

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie &  
Interdisziplinäres Stoffwechsel-Zentrum/Endokrinologie und Diabetes mellitus des Campus  
Virchow-Klinikums der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

**Dissertation**

**Untersuchungen zur Interaktion  
von Ghrelin und Cholezystokinin (CCK)  
bei der Appetitregulation**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Ines Tjandra

aus Hamburg

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. med. Dipl. Psych. Hubert Mönnikes
2. Prof. Dr. med. Heinz-Jürgen Krammer
3. Prof. Dr. med. Petra Arck

Datum der Promotion: 7. September 2007

# INHALTSVERZEICHNIS

## 1. EINLEITUNG

<b>1.1 Hunger und Sättigung</b>	1
<b>1.2 Brain-Gut-Axis</b>	2
<b>1.3 Nahrungsregulationszentren im ZNS</b>	3
1.3.1 Regulationszentren im Hypothalamus	3
1.3.2 Regulationszentren im Hirnstamm	4
<b>1.4 Nahrungsaufnahmesteuernde Peptide</b>	7
<b>1.4.1 Ghrelin</b>	8
1.4.1.1 Ghrelin und sein Einfluss auf die Hypophysenhormone	11
1.4.1.2 Ghrelin und sein Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt	11
1.4.1.3 Ghrelin und sein Effekt auf die Energiehomoöstase	12
1.4.1.4 Ghrelin und seine Informationsvermittlung zum Gehirn	13
1.4.1.5 Ghrelin und neuronale Aktivierungsmuster im Gehirn	14
1.4.1.6 Ghrelin und seine Interaktion mit zentralen Neuropeptiden	14
1.4.1.6.1 Die Rolle von Neuropeptid Y (NPY)	15
1.4.1.6.2 Die Rolle von <i>Agouti-related Protein</i> (AgrP)	15
<b>1.4.2 Cholezystokinin (CCK)</b>	16
1.4.2.1 CCK und sein Einfluss auf die Hypophysenhormone	19
1.4.2.2 CCK und sein Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt	19
1.4.2.3 CCK und sein Effekt auf die Energiehomoöstase	19
1.4.2.4 CCK und seine Informationsvermittlung zum Gehirn	20
1.4.2.5 CCK und neuronale Aktivierungsmuster im Gehirn	21
1.4.2.6 CCK und seine Interaktion mit zentralen Neuropeptiden	21
<b>1.5 Das Proto-Onkogen <i>c-Fos</i></b>	22
<b>1.6 Ziele der Arbeit</b>	23

## 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>2.1 Materialien</b>	24
2.1.1 Peptide	24
2.1.2 Antisera	24
2.1.3 Medikamente	24
2.1.4 Chemikalien	24
2.1.5 Geräte	25
2.1.6 Verschiedenes	25
<b>2.2 Versuchstiere</b>	26
<b>2.3 Peptidpräparation</b>	27
<b>2.4 Narkosemittel</b>	27
<b>2.5 Lösungen</b>	27
<b>2.6 Perfusionsgerät</b>	29
<b>2.7 Blockierungsmittel</b>	30
<b>2.8 Indirekte Immunfluoreszenztechnik</b>	30
<b>2.9 Antikörperlösungen</b>	31
<b>2.10 Fluorochrom zur Gegenfärbung</b>	32
<b>2.11 Eindeckmittel</b>	32
<b>2.12 Verwendete Filter am c-LSM</b>	32
<b>2.13 Handling der Tiere</b>	33
<b>2.14 Verhaltensbiologie zur Nahrungsaufnahme</b>	33
<b>2.15 Immunhistochemie</b>	34

2.15.1	Vorbereitung	35
2.15.2	Narkoseeinleitung	36
2.15.3	Transkardiale Perfusion	36
2.15.4	Gehirnpräparation	36
2.15.5	Kryostatpräparation	37
2.15.6	<i>c-Fos</i> -Immunhistologie	37
2.15.7	Gegenfärbung, Aufziehen und Auswertung der Gehirnschnitte	38
<b>2.16</b>	<b>Daten und statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
2.16.1	Verhaltensbiologie zur Nahrungsaufnahme	39
2.16.2	Immunhistologie	39
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse der Verhaltensbiologie</b>	<b>40</b>
3.1.1	Effekte von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	40
3.1.2	Effekte von CCK auf die Nahrungsaufnahme	41
3.1.3	Effekte von Ghrelin und CCK auf die Nahrungsaufnahme	41
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der <i>c-Fos</i>-Immunhistologie</b>	<b>45</b>
3.2.1	Effekte von Ghrelin und CCK auf die <i>c-Fos</i> -Expression im ARC	45
3.2.2	Effekte von Ghrelin und CCK auf die <i>c-Fos</i> -Expression im PVN	48
3.2.3	Effekte von Ghrelin und CCK auf die <i>c-Fos</i> -Expression im NTS	51
<b>3.3</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>55</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Effekte von Ghrelin und CCK auf die Nahrungsaufnahme</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>Nahrungsregulationszentren im ZNS</b>	<b>58</b>
4.2.1	Der Nucleus arcuatus (ARC)	59
4.2.2	Der Nucleus paraventricularis (PVN)	61
4.2.3	Der Nucleus tractus solitarius (NTS)	62
<b>4.3</b>	<b>Effekte von Ghrelin und CCK auf die Neuronenaktivität</b>	<b>64</b>
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle des N.vagus und der Blut-Hirn-Schranke</b>	<b>66</b>
<b>4.5</b>	<b>Durchführung der Studie mit gefasteten versus nicht gefasteten Tieren</b>	<b>68</b>
<b>4.6</b>	<b>Interaktion mit anderen Neuropeptiden</b>	<b>69</b>
<b>4.7</b>	<b>Resumé</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b>	
<b>7.1</b>	<b>Referenzliste</b>	<b>77</b>
<b>7.2</b>	<b>Eigene Publikationen</b>	<b>97</b>
<b>7.3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	
<b>8.1</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>101</b>
<b>8.2</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>
<b>8.3</b>	<b>Danksagung</b>	<b>103</b>

## **EINLEITUNG**

### **1.1 Hunger und Sättigung**

Hunger und Sättigung sind alltäglich bekannte Zustände, die das Nahrungsverhalten bestimmen. Ein Mangel an Nahrung induziert Hunger, der Menschen und Tiere zur Nahrungssuche und -aufnahme veranlasst, wohingegen Sättigung zu einem Beenden der Nahrungsaufnahme führt.

Nahrungsaufnahme stellt für die Existenz eines jeden Organismus eine essentielle Maßnahme dar. Sie dient sowohl dem Wachstum als auch der Erhaltung von Lebewesen, da mit der Nahrung die notwendigen Kalorien in Form von Makromolekülen (Kohlenhydrate, Proteine und Fette) und Mikromolekülen (Vitamine und Mineralien) aufgenommen werden. Bis zum Eintritt eines Sättigungsgefühls wird die Aufnahme von Nahrung aufrechterhalten. Diesen mehrmals am Tag repetitiven Vorgängen einen einzigen Regulationsweg zuschreiben zu wollen, ist nicht möglich. Viele physiologische Regulationsmechanismen sind im Nahrungsverhalten involviert und bilden zusammen ein komplexes System. Zu dessen Regulatorzentren zählen der Hypothalamus und der Hirnstamm.

Bei den am Nahrungsverhalten beteiligten Faktoren handelt es sich um afferente Signale wie die sensorischen Reize Geruch, Geschmack und Aussehen, wie der biologisch zirkadiane Tag-Nacht-Rhythmus und gelernte Gewohnheiten, sowie schließlich um efferente Kontrollinstanzen. Die efferente Steuerung der Nahrungsregulation erfolgt über drei Ebenen:

- 1) Stoffwechsel: Zirkulierende Stoffwechselprodukte/-substrate regulieren über Chemozeptoren die hypothalamischen Nahrungsregulationszentren. Ein bekanntes Beispiel stellt die glukostatische Hypothese nach Mayer dar. Sie besagt, dass geringe Abnahmen der Glukosekonzentration im Blut eine Nahrungsaufnahme induzieren (Mayer, 1953). Diese Annahme konnte in späteren Studien nach Auslösen einer Hypoglykämie oder Inhibition des Glukosemetabolismus in Tieren (Smith und Epstein, 1996) und im Menschen (Thompson und Campbell, 1977) bestätigt werden. Glukose-Rezeptoren sowohl im Hypothalamus (ventromedialer Nucleus und Nucleus arcuatus, Oomura *et al.*, 1969; Song *et al.*, 2001) als auch im Hirnstamm (Ritter *et al.*, 2000) scheinen die Vermittler zu sein.

- 2) Energiespeicher: Aus Adipocyten werden proportional zur Größe der Fettspeicher humorale Faktoren freigesetzt, welche die Nahrungsaufnahme regulieren (Kennedys „Lipostatisches Modell“, 1953). Das im Jahre 1994 entdeckte Leptin repräsentiert einen dieser Regulatoren. Ein durch langbestehende energiearme Diät erniedrigter Leptinspiegel initiiert aufgrund einer gestörten Hungerempfindung eine Nahrungsaufnahme (Keim *et al.*, 1998).
- 3) Gastrointestinaltrakt: In Abhängigkeit vom Füllungszustand des Magens und des Dünndarms wird über Mechanorezeptoren entweder bei Leere ein Hunger- oder bei Dilatation ein Sättigungsgefühl (Geliebter, 1988) induziert. Zur Transmission dienen vagale Afferenzen, deren Signale im Hirnstamm mitintegriert werden. Zudem werden nach Eintritt von Nahrung in den Magen-Darm-Trakt zahlreiche intestinale Peptide ins Blut ausgeschüttet, die verschiedenste Funktionen aufweisen. So ist diesen Peptiden u.a. eine Partizipation an der Nahrungsregulation zuzuschreiben.

## 1.2 *Brain-Gut-Axis*

Die Nahrungsregulation wird durch Efferenzen und Afferenzen kontrolliert, die miteinander in Wechselwirkung treten. Hierzu gehören u.a. Neuropeptide, die im zentralen Nervensystem gastrointestinale Funktionen regulieren. Durch die intrazerebroventrikuläre Gabe bestimmter Neuropeptide konnte ein Einfluss auf die Darmmotilität nachgewiesen werden (Bueno und Fioramonti, 1991). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die gastrointestinale Wirkung eines Neuropeptids über den Hirnstamm vermittelt wird (Ewart, 1991). Außerdem versuchte man die Hirnareale zu detektieren, die für den speziellen Effekt eines Neuropeptids auf den Gastrointestinaltrakt verantwortlich sind (Marshall *et al.*, 1991).

Durch das Wechselspiel der aus dem Gastrointestinaltrakt stammenden Peptide werden Veränderungen in den für Sättigung- und Nahrungsaufnahme- verantwortlichen Kerngebieten des Gehirns ausgelöst. Diese führen schließlich zu einem bestimmten Nahrungsverhalten.

Jene beschriebenen Interaktionen zwischen dem Gastrointestinaltrakt und dem zentralen Nervensystem werden unter der Bezeichnung „*Brain-Gut-Axis*“ zusammengefasst.

## 1.3 Nahrungsregulationszentren im ZNS

### 1.3.1 Regulationszentren im Hypothalamus

Die Regulation der Nahrungsaufnahme wird durch bestimmte Kernregionen des Hypothalamus gesteuert. Hierzu gehören der Nucleus paraventricularis (PVN), der Nucleus arcuatus (ARC), der dorsomediale (DMH), der ventromediale (VMH) und der laterale Hypothalamus (LH) (siehe *Abbildungen 1.1* und *1.2*, Paxinos und Watson, 1997).

Der PVN, der an der basalen Seitenwand des dritten Ventrikels lokalisiert ist, stellt den Hauptsyntheseort des Hormons Oxytocin dar und produziert zu einem geringeren Anteil auch Adiuretin (Vasopressin). Neben seiner Beteiligung an der Regulation und Integration neuroendokriner Vorgänge, an der Stressantwort sowie am Angstverhalten (limbisches System) (Charney und Deutch, 1996) spielt der PVN eine bedeutende Rolle in der Nahrungsregulation (Horvath *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2001).

Viele Studien belegen, dass Verbindungen zwischen dem PVN und dem Gastrointestinaltrakt bestehen. Rogers *et al.* zeigten, dass am PVN durchgeführte Läsionen die Magensäuresekretion reduzieren (Rogers und Hermann, 1985). Diese Sekretion wurde ebenfalls durch elektrische Stimuli in PVN-Arealen beeinflusst (Rogers und Hermann, 1986; Ohtake und Sakaguchi, 1987). Außerdem beobachteten Sakaguchi *et al.* nach Aktivierung des PVN eine verminderte Magenmotilität (Sakaguchi und Ohtake, 1987).

In tierexperimentellen zentralen Mikroinjektions-Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Neuropeptide im PVN an der zentralen Regulation von gastrointestinalen Sekretionsmechanismen beteiligt sind. Während die simultane Injektion von Bombesin und *Corticotropin-Releasing Factor* (CRF) in den PVN die Magensekretion inhibierte (Gunion und Taché, 1987 a; Gunion und Taché, 1987 b), stimulierte die alleinige CRF-Injektion sowohl die gastrale Bikarbonatsekretion (Gunion *et al.*, 1990) als auch die Kolonmotilität (Mönnikes *et al.*, 1991; Mönnikes *et al.*, 1993), hemmte aber die Magenmotilität (Mönnikes *et al.*, 1991).

Der PVN besitzt zahlreiche Projektionen. Es existieren Verbindungen zur Adeno- und Neurohypophyse (Mönnikes *et al.*, 1993) sowie zu präganglionären sympathischen und parasymphatischen Zentren des Hirnstammes und des Rückenmarks (Lang *et al.*, 1983).

Der ARC befindet sich am ventralen Boden des dritten Ventrikels und umschließt die Eminentia mediana, ein zirkumventrikuläres Organ (Luiten *et al.*, 1985). Neurone dieses Kerngebietes enthalten zahlreiche Neuropeptide wie Dopamin, Somatostatin, Neurotensin,

Gamma-Amino-Butter-Säure (GABA), Pro-opiomelanocortin (POMC),  $\alpha$ -MSH (Melanocyten-stimulierendes Hormon), *Cocaine- and Amphetamine-Regulating Transcript* (CART), *Agouti-related Protein* (AgRP) und Neuropeptid Y (NPY). Diese Hirnregion nimmt an emotionalen, sensorischen, vegetativ homöostatischen und autonomen Funktionen teil (Chronwall, 1985). Experimentelle Läsionen im ARC verursachten eine Hyperphagie und Übergewicht (Elmquist *et al.*, 1999).

Projektionen des ARC bestehen zu den Nachbarregionen PVN (Baker und Herkenham, 1995) und LH sowie zum Hirnstamm (Morton und Schwartz, 2001; Cone *et al.*, 2001). Diese Kernregionen sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme, am Energieverbrauch und an gastrointestinalen Funktionen beteiligt.

Der DMH spielt in der Mitregulation der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und des Körpergewichtes eine Rolle. Versuchstiere mit in dieser Hirnregion zugeführten Läsionen wiesen eine Hypophagie und -dipsie auf. Zusätzlich wurde bei ihnen nach Gabe einer fettreichen Diät im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine reduzierte Gewichtszunahme beobachtet. Auch die Durchtrennung von ventralen und dorsalen Projektionen vom DMH hatte eine Reduktion der Nahrungsaufnahme zur Folge. Ventrale Fasern scheinen eine wichtige Verbindung zum ARC darzustellen (Bernadis und Bellinger, 1987; Bellinger und Bernadis, 2002).

Die Kernregionen VMH und LH sind an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt. Während Läsionen im VMH eine Hyperphagie und Übergewicht verursachten, bewirkten Läsionen im LH hingegen Aphagie und Gewichtsverlust. Somit wird der VMH als Sättigungs-, der LH als Hungerzentrum postuliert (Bray *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 2000). Der LH weist Projektionen zum zerebralen Kortex sowie zu autonomen und motorischen Systemen des Hirnstammes und des Rückenmarks auf (Elmquist *et al.*, 1999).

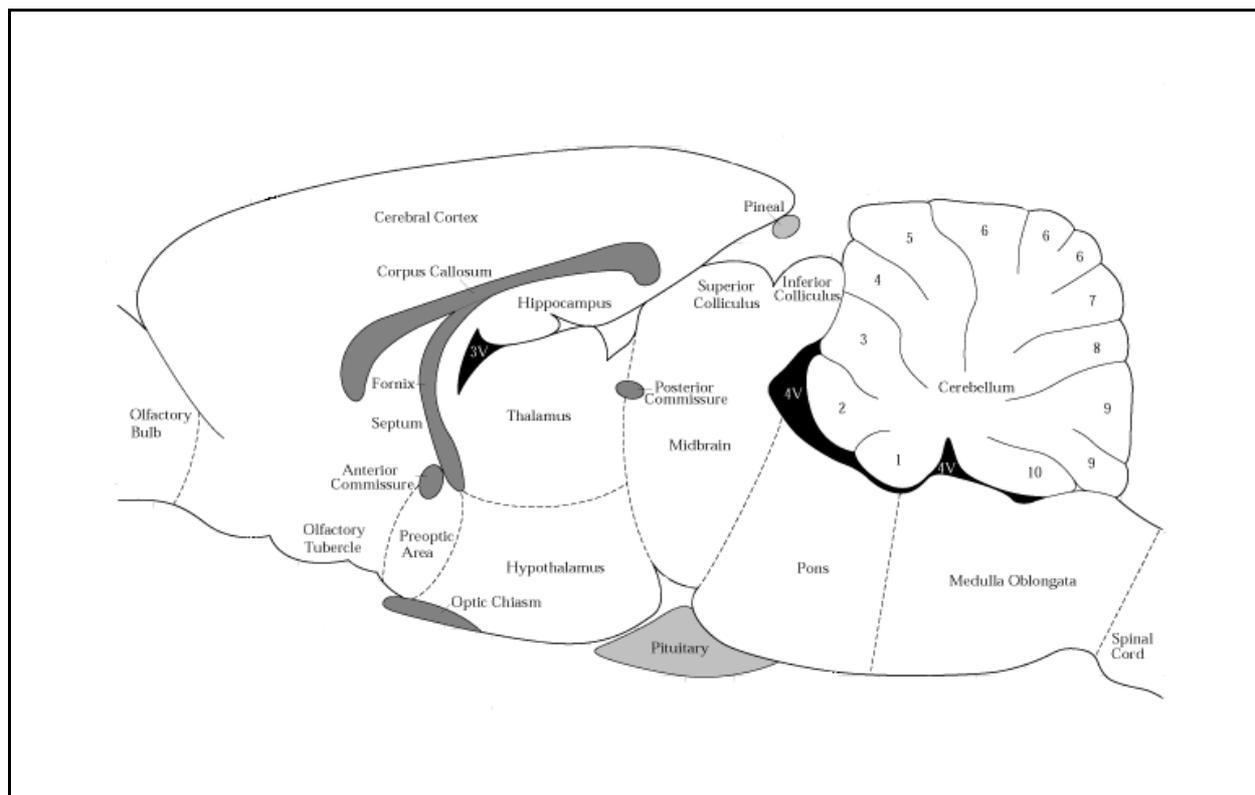
### **1.3.2 Regulationszentren im Hirnstamm**

Im Hirnstamm befindet sich der dorsale vagale Komplex (DVC), bestehend aus dem Nucleus tractus solitarius (NTS) und der Area postrema (AP). Verschiedene Arbeitsgruppen belegten, dass der DVC eine wichtige zentrale Rolle in der Kontrolle sowohl von Motilität als auch von Sekretion des Gastrointestinaltrakts spielt (Hornby *et al.*, 1991; Taché *et al.*, 1991).

