in Nagern zeigten (Kim et al., 2000; Wirth und Giraudo, 2000).

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass peripheres Ghrelin in der vorliegenden Untersuchung eine signifikante Steigerung der Fos-Expression im ARC, im PVN sowie im DMH bewirkte, wobei die neuronale Aktivierung im DMH vermutlich durch NPY-/AgRP-positive Fasern aus dem ARC erfolgte.

# 4.2 Desacyl-Ghrelin hemmt die Nahrungsaufnahme sowie die Körpergewichtszunahme und moduliert die neuronale Aktivität in Zucker-Ratten

In dieser an Zucker-Ratten durchgeführten Studie bewirkte die intraperitoneale Applikation von 5 nmol desacyl-Ghrelin eine Suppression der Nahrungsaufnahme, während die Injektion einer geringeren Dosis das Fressverhalten nicht beeinflusste. In der Langzeitbeobachtung führte die tägliche Applikation des Peptids im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Stagnation der Körpergewichtszunahme, die auch in den Tagen nach Ende der Behandlung nicht kompensiert wurde.

Die beobachtete Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Zucker-Ratten bestätigt die Ergebnisse früherer Experimente (siehe hierzu auch Tab. 4.2), die nach intraperitonealer Injektion von desacyl-Ghrelin in normalgewichtigen Tieren ebenfalls eine anorexinogene Wirkung des Peptids zeigten (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005).

Zudem wurde, im Einklang mit den vorliegenden Resultaten, eine Inhibition des Fressverhaltens auch in transgenen, Präproghrelin-überexprimierenden Mäusen beobachtet, die eine erhöhte desacyl-Ghrelin-Plasmakonzentration bei unverändertem Ghrelin-Spiegel aufwiesen (Ariyasu et al., 2005; Asakawa et al., 2005). Diese Tiere zeigten im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine signifikant geringere Nahrungsaufnahme und ein vermindertes Körpergewicht sowie einen reduzierten Körperfettanteil und eine verringerte Körperlänge (Ariyasu et al., 2005; Asakawa et al., 2005). Somit bestätigt die vorliegende Beobachtung eines anorexinogenen Effekts von exogenem desacyl-Ghrelin die in anderen Studien gezeigte appetithemmende Wirkung einer erhöhten endogenen Synthese des Peptids.

Im Kontrast hierzu wurde in zwei weiteren Untersuchungen (vgl. hierzu Tab. 4.2) keine Veränderung des Fressverhaltens nach intraperitonealer Applikation von desacyl-Ghrelin festgestellt (Neary et al., 2006; Toshinai et al., 2006).

# Tabelle4.2:UntersuchungenzurModulationderNahrungsaufnahmedurchdieintraperitonealeInjektion von desacyl-Ghrelin in Nagern

Referenz	Dosis/Tier	Spezies	metabolische Situation	Effekt*
Eigene Resultate	5 nmol	Zucker-Ratte	ungefastet	$\downarrow$
Asakawa et al., 2005	3 nmol	Maus	16 Std. gefastet	$\downarrow$
Chen et al., 2005	5 nmol	Ratte	gefastet/ungefastet	$\downarrow$
Neary et al., 2006	7,5 nmol	Maus	gefastet/ungefastet	0
Toshinai et al., 2006	1 u. 5 nmol	Maus	gefastet/ungefastet	0

(\* Beeinflussung der Nahrungsaufnahme: ↓ = Abnahme, o = kein Effekt)

Die von den vorliegenden Ergebnissen abweichenden Resultate der Studien von Neary et al. und Toshinai et al. könnten auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen zu sein, da

für den appetitregulatorischen Effekt von desacyl-Ghrelin vermutlich sowohl die zirkadiane Rhythmik als auch die metabolische Ausgangssituation der Tiere relevant sind (Zucker, 1971).

Die Wirkung eines Sättigungssignals lässt sich am besten nachweisen, wenn durch die experimentelle Intervention eine ansonsten hohe Nahrungsaufnahme reduziert wird. Ein gesteigertes Fressverhalten ist bei Nagern während der Dunkelphase sowie nach Nahrungsdeprivation zu beobachten (Zucker, 1971), weshalb die verhaltensbiologischen Untersuchungen dieser Studie in der Dunkelphase durchgeführt wurden.

Der Einfluss der Tageszeit und der metabolischen Ausgangssituation auf die Versuchsergebnisse wurde jedoch auch durch weitere Studien bestätigt. So beobachteten Chen et al. einen signifikanten anorexinogenen Effekt von desacyl-Ghrelin sowohl in gefasteten und *ad libitum*-gefütterten Tieren in der Dunkelphase als auch in Nahrungs-deprivierten Ratten in der Lichtphase (Chen et al., 2005). In *ad libitum*-gefütterten Tieren hingegen bewirkte das Peptid in der Lichtphase keine signifikante Suppression der Nahrungsaufnahme (Chen et al., 2005). Der fehlende anorexinogene Effekt von desacyl-Ghrelin in den Versuchen von Toshinai et al. könnte daher darauf zurückzuführen sein, dass die Experimente zwar unter verschiedenen metabolischen Ausgangsbedingungen, jedoch ausschließlich in der Lichtphase durchgeführt wurden (Toshinai et al., 2006). Auch Neary et al. stellten weder in gefasteten noch in *ad libitum*-gefütterten Mäusen nach der intraperitonealen Applikation von desacyl-Ghrelin einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme fest (s. Tab. 4.2), jedoch wurde in dieser Publikation die Tageszeit, zu der die Versuche stattfanden, nicht angegeben (Neary et al., 2006).

Insgesamt könnten die abweichenden Versuchsergebnisse also durchaus in der zirkadianen Rhythmik sowie der unterschiedlichen metabolischen Ausgangssituation der Versuchstiere begründet liegen. Angesichts der unzureichenden Datenlage ist eine abschließende Beurteilung jedoch bislang nicht möglich.

Die vorliegende Studie weist ferner bezüglich der Latenzzeit zwischen desacyl-Ghrelin-Injektion und Wirkungseintritt Differenzen zu den bisherigen Publikationen auf. Während in dieser Untersuchung erst nach fünf und zwölf Stunden ein signifikanter anorexinogener Effekt zu beobachten war, zeigten andere Arbeitsgruppen in Experimenten an normalgewichtigen Mäusen schon innerhalb der ersten Stunde *post injectionem* eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005). Eine tendenzielle Reduktion der Nahrungsaufnahme war jedoch auch in diesen Untersuchungen noch nach acht bzw. zwölf Stunden nachweisbar (Chen et al., 2005).

Das verzögerte Einsetzen des anorexinogenen Effekts von desacyl-Ghrelin in der vorliegenden Studie könnte auf die Verwendung von Zucker-Ratten als Versuchstiere zurückzuführen sein. Hierbei sind verschiedene Mechanismen denkbar, die, wie im Folgenden erläutert, durch eine differierende Pharmakokinetik oder aber durch die Alteration der Sättigungsregulation in diesen Tieren zu einer längeren Latenz bis zum Wirkeintritt des Peptids führen würden.

So könnte die starke Adipositas der Tiere zur Retention des intraperitoneal injizierten Peptids im abdominellen Fettgewebe führen, wodurch die Anflutung der Substanz in der systemischen Zirkulation und damit der Wirkeintritt verzögert würde. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass der anorexinogene Effekt des Neuropeptids Amylin, des Ghrelin-Antagonisten [D-Lys<sup>3</sup>]-GHRP-6 sowie des GLP-1-Rezeptor-Agonisten Exendin-4 nach intraperitonealer bzw. subkutaner Injektion in Zucker-Ratten bereits innerhalb der ersten Stunde nach der Applikation zu beobachten ist (Rodriquez de et al., 2000; Beck et al., 2004; Grabler und Lutz, 2004).

Des Weiteren wäre es möglich, dass desacyl-Ghrelin durch eine komplexe Interaktion mit verschiedenen peptidergen Mediatorsystemen wirkt. Die Beeinträchtigung der Appetitregulation bei Zucker-Ratten (Phillips et al., 1996; Beck, 2000) könnte in diesem Kontext mit einzelnen Komponenten bei der Vermittlung der desacyl-Ghrelin-Wirkung interferieren. So wäre vorstellbar, dass der initiale Sättigungseffekt von desacyl-Ghrelin über CCK-abhängige Mechanismen vermittelt wird. Die Leptin-Rezeptor-defizienten Zucker-Ratten sind jedoch gegenüber einer CCK-induzierten Inhibition der Nahrungsaufnahme resistent (Niederau et al., 1997; Grabler und Lutz, 2004), da CCK und Leptin synergistische Effekte aufweisen (Barrachina et al., 1997; Wang et al., 2000). Folglich könnte die reduzierte CCK-Sensitivität der Zucker-Ratten durch das Ausbleiben eines initialen, CCK-vermittelten Sättigungseffekts zu der gegenüber normalgewichtigen Tieren verlängerten Latenz bis zum Wirkbeginn von desacyl-Ghrelin geführt haben.

Eine dritte denkbare Erklärung für die beobachtete längere Dauer bis zum Wirkungseintritt von desacyl-Ghrelin liefern frühere Studien, die den Einfluss des Peptids auf die gastrointestinale Motilität untersuchten. In diesen Experimenten bewirkte sowohl die exogene Zufuhr als auch die genetisch gesteigerte endogene Synthese von desacyl-Ghrelin eine signifikante Verlangsamung der Magenentleerung (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005). Der durch desacyl-Ghrelin verzögerte Abtransport des Chymus aus dem Magen könnte bei den Tieren zu einer verstärkten gastralen Wanddehnung führen, die nach Erreichen der maximalen Akkomodation über vagale Afferenzen ein Sättigungsgefühl induziert (Geliebter et al., 1988). In den hier als Versuchstiere verwendeten Zucker-Ratten ist jedoch die Langzeitregulation der Energiehomöostase erheblich beeinträchtigt, weshalb die Tiere eine nahezu kontinuierliche Nahrungsaufnahme zeigen

(Phillips et al., 1996; Beck, 2000). Die Latenz bis zum Eintritt des anorexinogenen Effekts von desacyl-Ghrelin in der vorliegenden Studie könnte demnach darauf beruhen, dass die Zucker-Ratten erst bei ausreichender Magenfüllung durch die desacyl-Ghrelin-bedingte Störung des Weitertransports das Fressen einstellten, während bei den Wildtyp-Tieren in anderen Studien die Hemmung der gastrointestinalen Motilität bereits die Initiation der Nahrungsaufnahme verhinderte.