Die während einer Mahlzeit eintretenden sättigenden Signale werden über afferente Fasern des N.vagus zum Hirnstamm und über Afferenzen vom oberen Gastrointestinaltrakt zum

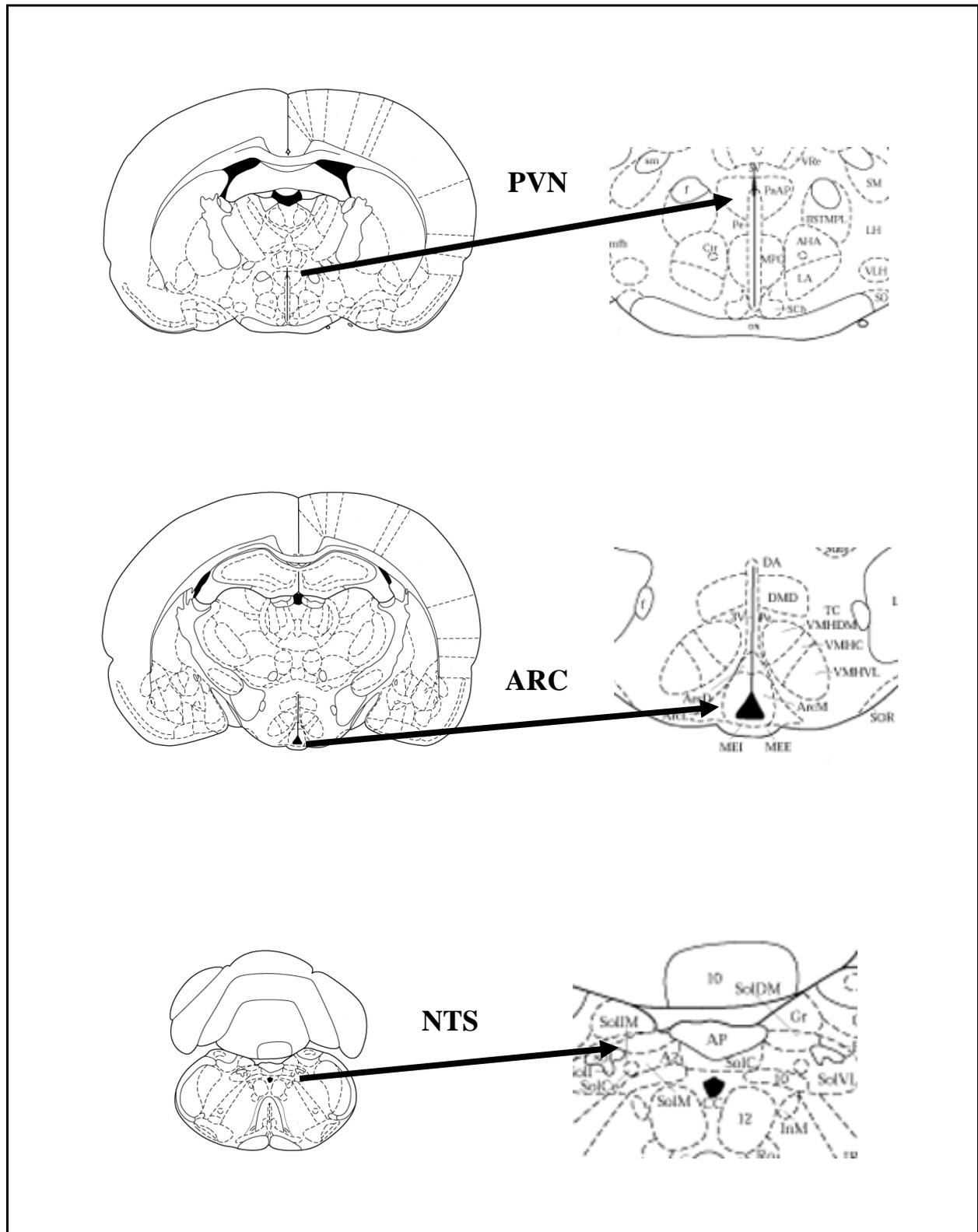
Rückenmark vermittelt (Ritter *et al.*, 1994). Diese Informationen erreichen den NTS (siehe *Abbildungen 1.1* und *1.2*) über zahlreiche afferente Projektionen. Demnach integriert der NTS sensorische Inputs vom Gastrointestinaltrakt und der abdominalen Viszera über den N.vagus (Rinaman und Miselis, 1987). Weiterhin erhält diese Kernregion Geschmacksinformationen über den N.facialis und N.glossopharyngeus (Travers und Norgren, 1987). Es existieren weitere Verbindungen vom NTS zur AP (Hay und Bishop, 1991) und zum Hypothalamus (Holstege, 1987; Olson *et al.*, 1992).

Der AP kommen als zirkumventrikuläre Struktur auf humoralem Wege Informationen über den Zustand des Organismus zu (Johnson und Gross, 1988). Dieses Hirnareal bildet zusammen mit dem ihm ventral gelegenen NTS ein zentrales „Brezzentrum“, das über viszerosensible Afferenzen aus dem Gastrointestinaltrakt aktiviert werden kann.



**Abbildung 1.1**

Rattenhirn – Längsschnitt (nach Paxinos und Watson, 1997)



**Abbildung 1.2**

Rattenhirn – Horizontalschnitte (nach Paxinos und Watson, 1997)

## 1.4 Nahrungsaufnahmesteuernde Peptide

Eine Gliederung der nahrungsaufnahmesteuernden Peptide ist nach zwei Aspekten möglich. Zunächst unterscheiden sie sich nach ihrem Herkunftsort. Während zentrale Peptide im zentralen Nervensystem gebildet werden (siehe *Abbildung 1.3*), findet die Produktion und Sekretion peripherer Peptide im Gastrointestinaltrakt statt (siehe *Abbildung 1.4*). Letztere können entweder direkt (über die Blut-Hirn-Schranke) oder indirekt (über den N.vagus oder spinale Afferenzen) mit zentralen Peptiden interagieren.

Weiterhin können diese regulierenden Peptide bezüglich ihres Effekts auf das Nahrungsverhalten differenziert werden. Orexigen wirkende Peptide stimulieren eine Nahrungsaufnahme und lösen damit ein Hungergefühl aus. Anorexigene Peptide hingegen inhibieren und beenden die Nahrungsaufnahme, vermitteln demzufolge Sättigung.

Peptide	Bildungsort	Wirkung	Referenzen
Neuropeptid Y (NPY)	ARC	orexigen	Allen <i>et al.</i> , 1983 Clark <i>et al.</i> , 1984
<i>Agouti-related Protein</i> (AgRP)	ARC	orexigen	Broberger <i>et al.</i> , 1998 a Hagan <i>et al.</i> , 2000
<i>Melanin-Concentrating Hormone</i> (MCH)	Perifornikale Area / lateraler Hypothalamus (PFLH)	orexigen	Vaughan <i>et al.</i> , 1989 Qu <i>et al.</i> , 1996
Galanin	PVN, ARC, PFLH	orexigen	Gundlach <i>et al.</i> , 2001 Kyrkouli <i>et al.</i> , 1986
Orexin A/B	Perifornikale Area/ lateraler Hypothalamus (PFLH)	orexigen	Broberger <i>et al.</i> , 1998 b Sakurai <i>et al.</i> , 1998
Pro-opiomelanocortin (POMC)	ARC, Adenohypophyse	anorexigen	Pelletier <i>et al.</i> , 1979 Li <i>et al.</i> , 2003
<i>Galanin-like Peptide</i>	Hypothalamus	anorexigen	Ohtaki <i>et al.</i> , 1999 Matsumoto <i>et al.</i> , 2002
<i>Cocaine- and Amphetamine- Regulated Transcript</i> (CART)	Hypothalamus	anorexigen	Koylu <i>et al.</i> , 1997 Kristensen <i>et al.</i> , 1998
<i>Corticotropin-Releasing Factor</i> (CRF)	Medialer parvocellulärer PVN	anorexigen	Arase <i>et al.</i> , 1988 Glowa <i>et al.</i> , 1992

### Abbildung 1.3

Zentrale Peptide, die die Nahrungsaufnahme steuern

Peptide	Bildungsort	Wirkung	Referenzen
Ghrelin	Magenfundus (X/A- ähnliche Zellen)	orexigen	Date <i>et al.</i> , 2000 a Tschöp <i>et al.</i> , 2000
Cholezystokinin (CCK)	Dünndarm (I-Zellen)	anorexigen	Mutt <i>et al.</i> , 1971 Larsson <i>et al.</i> , 1978 Kissileff <i>et al.</i> , 1981
Peptid YY (PYY)	Darm	anorexigen	Adrian <i>et al.</i> , 1985 Batterham <i>et al.</i> , 2002
Pankreatisches Polypeptid (PP)	Pankreas (Langerhans-Inseln)	anorexigen	Malaisse-Lagae <i>et al.</i> , 1977 Katsuura <i>et al.</i> , 2002
Oxyntomodulin	Darm und Gehirn	anorexigen	Dakin <i>et al.</i> , 2001 Cohen <i>et al.</i> , 2003
<i>Glucagon-like Peptide-1</i> (GLP-1)	Darm und Gehirn	anorexigen	Turton <i>et al.</i> , 1996 Gutzwiller <i>et al.</i> , 1999
Bombesin	Haut (Frosch <i>Bombina bombina</i> ), Zellen des APUD-Systems (Amin Precursor Uptake and Decarboxylation)	anorexigen	Ersparmer, 1971 Gibbs <i>et al.</i> , 1979 Muurahainen <i>et al.</i> , 1993
Glukagon	Pankreas (A-Zellen)	anorexigen	Inokuchi <i>et al.</i> , 1984

## Abbildung 1.4

### Periphere Peptide, die die Nahrungsaufnahme steuern

Da diese Studie mögliche bestehende Wechselwirkungen zwischen dem bisher einzig bekannten orexigen wirkenden peripheren Peptid Ghrelin und dem anorexigenen peripheren Cholezystokinin untersuchen soll, werden diese Peptide hier näher erläutert. Beide Peptide sind an der Kurzzeitregulation der Nahrungsaufnahme beteiligt.

#### 1.4.1 Ghrelin

Ghrelin, welches im Jahre 1999 entdeckt wurde, besteht aus 28 Aminosäuren (Kojima *et al.*, 1999). Ghrelin bindet an den *Growth-Hormone-Secretagogues*-Rezeptor (GHS-R) und setzt das Wachstumshormon (*Growth Hormone*, GH) aus der Adenohypophyse frei.

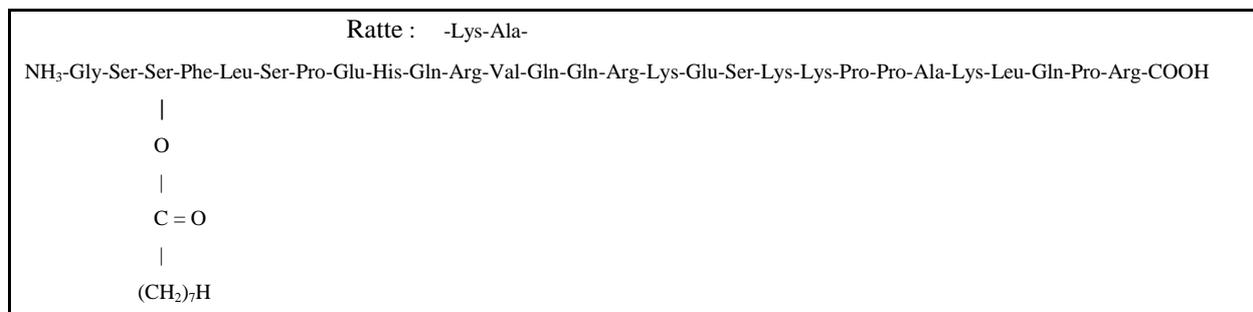
Die pulsatile GH-Sekretion wird hauptsächlich von zwei antagonistisierenden Hormonen beeinflusst (Plotsky und Vale, 1985). Das *Growth-Hormone-Releasing* Hormone (GHRH), welches im Hypothalamus gebildet wird, stimuliert die GH-Freisetzung. Das vom Hypothalamus, Gastrointestinaltrakt und Pankreas sezernierte Somastatin hingegen inhibiert

die Freisetzung von GH. Weitere GH-regulierende Faktoren sind *Thyreoid-Releasing Hormone* (TRH), Glukose, Dopamin, IGF 1/2, Aminosäuren, freie Fettsäuren, Glukokortikoide und Opiate (Dieguez *et al.*, 1988).

In den achtziger Jahren beobachteten Bowers *et al.*, dass nach spezieller chemischer Modifizierung des Pentapeptids Methionin-Enkephalin, dieses Opiat die GH-Sekretion *in vitro* verbesserte (Bowers *et al.*, 1980). In den folgenden Jahren wurden synthetische Peptide entwickelt, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine GH-Freisetzung aus der Hypophyse induzierten und somit *Growth-Hormone-Secretagogues* (GHS) genannt wurden. Erster Vertreter dieser GHS war das Hexapeptid *Growth-Hormone-Releasing Peptide* GHRP-6 (COOH-His-Asp-Trp-Ala-Trp-Asp-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>), das neben einer dosisabhängigen GH-Ausschüttung zu einer Gewichtszunahme führte (Bowers *et al.*, 1984). Es folgten weitere GHS-Peptide wie GHRP 1, GHRP 2 (Bowers, 1996) und Hexarelin (Deghenghi *et al.*, 1994) und Nicht-Peptide wie das Benzo-fusionierte Lactam L-692,429 (MK-0751) (Smith *et al.*, 1993) und das Spiroindolin L-163,191 (MK-0677) (Patchett *et al.*, 1995).

Im Jahre 1996 wurde der GHS-Rezeptor (GHS-R) in der Hypophyse und im Hypothalamus entdeckt (Pong *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1996). Man vermutete, dass endogene Liganden für diesen GHS-R existieren, welche die GH-Sekretion regulieren. Drei Jahre später isolierten Kojima *et al.* einen endogenen Liganden für den GHS-R aus dem Magen von Ratten. Dieser Ligand besteht aus 28 Aminosäuren, wobei die dritte Aminosäure Serin eine n-Oktanoyl-Gruppe aufweist (siehe *Abbildung 1.5*). Die posttranslationale Acetylierung ist für die biologische Aktivität dieses Peptids verantwortlich (Kojima *et al.*, 1999).

Dieser GH-stimulierende Faktor erhielt den Namen **Ghrelin**, welcher sich aus den protoindoeuropäischen Worten für Wachstum „ghre“ und für Freisetzung „relin“ zusammensetzt. Aus Ratten isoliertes Ghrelin unterscheidet sich von dem des Menschen in zwei Aminosäuren (11. und 12. Stelle: - Lys-Ala -).



### Abbildung 1.5

Humanes Ghrelin – Molekül

Ghrelin, dessen Vorläufermolekül Präpro-Ghrelin aus 117 Aminosäuren besteht, weist Homologien zu dem in den M-Zellen des Duodenums gebildeten Motilin auf (Tomasetto *et al.*, 2000; Asakawa *et al.*, 2001). Sowohl Ghrelin als auch Motilin beeinflussen die gastrointestinale Motilität und sind fähig, GH freizusetzen (Samson *et al.*, 1984). Ghrelin, das ein Molekulargewicht von 3314,9 Dalton besitzt, wurde in zahlreichen Säugetieren, Vögeln, Amphibien sowie Fischen nachgewiesen.

Hauptsyntheseort des Ghrelins sind X/A ähnliche endokrine Zellen der Mukosa im Magenfundus (Date *et al.*, 2000 a). Weitere Produktionsorte sind endokrine Zellen des übrigen Verdauungstrakts, der ARC (Kojima *et al.*, 1999), die Hypophyse (Korbonits *et al.*, 2001), der Pankreas (Date *et al.*, 2002 a; Volante *et al.*, 2002; Wierup *et al.*, 2002), die Nieren (Mori *et al.*, 2000), die Plazenta (Gualillo *et al.*, 2001), Immunzellen (Hattori *et al.*, 2001), der Hoden (Tena-Sempere *et al.*, 2002), das Herz, die Lunge und das Fettgewebe (Kojima *et al.*, 1999).

Die Sekretion von Ghrelin erfolgt in das Blutsystem, wobei die Ghrelinkonzentration im menschlichen Plasma bei  $117,2 \pm 37,2$  fmol/ml liegt (Kojima *et al.*, 1999).

Der GHS-Rezeptor existiert in zwei Formen: Typ 1a und 1b (Smith *et al.*, 1999). Letzterer besteht aus 289 Aminosäuren, die eine 5-transmembrane Struktur bilden. Der GHS-R 1b besitzt keine Affinität zu GHS. Der GHS-R 1a dagegen gehört mit seinen 366 Aminosäuren zu den G-Protein-gekoppelten 7-transmembran-Rezeptoren. Seine Aktivierung induziert über die Phospholipase C einen Verschluss von Kalium-Kanälen, der eine persistierende Membrandepolarisation auslöst. Weiterhin führt die Aktivierung von Phospholipase C zu einem Anstieg von Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und zu einer Induktion der Proteinkinase C, welche schließlich eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Speichern hervorrufen (Chen *et al.*, 1996).

Der GHS-R konnte im Hypothalamus, in der Hypophyse, im Pankreas, in der Schilddrüse, im Herzen, in den Nebennieren, in der Lunge, in den Ovarien, in der Leber, in den Nieren, in Muskelzellen, im Fettgewebe, in Gefäßwänden, in Speicheldrüsen, in der Prostata, im Magen, in der Milz, im Kolon, in der Haut, in Lymphknoten und in vielen anderen Organen nachgewiesen werden (Papotti *et al.*, 2000; Gnavanapan *et al.*, 2002).

Unmittelbar nach der Entdeckung von Ghrelin wurde ebenfalls aus Rattenmägen ein zweiter endogener Ligand des GHS-R, das des-Gln14-Ghrelin, isoliert. Es entspricht dem originalen Ghrelin, besteht allerdings nur aus 27 Aminosäuren. Aufgrund seiner Oktanoylierung an der dritten Aminosäure ist dieses Peptid biologisch aktiv und induziert wie Ghrelin nach intravenöser Injektion eine GH-Sekretion (Hosoda *et al.*, 2000).

#### **1.4.1.1 Ghrelin und sein Einfluss auf die Hypophysenhormone**

In den bisherigen Untersuchungen wurde ein dosisabhängiger Plasmaanstieg der GH-Konzentration sowohl nach intravenöser (Kojima *et al.*, 1999) als auch nach intrazerebroventrikulärer (Wren *et al.*, 2000; Date *et al.*, 2000 b) und intraperitonealer (Wren *et al.*, 2000) Applikation von Ghrelin bei Ratten beobachtet. Die intrazerebroventrikuläre Gabe von Ghrelin an Ratten stimulierte zusätzlich noch die Freisetzung von ACTH (Adrenocorticotropes Hormon), inhibierte aber die Freisetzung von TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) (Wren *et al.*, 2000).

Eine andere Studie zeigte, dass die intravenöse Injektion von Ghrelin bei Menschen nicht nur primär zu einem GH-, sondern auch zu einem ACTH-, Cortisol- und Prolaktin-Plasmaanstieg führte. Signifikante Änderungen in den Plasmaspiegeln von LH (Luteinisierendes Hormon), FSH (Follikel-stimulierendes Hormon) und TSH sind nicht gemessen worden (Takaya *et al.*, 2000).

#### **1.4.1.2 Ghrelin und sein Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt**

Masuda *et al.* konnten nach intravenöser Gabe von Ghrelin eine dosisabhängige Steigerung der gastralen Säuresekretion bei Ratten feststellen (Masuda *et al.*, 2000). Diese Beobachtung wurde später in zwei weiteren Studien von Date *et al.* (nach intrazerebroventrikulärer Gabe, 2001) und Chen *et al.* (nach intrazisternaler Gabe, 2002) bestätigt. Die Magensäuresekretion wird durch verschiedene Faktoren stimuliert. Hierzu gehören neben der Stimulation durch die Sinneseindrücke Schmecken, Riechen und Sehen, die mechanische Dilatation des Darmkanals oder lediglich der Gedanke an Nahrung.

Um sicherzustellen, dass der N.vagus als Mediator zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Magen und letztendlich für die Magensäuresekretion verantwortlich ist, wurden Vagotomien durchgeführt (Date *et al.*, 2001). Nach Vagotomie konnte nur noch eine geringfügige gastrale Säuresekretion gemessen werden. Dieses Ergebnis belegt, dass die Ghrelinwirkung am gastrointestinalen Trakt über den N.vagus ausgeübt wird.

Weiterhin steigert Ghrelin dosisabhängig die Magen-Darm-Motilität (Masuda *et al.*, 2000; Fujino *et al.*, 2003).

### 1.4.1.3 Ghrelin und sein Effekt auf die Energiehomoöstase

In Verhaltensstudien mit Nagetieren, die vor der intrazerebroventrikulären und intraperitonealen Applikation von Ghrelin Nahrung *ad libitum* erhielten, wurde ein dosisabhängiger Anstieg der Nahrungsaufnahme beobachtet, wobei der größte Effekt innerhalb der ersten Stunde *post injectio* zu verzeichnen war (Wren *et al.*, 2000).

Die tägliche subkutane Injektion von Ghrelin an Mäuse über einen Zeitraum von zwei Wochen resultierte durch einen reduzierten Fettstoffwechsel in eine Gewichtszunahme von 13,9%. Zudem konnte der Beweis erbracht werden, dass in Ratten die endogene Ghrelinserumkonzentration bei Nahrungsabstinenz, also Hungern, steigt und dass sie nach Wiederfütterung oder oraler Glukosegabe sinkt (Tschöp *et al.*, 2000). Auch im Menschen konnte ein präprandial zweifach höherer Anstieg vom Plasmaghrelin gemessen werden, der innerhalb einer Stunde nach Nahrungsaufnahme wieder sank (Cummings *et al.*, 2001).

Die geringste intraperitoneal applizierte Dosis, bei der Ghrelin noch eine signifikante orexigene Wirkung induziert, beträgt 1 nmol pro Ratte (Wren *et al.*, 2001 a). Dennoch scheint der Ghrelinspiegel auch vom aktuellen Ernährungszustand abhängig zu sein. Beim Prader-Willi-Syndrom oder bei Zuständen negativer Energiebilanz (z.B. niedrige kalorische Diät, chronische Belastung, Anorexie bei bösartigen Tumorerkrankungen, Anorexia nervosa) wurde eine erhöhte (Muccioli *et al.*, 2002), bei Übergewicht hingegen eine erniedrigte Ghrelinkonzentration im Plasma gemessen (Tschöp *et al.*, 2001).

Ferner beeinflusst Ghrelin den Glukose- und Insulinhaushalt. Broglio *et al.* zeigten, dass nach intravenöser Gabe von Ghrelin der Serumglukosespiegel bei Menschen signifikant ansteigt, der Seruminsulinspiegel dagegen deutlich abfällt (Broglio *et al.*, 2001). Umgekehrt konnte in einer anderen Studie nach intravenöser Applikation von Insulin ein signifikanter Abfall der Ghrelinkonzentration festgestellt werden (Saad *et al.*, 2002). Die eigentliche Hauptaufgabe des aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas sezernierten Insulins ist die Senkung des Blutzuckerspiegels. Diese erfolgt, indem Insulin die Glukoseaufnahme in Zellen und die Synthese von Speichersubstanzen wie Glykogen steigert. Neben seiner antilipolytischen und anabolen Wirkung gilt Insulin auch als Sättigungssignal. So führt die intrazerebroventrikuläre Gabe dieses Hormons sowohl zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme als auch zu einer Abnahme des Körpergewichts (Ikeda *et al.*, 1996).

Ein weiteres Hormon, welches wie das Insulin zu den „Körperfett“-Signalen gehört, ist das Leptin. Leptin, das Produkt des *ob*-Gens, wird hauptsächlich in weißen Fettzellen (Zhang *et al.*, 1994) und zu einem geringeren Teil im Magen produziert (Bado *et al.*, 1998). Nach

Abgabe ins Blut passiert es die Blut-Hirn-Schranke (Banks *et al.*, 1996) und bindet an Ob-Rezeptoren im Hypothalamus (Fei *et al.*, 1997). Hier kommt es zu Interaktionen mit anderen nahrungsaufnahmesteuernden Neuropeptiden (Campfield *et al.*, 1995). Ähnlich wie beim Insulin treten nach peripherer oder systemischer Gabe von Leptin an Mäuse eine Hemmung der Nahrungsaufnahme und ein Gewichtsverlust auf (Halaas *et al.*, 1997).

Die anorexigen wirkenden Signale Insulin und Leptin sind über bestimmte Prozesse im Gehirn für die Langzeit-Gewichtsregulation verantwortlich (Baskin *et al.*, 1999). Im Zentrum steht hier besonders der ARC, der auch für das Ghrelin eine wichtige Hirnregion darstellt und daher als Ort der Interaktion von Insulin, Leptin und Ghrelin fungiert (Hewson *et al.*, 2002).

#### **1.4.1.4 Ghrelin und seine Informationsvermittlung zum Gehirn**

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, um den stimulierenden Effekt von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme erklären zu können. Man nimmt an, dass Ghrelin entweder seine Wirkung direkt im Gehirn ausübt oder seine Informationen indirekt an das Gehirn weitergibt.

Die Eminentia mediana (EM) ist eine zirkumventrikuläre Struktur, welche eine undichte Blut-Hirn-Schranke besitzt (Weindl und Joynt, 1973). Da der ARC anatomisch die EM umschließt, könnten theoretisch Substanzen im Blut wie Ghrelin den ARC über diese defiziente Blut-Hirn-Schranke erreichen. Banks *et al.* legten in ihren Studien dar, dass humanes oktanoilyliertes Ghrelin über ein Transportsystem die Blut-Hirn-Schranke bei Mäusen überschreiten kann (Banks *et al.*, 2002). Ghrelin würde somit direkt im ZNS als Mediator agieren.

Einen indirekten Weg der Ghrelinwirkung zum Gehirn stellte die Studie von Date *et al.* vor (Date *et al.*, 2002 b). Sie untersuchten, ob eine Vagotomie (subdiaphragmatisch/gastral) oder die perivagale Vorbehandlung mit Capsaicin (Neurotoxin aus rotem Pfeffer, das die afferente vagale Innervation unterbindet) Auswirkungen auf die Ghrelin-induzierte gesteigerte Nahrungsaufnahme in Ratten hat. Sie beobachteten nach Blockade der gastral-vagalen afferenten Neurone keine gesteigerte Nahrungsaufnahme durch Ghrelin. Ferner fand der Nachweis statt, dass der afferente N.vagus über Ghrelin-Rezeptoren verfügt. Über diese Rezeptoren können Informationen an den NTS weitergeleitet werden, die hier letztlich in das komplexe System der Nahrungsregulation mitintegriert werden.

#### 1.4.1.5 Ghrelin und neuronale Aktivierungsmuster im Gehirn

Ghrelin induziert eine *c-Fos*-Expression in Neuronen bestimmter Hirnregionen. *c-Fos* gehört zu den „*immediate early gene*“-Produkten, welche neuronale Aktivität im zentralen Nervensystem aufzeigen.

Nachdem belegt wurde, dass nach systemischer Gabe vom synthetischen *GH-Secretagogue* GHRP-6 an Ratten die Expression der *c-Fos*-mRNA in Zellen des ARC stimuliert wird (Dickson und Luckman, 1997) und diese durch eine 48-stündige Nahrungsdeprivation um das Dreifache gesteigert werden konnte (Luckman *et al.*, 1999), wurde derselbe Effekt nach systemischer Applikation von Ghrelin beobachtet (Hewson und Dickson, 2000).

Die Begründung der gesteigerten *c-Fos*-Expression und somit der neuronalen Aktivität könnte darin liegen, dass Hungern einen erhöhten Plasmaghrelinspiegel induziert. Dies würde bedeuten, dass viel mehr Ghrelinmoleküle an GHS-Rezeptoren im ARC oder am N.vagus binden können. Außerdem steigert Hungern die mRNA-Expression des GHS-Rezeptors im Hypothalamus (Kim *et al.*, 2003), so dass mehr Ghrelinmoleküle gebunden werden können.

Ein weiterer Ort der *c-Fos*-Signalexpression neben dem ARC ist nach intraperitonealer Gabe von Ghrelin der PVN. Im NTS und in der AP hingegen induziert intraperitoneal appliziertes Ghrelin keine *c-Fos*-Expression (Rüter *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.6 Ghrelin und seine Interaktion mit zentralen Neuropeptiden

Nach der Induktion von *c-Fos*-Proteinen im ARC durch GHRP-6 oder Ghrelin wurden die Zellen dieser Kernregion näher charakterisiert. Die durch GHRP-6-aktivierten Neurone zeigten bei Ratten zur Hälfte eine Koexpression mit Neuropeptid Y (NPY) und zu einem Fünftel mit GHRH (Dickson und Luckman, 1997). Die intraperitoneale Gabe von Ghrelin führte bei Mäusen in etwa 90% der *c-Fos*-positiven Neurone zu einer NPY-mRNA-Expression (Wang *et al.*, 2002).

Es besteht die Annahme, dass die NPY-Neurone des ARC das primäre Ziel für Ghrelin darstellen. Diese These würde mit einem Studienergebnis von Willensen *et al.* übereinstimmen. Willensen *et al.* untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen dem GHS-R und NPY und wiesen eine GHS-R-mRNA Expression in 94% der NPY-Neurone nach (Willensen *et al.*, 1999).

#### 1.4.1.6.1 Die Rolle von Neuropeptid Y (NPY)

NPY ist ein im Hypothalamus produziertes, orexigen wirkendes Peptid, das nach zentraler Gabe zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und zu einer Gewichtszunahme bis hin zu Übergewicht führt (Clark *et al.*, 1984; Kalra und Kalra, 2003; Stanley *et al.*, 1989). Aus 36 Aminosäuren bestehend, weist NPY Ähnlichkeiten mit dem pankreatischen Polypeptid und dem Peptid YY auf (Tatemoto *et al.*, 1982). Über die Rezeptoren Y1, Y2 und Y5 wird der appetitstimulierende Effekt von NPY vermittelt (Stanley *et al.*, 1992; Thorsell und Heilig, 2002). Anatomisch betrachtet, findet man NPY in Neuronen des zentralen und des peripheren Nervensystems (Allen *et al.*, 1983; Gray und Morley, 1986). Primäre zentrale Lokalisationen sind der PVN, der Ncl. accumbens, das Septum, der DMH, der zerebrale Kortex, die hiläre Region des Hippocampus und der ARC. Von letzterem aus projizieren NPY-Neurone in den PVN (Gray und Morley, 1986; Morris, 1989). Auch vom Hirnstamm aus ziehen NPY-Projektionen zum PVN. Diese Tatsachen stützen die Annahme, dass der ARC und der PVN als Regulationszentren des Nahrungsverhaltens fungieren. Sowohl die einmalige als auch die chronische, systemische Applikation von Ghrelin steigerten nicht nur die NPY-Expression, sondern auch die des *Agouti-related-Proteins* (AgrP) im ARC. Diese Resultate deuten auf eine Koexpression beider Neuropeptide hin (Kamegai *et al.*, 2000 und 2001; Seoane *et al.*, 2003).

#### 1.4.1.6.2 Die Rolle von *Agouti-related Protein* (AgrP)

AgrP gehört dem hypothalamischen Melanocortin-System an, welches ebenfalls an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist (Yang und Harmon, 2003; Rowland, 2004). Weitere Vertreter dieses Systems sind Pro-opiomelanocortin (POMC)-Prohormone (Vorläufer des  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Melanocyten stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -MSH) und des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH)), Melanocortin-Rezeptoren (MCR), endogene Melanocortin-Mediatoren wie Mahagony und Syndecan und endogene MCR-Antagonisten wie das Agouti Protein neben dem bereits genannten AgrP (Vergoni und Bertolini, 2000; Yang und Harmon, 2003). Letzteres besteht aus 132 Aminosäuren und besitzt eine orexigene Wirkung (Broberger *et al.*, 1998 a; Hagan *et al.*, 2000; Rowland, 2004).

Die intrazerebroventrikuläre Gabe von AgrP führte zu einer Hyperphagie, zu Gewichts- und Körperfettmassenzunahme sowie zu einem erhöhten Leptin- und Insulinspiegel (Korner *et al.*, 2003).

Im ARC lokalisierte NPY- und AgrP-Neurone sind von großer Bedeutung bezüglich der Nahrungsregulation. Eine neuere Studie von Van den Top *et al.* zeigte, dass ARC-Neurone von Ratten, die NPY und AgrP enthalten, auf nahrungsaufnahmesteuernde Signale reagieren. Diese ARC-Neurone erfahren eine Aktivierung durch Orexigene, wie Ghrelin oder Orexin, wohingegen sie durch das anorexigen wirkende Leptin inhibiert werden (van den Top *et al.*, 2004).

Zusammenfassend kann man davon ausgehen, dass peripheres Ghrelin *in vivo* über die orexigene Wirkung von NPY und AgrP vermittelt wird. Die Präsenz von NPY und AgrP im ARC ist Voraussetzung für den orexigenen Effekt des Ghrelins, da in Abwesenheit beider Neurotransmitter der appetitstimulierende Effekt des Ghrelins völlig erlischt (Chen *et al.*, 2004).

#### 1.4.2 Cholezystokinin (CCK)

Im Jahre 1928 entdeckten Ivy & Oldberg in der Dünndarm-Mukosa eine Substanz, die eine Kontraktion der Gallenblase auslöste und nannten sie **Cholezystokinin** (Ivy und Oldberg, 1928). Vierzig Jahre später wurde CCK isoliert und die Aminosäuren-Sequenz aufgeklärt (Mutt und Jorpes, 1968).

Es existieren viele biologische Fragmente des CCK, die alle aus einem einzigen Gen (beim Menschen liegt es auf Chromosom 3) entweder durch posttranslationale oder extrazelluläre Modifizierung entstanden sind. In verschiedenen Spezies sind CCK-Moleküle im Gehirn, im Darm und im Blut nachgewiesen worden. Zu den häufiger vorkommenden und wichtigsten Formen gehören CCK-8, CCK-33 und CCK-58 (siehe *Abbildung 1.6*).

Gemeinsam besitzen sie ein 115 Aminosäuren (AS)-langes Präkursor-Molekül, welches aus einem Signalpeptid (20 AS), einem Spacerpeptid (25 AS), der Sequenz für CCK-58 und einem Verlängerungspeptid (12 AS) am C-terminalen Ende besteht (Deschenes *et al.*, 1984). Dieses Ende aus -Asp-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> ist für die biologische Aktivität von CCK verantwortlich. Die letzten fünf Aminosäuren sind mit denen des Gastrins identisch.

<b>CCK-Peptid</b>	<b>Aminosäuren-Sequenz</b>	<b>Molekulargewicht (D)</b>	<b>Bedeutung</b>	<b>Referenzen</b>
CCK-8S	Asp-Tyr(SO <sub>3</sub> H)-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH <sub>2</sub>	727	Prädominante Form im zentralen und peripheren Nervensystem	Larsson <i>et al.</i> , 1979 Rehfeld, 1985
CCK-33	Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-CCK-8S	3949	Prädominante Form im Plasma und Darm des Menschen	Rehfeld <i>et al.</i> , 2001
CCK-58	Val-Ser-Gln-Arg-Thr-Asp-Gly-Glu-Ser-Arg-Ala-His-Leu-Gly-Ala-Leu-Leu-Ala-Arg-Thr-Ile-Gln-Gln-Ala-Arg-CCK-33	6268	Prädominante Form im Plasma und Darm von Hunden	Eysselein <i>et al.</i> , 1987 Reeve <i>et al.</i> , 1994

### Abbildung 1.6

Die drei wichtigsten biologische Formen des Cholezystokinins (CCK)

CCK dient peripher als gastrointestinales Hormon und zentral als Neurotransmitter. In der Peripherie wird CCK in enteroendokrinen I-Zellen des Duodenums und des Jejunums gebildet (Polak *et al.*, 1975; Larsson und Rehfeld, 1978). Sie weisen eine trianguläre Form auf, dessen Spitze ins Darmlumen zeigt und enthalten an ihrer Basis CCK-Sekretgranula (Buchan *et al.*, 1978). Durch die luminale Anwesenheit von freien Fettsäuren, Glukose, Peptiden oder aromatischen Aminosäuren findet eine Freisetzung des CCK ins Blut und an die Umgebung statt (Liddle *et al.*, 1985). Zu den weiteren Syntheseorten gehört das enterische Nervensystem (Plexus myentericus, Plexus submucosus, Muskelschichten des Duodenums/Jejunums/Kolons, Plexus coeliacus, N.vagus) (Liddle, 1997).