Insgesamt zeigt die vorliegende Studie somit, übereinstimmend mit der aktuellen Literatur, einen anorexinogenen Effekt von intraperitoneal appliziertem desacyl-Ghrelin, der bei regelmäßiger Injektion des Peptids zu einer signifikanten Stagnation der Körpergewichtszunahme führt.

Ergänzend zu den vorangehend beschriebenen verhaltensbiologischen Versuchen wurden auch die zentralen Wirkmechanismen von desacyl-Ghrelin untersucht. Die in diesem Kontext durchgeführten immunhistochemischen Experimente ergaben, dass die intraperitoneale Applikation des Peptids insbesondere zu Beginn des Beobachtungszeitraums einen signifikanten Anstieg der neuronalen Aktivität im Nucleus arcuatus (ARC), im Nucleus paraventricularis (PVN) sowie im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) der Tiere induzierte.

Dieses hypothalamische Aktivitätsmuster trat sowohl bereits initial nach der desacyl-Ghrelin-Injektion als auch am Ende der Dunkelphase nach der physiologischen Nahrungsaufnahme der Vehikelgruppe auf. Damit könnte es das zentralnervöse molekularmorphologische Korrelat des Zustands der Sättigung dieser Tiere repräsentieren.

Im Nucleus tractus solitarius (NTS) war hingegen nach desacyl-Ghrelin-Gabe eine Reduktion der neuronalen Aktivität im Vergleich zur Vehikelgruppe zu beobachten, während in der Area postrema (AP) keine Beeinflussung derselben gefunden wurde.

Die beobachtete erhöhte neuronale Aktivität im PVN und im ARC stimmt mit den Ergebnisse früherer Untersuchungen an normalgewichtigen Tieren überein, die nach intraperitonealer desacyl-Ghrelin-Injektion in vergleichbarer Dosierung ebenfalls eine Aktivitätssteigerung in diesen Kernen zeigten (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005). Bezüglich der desacyl-Ghrelininduzierten neuronalen Aktivierung im DMH existieren hingegen in der aktuellen Literatur bislang noch keine weiteren Daten. Jedoch erscheint die beobachtete Aktivierung insofern plausibel, als bereits in zahlreichen früheren Studien eine Beteiligung dieses Kerns an der Regulation der Nahrungsaufnahme durch andere peptiderge Mediatoren festgestellt wurde (Elmquist et al., 1997; Elias et al., 2000; Kobelt et al., 2006b).

Insgesamt stehen die vorliegenden Ergebnisse einer neuronalen Aktivierung im ARC, PVN und DMH durch desacyl-Ghrelin somit im Einklang mit dem in der aktuellen Literatur postulierten zentralen Wirkmechanismus des Peptids. Als Indiz für diese Vermutung gilt, neben der reproduzierbaren hypothalamischen Aktivierung (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005), die Tatsache, dass desacyl-Ghrelin, im Gegensatz zu anderen Peptiden, die Blut-Hirn-Schranke durch transmembranäre Diffusion passiv überwindet und somit direkt im ZNS wirken könnte (Banks et al., 2002).

Basierend auf den Versuchsergebnissen weiterer Studien, ergibt sich in diesem Kontext zudem eine Hypothese bezüglich der zentralen Signaltransduktion. So beschrieben Asakawa et al. eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression der anorexinogenen Neuropeptide CART (*Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript*) und Urocortin im Hypothalamus nach intraperitonealer desacyl-Ghrelin-Gabe (Asakawa et al., 2005).

Die Peptide CART und Urocotin werden im Hypothalamus unter anderem im PVN, im ARC sowie im DMH exprimiert und induzieren bei zentraler Gabe eine Reduktion der Nahrungsaufnahme sowie des Körpergewichts (Kristensen et al., 1998; Larsen et al., 2000; Shi et al., 2000; Currie et al., 2001; Elias et al., 2001; Nagata et al., 2005). Der anorexinogene Effekt von exogenem CART wurde auch in Zucker-Ratten, die aufgrund der fehlenden Leptin-Wirkung eine erniedrigte endogene hypothalamische CART-Konzentration aufweisen, gezeigt (Kristensen et al., 1998; Larsen et al., 2000; Murphy et al., 2000).

Neben der Regulation der Nahrungsaufnahme beeinflussen CART und Urocortin über *Corticotropin releasing factor*-Rezeptor-2 (CRF<sub>2</sub>-R)-abhängige Signalwege auch die gastrointestinale Motilität (Okumura et al., 2000; Wang et al., 2001; Nagata et al., 2005; Czimmer et al., 2006). Für die Vermittlung des inhibitorischen Effekts von desacyl-Ghrelin auf die gastrale Motorik über diesen Mechanismus spricht in diesem Zusammenhang, dass nach der zentralen Gabe selektiver CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten und unselektiver CRF-Rezeptor-Blocker die desacyl-Ghrelin-induzierte Hemmung der Peristaltik ausblieb, während die Gabe selektiver CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten die desacyl-Ghrelin-Wirkung nicht beeinflusste (Chen et al., 2005).

Gestützt wird diese Annahme auch durch die Beobachtung, dass desacyl-Ghrelin CRF-positive Neurone im PVN aktiviert (Chen et al., 2005) sowie durch die Erkenntnis, dass im DMH lokalisierte CRF-exprimierende Neurone an der Appetitregulation beteiligt sind (Kobelt et al., 2006b). Die Neuromodulatoren CART und Urocortin könnten somit eine Schlüsselfunktion bei der zentralen Vermittlung der anorexinogenen desacyl-Ghrelin-Wirkung über CRF-abhängige Signalwege einnehmen (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005).

Weiterhin war in der vorliegenden Untersuchung nach desacyl-Ghrelin-Gabe im NTS eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte neuronale Aktivierung zu beobachten, während in früheren Studien keine Veränderung der Neuronenaktivität in diesem Kern festgestellt wurde (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005). Im Gebiet der AP war in der vorliegenden Studie hingegen keine Beeinflussung der neuronalen Aktivität durch desacyl-Ghrelin nachweisbar, wobei diesbezüglich bislang noch keine Versuchsergebnisse anderer Untersuchungen vorliegen. Da die neuronale Aktivität des NTS unter anderem die chemische und mechanische Stimulation vagaler Afferenzen durch die Chymus-Passage reflektiert (Fraser und Davison, 1993; Zittel et al., 1999), könnten die diesbezüglich differierenden Resultate auf die unterschiedliche Fütterung der Versuchstiere zurückzuführen sein. So hatten die Tiere in der vorliegenden Untersuchung

zwischen der Injektion der Versuchslösungen und der transkardialen Perfusion freien Zugang zum Futter, während in den anderen Studien in diesem Zeitraum keine Nahrung angeboten wurde (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005).

Die *ad libitum*-gefütterten Zucker-Ratten nahmen somit vermutlich bis zur Narkotisierung größere Mengen Nahrung auf (Phillips et al., 1996; Beck, 2000), womit eine vermehrte neuronale Aktivierung im NTS einherginge (Fraser und Davison, 1993; Zittel et al., 1999). Während dieser Effekt aufgrund der anorexinogenen Wirkung und der Inhibition der Magenentleerung (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005) bei der desacyl-Ghrelin-Gruppe nur moderat ausgeprägt gewesen sein könnte, resultierte wahrscheinlich die höhere Nahrungsaufnahme der Vehikelgruppe in Kombination mit der intakten gastralen Motilität in einer forcierten neuronalen Aktivierung im NTS der Kontrolltiere.

Bei den Nahrungs-deprivierten Tieren in den Untersuchungen von Asakawa und Chen hatten die Effekte von desacyl-Ghrelin aufgrund des fehlenden Futterangebots hingegen keine Auswirkung auf die NTS-Aktivität, die somit keinen Unterschied zwischen Verum- und Vehikelgruppe aufwies (Asakawa et al., 2005; Chen et al., 2005).

Im Umkehrschluss wäre die reduzierte neuronale Aktivierung im NTS der desacyl-Ghrelinbehandelten Tiere somit keine direkte Wirkung des Peptids, sondern vermutlich eine Folge der aus der geringeren Nahrungsaufnahme resultierenden verminderten Vagusaktivität.

Zudem spricht die Beobachtung, dass desacyl-Ghrelin auch nach der chemischen Destruktion Capsaicin-sensitiver vagaler Afferenzen weiterhin anorexinogen wirkt (Chen et al., 2005), ebenfalls gegen eine direkte Vermittlung dieses desacyl-Ghrelin-Effekts über afferente Vagusfasern.

Demgegenüber wird die bereits beschriebene desacyl-Ghrelin-induzierte Hemmung der Magenmotorik durch eine komplette Vagotomie vollständig aufgehoben (Chen et al., 2005).

89

Somit erfolgt die Beeinflussung der gastrointestinalen Motilität vermutlich nicht über die Interaktion des Peptids mit peripheren Rezeptoren, sondern könnte, wie erläutert, durch zentrale, CRF-abhängige Mechanismen gesteuert und über vagale Efferenzen vermittelt werden (Chen et al., 2005).

Zusammenfassend stützen die in der vorliegenden Studie beobachtete Reduktion der Nahrungsaufnahme, die Suppression der Körpergewichtszunahme sowie die Modulation der neuronalen Aktivität appetitregulatorischer Zentren in Hypothalamus und Hirnstamm nach desacyl-Ghrelin-Injektion die Beteiligung dieses gastrointestinalen Peptids an der Regulation der Energiehomöostase. Aufgrund der bislang spärlichen Datenlage ergibt sich aus diesen Erkenntnissen nun für nachfolgende Untersuchungen die Fragestellung nach den exakten Mechanismen, die der Vermittlung der desacyl-Ghrelin-Wirkung zugrunde liegen.