An Nervenendigungen im Gehirn wurde in Vesikeln verpacktes CCK lokalisiert, das infolge von Depolarisation freigesetzt wird (Dodd *et al.*, 1980; Emson *et al.*, 1980). CCK-Neurone befinden sich im Kortex, in der Amygdala, im Hippocampus, im Septum, im Thalamus, im Hypothalamus, in den Basalganglien und im dorsalen Hirnstamm (Beinfeld und Palkovits, 1981). Je nachdem, in welcher Hirnregion CCK ausgeschüttet wird, ist CCK an Verhaltensvorgängen wie Angst oder Lernen, am Sexualverhalten, an Gedächtnisprozessen, an der Auslösung einer Sedierung, an der Spontanaktivität, an der Sättigungsregulation und an der Schmerzempfindung beteiligt (Crawley und Corwin, 1994).

Im Jahre 1980 wurden CCK-Rezeptoren zunächst im Pankreas und im Gehirn detektiert (Innis und Snyder, 1980). Später konnten Moran *et al.* diese Rezeptoren im Gehirn mittels <sup>125</sup>I-markiertem CCK-33 genauer differenzieren (Moran *et al.*, 1986). CCK kann an zwei verschiedene Rezeptortypen binden, an CCK-A- (CCK1) und an CCK-B- (CCK2) Rezeptoren.

CCK besitzt eine 1000-fach höhere Affinität zum CCK-A-Rezeptor im Vergleich zu Gastrin. Ferner bindet sulfatiertes CCK verglichen mit nicht-sulfatiertem CCK an den CCK-A-Rezeptor mit einer 1000-fach höheren Neigung (Innis und Snyder, 1980; Noble *et al.*, 1999). Da dieser Rezeptor primär im Gastrointestinaltrakt (Pankreas, Gallenblase, Pylorus) entdeckt wurde (Wank *et al.*, 1992 a; Wank *et al.*, 1992 b), erhielt er die Bezeichnung CCK-A (A= *alimentary*). Weitere Lokalisationen dieses Rezeptors sind peripher der afferente N.vagus und zentral der NTS, die AP, der Nucleus interpeduncularis, der mediane Raphekern, der DMH und der Nucleus accumbens (Hill *et al.*, 1987; Honda *et al.*, 1993; Kopin *et al.*, 1992; Moran und Kinzig, 2004).

Der CCK-B-Rezeptor hingegen weist dieselbe Affinität für sulfatiertes und nicht-sulfatiertes CCK auf (Innis und Snyder, 1980; Noble *et al.*, 1999). Er ist mit dem Rezeptor für Gastrin identisch (Kopin *et al.*, 1992). Die meisten CCK-B-Rezeptoren sind im Gehirn (B=*brain*) nachgewiesen worden (Honda *et al.*, 1993; Pisegna *et al.*, 1992). Weitere befinden sich im Magen und im afferenten N.vagus (Hill *et al.*, 1987; Honda *et al.*, 1993; Pisegna *et al.*, 1992). Beide CCK-Rezeptoren gehören der G-Protein gekoppelten 7-transmembran-Rezeptorfamilie an, wobei sie untereinander eine 48%ige Homologie aufweisen (Wank *et al.*, 1992 b). Während CCK an den CCK-A-Rezeptor gebunden über die Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diazylglyzerol (DAG) und nach der Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> und DAG schließlich zu einer Aktivierung von Proteinkinase C führt, folgt nach Bindung von CCK an den CCK-B-Rezeptor eine Ausschüttung von Arachidonsäure und Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) (Miyasaka und Funakoshi, 2003).

Die humane Basalkonzentration von CCK im Plasma beträgt ca. 1 pmol/Liter. Postprandial, besonders nach Aufnahme von Nahrungsfetten und Proteinen (Hildebrand *et al.*, 1998; Liddle *et al.*, 1985), steigt der CCK-Plasmaspiegel innerhalb von 10-30 Minuten für 3 bis 5 Stunden an (Moran und Kinzig, 2004). Neben Nahrungslipiden und Proteinen induzieren auch die *CCK-Releasing Factors* eine endogene CCK-Freisetzung. Vertreter dieser Gruppe sind Trypsin-Inhibitoren (Weller *et al.*, 1992) sowie die im Gastrointestinaltrakt produzierten Hormone *Luminal CCK-Releasing Factor* (LCRF) (Spannagel *et al.*, 1996) und *Dendiazepam-Binding Inhibitor* (DBI) (Herzig *et al.*, 1998).

#### **1.4.2.1 CCK und sein Einfluss auf die Hypophysenhormone**

Sowohl in Ratten, in Primaten als auch in Menschen stimuliert systemisch appliziertes CCK die Hypothalamus-Hypophysen-Achse. CCK steigert die Plasmakonzentration von ACTH (Kamilaris *et al.*, 1992) und vom *Gonadotropin-Releasing Hormone* (Perera *et al.*, 1993).

Während die CCK-Gabe in Ratten eine Oxytocin-Sekretion (Verbalis *et al.*, 1986) induziert, führt sie in Primaten zu einer Ausschüttung von Adiuretin (Verbalis *et al.*, 1987).

#### **1.4.2.2 CCK und sein Einfluss auf den Gastrointestinaltrakt**

Die gastrointestinale Motilität wie auch die Sekretion von Enzymen des Verdauungstrakts werden durch CCK beeinflusst. Es reguliert die Kontraktion der Gallenblase, dessen glatte Muskulatur CCK-A-Rezeptoren enthält (Wank *et al.*, 1992 b). Ferner relaxiert CCK den *Sphincter Oddi*, so dass Gallen- und Pankreasflüssigkeit ins Duodenum abfließen können, die den Verdauungsprozess unterstützen (Ivy und Oldberg, 1928; Lin, 1975; Kennedy und Mawe, 1998). Neben der Sekretionsstimulation von Pankreasenzymen (beim Menschen über CCK-A-Rezeptoren) und von Pepsinogen und Salzsäure aus dem Magen (über CCK-B-Rezeptoren) erhöht CCK die Aktivität der intestinalen Motilität in zahlreichen Spezies (Levant *et al.*, 1974; Stewart und Burks, 1977; Weems *et al.*, 1985).

In diesem Zusammenhang zeigten Mönnikes *et al.*, dass die Applikation von CCK-A-Rezeptor-Antagonisten in den PVN die Kolonmotilität in Ratten reduziert (Mönnikes *et al.*, 2000). Endogenes CCK scheint über den PVN den Kolontransit zu regulieren. Zudem konnte belegt werden, dass CCK das Wachstum von Pankreas und Leber begünstigt (Ohlsson *et al.*, 1999).

#### **1.4.2.3 CCK und sein Effekt auf die Energiehomöostase**

Im Jahre 1973 entdeckten Gibbs *et al.*, dass CCK die Rolle eines Sättigungssignals im Nahrungszyklus einnimmt. Nach peripherer Gabe von CCK vor der Mahlzeitgabe an Ratten konnte eine dosisabhängige Reduktion der aufgenommenen Nahrungsmenge gemessen werden (Gibbs *et al.*, 1973). Zusätzlich nahm auch die Zeitdauer der Nahrungsaufnahme ab.

Später wurde auch am Menschen ein beschleunigtes Eintreten der Sättigung durch exogen zugeführtes CCK-8 beobachtet (Kissileff *et al.*, 1981).

Die Hypothese, dass endogenes CCK ebenfalls für eine Sättigung verantwortlich ist, wird durch Untersuchungen gestützt, in denen ein spezifischer CCK-A-Rezeptor-Antagonist wie Devazepid (L 364,718) appliziert wurde, der schließlich zu einem Anstieg der Nahrungsaufnahme führte (Hewson *et al.*, 1988). Die Applikation eines weiteren CCK-A-Rezeptor-Antagonisten Loxiglumide senkte sogar das subjektive Empfinden eines Sättigungsgefühls beim Menschen (Beglinger *et al.*, 2001). Nach Gabe des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten L 365,260 hingegen konnte weder eine Abnahme noch eine Zunahme der Nahrungsaufnahme festgestellt werden (Moran *et al.*, 1993).

Der CCK-A-Rezeptor vermittelt den Nahrungsaufnahme-inhibierenden Effekt des CCK. An Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF)-Ratten, die nach spontaner Neumutation defekte CCK-A-Rezeptoren aufweisen, konnte gezeigt werden, dass diese Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe die doppelte Nahrungsmenge zu sich nahmen. Sie legten an Gewicht zu, obwohl die Frequenz der Nahrungsaufnahme abnahm (Bi und Moran, 2002).

Es entstanden Überlegungen, CCK therapeutisch zur Behandlung von Übergewicht und anderen Essstörungen einzusetzen. Allerdings verlor CCK nach chronischer Gabe rasch an Wirksamkeit (Crawley und Beinfeld, 1983). Zwar reduzierte sich nach CCK-Injektion die darauffolgende aufgenommene Nahrungsmenge, es wurden aber über den Tag hinweg mehr Mahlzeiten als normal eingenommen. Letztlich resultierten hier unerwünschte Zunahmen der Nahrungsmenge und des Körpergewichts (West *et al.*, 1984).

#### **1.4.2.4 CCK und seine Informationsvermittlung zum Gehirn**

Der Sättigungseffekt von CCK scheint über die Afferenz des N.vagus vermittelt zu werden. Sowohl die chirurgische als auch die chemische Deafferenzierung des N.vagus hatten eine deutliche Abschwächung der anorexigenen Wirkung von CCK zur Folge. Die Durchführung einer abdominalen oder gastraln Vagotomie vor CCK-8S-Applikation an Ratten verminderte die Sättigungswirkung von CCK (Smith *et al.*, 1981). Nach Vorbehandlung mit Capsaicin wurde eine Abschwächung der CCK-induzierten verminderten Nahrungsaufnahme beobachtet (Ritter und Ladenheim, 1999). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Effekt von CCK auf das zentrale Nervensystem von gastraln vagalen Afferenzen und von Capsaicin-sensitiven Neuronen abhängig ist.

#### 1.4.2.5 CCK und neuronale Aktivierungsmuster im Gehirn

Das Applizieren von CCK führt zu einer Änderung der neuronalen Aktivität in bestimmten Hirnregionen, die mittels der Expression von *c-Fos*-Signalen detektiert werden kann. Die an Ratten durchgeführte Studie von Olson *et al.* ergab, dass systemisch verabreichtes CCK eine *c-Fos*-Expression in oxytocinergen Neuronen des PVN aktiviert. Diese Neurone projizieren zum dorsalen vagalen Komplex (DVC) (Olson *et al.*, 1992).

Die intraperitoneale Gabe von sulfatiertem CCK-8 induziert *c-Fos*-Signale im PVN, im NTS, in der AP, im Ncl. supraopticus (SON), im zentralen Kern der Amygdala, in sensorischen Anteilen des DVC sowie im Ncl. locus coeruleus/subcoeruleus (LC/SC) (Chen *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1994; Mönnikes *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Der PVN stellt eine wichtige Region der Nahrungsregulation dar, da nach seiner Läsion eine CCK-abhängige Hemmung der Nahrungsaufnahme ausbleibt (Crawley und Kiss, 1985).

Weitere Untersuchungen stützen die Annahme, dass die Wirkung von CCK-8 an CCK-A-Rezeptoren über vagale Afferenzen vermittelt wird. Vorbehandlungen mit CCK-A-Rezeptor-Antagonisten ergaben eine verminderte *c-Fos*-Expression im PVN, im NTS, in der AP und im LC/SC nach CCK-Applikation. Die Vorbehandlung mit CCK-B-Rezeptor-Antagonisten hingegen hatte keinen Einfluss auf die *c-Fos*-Expression (Chen *et al.*, 1993; Mönnikes *et al.*, 1997). Ferner wurde nach einer bilateralen perivagalen Capsaicin-Vorbehandlung ebenfalls eine Reduktion der *c-Fos*-Signale in den bereits erwähnten Regionen festgestellt (Mönnikes *et al.*, 1997).

#### 1.4.2.6 CCK und seine Interaktion mit zentralen Neuropeptiden

Es sind Wechselwirkungen zwischen dem CCK und dem orexigen wirkenden NPY nachgewiesen worden. Da intraperitoneal appliziertes CCK-8S die NPY-Expression im Hypothalamus vermindert (Pages *et al.*, 1990), besteht die Annahme, dass CCK und NPY antagonistische Effekte in der Nahrungskontrolle besitzen.

Ferner interagiert CCK mit einem weiteren Peptid, dem anorexigen wirkenden POMC. Die Applikation von CCK-8S aktivierte POMC-positive Neurone im NTS (Fan *et al.*, 2004). POMC scheint somit am Sättigungsmechanismus von CCK mitzuwirken.

## 1.5 Das Proto-Onkogen *c-Fos*

*c-Fos* ist ein Proto-Onkogen, welches zu den „*immediately early genes*“ gehört. Seine Synthese erfolgt durch extrazelluläre Stimuli (Morgan und Curran, 1991).

Die Aufgabe des intranukleären *c-Fos*-Proteins besteht in der Mitregulation der Transkriptionsrate von Genen zellulärer Funktionen und des Zellmetabolismus (Morgan und Curran, 1991; Dragunow und Robertson, 1987; Hunt *et al.*, 1987).

Mittels immunhistologischer Methoden lässt sich die Expression des *c-Fos*-Gens nachweisen. Die *c-Fos*-Signalexpression markiert neuronale Aktivierung. Somit ermöglicht diese Methode die Aktivierung sekundärer Neurone und Neurone höherer Ordnung infolge pharmakologischer, elektrischer und physiologischer Stimuli im zentralen Nervensystem darzustellen (Hanley, 1988; Diop *et al.*, 1991). Für metabolisches „*Mapping*“ ist sie ebenfalls geeignet (Sagar *et al.*, 1988). Aufgrund der geringen Basalexpression des *c-Fos*-Proteins kann anhand dieser Methode eine Aktivierung von Neuronen in bestimmten Hirnregionen nach konkreter Stimulusgabe detektiert werden.

## 1.6 Ziele der Arbeit

Der Hunger- und Sättigungsmechanismus unterliegt komplexen Regulationsvorgängen, an denen verschiedene periphere und zentrale Peptide beteiligt sind. Es existieren kaum Studien zu den Fragen, inwiefern sich die einzelnen Peptide gegenseitig beeinflussen oder ob überhaupt eine Interaktion zwischen ihnen stattfindet.

Im Mittelpunkt dieser Studie stehen die peripheren Peptide Ghrelin und CCK, die antagonistische Effekte auf die Nahrungsaufnahme ausüben.

1. Es gilt zu prüfen, wie sich die an Ratten intraperitoneal applizierte Einzelgabe von Ghrelin, die Einzelgabe von CCK und die simultane Gabe von Ghrelin und CCK auf das Nahrungsverhalten auswirken. Die anschließende verhaltensbiologische Untersuchung zur Nahrungsaufnahme erfolgt über die Ermittlung der kumulativ aufgenommenen Nahrungsmenge eines jeden Tieres nach jeweils konstanten Zeitpunkten.
2. Es soll untersucht werden, in welchen Hirnregionen und in welchem Ausmaß intraperitoneal appliziertes Ghrelin oder CCK eine Aktivierung von Neuronen induzieren. Danach gilt es zu prüfen, inwieweit die simultane Gabe von Ghrelin und CCK zu veränderten Neuronenaktivitäten in den bereits untersuchten Hirnarealen führt. Die Beantwortung dieser Fragen erfolgt über die quantitative Bestimmung der *c-Fos*-Signalexpression in den Hirnkernen ARC, PVN sowie NTS nach intraperitonealer Peptidapplikation an Ratten mittels der *c-Fos*-Immunhistochemie.

## **MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Peptide**

Cholezystokinin-Oktapeptid, sulfatiert (CCK-8S)

Bachem AG, Heidelberg, Deutschland

Ghrelin (Ratte)

Bachem AG, Heidelberg, Deutschland

#### **2.1.2 Antisera**

*Anti-Rat c-Fos Protein Ab-5*

Oncogene Research Products, Boston, USA

(Kaninchen, polyklonal)

*Anti-Rabbit IgG- FITC-Antibody*

Sigma Chemicals, St.Louis, USA

(Ziege, polyklonal)

#### **2.1.3 Medikamente**

Ketamin (Ketanest®)

Curamed, Karlsruhe, Deutschland

Heparin (Liquemin®)

Hoffmann-La Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland

Dextran 75 (Longasteril®)

Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

Xylazin (Rompun®)

Bayer, Leverkusen, Deutschland

#### **2.1.4 Chemikalien**

Rinderserumalbumin

Sigma Chemicals, St.Louis, USA

1,4-Diazabicyklo-[2.2.2]-oktan

Sigma Chemicals, St.Louis, USA

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat

Merck, Darmstadt, Deutschland

Glutaraldehyd

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glyzerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hexan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Sigma Chemicals, St.Louis, USA
Natriumborhydrid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
0,15 M Natriumchlorid Lösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Chemicals, St.Louis, USA
Pikrinsäure (Trinitrophenol)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Propidiumiodid	Sigma Chemicals, St.Louis, USA
Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.5 Geräte

Binokular	Zeiss Opton, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop Typ 510	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Heizplatte, Rec-G	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Kühl-/Gefrierschrank	Liebherr Premium, Deutschland
Kryostat, Typ HM 500 OM	Microm Laborgeräte, Walldorf, Deutschland
Mikroliter-Pipetten	Biohit Proline, Helsinki, Finnland
<i>Shaker</i> Typ MS1	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Perfusionsgerät	Universität Marburg, Deutschland
pH-Meter, Mikroprozessor pH 537	WTW Weilheim, Deutschland
Plastikgefäße (konisch, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Schüttler (horizontal) Typ HS 250 <i>basic</i>	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Waage	Scout Pro SPU 402, Ohaus, Pine Brook, USA

### 2.1.6 Verschiedenes

<i>Brain</i> -Matrix	Technisches Forschungslabor, Charité, Berlin, Deutschland
Deckgläser (24 x 46 mm)	Superior Marienfeld, Deutschland

Filterpapier	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
Glasflaschen	Fischerbrand, Deutschland
Injektionsspritzen	BD Plastikpak, Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Knochenzange	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Korkscheiben	Sagra, Spanien
Makrolon-Käfig	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Messgläser	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Messzylinder	Simax, Tschechische Republik
Mikroinjektionskanülen	Sterican, B.Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Objektträger (76 x 26 mm)	R.Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Pasteurpipetten	WU Mainz, Deutschland
Pinsel	Pelikan, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präparationsbesteck	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
<i>Cutfix</i> -Skalpell	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Standard-Rattenfutter	Altromin®, Lage, Deutschland
Thermometer-Messgerät	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Tissue Tec</i>	Bio Optica, Milano, Italien
Trichter	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Zellkulturplatten (24 wells)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

## 2.2 Versuchstiere

Die in den Experimenten verwendeten Versuchstiere waren zwischen 250-350 g schwere männliche *Sprague-Dawley*-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borchon, Deutschland), die mindestens 21 Tage vor Versuchsbeginn sowohl für die Verhaltensbiologie als auch für die immunhistochemischen Untersuchungen bezogen wurden.

Die Haltung erfolgte unter Zugang zu Altromin® Standardfutter und Trinkwasser *ad libitum* in Makrolon-Käfigen (40 x 60 cm) zu je vier Tieren unter konstanten Umweltbedingungen. Bei einer Luftfeuchtigkeit von 60% lag die Raumtemperatur bei  $22 \pm 2$  °C. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug je 12 Stunden. Die Tag-Phase begann um 6.30 Uhr und endete um 18.30 Uhr.

Alle Versuche waren durch die Tierschutzkommission beim Landesamt für Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer 0089/03, 1. April 2003)

## 2.3 Peptidpräparation

Ghrelin und sulfatiertes Cholezystokinin-Oktapeptid (CCK-8S) wurden jeweils in *aqua bidest* (1 mg/ml) gelöst und zu 50 µl aliquotiert. Anschließend erfolgte die Lagerung der Lösungen bei - 20 °C. Direkt vor dem Experimentbeginn wurden die Peptidlösungen jeweils mit steriler 0,15 M NaCl-Lösung verdünnt, um die gewünschten Konzentrationen zu erreichen. Die Dosierung von Ghrelin betrug 13 µg/kg KG ( $\approx 1$  nmol pro Ratte), die von CCK-8S 2 µg/kg KG und 25 µg/kg KG ( $\approx 0,57$  nmol, bzw.  $\approx 7,14$  nmol pro Ratte).

## 2.4 Narkosemittel

Das Narkosemittelgemisch besteht aus Ketanest® (Ketamin, 500 mg) und Rompun® (Xylazin, 2%). Ketamin zeichnet sich durch eine hervorragende Analgesie und Sedierung aus. Xylazin ist ein  $\alpha 2$ -Rezeptor-Agonist und bewirkt Sedation, Muskelrelaxation sowie Analgesie. Vor Perfusionsbeginn erhielt jedes Tier 100 mg/kg Körpergewicht Ketanest® und 10 mg/kg Körpergewicht Rompun® intraperitoneal appliziert.

## 2.5 Lösungen

### Fixierlösung

In 750 ml *aqua bidest* wurden 40 g Paraformaldehyd gelöst und auf ca. 60 °C erwärmt. Die Suspension wurde durch Zugabe von 150 µl 10 N Natriumhydroxid (NaOH) geklärt. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurden 13,8 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 2 ml Glutaraldehyd und 166,5 ml gesättigte Pikrinsäure zugesetzt. Es folgte eine temperaturkalibrierte Einstellung des pH-Wertes auf 7,4. Der Ansatz wurde anschließend mit *aqua bidest* auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter aufgefüllt. Nicht

gelöste Anteile wurden durch Filtration (Faltenfilter) entfernt. Aufgrund der Entwicklung giftiger Dämpfe wurde die Herstellung dieser Fixierlösung unter einer Dampf-abzugseinrichtung durchgeführt. Unter Lichtschutz wurde die Fixierlösung bei 4 °C gelagert und vor Versuchsbeginn an die Raumtemperatur angeglichen.

### **Phosphatpuffer (PBS)**

Der 0,5 M konzentrierte Phosphatpuffer setzt sich aus 249,46 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $2\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 35,28 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  zusammen, die unter Erwärmung in 2 Liter *aqua bidest* gelöst wurden. Um eine bessere Haltbarkeit dieser Lösung sicherzustellen, wurde ihr 2%iges  $\text{NaN}_3$  zugesetzt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur dieses Puffergemisch durch Zugabe von NaOH auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt. Um einen Phosphatpuffer von 0,1 M zu erhalten, wurde die hergestellte 0,5 M Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit *aqua bidest* verdünnt.

### **Saccharose-Lösungen**

#### *5%ige Saccharose-Lösung*

Zur Herstellung von einem Liter 5%iger Saccharose-Lösung wurden 50 g Saccharose und 13,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 500 ml *aqua bidest* gelöst. Die pH-Wert Einstellung auf 7,4 erfolgte durch Zugabe von NaOH. Das Volumen wurde durch Auffüllen mit *aqua bidest* auf 1 Liter ergänzt und anschließend filtriert. Die Lösung wurde bei 4 °C gelagert.

#### *15%ige Saccharose-Lösung*

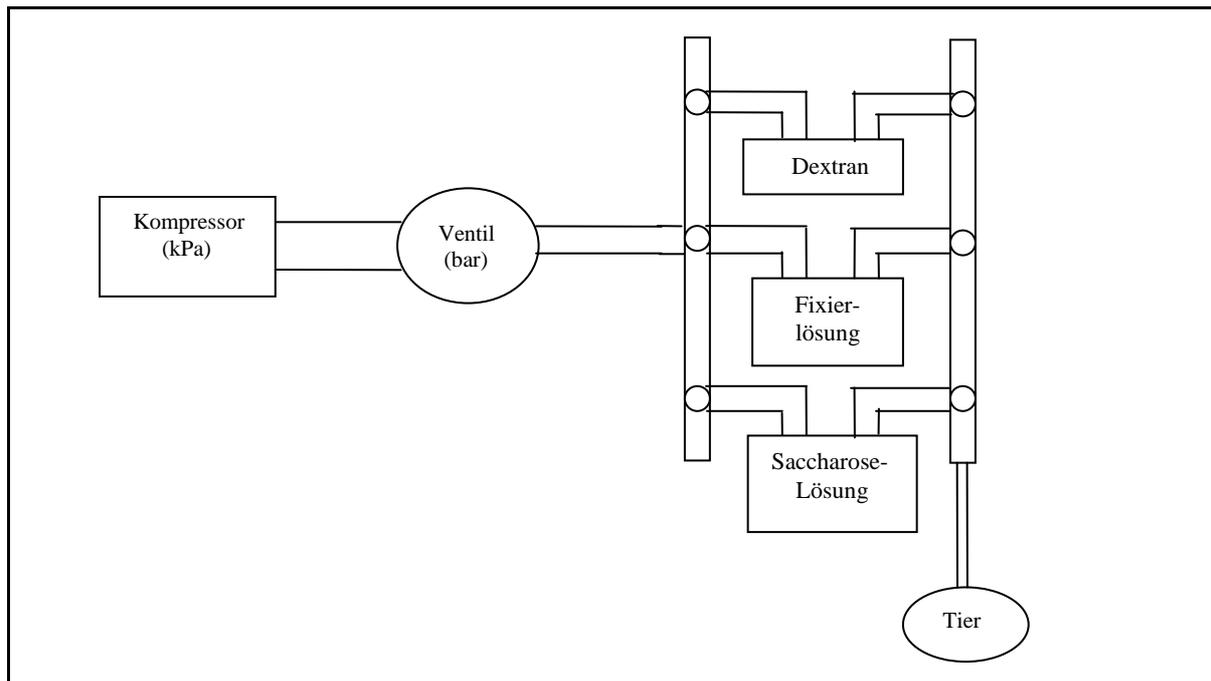
Ein Liter 15%iger Saccharose-Lösung besteht aus 150 g Saccharose und 13,79 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , die in 500 ml *aqua bidest* gelöst wurden. Es folgte eine Einstellung auf den pH-Wert 7,4, eine Auffüllung mit *aqua bidest* auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter und eine Filtrierung der Lösung. Die Aufbewahrung fand bei einer Temperatur von 4 °C statt.

### *27,3%ige Saccharose-Lösung*

Ein Liter 27,3%iger Saccharose-Lösung wurde aus 273,84 g Saccharose, 13,79 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und 500 ml *aqua bidest* hergestellt. Die Lösung wurde auf den pH-Wert 7,4 eingestellt. Nach Zugabe von *aqua bidest* auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter wurde die Lösung filtriert und anschließend bei 4 °C gelagert.

## **2.6 Perfusionsgerät**

Es handelt sich um ein durch Luftkompression gesteuertes Perfusionsgerät (siehe *Abbildung 2.1*), das über Schläuche und Ventile mit drei Perfusionslösungen in Verbindung steht. Als Vorspüllösung wurde in einem Wasserbad vorgewärmtes Dextran 75 (Longasteril®) eingesetzt, um das Blut aus dem Kreislaufsystem des Versuchstieres herauszuspülen. Die aus Paraformaldehyd und Pikrinsäure bestehende Fixierlösung sorgt für eine weitgehende Erhaltung der Zellstrukturen. Paraformaldehyd führt zur Vernetzung von Proteinen. Pikrinsäure fällt Proteine durch Salzbildung aus. Als Nachspüllösung wurde in PBS gelöste 5%ige Saccharose infundiert, um die Fixierlösung aus dem Blutsystem des Tieres zu entfernen. Durch Regulierung am Ventil des durch den Luftkompressor entstehenden Druckes erreicht die jeweilige Lösung über Zuflussregler (Dreiwegehahn) das Tier.



**Abbildung 2.1**

Schematische Darstellung des Perfusionsgeräts

## 2.7 Blockierungsmittel

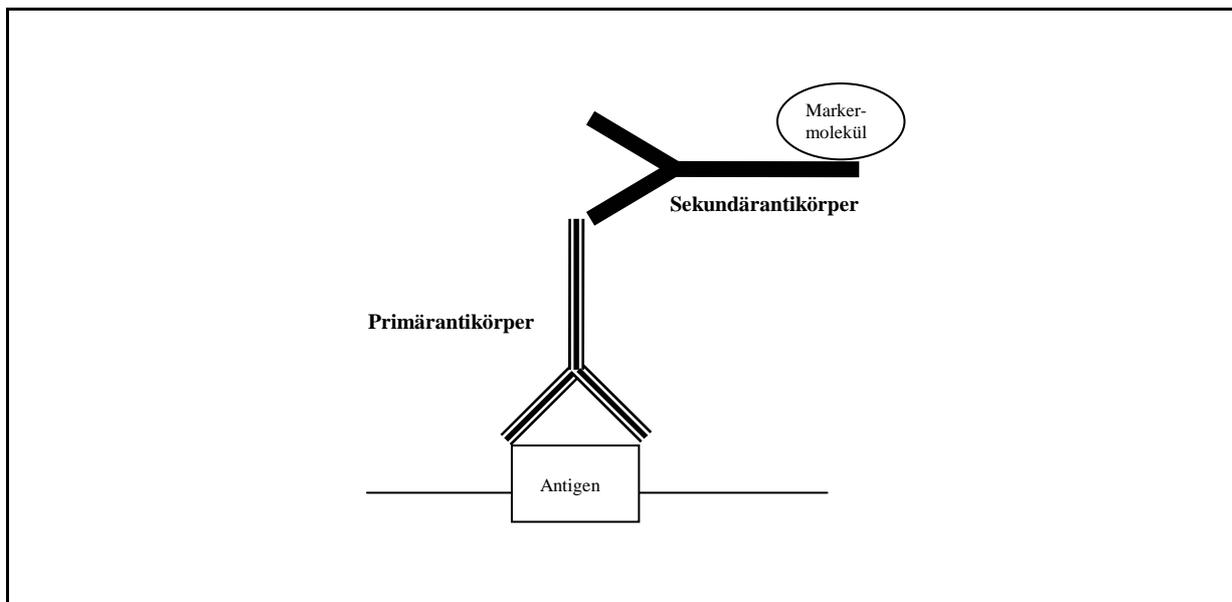
Das Blockierungsmittel besteht aus Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumine*, BSA, 10%) unter Zusatz von Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ , 0,1%) und Triton X-100 (0,3%). Das Serumalbumin blockiert unspezifische Antigene. Natriumazid verlängert die Haltbarkeit der Lösung. Triton X-100 verhindert unspezifische Bindungen und steigert die Permeabilität der Gehirnschnitte, so dass Antikörper besser in das Gewebe eindringen können.

## 2.8 Indirekte Immunfluoreszenztechnik

Zur Darstellung von Antigenen diente die Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei indirekten Methoden wird diese Antigen-Antikörper-Reaktion im Gewebe indirekt, d.h. mit Hilfe zusätzlicher immunologischer oder chemischer Reaktionen visualisiert. Es werden gegen den Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper eingesetzt, die selbst ein Markermolekül

tragen (siehe *Abbildung 2.2*). Bei diesen Markern handelt es sich meist um fluoreszierende Farbstoffe, die nach Exzitation durch Ultrablau- oder Ultraviolett-Bestrahlung sichtbares Licht mit definitiver Wellenlänge abgeben. Zur Beobachtung dieser Farbstoffe wird ein mit geeigneter Farbfilterkombination ausgerüstetes Auflichtmikroskop (Fluoreszenzmikroskop, konfokales Laser-Scanning-Mikroskop) benötigt.

In dieser Arbeit sollte das Antigen *c-Fos* dargestellt werden. Als Primärantikörper dieses Antigens wurde *Anti-Rat c-Fos* eingesetzt. Um den Primärantikörper zu detektieren, diente als Sekundärantikörper *Anti-Rabbit IgG*, der mit Fluoresceinthiocyanat (FITC) konjugiert ist. Die maximale Absorption von FITC liegt bei 490 nm, seine maximale Emission bei 520 nm. Am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) wurde FITC eine grünliche Färbung zugeordnet.



**Abbildung 2.2**

Antigen – Primärantikörper – Sekundärantikörper – Komplex

## 2.9 Antikörperlösungen

Der Primärantikörper (*Rabbit-Anti-Rat c-Fos*) wurde 1:10000, der mit FITC-konjugierter Sekundärantikörper (*Goat-Anti-Rabbit IgG*) 1:800 in einer aus 10% BSA, 0,3% Triton X-100 und 0,1%  $\text{NaN}_3$  bestehenden Lösung verdünnt.

## 2.10 Fluorochrom zur Gegenfärbung

Die Gegenfärbung erfolgte durch Anwendung des Fluorochroms Propidiumiodid (PI, 2,5 µg PI in 1 ml PBS), die zur Darstellung der Kerngebiete diente. PI bewirkt eine Färbung des Zellchromatins. Seine mittlere Anregungswellenlänge beträgt 536 nm, seine mittlere Emissionswellenlänge 617 nm. Am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurde PI eine rötliche Färbung zugeordnet.

## 2.11 Eindeckmittel

Das Eindeckmittel wurde aus 90% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) Phosphatpuffer pH 7,4 und 100 mg/ml 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan (DABCO) für die Fluoreszenzmikroskopie hergestellt. DABCO verhindert ein frühzeitiges Ausbleichen von Fluoreszeinthiozyanat unter Blaulicht.

## 2.12 Verwendete Filter am cLSM

Die Einstellungen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Argon-Laser) zur Detektion von mit FITC-markiertem *c-Fos* und mit Propidiumiodid-markiertem Zellchromatin sind in der Abbildung 2.3 dargestellt.

	<b>Markermolekül</b>	<b>Beamsplitter</b>	<b>Filter</b>
<i>c-Fos</i>	Fluoreszeinthiozyanat (FITC)	HFT 488/543	Bandpass 505- 530
<b>Zellchromatin</b>	Propidiumiodid	NFT 545	Langpass 560

### Abbildung 2.3

Filtereinstellung am cLSM

## Methoden

### 2.13 Handling der Tiere

Vor den Experimenten wurden die Ratten nach Bezug zunächst für eine Woche im Käfig belassen. In den folgenden zwei Wochen wurden die Tiere täglich morgens zwischen 8 und 11 Uhr den Versuchsbedingungen ausgesetzt. Ziel war es, die Tiere an den Umgang mit Menschen und an die späteren experimentellen Vorgehensweisen zu gewöhnen. Dadurch sollten mögliche stressbedingte Verfälschungen der Studienergebnisse ausgeschlossen werden.

Beim sogenannten Handling wurden die Ratten aus dem Käfig herausgenommen und sorgsam in der Hand gehalten. Die Position, in der später die intraperitoneale Injektion erfolgen sollte, wurde mehrmals eingeübt. Mit der einen Hand wurden die Vorder-, mit der anderen Hand die Hinterbeine des Tieres umfasst. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage gestreckt und für einen Augenblick in dieser Position gehalten. Nach Ermittlung und Dokumentation seines Gewichtes wurde das Tier wieder in den Käfig zurückgesetzt.

Ab der zweiten Woche wurden die Ratten täglich für zwei Stunden in Einzelkäfigen isoliert. Dort hatten sie freien Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Jeweils vor und nach der Isolierung wurde das Gewicht ermittelt und dokumentiert. Am letzten Tag vor Versuchsbeginn wurden die Tiere lediglich gewogen.

## Versuchsaufbau

### 2.14 Verhaltensbiologie zur Nahrungsaufnahme

Im ersten Teil der Experimente sollten die Auswirkungen nach einzelner intraperitonealer Applikation von Ghrelin und CCK-8S und simultaner Injektion von Ghrelin und CCK-8S auf das Nahrungsverhalten von Ratten untersucht werden. Es wurden Konzentrationen ausgewählt, die bereits in anderen Studien eingesetzt worden sind (Mönnikes *et al.*, 1997; Rüter *et al.*, 2003; Willensen *et al.*, 1999). Das Endvolumen aller intraperitonealen Injektionen betrug 0,5 ml. Die Tiere wurden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von CCK-8S (2 und 25 µg/kg KG) behandelt, um eventuelle Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten zu

erfassen. Mittels Randomisierung wurden die Tiere in sechs verschiedene Gruppen eingeteilt (siehe *Abbildung 2.4*). Um gleiche Versuchsbedingungen für alle Tiere sicherzustellen, begannen die Untersuchungen stets im Zeitraum zwischen 10:00 und 10:30 Uhr.

Vor Experimentbeginn wurde das Gewicht des Tieres ermittelt und dokumentiert. Es folgte die intraperitoneale Injektion des jeweiligen Peptids oder der Peptidmischung. Anschließend wurde das Tier in einem Einzelkäfig isoliert. Dort hatte es Zugang zu bereits abgewogenem Futter und Wasser *ad libitum*. Nach jeweils 30 Minuten, einer Stunde und zwei Stunden wurde das bereitgestellte Futter gewogen und gegebenenfalls neues hinzugegeben.