Besondere Relevanz erhält dieses Thema durch klinische Studien, die zeigten, dass anorektische Dialysepatienten signifikant höhere desacyl-Ghrelin-Plasmaspiegel aufwiesen als jene ohne beeinträchtigten Appetit (Muscaritoli et al., 2007). Muscaritoli et al. folgerten, dass die fehlende desacyl-Ghrelin-Clearance niereninsuffizienter Patienten die anorexinogene Wirkung des Peptids verstärke und damit die verminderte Nahrungsaufnahme bedinge (Muscaritoli et al., 2007).

Zur weiteren Erforschung dieses somit vermutlich auch im humanen Organismus relevanten Systems wäre deshalb beispielsweise die Charakterisierung des Rezeptors, mit dem desacyl-Ghrelin interagiert, hilfreich, um anhand des Expressionsmusters die Wirkorte des Peptids aufzuklären und Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Mechanismen zu ermöglichen. Sollten zukünftige Studien die gezeigten Effekte auch bei Menschen bestätigen, so ließe sich desacyl-Ghrelin eventuell in der pharmakologischen Adipositas-Therapie anwenden.

## **4.3 Obestatin beeinflusst in Ratten weder die Nahrungsaufnahme noch die neuronale** Aktivität in Hypothalamus und Hirnstamm

Die intraperitoneale Injektion von Obestatin in verschiedenen Dosierungen zeigte in der vorliegenden Untersuchung unabhängig von den metabolischen Ausgangsbedingungen und der zirkadianen Rhythmik keinen inhibitorischen Effekt auf die Nahrungsaufnahme in Ratten.

Hingegen war bei den als Positivkontrolle mitgeführten CCK-8S-behandelten Tieren in allen Versuchen eine kurzzeitige, aber stabile Suppression der Nahrungsaufnahme zu beobachten, die nur bei ungefasteten Tieren in der Lichtphase kein signifikantes Niveau erreichte. Dieses Resultat lässt sich darauf zurückführen, dass die physiologische Nahrungsaufnahme in der Licht-

phase in ungefasteten Tieren sehr gering ist (Zucker, 1971), sodass ein zusätzliches Sättigungssignal nur bei sehr großen Stichproben einen statistisch signifikanten Effekt aufweisen würde.

Die gewählte Methodik, die Versuchsdurchführung und die verwendeten Versuchstiere waren somit offensichtlich zum Nachweis einer appetitregulatorischen Wirkung der Peptide geeignet. Fehlinjektionen sind zwar in der vorliegenden Studie nicht gänzlich auszuschließen, jedoch zeigten die Tiere keinerlei Verhaltensauffälligkeiten, wie beispielsweise eine Schonhaltung, peranale Blutungen oder Nahrungsverweigerung. Zudem war die Anzahl der Tiere mit acht bis 14 Ratten pro Versuchsgruppe ausreichend hoch und die an verschiedenen Tagen durchgeführten Studien ergaben übereinstimmende Ergebnisse. Trotz geeigneter Experimentalbedingungen und adäquater Versuchsdurchführung lieferten die Untersuchungen zur Modulation der Nahrungsaufnahme somit keinen Hinweis für einen appetitregulatorischen Effekt des Peptids Obestatin.

Wie einleitend beschrieben, ist diesbezüglich auch die Datenlage in der aktuellen Literatur inkonsistent. Nach der Entdeckung des Peptids im Jahr 2005 beschrieben Zhang et al. zunächst eine anorexinogene Wirkung in gefasteten Mäusen (Zhang et al., 2005). Diese Ergebnisse wurden jedoch nur durch wenige Untersuchungen bestätigt (Bresciani et al., 2006; Green et al., 2007; Lagaud et al., 2007), wohingegen zahlreiche andere Studien keine signifikante Modulation der Nahrungsaufnahme durch die Applikation des Peptids zeigten (Gourcerol et al., 2006; Holst et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; Samson et al., 2006; Seoane et al., 2006; Sibilia et al., 2006; De Smet et al., 2007; Zizzari et al., 2007).

Eine Zusammenfassung der bislang vorliegenden Publikationen zur Wirkung der akuten Obestatin-Administration auf die Nahrungsaufnahme ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

# **Tabelle 4.3: Effekt der akuten Obestatin-Injektion auf die Nahrungsaufnahme in Nagern** (i.p. = intraperitoneal; i.c.v. = intrazerebroventrikulär; p.i. = *post injectionem*)

Studio	Spozios	metabolische Dosis		Effekt auf kumulative		
Studie	Spezies	Ausgangssituation (Applikationsart)		Nahrungsaufnahme		
Zhang	Mana	16 Std anfortat	1 µmol/kg (i.p.)/	signifikante Inhibition		
et al., 2005	Iviaus	10 Std. gefästet	8 nmol/kg (i.c.v.)	(1, 3 und 5 Stunden p.i.)		
Bresciani	Patta 16 Std. gafastat		320 µg/kg (i.p.) ~	signifikante Inhibition		
et al., 2006	Katte	10 Stu. gelästet	128 nmol/kg (i.p.)	(in der 1. Stunde p.i.)		
Green	Maus	16 Std. gefastet	$1 \text{ umol/kg}(\mathbf{i} \mathbf{p})$	signifikante Inhibition		
et al., 2007	Iviaus	10 Stu. gelästet	1 μποι/kg (i.p.)	(in 15 min. 4 Std. p.i.)		
Lagaud	Maus/ Ratte über Nacht gefastet		0,01 nmol/kg bis	signifikante Inhibition		
et al., 2007			3 µmol/kg (i.p.)	(bei 10-300 nmol/kg)		
Holst	Maue	16 Std. gefastet/	100 nmol oder	tendenzielle Reduktion		
et al., 2006	Iviaus	ad libitum	1 μmol/kg (i.p.)	(nicht signifikant)		
Samson	Potto	18 Std. gefastet/	0,3 bis 3 nmol/	tendenzielle Reduktion		
et al., 2006	Katte	ad libitum	Tier (i.c.v.)	(nicht signifikant)		
Sibilia	Ratte	16 Std. gefastet	0,3 oder 0,84	tendenzielle Reduktion		
et al., 2006	Katte	10 Std. gelastet	nmol/Tier (i.c.v.)	(nicht signifikant)		
Zizzari	Maus	24 Std. gefastet/	1 umol/kg (i n )	keine Modulation		
et al., 2007	Muus	ad libitum	1 μποι/κ <u>β</u> (π.p.)	Keme woodulation		
Gourcerol	Maus/	über Nacht gefastet	12 bis 120	keine Modulation		
et al., 2006	Ratte	uber Maent gerästet	nmol/kg (i.p.)			
Seoane	Ratte	12 Std. gefastet/	$\sim 9 \text{ nmol/kg}(i c y)$	keine Modulation		
et al., 2006	Ratic	ad libitum	(1.e.v.)	Kenic Wiodulation		
Nogueiras	Maus 16-18 Std gefastet		125 nmol oder	keine Modulation		
et al., 2006	maus		1 µmol/kg (i.p.)			
De Smet	Maus	18 Std. gefastet	125 nmol/kg (i n )	keine Modulation		
et al., 2007	111000	10 Stal Golubiot				

Das Resultat einer fehlenden Obestatin-Wirkung in der vorliegenden Untersuchung bestätigt somit die Ergebnisse der Mehrzahl aller bisherigen Publikationen zu diesem Thema. Jedoch ist bislang ungeklärt, welche Einflussfaktoren die widersprüchlichen Ergebnisse – im Sinne eines anorexinogenen Effekts von Obestatin in anderen Studien – bedingen könnten. Mögliche ursächliche Determinanten könnten Differenzen bezüglich der metabolischen Ausgangssituation der Tiere, der zirkadianen Rhythmik, der Versuchstierspezies, der injizierten Peptid-Dosis oder aber der Applikationsart darstellen. Der Einfluss dieser Parameter soll daher im Folgenden diskutiert werden.

Als ein möglicher Erklärungsansatz standen die metabolische Ausgangssituation der Tiere sowie die zirkadiane Rhythmik im Fokus der vorliegenden Untersuchung. In diesem Kontext wurden verschiedene Experimente unter variierenden Versuchsbedingungen, nämlich an *ad libitum*-gefütterten sowie an gefasteten Ratten, jeweils sowohl in der Licht- als auch in der Dunkelphase durchgeführt, um den Einfluss dieser Versuchsparameter auf die Obestatin-Wirkung zu untersuchen. Jedoch hatte der von Zhang et al. als essentielle Bedingung für den anorexinogenen Effekt von Obestatin beschriebene gefastete Zustand der Tiere (Zhang et al., 2005), unabhängig von der zirkadianen Rhythmik, weder in der vorliegenden Studie noch in weiteren Untersuchungen (s. Tab. 4.3) einen Einfluss auf die Obestatin-Wirkung (Gourcerol et al., 2006; Holst et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; Samson et al., 2006; Seoane et al., 2006; Sibilia et al., 2006; De Smet et al., 2007; Zizzari et al., 2007).

Eine weitere denkbare Erklärung für die Abweichung der Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen könnten die unterschiedlichen verwendeten Versuchstier-Spezies sein. Während in dieser Studie Ratten untersucht wurden, stammten die ursprünglichen Beobachtungen aus an Mäusen durchgeführten Experimenten (Zhang et al., 2005). Jedoch zeigten zwei Arbeitsgruppen auch bei Ratten eine Reduktion der Nahrungsaufnahme durch Obestatin (Bresciani et al., 2006; Lagaud et al., 2007), während viele weitere Studien weder in Mäusen (Gourcerol et al., 2006; Holst et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; De Smet et al., 2007; Zizzari et al., 2007) noch in Ratten (Gourcerol et al., 2006; Samson et al., 2006; Seoane et al., 2006; Sibilia et al., 2006) einen anorexinogenen Effekt des Peptids reproduzieren konnten (vgl. hierzu Tab. 4.3). Entsprechend scheint die Wahl der Spezies Ratte als Versuchstiere nicht der Grund des fehlenden Sättigungseffekts zu sein.