	<b>Intraperitoneale Injektion mit</b>	<b>Fallzahl</b>
<b>Gruppe 1</b>	0,15 M NaCl (Vehikel) + 0,15 M NaCl	15
<b>Gruppe 2</b>	0,15 M NaCl + 2 µg CCK-8S/kg KG	14
<b>Gruppe 3</b>	0,15 M NaCl + 25 µg CCK-8S/kg KG	15
<b>Gruppe 4</b>	13 µg Ghrelin/kg KG + 2 µg CCK-8S/kg KG	12
<b>Gruppe 5</b>	13 µg Ghrelin /kg KG + 25 µg CCK-8S/kg KG	15
<b>Gruppe 6</b>	13 µg Ghrelin/kg KG + 0,15 M NaCl	15

#### **Abbildung 2.4**

Intraperitoneale Injektionen der Gruppen 1-6

### **2.15 Immunhistochemie**

Im zweiten Teil der Experimente sollten die Auswirkungen von intraperitoneal appliziertem Ghrelin, CCK-8S und der simultanen Injektion von Ghrelin und CCK-8S auf die *c-Fos*-Immunreaktivität im Rattenhirn untersucht werden. Die Tiere wurden mit zwei verschiedenen

CCK-8S Konzentrationen (2 und 25 µg/kg KG) behandelt, um mögliche dosisabhängige Unterschiede in der neuronalen Aktivierung nachzuweisen.

### 2.15.1 Vorbereitung

Wie im Versuch zuvor wurden die Tiere durch Randomisierung in sechs Gruppen eingeteilt (siehe *Abbildung 2.5*). Vor Experimentbeginn wurden die Tiere gewogen und ihre Gewichte dokumentiert. Die Versuche begannen regelmäßig zwischen 10:00 und 10:30 Uhr morgens. Nach Applikation des Peptids oder der Peptidmischung (das Endvolumen aller intraperitonealen Injektionen betrug 0,5 ml) wurde das Tier in einem Einzelkäfig isoliert und unter Nahrungskarenz gehalten. Wasser erhielten die Tiere *ad libitum*. Die Nahrungskarenz sollte eine Nahrungsaufnahme-induzierte Zunahme der *c-Fos*-positiven Signale in den entsprechenden Hirnregionen vermeiden (Wang *et al.*, 2002).

	<b>Intraperitoneale Injektion</b>	<b>Fallzahl</b>
	<b>mit</b>	
<b>Gruppe 1</b>	0,15 M NaCl (Vehikel) + 0,15 M NaCl	8
<b>Gruppe 2</b>	0,15 M NaCl + 2 µg CCK-8S/kg KG	4
<b>Gruppe 3</b>	0,15 NaCl + 25 µg CCK-8S/kg KG	4
<b>Gruppe 4</b>	13 µg Ghrelin/kg KG + 2 µg CCK-8S/kg KG	4
<b>Gruppe 5</b>	13 µg Ghrelin/kg KG + 25 µg CCK-8S/kg KG	4
<b>Gruppe 6</b>	13 µg Ghrelin/kg KG + 0,15 M NaCl	8

### Abbildung 2.5

Intraperitoneale Injektionen der Gruppen 1-6

### **2.15.2 Narkoseeinleitung**

Die Tiere wurden 90 Minuten nach der Injektion intraperitoneal mit Ketamin (Ketanest®, 100 mg/kg KG) und Xylazin (Rompun®, 10 mg/kg KG) anästhesiert. Anhand der Auslösung von Lid- und Schmerzreflexen wurde die Narkosetiefe überprüft, die nach 10-15 Minuten komplett war. Anschließend erhielt jedes Tier eine intraperitoneale Injektion von 2500 U Heparin (Liquemin®), um einer Thrombenbildung entgegenzuwirken.

### **2.15.3 Transkardiale Perfusion**

Das narkotisierte Tier wurde in Rückenlage auf einer Kunststoffplatte platziert und an den Extremitäten mit Klebestreifen fixiert. Die Haut wurde, beginnend von der Symphyse, entlang der Linea alba bis zum Jugulum aufgeschnitten. Nach Durchtrennung der Abdominalmuskulatur und der oberflächlichen thorakalen Muskulatur erfolgte die Eröffnung des Thorax. Anschließend wurde das Herz freipräpariert. Es folgte ein kleiner Schnitt an der Herzspitze in den linken Ventrikel. Über diese Inzision wurde eine Perfusionskanüle bis zum unpaaren Truncus arteriosus hineingeschoben, die dort mit einer Gefäßklemme fixiert wurde. Nach Eröffnen des Sinus venosus am rechten Herzohr wurde die Perfusion gestartet.

Zunächst wurde den Tieren 50 ml Plasmaexpander Dextran 75 (Longasteril®) für 10 Sekunden bei einem Druck von 210 Torr infundiert. Danach erfolgte die Infusion von 1 Liter Fixierlösung bei einem Druck von 210 Torr. Nach 5 Minuten wurde der Druck auf 20 Torr gesenkt und die Infusion für weitere 20 Minuten fortgesetzt. Diese Fixierung ermöglicht die Erhaltung von Zellen und Gewebe in ihrer ursprünglich biologischen und morphologischen Struktur. Sie verhindert ferner die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme. Zur Entfernung der Fixierlösung aus dem Kreislaufsystem wurde bei einem Druck von 100 Torr für weitere 5 Minuten 400 ml Nachspüllösung (5%ige Saccharose in PBS) infundiert.

### **2.15.4 Gehirnpräparation**

Mit Hilfe eines Skalpells wurde das perfundierte Tier großzügig oberhalb seiner Claviculae dekapitiert. Nach Wegklappen der Kopfhaut und der Muskulatur wurde mit einer Knochenzange entlang des Rückenmarks stückweise knöcherner Schädel abgetragen, bis das

gesamte Gehirn freilag. Nach Abtrennung der Dura und Durchtrennung der Hirnnerven wurde das Gehirn mitsamt den Bulbi vorsichtig aus dem Schädel entnommen. Anschließend wurden die Gehirne 2 Stunden in einer 5%igen Saccharose-Lösung bei einer Temperatur von 4 °C aufbewahrt. Danach erfolgte mit Hilfe einer Gehirn-Matrix aus Plexiglas eine Teilung des Gehirns in 1.0 bis 4.5 mm große Koronarsegmente, die u.a. den Hypothalamus und den Hirnstamm enthielten.

### **2.15.5 Kryostatpräparation**

Die Gehirnblöcke wurden durch einen ansteigenden Saccharosegradienten bei einer Temperatur von 4 °C geführt. Zunächst wurden sie für 12 Stunden in 15%iger Saccharose-Lösung aufbewahrt. Nach Absinken der Gehirnsegmente wurden sie für weitere 12 Stunden in 27,3%iger Saccharose-Lösung eingelegt (Barthel und Raymond, 1990). Mit diesem Vorgang sollten sowohl ein Gefrierschutz als auch eine weitere Auswaschung von ungebundenem Fixiermittel erzielt werden. Anschließend wurden die Gehirnblöcke mittels *Tissue Tec* auf beschriftete Korkscheiben fixiert und für 20 Minuten in gekühltem Hexan aufbewahrt. Die gefrorenen Blöcke wurden zum Abdampfen des Hexans für eine ½ bis 1 Stunde bei einer Temperatur von - 20 °C belassen. Danach wurden sie in Plastikgefäße (*Tubes*) sortiert, die bei - 80 °C gelagert wurden. Zur weiteren Verarbeitung für die Immunhistochemie erfolgte die Herstellung serieller Koronarschnitte. Am Kryostat wurden die Gehirnblöcke des Hypothalamus (beinhaltet den ARC und PVN) und der Medulla oblongata (beinhaltet den NTS) in 25 µm dünne Koronarscheiben geschnitten. Die Festlegung der Grenzen der Hirnkerne wurde mit Hilfe des Atlas von Paxinos und Watson (1997) erarbeitet. Die Präparate wurden einzeln als frei flottierende Schnitte („*free-floating*“) in mit PBS gefüllte Gewebeskulturschalen (*wells*) gesammelt.

### **2.15.6 *c-Fos*-Immunhistologie**

Die *c-Fos*-Immunfärbung basiert auf der „*free-floating*“-Methode, bei der alle Inkubationen und Waschvorgänge einen horizontalen Schüttler erfordern. Diese Technik ermöglicht eine gleichmäßige Beschichtung (Seren und Antikörper können an einer großen Oberfläche wirken) und Auswaschung. Außerdem erlaubt sie eine simultane Anfärbung einer großen

Anzahl von Gehirnschnitten. Die Arbeitsschritte erfolgten in Anlehnung nach Kobelt *et al.* (Kobelt *et al.*, 2004).

Nach Entfernung des PBS wurden die Gehirnschnitte für 15 Minuten mit in 0,1 M PBS gelöstem 1%igen Natriumborhydrid inkubiert. Natriumborhydrid dient zur Reduktion der Aldehyd-induzierten Hintergrund-Autofluoreszenz des Gewebes (Clancy und Cauller, 1998). Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit PBS gewaschen (1 x 2 min, 1 x 20 min und 1 x 30 min), um überschüssiges Natriumborhydrid zu entfernen. Die darauffolgende 60-minütige Inkubation mit Blockierungsmittel aus 10% BSA unter Zusatz von 0,1% NaN<sub>3</sub> und 0,3% Triton X-100 sollte eine unspezifische Bindung von Antikörpern an das Gewebe verhindern. Zum Nachweis von nukleärem *c-Fos* wurden die Gehirnschnitte bei Raumtemperatur für 20 Stunden auf dem Schüttler in Primär-*Rabbit-Anti-Rat c-Fos*-Antikörper-Lösung (1:10000 in Blockierungsmittel verdünnt) inkubiert. Jeweils 250 µl dieser Lösung bedeckten ein Präparat. Es folgten drei Waschvorgänge mit PBS (1 x 10 min, 1 x 30 min und 1 x 40 min), um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Danach erfolgte eine zweistündige Inkubation mit Blockierungsmittel. Schließlich wurde jeder Gehirnschnitt mit 250 µl FITC konjugierten Sekundär-*Goat-Anti-Rabbit IgG*-Antikörpern (1:800 in Blockierungsmittel verdünnt) für zwölf Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (1 x 10 min, 1 x 30 min und 1 x 40 min) wurde die Reaktion beendet.

### **2.15.7 Gegenfärbung, Aufziehen und Auswertung der Gehirnschnitte**

Zur Darstellung von Kerngebieten im Gehirn erfolgte eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI). Dieses Fluorochrom färbt Zellchromatin an. Jeder Hirnschnitt wurde für 15 Minuten mit 150 µl PI (2,5 µg PI in 1 ml PBS) inkubiert. Es folgten drei Waschvorgänge mit PBS (1 x 2 min, 1 x 15 min und 1 x 30 min), um nicht gebundenes PI zu entfernen. Mit Hilfe von feinen Pinseln wurden unter dem Binokular 4 bis 5 Gehirnschnitte auf einen Objektträger gezogen. Die anschließende Einbettung mit Eindeckmittel aus 1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-oktan, PBS und Glycerin (Longin *et al.*, 1993; Romijn *et al.*, 1999) wurde zur Erhaltung der Fluoreszenz von FITC-markierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Nachdem die Hirnschnitte mit einem Deckglas bedeckt wurden, erfolgte ihre Lagerung unter Lichtausschluss bei - 20 °C. Anschließend wurden die Gehirnschnitte unter dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) analysiert und fotografiert.

## 2.16 Daten und statistische Auswertung

### 2.16.1 Verhaltensbiologie zur Nahrungsaufnahme

Die nach den Zeiträumen 30 Minuten, einer Stunde und zwei Stunden kumulativ aufgenommenen Nahrungsmengen (g/kg Körpergewicht) jedes Tieres wurden dokumentiert. Für jede Gruppe wurden Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Es erfolgte ein Gruppenvergleich mittels ANOVA (*Analysis of Variance*). Auftretende Differenzen zwischen den verschiedenen Gruppen sind mit dem *Least Significant Difference*-Test ausgewertet worden, wobei ein Unterschied von  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet wurde. Mit Hilfe des Statistikprogramms Statistica® (Version 5) erfolgten die statistischen Berechnungen.

### 2.16.2 Immunhistochemie

Nach der immunhistochemischen Färbung der Gehirnschnitte wurde am c-LSM der Grad der neuronalen Aktivierung im ZNS beurteilt. Es wurden *c-Fos*-Signale in den Hirnregionen Ncl. arcuatus (ARC), Ncl. paraventricularis (PVN) und Ncl. tractus solitarius (NTS) ausgezählt. Als *c-Fos*-positiv galten die Neurone, deren Zellkerne grün angefärbt wurden. Um die Kerngebiete ARC, PVN und NTS zu lokalisieren, diente die Gegenfärbung mit Propidiumiodid. Jeder zweite 25  $\mu\text{m}$  dünne Koronar-Gehirnschnitt wurde bilateral auf *c-Fos*-positive Signale hin analysiert, so dass jeweils 15 Gehirnschnitte im ARC und NTS und 10 Gehirnschnitte im PVN pro Rattenhirn ausgewertet werden konnten. Hierbei war nicht bekannt, welche Behandlung das jeweilige Tier erhielt (Blindstudie). Die Anzahl der *c-Fos*-Signale wurde pro Präparat dokumentiert. Für jede Behandlungsgruppe wurde eine Fallzahl von mindestens 4 gewählt, um eine maximale Konsistenz der Ergebnisse zu erreichen. Die Durchschnittszahl der *c-Fos*-positiven Neurone pro Gehirnschnitt in den entsprechenden Hirnkernen wurde für jedes Versuchstier ermittelt. Aufgrund der kleinen Fallzahlen wurden die Daten als Mediane und in Interquartil-Rängen aufgeführt. Die Differenzen zwischen den Gruppen wurden mit der nicht-parametrischen Rangvarianzanalyse (*Kruskal-Wallis-ANOVA-Median-Test*) und dem *Mann-Whitney-U-Test* ausgewertet. Ein Unterschied von  $p < 0,05$  galt als signifikant.

## **ERGEBNISSE**

In dieser Studie wurden die Interaktionen zwischen dem orexigen wirkenden Ghrelin und dem anorexigen wirkenden Cholezystokinin (CCK) untersucht. Es sollte geprüft werden, ob CCK die Ghrelin-induzierten Effekte auf die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Die Versuchstiere wurden mit sechs verschiedenen intraperitonealen Injektionen behandelt. Sie erhielten entweder Vehikel (NaCl, Vehikel + Vehikel-Gruppe), Ghrelin (13 µg/kg, 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe), CCK-8S (2 oder 25 µg/kg, Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe und Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe) oder simultan Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg, 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe und 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe).

Um die Auswirkungen der verschiedenen Injektionen vergleichen zu können, wurden zwei Aspekte betrachtet. Im ersten Teil der Experimente wurde verhaltensbiologisch die Nahrungsaufnahme der Tiere über einen Messzeitraum von zwei Stunden *post injectio* beobachtet. Im zweiten Teil der Experimente wurde anhand der immunhistochemischen Quantifizierung von *c-Fos*-Signalen beurteilt, inwiefern die jeweiligen Injektionen eine neuronale Aktivierung in den Kernregionen ARC, PVN und NTS induzierten.

### **3.1 Ergebnisse der Verhaltensbiologie**

#### **3.1.1 Effekte von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme**

Die intraperitoneale Applikation von Ghrelin (13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe) führte innerhalb von 30 Minuten zu einem signifikanten ~ 2,3-fachen Anstieg der Nahrungsaufnahme verglichen mit der Vehikel + Vehikel-Gruppe (Mittelwert der kumulativen Nahrungsaufnahme ± Standardabweichung des Mittelwerts: 2,89 ± 1,04 g/kg vs. 1,23 ± 0,52 g/kg;  $p = 0,028$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Auch nach einem Messzeitraum von einer Stunde *post injectio* zeigte die 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe im Vergleich zu der Vehikel + Vehikel-Gruppe eine signifikante ~ 2,1-fache Erhöhung der Nahrungsaufnahme (3,83 ± 1,15 g/kg vs. 1,84 ± 0,73 g/kg;  $p = 0,044$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Nach dem Beobachtungszeitraum von zwei Stunden konnte kein signifikanter Unterschied in der

kumulativen Nahrungsaufnahme zwischen der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe und der Vehikel + Vehikel-Gruppe mehr festgestellt werden ( $5,15 \pm 1,54$  g/kg vs.  $2,1 \pm 1,19$  g/kg;  $p = 0,49$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*).

### 3.1.2 Effekte von CCK auf die Nahrungsaufnahme

CCK-8S in den verschiedenen Dosierungen (2 und 25 µg/kg, Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe und Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe) reduzierte konzentrationsabhängig (~ 4,3- und ~ 57,8-fach) in den ersten 30 Minuten *post injectio* signifikant die Nahrungsaufnahme gegenüber der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe ( $0,68 \pm 0,4$  g/kg;  $p = 0,004$  und  $0,05 \pm 0,05$  g/kg;  $p = 0,0002$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Nach einem Messzeitraum von einer Stunde zeigte nur noch die Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe eine signifikant ~ 12,4-fach verminderte Nahrungsaufnahme verglichen mit der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe ( $0,31 \pm 0,26$  g/kg;  $p = 0,005$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Nach einem Beobachtungszeitraum von zwei Stunden waren signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen CCK-8S-Gruppen (2 und 25 µg/kg) und der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe nicht mehr nachweisbar ( $4,36 \pm 1,39$  g/kg;  $p = 0,61$  und  $3,01 \pm 0,82$  g/kg;  $p = 0,16$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Innerhalb des gesamten Messzeitraums führte CCK-8S in den unterschiedlichen Dosierungen (2 und 25 µg/kg) im Vergleich zu der Vehikel + Vehikel-Gruppe tendenziell zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme, erreichte aber keine statistische Signifikanz.

### 3.1.3 Effekte von Ghrelin und CCK auf die Nahrungsaufnahme

Die simultane Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in den verschiedenen Konzentrationen (2 und 25 µg/kg) führte innerhalb von 30 Minuten verglichen mit der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe zu einer signifikanten Hemmung (~ 13,1- und ~ 8,3-fach) der Ghrelin-induzierten Nahrungsaufnahme ( $0,22 \pm 0,13$  g/kg;  $p = 0,008$  und  $0,33 \pm 0,23$  g/kg;  $p = 0,008$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Auch nach dem Beobachtungszeitraum von einer Stunde hatte die gleichzeitige Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) im Vergleich zu der 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe eine signifikante Blockade der Nahrungsaufnahme (~ 17,4- und ~ 5,9-fach) zur Folge (13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe:  $0,22 \pm 0,13$ ;  $p = 0,008$  und 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe:  $0,65 \pm 0,42$ ;  $p = 0,0016$ ,

siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Nach dem Messzeitraum von zwei Stunden hielt die reduzierte Nahrungsaufnahme weiter an. Die 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe und 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe nahmen signifikant ~ 6,2- und ~ 3,9-fach weniger Nahrung zu sich als die 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe ( $0,83 \pm 0,72$  g/kg;  $p = 0,009$  und  $1,32 \pm 0,82$  g/kg;  $p = 0,015$ , siehe *Tabelle 3.1/Abbildung 3.1*). Ferner waren signifikante Unterschiede zwischen der 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe und den Gruppen Vehikel + Vehikel und 13 µg Ghrelin + Vehikel nachweisbar ( $p = 0,048$  vs. Vehikel + Vehikel und  $p = 0,036$  vs. Vehikel + 2 µg CCK).

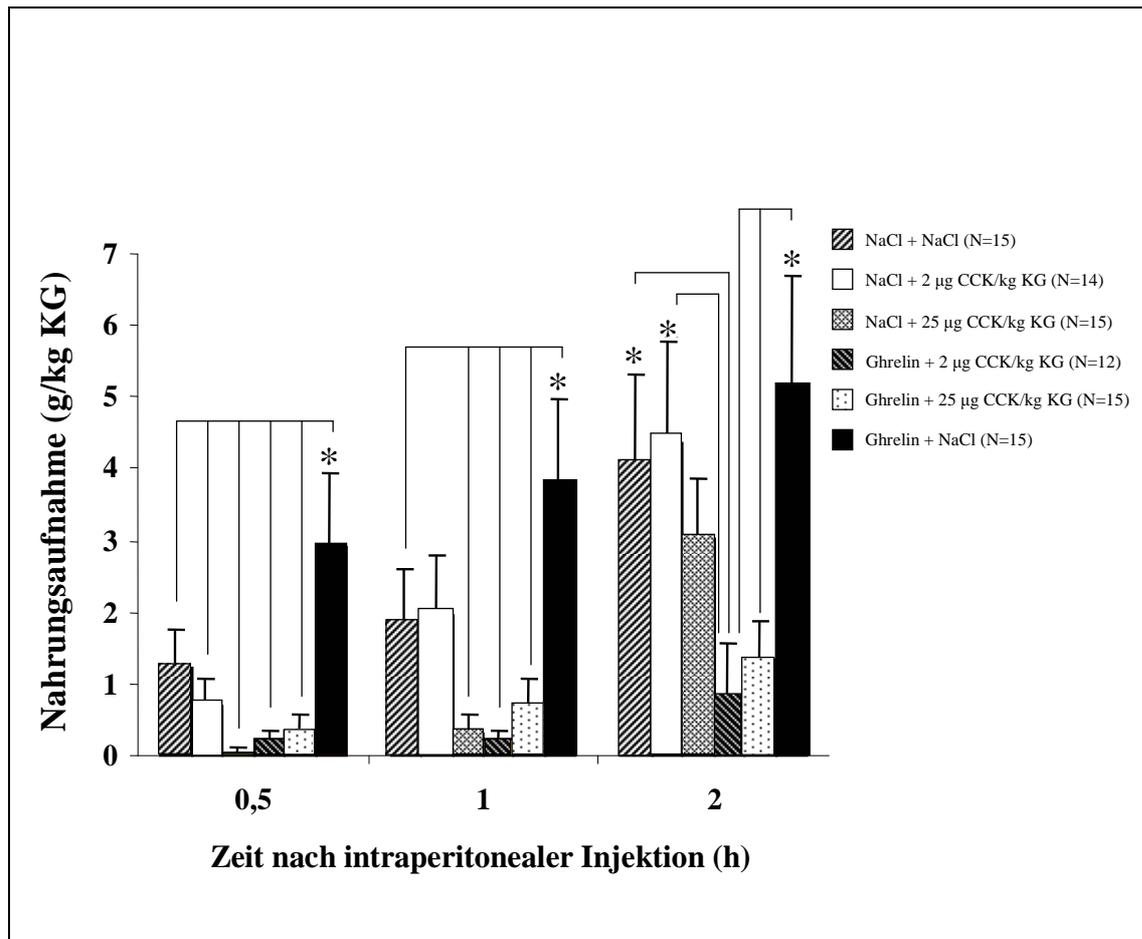
Innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums von zwei Stunden inhibierte die simultane Applikation von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in niedriger Konzentration (2 µg/kg) die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme stärker als die gleichzeitige Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in hoher Dosierung (25 µg/kg). Diese Unterschiede erreichten aber keine statistische Signifikanz.

<b>i.p. Behandlung</b>  <b>Kumulative Nahrungs- aufnahme</b>	<b>13 µg Ghrelin/kg + Vehikel (0,15 M NaCl)</b>	<b>Vehikel (0,15 M NaCl) + 2 µg CCK-8S/kg</b>	<b>Vehikel (0,15 M NaCl) + 25 µg CCK-8S/kg</b>	<b>13 µg Ghrelin/kg + 2 µg CCK-8S/kg</b>	<b>13 µg Ghrelin/kg + 25 µg CCK-8S/kg</b>	<b>Vehikel (0,15 M NaCl) + Vehikel (0,15 M NaCl)</b>
<b>30 Minuten</b>	2,89 ± 1,04 * & % \$ §	0,68 ± 0,4	0,05 ± 0,05	0,22 ± 0,13	0,33 ± 0,23	1,23 ± 0,52
<b>1 Stunde</b>	3,83 ± 1,15 x 0 Δ ∞	1,96 ± 0,82	0,31 ± 0,26	0,22 ± 0,13	0,65 ± 0,42	1,82 ± 0,73
<b>2 Stunden</b>	5,15 ± 1,54 + □	4,36 ± 1,39	3,01 ± 0,82	0,83 ± 0,72 • °	1,32 ± 0,82	2,1 ± 1,19

**Tabelle 3.1**

Kumulative Nahrungsaufnahme in g/kg KG (Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwerts) in den Versuchstieren über den Messzeitraum von zwei Stunden nach intraperitonealer Peptidapplikation

\* p = 0,028 vs. Vehikel + Vehikel; & p = 0,0044 vs. Vehikel + 2 µg CCK; % p = 0,0002 vs. Vehikel + 25 µg CCK; § p = 0,0001 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; \$ p = 0,0008 vs. 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK; x p = 0,044 vs. Vehikel + Vehikel; 0 p = 0,005 vs. Vehikel + 25 µg CCK; Δ p = 0,008 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; ∞ p = 0,001 vs. 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK; + p = 0,009 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; □ p = 0,015 vs. 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK; • p = 0,048 vs. Vehikel + Vehikel; ° p = 0,036 vs. Vehikel + 2 µg CCK



**Abbildung 3.1**

Kumulative Nahrungsaufnahme in g/kg KG (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts) in den Versuchsgruppen zu den Messzeitpunkten 30 min, eine Stunde und zwei Stunden nach intraperitonealer Peptidapplikation. Ghrelin (13  $\mu$ g/kg) führt im Vergleich zu allen anderen Gruppen innerhalb von 30 Minuten und der ersten Stunde zu einem signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme (\*  $p < 0,05$ , genaue  $p$ -Werte siehe *Tabelle 3.1*). CCK-8S allein (2 oder 25  $\mu$ g/kg) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Nahrungsaufnahme. Der orexigene Effekt von Ghrelin wird durch die simultane Applikation von CCK-8S (2 oder 25  $\mu$ g/kg) blockiert. Nach einem Messzeitraum von zwei Stunden bleibt die signifikante Hemmung der Nahrungsaufnahme nach gleichzeitiger Injektion von Ghrelin (13  $\mu$ g/kg) und CCK-8S (2 oder 25  $\mu$ g/kg) gegenüber alleiniger Ghrelin-Applikation bestehen (\*  $p < 0,05$ , genaue  $p$ -Werte siehe *Tabelle 3.1*). Außerdem reduziert die simultane Gabe von 13  $\mu$ g Ghrelin und 2  $\mu$ g CCK-8S signifikant die Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Vehikel + Vehikel- (\*  $p < 0,05$ ;  $p = 0,048$ ) und zur Vehikel + 2  $\mu$ g CCK-Gruppe (\*  $p < 0,05$ ;  $p = 0,036$ ). N = Anzahl der Tiere

## 3.2 Ergebnisse der *c-Fos*-Immunhistologie

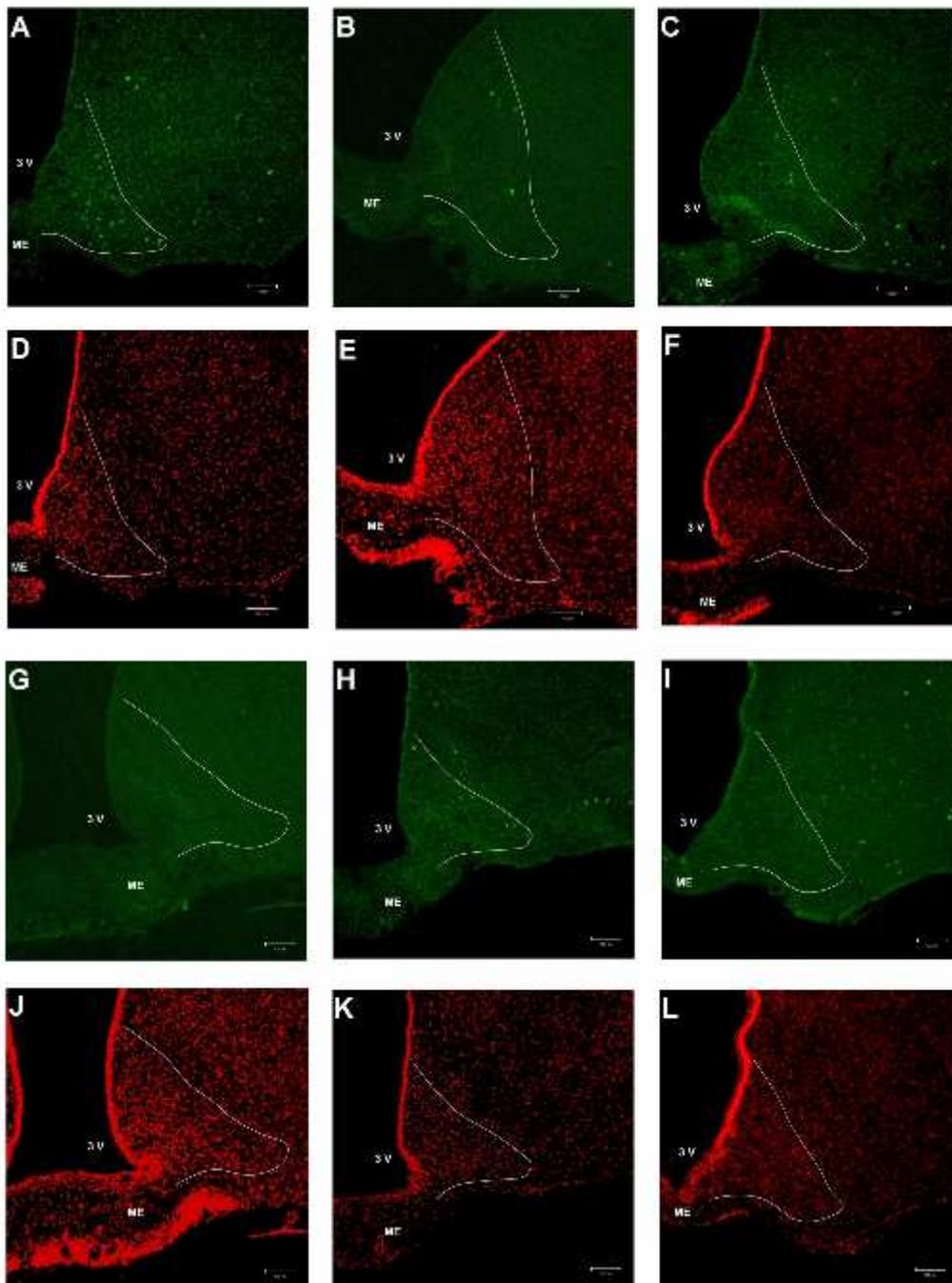
### 3.2.1 Effekte von Ghrelin und CCK auf die *c-Fos*-Expression im ARC

Die intraperitoneale Injektion von Ghrelin (13 µg/kg, 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe) stimulierte im Vergleich zu der Vehikel + Vehikel-Gruppe eine signifikant ~ 3,1-fach höhere Dichte von *c-Fos*-immunreaktiven Zellkernen im medialen ARC (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 31,35 vs. 9,86;  $p = 0,0001$ , siehe *Abbildung 3.2 A, I / 3.3, Tabelle 3.2*).

CCK-8S in den verschiedenen Dosierungen (2 und 25 µg/kg) hatte keinen Einfluss auf die Neuronenaktivierung im ARC. Es wurden signifikant weniger *c-Fos*-Signale als nach Applikation von Ghrelin stimuliert (Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe: 5,33 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,004$ , Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe: 11,21 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,004$ , siehe *Abbildung 3.2 B, C / 3.3, Tabelle 3.2*).

Die Ghrelin-induzierte robuste neuronale Aktivierung im ARC wurde durch die zusätzliche Gabe von CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) signifikant aufgehoben (13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe: 13,33 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,008$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel, 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe: 12,87 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,004$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel, siehe *Abbildung 3.2 G, H / 3.3, Tabelle 3.2*). Die Reduktion in der *c-Fos*-Expression erfolgte CCK-dosisunabhängig, da beide CCK-Konzentrationen (2 und 25 µg/kg) zu einer ähnlichen Anzahl von *c-Fos*-positiven Neuronen im ARC führten.

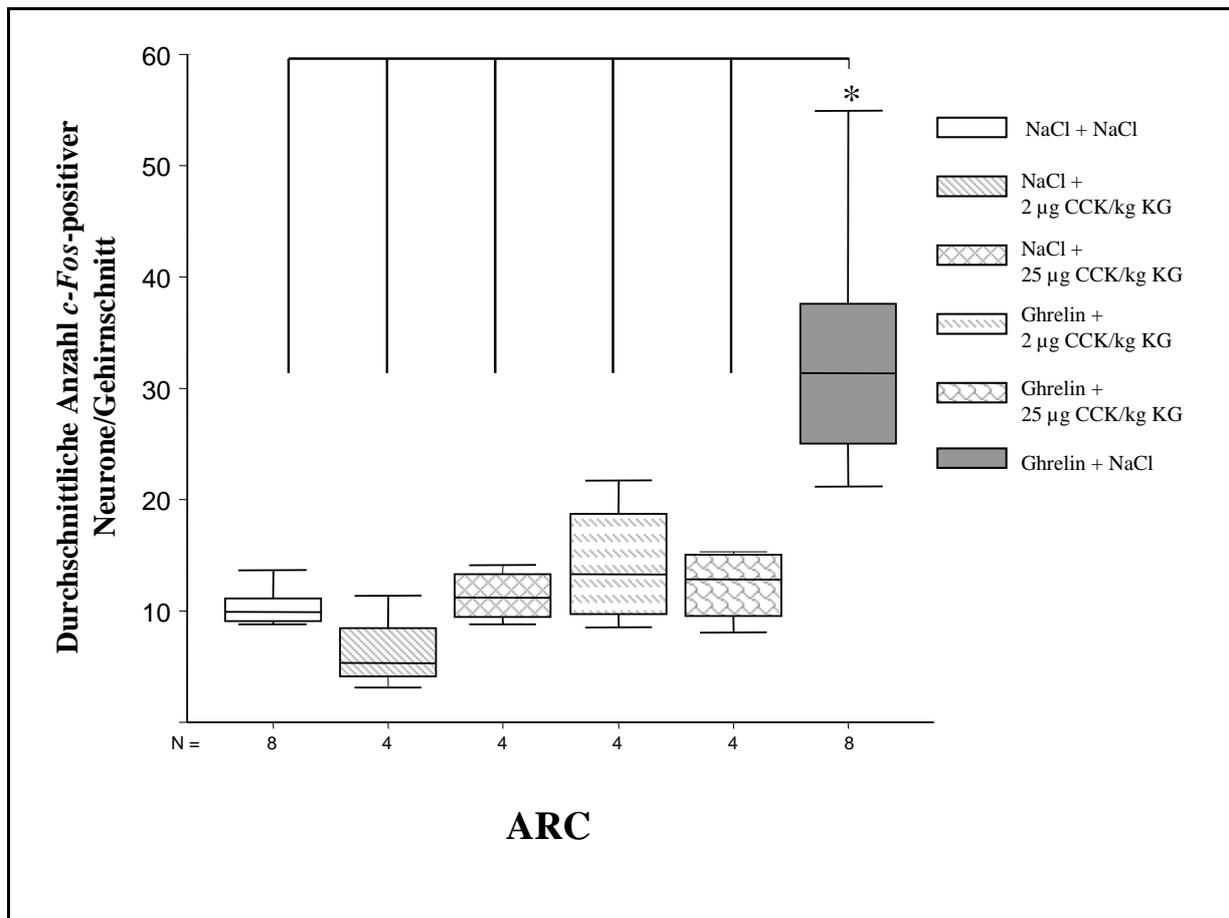
### Mikroskopische Darstellung der *c-Fos*-Expression im ARC



3V = dritter Ventrikel, ME = Mediana eminentia

#### Abbildung 3.2, Repräsentative Gehirnschnitte

*c-Fos*-positive Neurone (grüne Signale) nach intraperitonealer Injektion von 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + Vehikel **A**, Vehikel + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **B**, Vehikel + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **C**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **G**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **H** und Vehikel + Vehikel **I** Gegenfärbung mit Propidiumiodid zur Lokalisation des ARC (rote Signale): 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + Vehikel **D**, Vehikel + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **E**, Vehikel + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **F**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **J**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **K** und Vehikel + Vehikel **L** Die weiße Linie markiert die Region des ARC. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

**Quantitative Darstellung der *c-Fos*-Expression im ARC****Abbildung 3.3**

Effekte von Ghrelin und CCK-8S auf die *c-Fos*-Expression im ARC (Durchschnittliche Anzahl der *c-Fos*-positiven Neurone/Hirnschnitt).

Ghrelin (13 µg/kg) führt zu einem signifikanten Anstieg der *c-Fos*-Expression im ARC gegenüber allen anderen Gruppen (\*  $p < 0,05$ , genaue p-Werte siehe *Tabelle 3.2*). Nach simultaner Applikation von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) inhibiert CCK den Ghrelin-induzierten Anstieg der *c-Fos*-positiven Signale im ARC.