Auch die differierenden Obestatin-Dosierungen, die in den bisherigen Untersuchungen injiziert wurden, könnten den unvereinbaren Versuchsergebnissen zugrunde liegen. In der vorliegenden Studie bewirkte weder die Applikation von 1 µmol noch von 5 µmol Obestatin/kg KG eine Modulation der Nahrungsaufnahme. Eine aktuelle Untersuchung von Lagaud et al. (s. Tab. 4.3) zeigte jedoch, dass die Dosis-Wirkungs-Beziehung des anorexinogenen Effekts von Obestatin umgekehrt parabelförmig verlaufen könnte (Lagaud et al., 2007). In der entsprechenden Studie

resultierte die intraperitoneale Applikation moderater Konzentrationen des Peptids (100 bzw. 300 nmol/kg KG) in Ratten in einer signifikanten Inhibition der Nahrungsaufnahme, während höhere und niedrigere Dosierungen keine Modulation des Fressverhaltens bewirkten (Lagaud et al., 2007). Dieser Annahme folgend, würden die in der vorliegenden Untersuchung injizierten Dosierungen bereits über dem anorexinogen wirkenden Bereich liegen.

Gegen Lagauds Hypothese spricht jedoch einerseits, dass in zwei (Zhang et al., 2005; Green et al., 2007) der drei Studien, die einen signifikanten Sättigungseffekt von Obestatin zeigten, ebenfalls eine Dosis von 1 µmol/kg KG verabreicht wurden (s. Tab. 4.3) sowie andererseits die Tatsache, dass in weiteren Studien auch nach der Applikation von Konzentrationen zwischen 100 und 125 nmol/kg KG keine Beeinflussung der Nahrungsaufnahme zu beobachten war (Gourcerol et al., 2006; Holst et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; De Smet et al., 2007).

Festzuhalten ist ferner, dass die sowohl in dieser als auch in weiteren Studien verwendeten Obestatin-Dosierungen im mikromolaren Bereich etwa tausendfach über der appetitregulatorisch wirkenden Konzentration anderer gastrointestinaler Neuropeptide liegen. Beispielsweise ist bei peripherer Injektion bereits ab einer Dosis von 1 nmol Ghrelin/Ratte oder 1 nmol CCK-8S/kg KG ein signifikanter Effekt auf die Nahrungsaufnahme zu beobachten (Garlicki et al., 1990; Wren et al., 2001b).

Die variierende Applikationsart in den verschiedenen Untersuchungen könnte die Wirksamkeit ebenfalls beeinflusst haben. Die in dieser Studie praktizierte intraperitoneale Applikation wurde gewählt, da auch endogenes Obestatin hauptsächlich peripher in der gastralen Mukosa gebildet 2005). Andere Arbeitsgruppen untersuchten wird (Zhang et al.. hingegen den appetitregulatorischen Effekt von zentral injiziertem Obestatin. Insgesamt liegen auch diesbezüglich kontroverse Ergebnisse vor, da einige Untersuchungen einen signifikanten anorexinogenen Effekt von intraperitoneal (Zhang et al., 2005; Bresciani et al., 2006; Lagaud et al., 2007; Green et al., 2007) sowie intrazerebroventrikulär (Zhang et al., 2005) verabreichtem Obestatin zeigten, während in anderen Experimenten weder die i.p.- (Gourcerol et al., 2006; Holst et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; De Smet et al., 2007; Zizzari et al., 2007) noch die i.c.v.-Gabe (Samson et al., 2006; Seoane et al., 2006; Sibilia et al., 2006) von Obestatin eine signifikante Reduktion der Nahrungsaufnahme bewirkte. Die periphere Applikation scheint folglich nicht die Ursache einer mangelnden Wirksamkeit des Peptids in der vorliegenden Studie zu sein.

Insgesamt zeigen die Betrachtung der Versuchsdurchführung sowie der Vergleich der Experimentalbedingungen der vorliegenden Studie mit dem in der aktuellen Literatur beschriebenen

Versuchsdesign somit kein schlüssiges Konzept zur Erklärung der differierenden Resultate der verschiedenen Untersuchungen. Entsprechend bleibt unklar, weshalb die vorgestellten Ergebnisse, übereinstimmend mit den meisten Publikationen, gegen eine appetithemmende Wirkung von Obestatin sprechen, während einige Beobachtungen einen anorexinogenen Effekt des Peptids vermuten lassen.

Zur Komplementierung der verhaltensbiologischen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Wirkung von Obestatin auf die neuronale Aktivität zentralnervöser Kerne, die an der Sicherung der Energiehomöostase beteiligt sind, untersucht. Die intraperitoneale Gabe des Peptids bewirkte jedoch weder in wichtigen hypothalamischen Gebieten der Appetitregulation wie dem Nucleus arcuatus (ARC), dem Nucleus paraventricularis (PVN), dem ventromedialen Hypothalamus (VMH) und dem dorsomedialen Hypothalamus (DMH) noch im medullär lokalisierten Nucleus tractus solitarius (NTS) eine Veränderung der neuronalen Aktivität. Die als Positivkontrolle durchgeführte CCK-Applikation induzierte indes eine signifikante Aktivitätssteigerung im PVN, im DMH sowie im NTS.

Vergleichbare Untersuchungen weiterer Arbeitsgruppen zur Beeinflussung der Fos-Expression durch Obestatin liegen bislang noch nicht vor. Jedoch zeigten diverse Studien den modulierenden Effekt zahlreicher anderer gastrointestinaler Mediatoren auf die neuronale Aktivität appetitregulatorischer Kerne in Hypothalamus und Hirnstamm. So führt beispielsweise die Applikation der appetithemmenden Peptide CCK, PYY, GLP, Amylin, Leptin und Insulin zu signifikanten Veränderungen des hypothalamischen sowie des medullären Fos-Expressionsmusters und auch die Injektion des orexinogen wirkenden Ghrelins resultierte in einer Änderung der neuronalen Aktivität in diesen Gebieten (Bonaz et al., 1993; Griffond et al., 1994; Elmquist et al., 1997; Rowland et al., 1997; Traebert et al., 2002; Kobelt et al., 2006b).

Entsprechend wäre zu erwarten, dass Obestatin ebenfalls einen Einfluss auf die Neuronenaktivität der genannten Kerngebiete hat. Die in der vorliegenden Studie gezeigte fehlende Modulation des Fos-Expressionsmusters nach Obestatin-Injektion spricht daher gegen einen zentralen Wirkmechanismus des Peptids.

Die Hypothese, dass Obestatin an der Regulation der Insulinsekretion mitbeteiligt ist und über diesen Mechanismus seine appetitregulatorische Wirkung vermittelt (Chanoine et al., 2006), erscheint durch den fehlenden Einfluss auf die neuronale Aktivität ebenfalls fraglich. Zwar konnten Chanoin et al. an Ratten eine positive Korrelation zwischen Obestatin- und Insulin-Konzentration in Pankreas und Plasma beobachten (Chanoine et al., 2006), jedoch führte eine erhöhte plasmatische Insulinkonzentration in anderen Untersuchungen zu einer neuronalen

95

Aktivierung im Hypothalamus, die sich als gesteigerte Fos-Expression dieses Gebiets darstellte (Griffond et al., 1994). Eine signifikante Beeinflussung des Insulinspiegels durch Obestatin ist aufgrund der fehlenden neuronalen Aktivierung in der vorliegenden Studie somit unwahrscheinlich.

Auch die mRNA-Expression der zentralen orexinogenen und anorexinogenen Neuropeptide NPY, AgRP, POMC oder CART im Hypothalamus wird durch eine repetitive zentrale Obestatin-Applikation nicht beeinflusst (Nogueiras et al., 2006).

Zudem stellen die Ergebnisse anderer Studien eine regulatorische Funktion des Peptids im Kontext der Energiehomöostase ebenfalls in Frage. So induzierte in weiteren Untersuchungen auch die regelmäßige Gabe von Obestatin keine stabile Inhibition der Nahrungsaufnahme. Die tägliche Applikation von Obestatin führte in Nagern weder bei zentraler noch bei peripherer Injektion zu einer nennenswerten Reduktion der Nahrungsaufnahme (Nogueiras et al., 2006; Sibilia et al., 2006). Neben eindeutigen Daten bezüglich der kurzfristigen Suppression der Nahrungsaufnahme fehlt somit auch die Evidenz für eine Beeinflussung der Langzeitregulation des Fressverhaltens. Zudem liegt die plasmatische Halbwertszeit (HWZ) von Obestatin mit  $22 \pm 2$  Minuten (Zizzari et al., 2007) weit über jener von Peptiden wie beispielsweise CCK (HWZ 1-2 Minuten) oder PYY (HWZ ca. 12 Minuten), die bereits nach einmaliger Injektion einen appetitregulatorischen Effekt zeigen (Yoshinaga et al., 1992; Hoffmann et al., 1993).

Bezüglich der physiologischen Plasmakonzentration des endogenen Obestatins liegen in der aktuellen Literatur ebenfalls differierende Daten vor. Zhang et al. wiesen per Radioimmunoassay im Plasma einen Obestatin-Spiegel von circa 100 pmol/l nach, der durch 48-stündiges Fasten unbeeinflusst blieb (Zhang et al., 2005). Eine andere Untersuchung zeigte indes, dass die plasmatische Obestatin-Konzentration pulsatilen Schwankungen zwischen 200 und 600 pmol/l unterlag und ein durchschnittliches Niveau von über 300 pmol/l aufwies (Zizzari et al., 2007). Des Weiteren führte 24-stündiges Fasten zu einer signifikanten Reduktion des Obestatin-Spiegels (Zizzari et al., 2007). Die Werte in der Studie von Zizzari et al. lagen damit trotz vergleichbarer Versuchsbedingungen etwa dreifach über der von Zhang postulierten Serum-Konzentration, während das Peptid in Untersuchungen von Bang et al. in Gewebeextrakten aus Magen, Duodenum, Kolon, Schilddrüse, Niere, Nebenniere und weiteren Organen sowie im Plasma gar nicht nachgewiesen werden konnte (Bang et al., 2007).

Auch kann ein mögliches Zielorgan der Obestatin-Wirkung entgegen früherer Annahmen nicht anhand des GPR-39-Expressionsmusters identifiziert werden, da die zunächst vermutete Interaktion des Peptids mit diesem Rezeptor (Zhang et al., 2005) in nachfolgenden Studien widerlegt wurde (Holst et al., 2006; Lauwers et al., 2006; Zhang et al., 2007).

Die hochkonservierte Aminosäuresequenz in unterschiedlichen Spezies, die ursprünglich zur Entdeckung des Peptids führte, spricht jedoch gegen einen völligen Funktionsverlust des Peptids (Zhang et al., 2005). Vielmehr könnten die in weiteren Studien gezeigten Effekte, wie die Beeinflussung des Flüssigkeitshaushaltes (Samson et al., 2006), der Erinnerung und des Angstverhaltens (Carlini et al., 2007) oder des Schlafrhythmus (Szentirmai und Krueger, 2006) im Vordergrund stehen.

Abschließend ist somit zu resümieren, dass die Datenlage bezüglich der biologischen Bedeutung von Obestatin sehr inkonsistent ist. Die Ergebnisse der vorliegenden verhaltensbiologischen sowie immunhistochemischen Studien sprechen jedoch gegen eine relevante Beeinflussung der Nahrungsaufnahme durch Obestatin in Ratten. Um sowohl mögliche physiologische Effekte als auch den Wirkmechanismus von Obestatin abschließend beurteilen zu können, sind jedoch weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet notwendig.

## 4.4 Resümee

Die durch das Ghrelin-Gen kodierten gastrointestinalen Neuropeptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin zeigten in den verhaltensbiologischen und immunhistochemischen Experimenten im Rahmen dieser Untersuchung wesentliche Unterschiede in ihrer Wirkung.

**Ghrelin** induzierte in der vorliegenden Studie nach peripherer Applikation neben der bereits bekannten Steigerung der Aktivität im PVN und ARC auch eine neuronale Aktivierung im DMH. Hierbei konnte gezeigt werden, dass diese nach Ghrelin-Injektion aktivierten DMH-Neurone von einem dichten Netzwerk NPY-/AgRP-positiver Nervenfasern umgeben sind.

Die Neuromodulatoren NPY und AgRP sind, wie ausgeführt, für die Vermittlung der Ghrelin-Wirkung essentiell (Nakazato et al., 2001; Lawrence et al., 2002; Chen et al., 2004a). Da AgRP nur in NPY-koexprimierenden Neuronen des ARC synthetisiert wird (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998), lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse spekulieren, dass peripheres Ghrelin zunächst ARC-ständige Neurone aktiviert (Wang et al., 2002). Diese erreichen über NPY-/AgRP-koexprimierende Projektionsfasern den DMH (Broberger et al., 1998; Wang et al., 2002) und könnten somit eine sekundäre Aktivierung dieses Kerns bewirken (vgl. Abb. 4.2).



# Abbildung 4.2: Hypothese zur sekundären Aktivierung der DMH-Neurone über NPY-/ AgRP-positive Projektionsfasern aus dem ARC

In diesem Kontext ist anzunehmen, dass NPY und AgRP nach der Freisetzung aus den Nervenendigungen der ARC-Neurone im DMH mit dort lokalisierten MC<sub>4</sub>-, Y<sub>1</sub>- und Y<sub>5</sub>-Rezeptoren interagieren (Mountjoy et al., 1994; Parker und Herzog, 1999). Hierbei verdrängt vermutlich AgRP das anorexinogen wirkende α-MSH über einen kompetitiven Antagonismus am MC<sub>4</sub>-R und stimuliert so indirekt die Nahrungsaufnahme (Ollmann et al., 1997), während NPY über den Y<sub>1</sub>- und Y<sub>5</sub>-Rezeptor direkt orexinogen wirkt (Fekete et al., 2002). Zudem projizieren die ARCständigen NPY-/AgRP-positiven Fasern auch in den PVN und induzieren dort über Y<sub>1</sub>- bzw. Y<sub>5</sub>-Rezeptoren ebenfalls eine Steigerung der Nahrungsaufnahme (Fekete et al., 2002). Somit ist der DMH als wichtiges Areal bei der Regulation der Energiehomöostase (Elmquist et al., 1997; Elias et al., 2000; Zhu et al., 2007) offensichtlich auch in die Vermittlung der Ghrelin-stimulierten Nahrungsaufnahme involviert. **Desacyl-Ghrelin** bewirkte in Zucker-Ratten eine Reduktion der Nahrungsaufnahme und führte bei regelmäßiger Injektion zu einer Stagnation der Körpergewichtszunahme. Zudem beeinflusste das Peptid die neuronale Aktivität im PVN, im ARC, im DMH sowie im NTS, wobei insbesondere die beobachtete Zunahme der hypothalamischen Neuronenaktivität einen zentralen Wirkmechanismus des Peptids vermuten lässt.

Für diese Hypothese spricht zudem die von Asakawa et al. gezeigte desacyl-Ghrelin-induzierte Steigerung der CART- und Urocortin-Expression im Hypothalamus (Asakawa et al., 2005). Über CRF<sub>2</sub>-Rezeptor-abhängige Signalwege wirken CART und Urocortin anorexinogen und hemmen die gastrointestinale Motilität (Okumura et al., 2000; Wang et al., 2001; Chen et al., 2005; Nagata et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sowie die vermuteten zugrunde liegenden zentralen Wirkmechanismen von desacyl-Ghrelin sind in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt.



Abbildung 4.3: Hypothese zum zentralen Wirkmechanismus von intraperitoneal injiziertem desacyl-Ghrelin in Zucker-Ratten

Somit könnte desacyl-Ghrelin über die Neuromodulatoren CART und Urocortin die Nahrungsaufnahme hemmen und damit sowohl eine Abnahme des Körpergewichts als auch eine geringere Stimulation vagaler Afferenzen und damit eine verminderte neuronale Aktivität im NTS bedingen.

In Anbetracht dieser Beobachtungen ist anzunehmen, dass desacyl-Ghrelin über hypothalamische Mechanismen anorexinogen wirkt und somit in die Regulation der Energiehomöostase in Ratten involviert ist.

**Obestatin** beeinflusste hingegen in der vorliegenden Untersuchung weder die Nahrungsaufnahme noch die neuronale Aktivität appetitregulatorischer Zentren in Hypothalamus und Hirnstamm, weshalb eine anorexinogene Wirkung des Peptids fraglich erscheint.

Die bisherigen Publikationen zur appetitregulatorischen Wirkung von Obestatin beschreiben eine widersprüchliche Datenlage, wobei in zahlreichen weiteren Untersuchungen ebenfalls kein Einfluss auf die Nahrungsaufnahme beobachtet wurde (Gourcerol et al., 2006; Nogueiras et al., 2006; Seoane et al., 2006; Zizzari et al., 2007; De Smet et al., 2007), während andere Studien trotz vergleichbarer Versuchsbedingungen Hinweise für eine Beteiligung des Peptids an der Regulation des Fressverhaltens lieferten (Zhang et al., 2005; Bresciani et al., 2006; Green et al., 2007; Lagaud et al., 2007). Eine abschließende Bewertung der physiologischen Bedeutung von Obestatin im Kontext der Sicherung der Energiehomöostase ist daher bislang nicht möglich.

Zusammenfassend spricht die vorliegende Untersuchung zur Appetitregulation durch die Derivate des Ghrelingens somit dafür, dass sowohl Ghrelin als auch desacyl-Ghrelin, nicht aber Obestatin einen modulierenden Effekt auf die neuronale Aktivität und die Nahrungsaufnahme in Ratten besitzen.

100

### 5. Zusammenfassung

## 5. Zusammenfassung

## Hintergrund:

Übergewicht und Adipositas stellen weltweit ein stetig zunehmendes Problem dar. Infolgedessen ist die Erforschung der Appetitregulation von großem wissenschaftlichem und gesellschaftlichem Interesse. In den vergangenen Jahrzehnten wurden in diesem Zusammenhang zahlreiche peptiderge Mediatoren identifiziert, die als Element der *brain-gut-axis* maßgeblich an der Steuerung von Hunger und Sättigung beteiligt sind. Neben vielen weiteren Faktoren gehören zu diesem komplexen System der humoralen Appetitregulation auch die Peptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin, die durch unterschiedliche posttranslationale Prozessierung aus dem gemeinsamen Vorläuferprotein Präproghrelin entstehen.

## Methodik:

In der vorliegenden Studie wurde die appetitregulatorische Wirkung von Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin mittels verhaltensbiologischer sowie immunhistochemischer Experimente an Ratten untersucht. In diesem Kontext wurde zum einen die Beeinflussung der Nahrungsaufnahme und der Körpergewichtsentwicklung nach intraperitonealer Injektion von desacyl-Ghrelin und Obestatin evaluiert. Zum anderen wurden die zugrunde liegenden zentralen Wirkmechanismen in molekularmorphologischen Untersuchungen erforscht. Zur Darstellung der neuronalen Aktivierung nach Applikation der Peptide diente die Färbung des metabolischen Markers Fos. Ergänzend wurden intrahypothalamische Projektionsfasern durch die immunhistochemische Detektion ausgewählter Neuromodulatoren phänotypisiert.

## **Ergebnisse und Schlussfolgerung:**

Die Injektion von Ghrelin führte im Vergleich zur Kontrollgruppe in den hypothalamischen Kernen Nucleus arcuatus (ARC), Nucleus paraventricularis (PVN) und im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) zu einer signifikanten Steigerung der neuronalen Aktivität. Weiterhin ergab die Faserphänotypisierung, dass die aktivierten Neurone des DMH von einem dichten Netzwerk NPY- und AgRP-positiver Projektionsfasern umgeben sind.

Da NPY-/AgRP-positive Projektionsfasern nach derzeitigem Kenntnisstand ausschließlich dem ARC entstammen, legen diese Resultate die Vermutung nahe, dass peripher appliziertes Ghrelin über Projektionen des ARC eine Steigerung der neuronalen Aktivität im DMH bewirkt. Somit könnte neben der in der aktuellen Literatur beschriebenen Schlüsselrolle des ARC auch der

### 5. Zusammenfassung

DMH eine bedeutende Funktion in der Vermittlung der Ghrelin-induzierten Stimulation der Nahrungsaufnahme aufweisen.

In weiteren Versuchen bewirkte desacyl-Ghrelin nach einmaliger Applikation eine signifikante Inhibition der Nahrungsaufnahme in Zucker-Ratten. Überdies konnte bei repetitiver Injektion des Peptids eine Stagnation der Körpergewichtszunahme beobachtet werden. In immunhistochemischen Untersuchungen zur zentralen Wirkung von desacyl-Ghrelin induzierte das Peptid eine signifikante Steigerung der Neuronenaktivität im ARC, PVN und DMH, während der Nucleus tractus solitarius (NTS) eine reduzierte neuronalen Aktivität aufwies.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der verhaltensbiologischen Versuche in Ratten somit für eine anorexinogene Wirkung von desacyl-Ghrelin nach intraperitonealer Applikation. Weiterhin impliziert die gesteigerte neuronale Aktivität hypothalamischer Kerngebiete eine Vermittlung des appetithemmenden Effekts über zentrale Wirkmechanismen.

Indes beeinflusste die intraperitoneale Injektion von Obestatin in unterschiedlichen Dosierungen und unter variierenden Versuchsbedingungen in der vorliegenden Studie weder das Fressverhalten noch die Aktivität appetitregulatorischer Zentren in Hypothalamus und Hirnstamm. Damit stehen die vorliegenden negativen Ergebnisse der verhaltensbiologischen Untersuchungen im Einklang mit den immunhistochemischen Versuchen dieser Studie sowie den Resultaten anderer Studien, die ebenfalls keine modulierende Wirkung des Peptids auf die Nahrungsaufnahme zeigten. Eine biologische Relevanz von Obestatin im Kontext der Appetitregulation erscheint somit fraglich.

### Fazit:

Zusammenfassend betrachtet, zeigt die vorliegende Arbeit neue Aspekte der Ghrelin-Wirkung im Sinne einer Einbeziehung des DMH über NPY-/AgRP-positive Projektionen des ARC. Weiterhin konnte die anorexinogene Potenz von desacyl-Ghrelin erstmals in adipösen Versuchstieren bestätigt und Erkenntnisse zur hypothalamischen Verarbeitung des desacyl-Ghrelin-Stimulus gewonnen werden. Demgegenüber wies Obestatin als einziges der drei in dieser Studie untersuchten Derivaten des Ghrelingens keinen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und die zentrale Appetitregulation auf.

Weiterführende Untersuchungen des Ghrelin-/desacyl-Ghrelin-Systems sind nun notwendig, um eine potentielle Beeinflussbarkeit dieser Komponenten der *brain-gut-axis* im Rahmen der pharmakologischen Adipositas-Therapie zu evaluieren.

# 6. Literatur

## 6.1 Referenzliste

Akamizu T, Takaya K, Irako T, et al. Pharmacokinetics, safety, and endocrine and appetite effects of ghrelin administration in young healthy subjects. Eur J Endocrinol 2004; 150(4): 447-55

Ariyasu H, Takaya K, Iwakura H, et al. Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. Endocrinology 2005; 146(1): 355-64

Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, et al. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(10): 4753-8

Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - a review. Neuropeptides 2006; 40(6): 375-401

Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, et al. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. Gut 2005; 54(1): 18-24

Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. Gut 2003; 52(7): 947-52

Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice. Neuroendocrinology 2001; 74(3): 143-7

Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. Gastroenterology 2001; 120(2): 337-45

Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, et al. An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. Brain Res 1985; 331(1): 172-5

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. J Cell Biol 2002; 159(6): 1029-37

Bang AS, Soule SG, Yandle TG, et al. Characterisation of proghrelin peptides in mammalian tissue and plasma. J Endocrinol 2007; 192(2): 313-23

Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. J Pharmacol Exp Ther 2002; 302(2): 822-7

Barrachina MD, Martinez V, Wang L, et al. 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

Barthel LK, Raymond PA. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. J Histochem (1990; 38(9): 1383-8

Bassil AK, Haglund Y, Brown J, et al. Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract. Br J Pharmacol 2007; 150(1): 58-64

Beck B. Neuropeptides and obesity. Nutrition 2000; 16(10): 916-23

Beck B, Richy S, Stricker-Krongrad A. Feeding response to ghrelin agonist and antagonist in lean and obese Zucker rats. Life Sci 2004; 76(4): 473-8

Bedendi I, Alloatti G, Marcantoni A, et al. Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin. Eur J Pharmacol 2003; 476(1-2): 87-95
Bell ME, Bhatnagar S, Akana SF, et al. Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. J Neurosci 2000; 20(17): 6707-13

Bernardis LL, Bellinger LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1998 update. Proc Soc Exp Biol Med 1998; 218(4): 284-306

Bi S, Ladenheim EE, Schwartz GJ, et al. A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 281(1): R254-R260

Bonaz B, Taylor I, Tache Y. Peripheral peptide YY induces c-fos-like immunoreactivity in the rat brain. Neurosci Lett 1993; 163(1): 77-80

Bresciani E, Rapetti D, Dona F, et al. Obestatin inhibits feeding but does not modulate GH and corticosterone secretion in the rat. J Endocrinol Invest 2006; 29(8): RC16-RC18

Broberger C, Johansen J, Johansson C, et al. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(25): 15043-8

Carlini VP, Monzon ME, Varas MM, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. Biochem Biophys Res Commun 2002; 299(5): 739-43

Carlini VP, Schioth HB, Debarioglio SR. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. Biochem Biophys Res Commun 2007; 352(4): 907-12

Cassoni P, Ghe C, Marrocco T, et al. Expression of ghrelin and biological activity of specific receptors for ghrelin and des-acyl ghrelin in human prostate neoplasms and related cell lines. Eur J Endocrinol 2004; 150(2): 173-84

Cassoni P, Papotti M, Ghe C, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(4): 1738-45

Chanoine JP, Wong AC, Barrios V. Obestatin, Acylated and Total Ghrelin Concentrations in the Perinatal Rat Pancreas. Horm Res 2006; 66(2): 81-8

Chartrel N, Alvear-Perez R, Leprince J, et al. Comment on "Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake". Science 2007; 315(5813): 766

Chen CY, Inui A, Asakawa A, et al. Des-acyl Ghrelin Acts by CRF Type 2 Receptors to Disrupt Fasted Stomach Motility in Conscious Rats. Gastroenterology 2005; 129(1): 8-25

Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, et al. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. Endocrinology 2004; 145(6): 2607-12

Chen P, Williams SM, Grove KL, et al. Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. J Neurosci 2004; 24(22): 5091-100

Chronwall BM. Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus. Peptides 1985; 6 Suppl 2: 1-11

Clancy B, Cauller LJ. Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. J Neurosci Methods 1998; 83(2): 97-102

Clark JT, Kalra PS, Crowley WR, et al. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology 1984; 115(1): 427-9

Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, et al. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. Neuron 1999; 24(1): 155-63

Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron 2003; 37(4): 649-61

Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, et al. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. Diabetes 2001; 50(8): 1714-9

Currie PJ, Coscina DV, Bishop C, et al. Hypothalamic paraventricular nucleus injections of urocortin alter food intake and respiratory quotient. Brain Res 2001; 916(1-2): 222-8

Czimmer J, Million M, Taché Y. Urocortin 2 acts centrally to delay gastric emptying through sympathetic pathways while CRF and urocortin 1 inhibitory actions are vagal dependent in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2006; 290(3): G511-G518

Dai J, Van d, V, Swaab DF, et al. Postmortem anterograde tracing of intrahypothalamic projections of the human dorsomedial nucleus of the hypothalamus. J Comp Neurol 1998; 401(1): 16-33

Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 2000; 141(11): 4255-61

Date Y, Murakami N, Toshinai K, et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. Gastroenterology 2002; 123(4): 1120-8

Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, et al. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. Diabetes 2002; 51(1): 124-9

Date Y, Nakazato M, Murakami N, et al. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. Biochem Biophys Res Commun 2001; 280(3): 904-7

De Smet B, Thijs T, Peeters TL, et al. Effect of peripheral obestatin on gastric emptying and intestinal contractility in rodents. Neurogastroenterol Motil 2007; 19(3): 211-7

De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, et al. Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. Endocrinology 2004; 145(11): 4997-5005

DelParigi A, Tschöp M, Heiman ML, et al. High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in prader-willi syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(12): 5461-4

DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, et al. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. Pharmacol Biochem Behav 2002; 71(3): 469-80

Dornonville dlC, Lindstrom E, Norlen P, et al. Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. Regul Pept 2004; 120(1-3): 23-32

Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. J Neurosci Methods 1989; 29(3): 261-5

Dragunow M, Robertson HA. Kindling stimulation induces c-fos protein(a) in granule cells of the rat dentate gyrus. Nature 1987; 329: 441-2

Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Minireview: Gut peptides regulating satiety. Endocrinology 2004; 145(6): 2660-5

Dun SL, Brailoiu GC, Brailoiu E, et al. Distribution and biological activity of obestatin in the rat. J Endocrinol 2006; 191(2): 481-9

Elias CF, Kelly JF, Lee CE, et al. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. J Comp Neurol 2000; 423(2): 261-81

Elias CF, Lee CE, Kelly JF, et al. Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. J Comp Neurol 2001; 432(1): 1-19

Elmquist JK, Ahima RS, Maratos-Flier E, et al. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. Endocrinology 1997; 138(2): 839-42

Elmquist JK, Maratos-Flier E, Saper CB, et al. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. Nat Neurosci 1998; 1(6): 445-50

Fekete C, Sarkar S, Rand WM, et al. Neuropeptide Y1 and Y5 receptors mediate the effects of neuropeptide Y on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. Endocrinology 2002; 143(12): 4513-9

Ferguson AV. The area postrema: a cardiovascular control centre at the blood-brain interface? Can J Physiol Pharmacol 1991; 69(7): 1026-34

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

Fraser KA, Davison JS. Meal-induced c-fos expression in brain stem is not dependent on cholecystokinin release. Am J Physiol 1993; 265(1 Pt 2): R235-R239

Garg A. The ongoing saga of obestatin: is it a hormone? J Clin Endocrinol Metab 2007; 92(9): 3396-8

Garlicki J, Konturek PK, Majka J, et al. Cholecystokinin receptors and vagal nerves in control of food intake in rats. Am J Physiol 1990; 258(1 Pt 1): E40-E45

Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JA, et al. Unacylated ghrelin acts as a potent insulin-secretagogue in glucosestimulated conditions. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293(3):E697-704

Geisler S, Andres KH, Veh RW. Morphologic and cytochemical criteria for the identification and delineation of individual subnuclei within the lateral habenular complex of the rat. J Comp Neurol 2003; 458(1): 78-97

Geisler S, Heilmann H, Veh RW. An optimized method for simultaneous demonstration of neurons and myelinated fiber tracts for delineation of individual trunco- and palliothalamic nuclei in the mammalian brain. Histochem Cell Biol 2002; 117(1): 69-79

Geliebter A, Westreich S, Gage D. Gastric distention by balloon and test-meal intake in obese and lean subjects. Am J Clin Nutr 1988; 48(3): 592-4

Giraudo SQ, Billington CJ, Levine AS. Feeding effects of hypothalamic injection of melanocortin 4 receptor ligands. Brain Res 1998; 809(2): 302-6

Gooley JJ, Schomer A, Saper CB. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of foodentrainable circadian rhythms. Nat Neurosci 2006; 9(3): 398-407

Gourcerol G, Million M, Adelson DW, et al. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. Peptides 2006; 27(11):2811-9

Grabler V, Lutz TA. Chronic infusion of the amylin antagonist AC 187 increases feeding in Zucker fa/fa rats but not in lean controls. Physiol Behav 2004; 81(3): 481-8

Green BD, Irwin N, Flatt PR. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice. Peptides 2007; 28(5):981-7

Griffond B, Deray A, Bahjaoui-Bouhaddi M, et al. Induction of Fos-like immunoreactivity in rat oxytocin neurons following insulin injections. Neurosci Lett 1994; 178(1): 119-23

Grijalva CV, Novin D. The role of the hypothalamus and dorsal vagal complex in gastrointestinal function and pathophysiology. Ann N Y Acad Sci 1990; 597: 207-22

Guan XM, Yu H, Palyha OC, et al. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. Brain Res Mol Brain Res 1997; 48(1): 23-9

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, et al. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. Nat Neurosci 1998; 1(4): 271-2

Hashimoto H, Fujihara H, Kawasaki M, et al. Centrally and peripherally administered ghrelin potently inhibits water intake in rats. Endocrinology 2007; 148(4): 1638-47

Hay M, Bishop VS. Effects of area postrema stimulation on neurons of the nucleus of the solitary tract. Am J Physiol 1991; 260(4 Pt 2): H1359-H1364

Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. J Neuroendocrinol 2000; 12(11): 1047-9

Hoffmann P, Eberlein GA, Reeve JR, Jr., et al. Comparison of clearance and metabolism of infused cholecystokinins 8 and 58 in dogs. Gastroenterology 1993; 105(6): 1732-6

Holst B, Egerod KL, Schild E, et al. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. Endocrinology 2006; 148(1):13-20

Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. Biochem Biophys Res Commun 2000; 279(3): 909-13

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. Nature 1987; 328: 632-4

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 1997; 88(1): 131-41

Inui A. Transgenic approach to the study of body weight regulation. Pharmacol Rev 2000; 52(1): 35-61

Jackson VR, Nothacker HP, Civelli O. GPR39 receptor expression in the mouse brain. Neuroreport 2006; 17(8): 813-6

Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, et al. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. Diabetes 2001; 50(11): 2438-43

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci 1953; 140(901): 578-96

Kim MS, Rossi M, Abusnana S, et al. Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. Diabetes 2000; 49(2): 177-82

Kobelt P, Helmling S, Stengel A, et al. Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. Gut 2006; 55(6): 788-92

Kobelt P, Paulitsch S, Goebel M, et al. Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. Brain Res 2006; 1117(1):109-17

Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, 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

Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 1999; 402(6762): 656-60

Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, et al. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. J Physiol Pharmacol 2004; 55(1 Pt 2): 137-54

Korbonits M, Bustin SA, Kojima M, et al. The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(2): 881-7

Kristensen P, Judge ME, Thim L, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. Nature 1998; 393(6680): 72-6

Lagaud GJ, Young A, Acena A, et al. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. Biochem Biophys Res Commun 2007; 357(1): 264-9

Lanteri-Minet M, Isnardon P, de Pommery J, et al. Spinal and hindbrain structures involved in visceroception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox- 24 proteins. Neuroscience 1993; 55(3): 737-53

Larsen PJ, Vrang N, Petersen PC, et al. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. Obes Res 2000; 8(8): 590-6

Lauwers E, Landuyt B, Arckens L, et al. Obestatin does not activate orphan G protein-coupled receptor GPR39. Biochem Biophys Res Commun 2006; 351(1): 21-5

Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, et al. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. Endocrinology 2002; 143(1): 155-62

Lee HM, Wang G, Englander EW, et al. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. Endocrinology 2002; 143(1): 185-90

Levine AS, Morley JE. Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. Peptides 1984; 5(6): 1025-9

Lucidi P, Murdolo G, Di Loreto C, et al. Meal intake similarly reduces circulating concentrations of octanoyl and total ghrelin in humans. J Endocrinol Invest 2004; 27(5): RC12-RC15

Magoul R, Onteniente B, Benjelloun W, et al. Tachykinergic afferents to the rat arcuate nucleus. A combined immunohistochemical and retrograde tracing study. Peptides 1993; 14(2): 275-86

Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, et al. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. Biochem Biophys Res Commun 2000; 276(3): 905-8

Mayer J. Glucostatic mechanism of regulation of food intake. N Engl J Med 1953; 249(1): 13-6

McShane TM, Wise PM, Jennes L. Neuropeptide-Y neurons projectioning to the medial septum-diagonal band do not have access to fenestrated capillaries in the rat brain. Mol Cell Neurosci 1994; 5(5): 459-65

Mondal MS, Date Y, Yamaguchi H, et al. Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus. Regul Pept 2005; 126(1-2): 55-9

Mönnikes H, Lauer G, Arnold R. Intraduodenal infusion of lipids induces c-fos expression in the locus coeruleus, area postrema, nucleus of the solitary tract and paraventricular nucleus via CCK-A receptors and capsaicin-sensitive vagal pathways. Gastroenterology 1997; 770(1-2):277-88

Mönnikes H, Lauer G, Bauer C, et al. Pathways of Fos expression in locus coeruleus, dorsal vagal complex and PVN in response to intestinal lipid. Am J Physiol 1997; 273: R2059-R2071

Mönnikes H, Rüter J, König M, et al. Differential induction of c-fos expression in brain nuclei by noxious and nonnoxious colonic distension: role of afferent C-fibers and 5- HT(3) receptors. Brain Res 2003; 966(2): 253-64

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible protooncogenes fos and jun. Annu Rev Neurosci 1991; 14: 421-51

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, et al. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. Mol Endocrinol 1994; 8(10): 1298-308

Murphy KG, Abbott CR, Mahmoudi M, et al. Quantification and synthesis of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide (79-102)-like immunoreactivity and mRNA in rat tissues. J Endocrinol 2000; 166(3): 659-68

Muscaritoli M, Molfino A, Chiappini MG, et al. Anorexia in Hemodialysis Patients: The Possible Role of Des-Acyl Ghrelin. Am J Nephrol 2007; 27(4): 360-5

Nagata T, Uemoto M, Yuzuriha H, et al. Intracerebroventricularly administered urocortin inhibits gastric emptying in mice. Int J Mol Med 2005; 15(6): 1041-3

Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, et al. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 280(5): R1483-R1487

Nakazato M, Murakami N, Date Y, et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 2001; 409(6817): 194-8

Neary NM, Druce MR, Small CJ, et al. Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. Gut 2006; 55(1): 135

Niederau C, Meereis-Schwanke K, Klonowski-Stumpe H, et al. CCK-resistance in Zucker obese versus lean rats. Regul Pept 1997; 70(2-3): 97-104

Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, et al. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. Endocrinology 2006; 148(1):21-6

Nonogaki K, Ohashi-Nozue K, Oka Y. Induction of hypothalamic serum- and glucocorticoid-induced protein kinase-1 gene expression and its relation to plasma des-acyl ghrelin in energy homeostasis in mice. Biochem Biophys Res Commun 2006; 344(2): 696-9

Okumura T, Yamada H, Motomura W, et al. Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via brain corticotropin-releasing factor system. Endocrinology 2000; 141(8): 2854-60

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, et al. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science 1997; 278(5335): 135-8

Parker RM, Herzog H. Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. Eur J Neurosci 1999; 11(4): 1431-48

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press, 1997

Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, et al. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. Nat Genet 1996; 13(1): 18-9

Rodriquez de FF, Navarro M, Alvarez E, et al. Peripheral versus central effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on satiety and body weight loss in Zucker obese rats. Metabolism 2000; 49(6): 709-17

Romijn HJ, van Uum JF, Breedijk I, et al. Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 1999; 47(2): 229-36

Rossi M, Kim MS, Morgan DG, et al. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. Endocrinology 1998; 139(10): 4428-31

Rowland NE, Crews EC, Gentry RM. Comparison of Fos induced in rat brain by GLP-1 and amylin. Regul Pept 1997; 71(3): 171-4

Rüter J, Kobelt P, Tebbe JJ, et al. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. Brain Res 2003; 991(1-2): 26-33

Sahu A, Kalra SP, Crowley WR, et al. Evidence that NPY-containing neurons in the brainstem project into selected hypothalamic nuclei: implication in feeding behavior. Brain Res 1988; 457(2): 376-8

Samson WK, White MM, Price C, et al. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2006; 292(1):R637-43

Sato T, Fukue Y, Teranishi H, et al. Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2deoxy-d-glucose administration. Endocrinology 2005; 146(6): 2510-6

Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, et al. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Comp Neurol 1985; 241(2): 138-53

Seoane LM, Al Massadi O, Pazos Y, et al. Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats. J Endocrinol Invest 2006; 29(8): RC13-RC15

Shanado Y, Kometani M, Uchiyama H, et al. Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach. Biochem Biophys Res Commun 2004; 325(4): 1487-94

Shaw AM, Irani BG, Moore MC, et al. Ghrelin-induced food intake and growth hormone secretion are altered in melanocortin 3 and 4 receptor knockout mice. Peptides 2005; 26(10):1720-7

Shi M, Yan X, Ryan DH, et al. Identification of urocortin mRNA antisense transcripts in rat tissue. Brain Res Bull 2000; 53(3): 317-24

Shiiya T, Nakazato M, Mizuta M, et al. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(1): 240-4

Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, et al. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. Diabetes 2001; 50(2): 227-32

Sibilia V, Bresciani E, Lattuada N, et al. Intracerebroventricular acute and chronic administration of obestatin minimally affect food intake but not weight gain in the rat. J Endocrinol Invest 2006; 29(11): RC31-RC34

Sofroniew MV, Schrell U. Long-term storage and regular repeated use of diluted antisera in glass staining jars for increased sensitivity, reproducibility, and convenience of single- and two-color light microscopic immunocytochemistry. J Histochem Cytochem 1982; 30(6): 504-11

Stanley BG, Kyrkouli SE, Lampert S, et al. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 1986; 7(6): 1189-92

Steinle NI, Pollin TI, O'connell JR, et al. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the Old Order Amish. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(12):6672-7

Sun Y, Wang P, Zheng H, et al. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(13): 4679-84

Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. Neurosci Lett 2006; 404(1-2): 222-6

Takayama K, Johno Y, Hayashi K, et al. Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. Neurosci Lett 2007; 417(3): 292-6

Thompson NM, Gill D, Davies R, et al. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. Endocrinology 2004; 145(1): 234-42

Thompson RH, Swanson LW. Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a reexamination with Fluorogold and PHAL in the rat. Brain Res Brain Res Rev 1998; 27(2): 89-118

Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, et al. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. Biochem Biophys Res Commun 2001; 281(5): 1220-5

Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, et al. Des-acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. Endocrinology 2006; 147(5):2306-14

Traebert M, Riediger T, Whitebread S, et al. Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. J Neuroendocrinol 2002; 14(7): 580-6

Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature 2000; 407(6806): 908-13

Tschöp M, Statnick MA, Suter TM, et al. GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. Endocrinology 2002; 143(2): 558-68

Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, et al. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. Diabetes 2001; 50(4): 707-9

Wang L, Barachina MD, Martinez V, et al. Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. Regul Pept 2000; 92(1-3): 79-85

Wang L, Martinez V, Rivier JE, et al. Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 281(5): R1401-R1410

Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. Neurosci Lett 2002; 325(1): 47-51

Wang Q, Bing C, Al Barazanji K, et al. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. Diabetes 1997; 46(3): 335-41

Watts AG, Sanchez-Watts G, Kelly A. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration-induced anorexia. J Neurosci 1999; 19(14): 6111-21

Weikel JC, Wichniak A, Ising M, et al. Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 284(2): E407-E415

WHO, Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 2000; 894: i-253

Williams G, Bing C, Cai XJ, et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. Physiol Behav 2001; 74(4-5): 683-701

Wirth MM, Giraudo SQ. Agouti-related protein in the hypothalamic paraventricular nucleus: effect on feeding. Peptides 2000; 21(9): 1369-75

Woods SC. Gastrointestinal satiety signals I. An overview of gastrointestinal signals that influence food intake. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2004; 286(1): G7-13

Wortley KE, del Rincon JP, Murray JD, et al. Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. J Clin Invest 2005; 115(12): 3573-8

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86(12): 5992

Wren AM, Small CJ, Abbott C, et al. Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. Diabetes 2001; 50(11): 2540-7

Wren AM, Small CJ, Ward HL, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. Endocrinology 2000; 141(11): 4325-8

Wu R, Zhou M, Cui X, et al. Ghrelin clearance is reduced at the late stage of polymicrobial sepsis. Int J Mol Med 2003; 12(5): 777-81

Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, et al. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. Regul Pept 2007; 138(2-3): 141-4

Yang J, Brown MS, Liang G, et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetitestimulating peptide hormone. Cell 2008; 132(3): 387-96

Yoshinaga K, Mochizuki T, Yanaihara N, et al. Structural requirements of peptide YY for biological activity at enteric sites. Am J Physiol 1992; 263(5 Pt 1): G695-G701

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, et al. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. Science 2005; 310(5750): 996-9

Zhang VJ, Klein C, Ren PG, et al. Response to Comment on "Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake". Science 2007; 766d

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 1994; 372(6505): 425-32

Zhu JN, Guo CL, Li HZ, et al. Dorsomedial hypothalamic nucleus neurons integrate important peripheral feedingrelated signals in rats. J Neurosci Res 2007; 85(14):3193-204

Zhu X, Cao Y, Voogd K, et al. On the processing of proghrelin to ghrelin. J Biol Chem 2006; 281(50): 38867-70

Zigman JM, Elmquist JK. In search of an effective obesity treatment: a shot in the dark or a shot in the arm? Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(35): 12961-2

Zigman JM, Nakano Y, Coppari R, et al. Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. J Clin Invest 2005; 115(12): 3564-72

Zittel TT, Glatzle J, Kreis ME, et al. C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. Brain Res 1999; 846(1): 1-11

Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, et al. Obestatin partially affects Ghrelin stimulation of food intakeand GH secretion in rodents. Endocrinology 2007; 148(4):1648-53

Zorrilla EP, Iwasaki S, Moss JA, et al. Vaccination against weight gain. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(35): 13226-31

Zucker I. Light-dark rhythms in rat eating and drinking behavior. Physiol Behav 1971; 6(2): 115-26

#### **6.2 Eigene Publikationen**

Kobelt P\*, **Wisser AS**\*, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H. Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. Brain Res. 2008 Apr 14; 1204:77-86. \*These authors contributed equally

Kobelt P\*, **Wisser AS**\*, Stengel A, Goebel M, Bannert N, Gourcerol G, Inhoff T, Noetzel S, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H. Peripheral obestatin has no effect on feeding behavior and brain Fos expression in rodents. Peptides. 2008 Jun; 29(6):1018-27. \*These authors contributed equally

Riedl A, Schmidtmann M, Stengel A, Goebel M, **Wisser AS**, Klapp BF, Mönnikes H. Somatic comorbidities of irritable bowel syndrome: a systematic analysis. J Psychosom Res. 2008 Jun; 64(6):573-82.

Mönnikes H, Schmidtmann M, **Wisser AS**. Functional Dyspepsia - Pathomechanisms, Diagnostics, Therapy and Prospects. 2008 In: Carey, Dite, Gabryelewicz, Mössner (Hrsg.) Future Perspectives in Gastroenterology. Springer, Berlin Heidelberg New York 2008

Kapeller J, Houghton LA, Mönnikes H, Walstab J, Möller D, Bönisch H, Burwinkel B, Autschbach F, Funke B, Lasitschka F, Gassler N, Fischer C, Whorwell PJ, Atkinson W, Fell C, Büchner KJ, Schmidtmann M, van der Voort I, **Wisser AS**, Berg T, Rappold G, Niesler B. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. Hum Mol Genet. 2008 Oct 1;17(19):2967-77.

Mönnikes H, Wisser AS. Funktionelle Dyspepsie. Der Gastroenterologe. 2008 Nov; 3(6):471-9

Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Riedl A, **Wisser AS**, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. Peptides. 2008 Dec;29(12):2159-68.

Noetzel S, Stengel A, Inhoff T, Goebel M, **Wisser AS**, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P. 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 Oct 9;157(1-3):84-91.

**Wisser AS**, Habbel P, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P. Interactions of gastrointestinal peptides: Ghrelin and its anorexigenic antagonists. Int J peptides 2010, vol. 2010, Article ID 817457, doi:10.1155/2010/817457

# 7. Anhang

# 7.1 Abkürzungsverzeichnis

3V	III. Ventrikel
AgRP	Agouti Related Peptide
α-MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Area postrema
aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
ARC	Nucleus arcuatus
BSA	Bovines Serumalbumin
C8:0	Oktanoylrest
CART	Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CC	Canalis centralis
CCK-8S	sulfatiertes Cholecystokinin
cLSM	confocal Laser Scanning Microscope
CRF	Corticotropin Releasing Factor
DABCO	1,4-Diazabizyklo-(2.2.2)-oktan
DAPI	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
EM	Eminentia mediana
et al.	et alii
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GH	Growth Hormone
GHS-R	Growth Hormone Secretagogue-Receptor
GLP-1	Glucagon-like Peptide 1
GPR-39	G-Protein gekoppelter Rezeptor 39
i.c.v.	intrazerebroventrikulär
I.E.	Internationale Einheiten
IgG	Immunglobulin Gamma
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

7. Anhang

KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
LHA	Lateraler Hypothalamus
М	Molar
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
MSH	Melanozyten-stimulierendes Hormon
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaH2PO4×H2O	Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarius
р	Signifikanzniveau
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis
РҮҮ	Peptid YY
SEM	Standard Error of Mean
TRH	TSH Releasing Hormone
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
VMH	ventromedialer Hypothalamus
vs.	versus
WHO	World Health Organization

## 7.2 Erklärung der Selbstständigkeit

"Ich, Anna-Sophia Wisser, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Untersuchung zur zentralen Appetitregulation durch die Neuropeptide Ghrelin, desacyl-Ghrelin und Obestatin" 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, den 27.06.2008

Anna-Sophia Wisser

# 7.3 Lebenslauf

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

### 7.4 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Psych. Hubert Mönnikes für die Bereitstellung dieses spannenden Promotionsthemas und für die hervorragenden Bedingungen, unter denen ich in seiner Forschungsgruppe wissenschaftlich arbeiten durfte. Durch seine stetige konstruktive Unterstützung habe ich interessante Einblicke in die medizinische Grundlagenforschung erhalten und wertvolle Erfahrungen gesammelt.

Mein Dank gilt zudem Herrn Dr. rer. nat. Peter Kobelt für die ausgezeichnete Zusammenarbeit. Aufgrund seiner kontinuierlichen, engagierten und kompetenten Betreuung war er ein wichtiger Ratgeber bei der Durchführung der Experimente.

Bei meiner Familie und bei Franziska bedanke ich mich herzlich für die verständnisvolle und geduldige Unterstützung, mit der sie mich während der gesamten Zeit der Promotion begleitet und bestärkt haben.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Piet, der durch die unermüdliche Diskussion dieses Manuskripts und seine konstruktive Kritik maßgebliche Anregungen zur Erstellung dieser Dissertationsschrift beitrug.