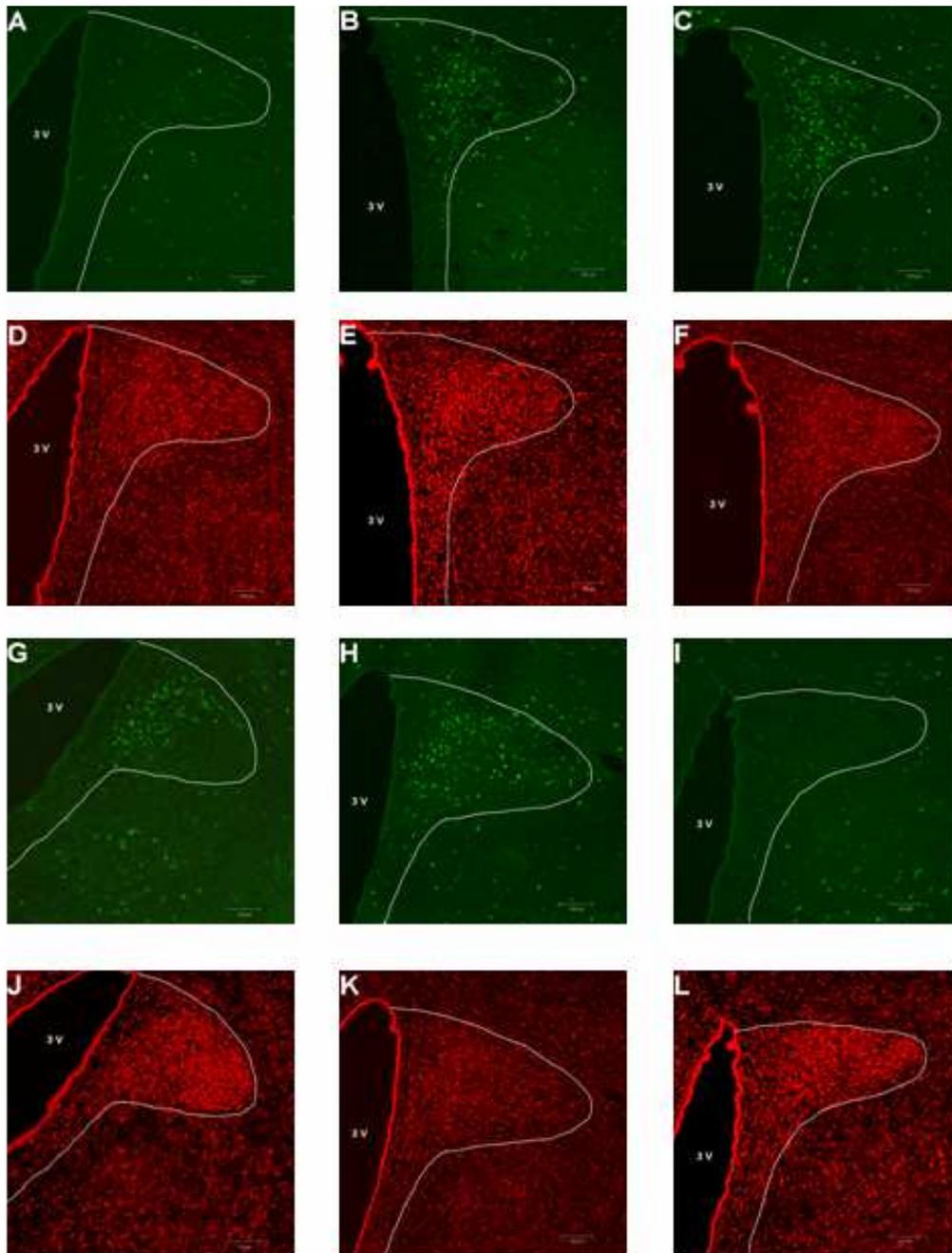
Die Grafik zeigt Box- und Whiskersplots. Der Boxplot stellt den Median (Linie in der Box) mit der 25igsten (untere Begrenzung der Box) und der 75igsten Perzentile (obere Begrenzung der Box) dar. Der Whiskerplot beschreibt die am meisten (Linie oberhalb der Box) und wenigsten (Linie unterhalb der Box) gezählten *c-Fos*-Signale (Whiskerplots). N = Anzahl der Tiere

### 3.2.2 Effekte von Ghrelin und CCK auf die *c-Fos*-Expression im PVN

Die Applikation von Ghrelin (13 µg/kg, 13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe) führte zu einem signifikanten ~ 2,5-fachen Anstieg der *c-Fos*-Immunreaktivität im PVN gegenüber der Vehikel + Vehikel-Gruppe (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 50,56 vs. 20,25;  $p = 0,016$ , siehe *Abbildung 3.4 A, I / 3.5, Tabelle 3.2*).

Die Injektion von CCK-8S (2 oder 25 µg/kg, Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe und Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe) induzierte dosisabhängig signifikant mehr *c-Fos*-positive Signale im PVN als die Gruppen 13 µg Ghrelin + Vehikel und Vehikel + Vehikel (Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe: 141,38 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel; Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe: 312,27 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel, siehe *Abbildung 3.4 B, C / 3.5, Tabelle 3.2*). CCK in hoher Dosierung (25 µg/kg) hatte gegenüber der niedrigeren (2 µg/kg) eine signifikant höhere *c-Fos*-Signaldichte zur Folge ( $p = 0,028$ ).

Die simultane Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg, 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe und 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe) führte ebenfalls im Vergleich zur 13 µg Ghrelin + Vehikel- und Vehikel + Vehikel-Gruppe zu einer signifikant erhöhten *c-Fos*-Expression im PVN (13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe: 144,69 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel, 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe: 275,36 *c-Fos*-positive Neurone/Hirnschnitt;  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel, siehe *Abbildung 3.4 G, H / 3.5, Tabelle 3.2*). Die Verabreichung von 25 µg/kg CCK-8S stimulierte signifikant mehr *c-Fos*-immunreaktive Neurone als von 2 µg/kg CCK-8S ( $p = 0,028$ ). Sowohl CCK-8S allein (2 oder 25 µg/kg) als auch Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) simultan führten zu einer ähnlichen *c-Fos*-Signaldichte im PVN. Ghrelin hat keinen Einfluss auf die konzentrationsabhängige CCK-induzierte *c-Fos*-Expression im PVN.

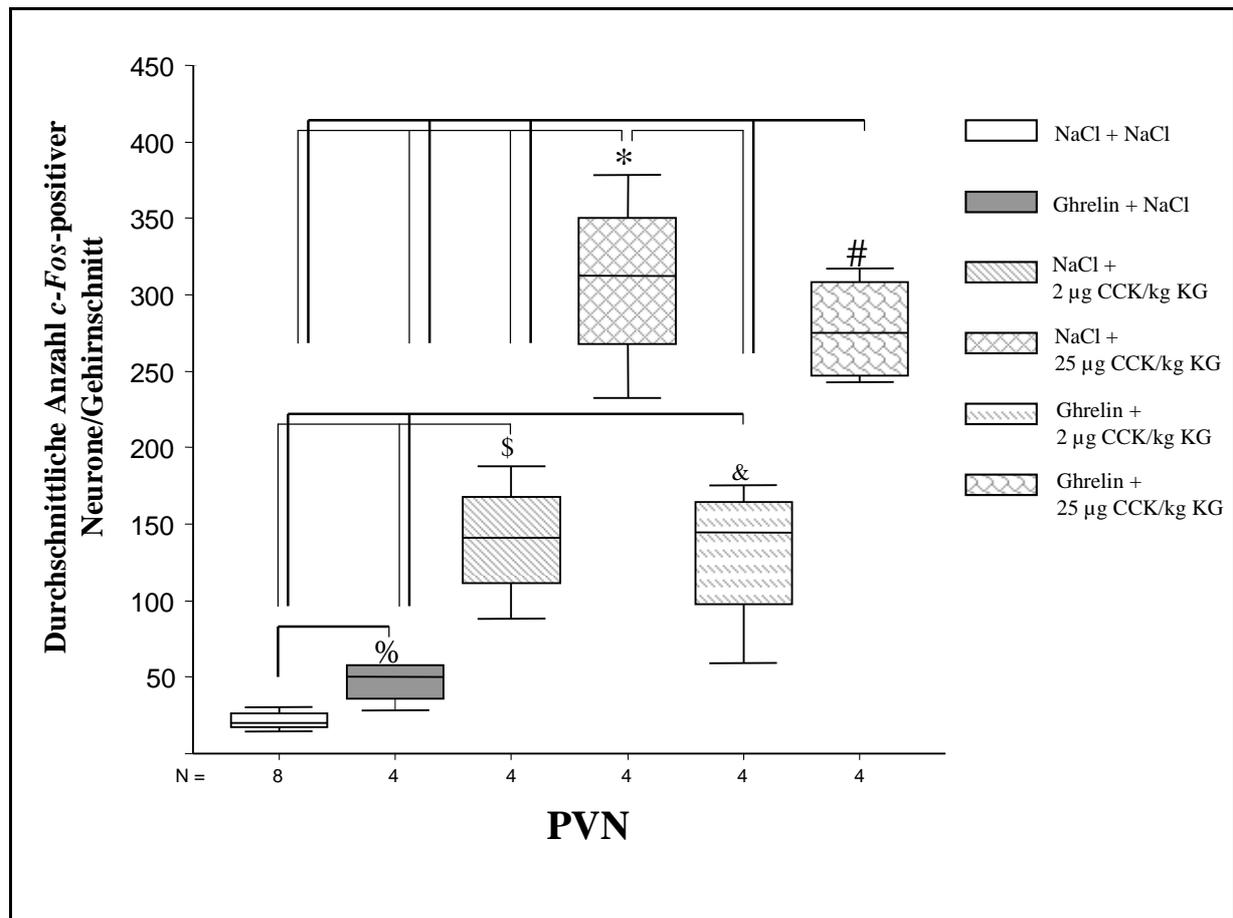
**Mikroskopische Darstellung der *c-Fos*-Expression im PVN**

3V = dritter Ventrikel

**Abbildung 3.4,** Repräsentative Gehirnschnitte

*c-Fos*-positive Neurone (grüne Signale) nach intraperitonealer Injektion von 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + Vehikel **A**, Vehikel + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **B**, Vehikel + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **C**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **G**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **H** und Vehikel + Vehikel **I** Gegenfärbung mit Propidiumiodid zur Lokalisation des PVN (rote Signale): 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + Vehikel **D**, Vehikel + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **E**, Vehikel + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **F**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 2  $\mu\text{g}$  CCK-8S **J**, 13  $\mu\text{g}$  Ghrelin + 25  $\mu\text{g}$  CCK-8S **K** und Vehikel + Vehikel **L** Die weiße Linie markiert die Region des PVN. Der weiße Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

### Quantitative Darstellung der *c-Fos*-Expression im PVN



#### Abbildung 3.5

Effekte von Ghrelin und CCK auf die *c-Fos*-Expression im PVN (Durchschnittliche Anzahl der *c-Fos*-positiven Neurone/Hirnschnitt).

Ghrelin (13 µg/kg) induziert eine signifikant höhere *c-Fos*-Expression im PVN als die Vehikel + Vehikel-Gruppe (%  $p = 0,0016$ ). CCK in niedriger Dosierung (2 µg/kg) allein oder simultan mit Ghrelin (13 µg/kg) führt zu einem signifikanten Anstieg der *c-Fos*-Neuronenaktivierung im PVN (Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe: \$  $p < 0,05$  vs. Vehikel + Vehikel und 13 µg Ghrelin + Vehikel, 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe: &  $p < 0,05$  vs. Vehikel + Vehikel und 13 µg Ghrelin + Vehikel). Im Vergleich verdoppelt CCK in hoher Dosierung (25 µg/kg) allein oder simultan mit Ghrelin (13 µg/kg) die Anzahl der *c-Fos*-positiven Neurone im PVN. Der Unterschied zu allen anderen Gruppen ist signifikant (Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe: \*  $p < 0,05$  vs. Vehikel + Vehikel, 13 µg Ghrelin + Vehikel, Vehikel + 2 µg CCK und 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe: #  $p < 0,05$  vs. Vehikel + Vehikel, 13 µg Ghrelin + Vehikel, Vehikel + 2 µg CCK und 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK, genaue p-Werte siehe *Tabelle 3.2*).

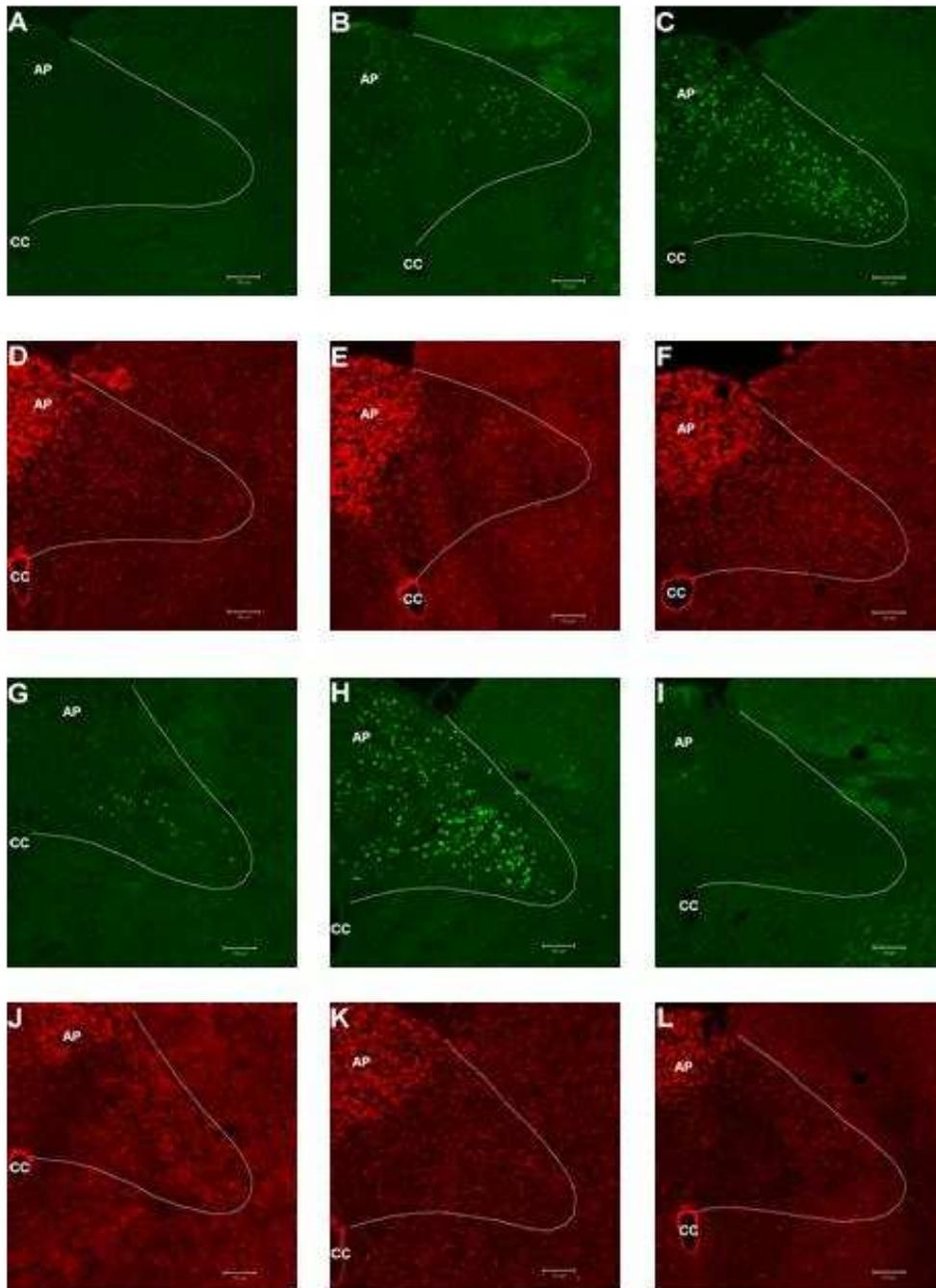
Die Grafik zeigt Box- und Whiskersplots (Beschreibung siehe *Abbildung 3.3*). N = Anzahl der Tiere

### 3.2.3 Effekte von Ghrelin und CCK auf die *c-Fos*-Expression im NTS

Die Injektion von Ghrelin (13 µg Ghrelin + Vehikel-Gruppe) hatte verglichen mit der Vehikel + Vehikel-Gruppe keinen signifikanten Effekt auf die *c-Fos*-Expression im NTS (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 24,29 vs. 18,85;  $p = 0,57$ , siehe *Abbildung 3.6 A, I / 3.7, Tabelle 3.2*).

Die Applikation von CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Neuronenaktivierung im NTS. CCK-8S in niedriger Konzentration (2 µg/kg) stimulierte signifikant mehr *c-Fos*-positive Signale als die 13 µg Ghrelin + Vehikel- (~ 6,0-fach) und Vehikel + Vehikel-Gruppe (~ 7,8-fach) (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 146,5;  $p = 0,004$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel, siehe *Abbildung 3.6 B / 3.7, Tabelle 3.2*). CCK-8S in hoher Dosierung (25 µg/kg) zeigte außer zur 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe ( $p = 0,2$ ) eine signifikante Erhöhung der *c-Fos*-Expression zu allen anderen Behandlungsgruppen (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 314,44;  $p = 0,004$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel,  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel,  $p = 0,028$  vs. Vehikel + 2 µg CCK,  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK, siehe *Abbildung 3.6 C / 3.7, Tabelle 3.2*).

Die Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) mit CCK-8S in niedriger Dosierung (2 µg/kg) induzierte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der *c-Fos*-positiven Neurone im NTS im Vergleich zu den Gruppen 13 µg Ghrelin + Vehikel (~ 6,2-fach) und Vehikel + Vehikel (~ 8,0-fach) (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 150,52;  $p = 0,004$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel, siehe *Abbildung 3.6 G / 3.7, Tabelle 3.2*). Die simultane Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in hoher Konzentration (25 µg/kg) verdoppelte die *c-Fos*-Signaldichte auf einen Median von 362,44 *c-Fos*-positiven Neuronen pro Hirnschnitt (siehe *Abbildung 3.6 H / 3.7, Tabelle 3.2*). Die *c-Fos*-Expression in der 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe unterschied sich außer zur Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe ( $p = 0,2$ ) signifikant zu allen anderen Versuchsgruppen ( $p = 0,004$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel,  $p = 0,004$  vs. Vehikel + Vehikel,  $p = 0,028$  vs. Vehikel + 2 µg CCK,  $p = 0,028$  vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK). Die *c-Fos*-Signalmuster nach alleiniger CCK-8S-Injektion (2 oder 25 µg/kg) sowie nach gemeinsamer Applikation von CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) und Ghrelin (13 µg/kg) wiesen quantitative Ähnlichkeiten auf. Ghrelin (13 µg/kg) zeigte somit keinen Effekt auf die CCK-dosisabhängige *c-Fos*-Induktion im NTS.

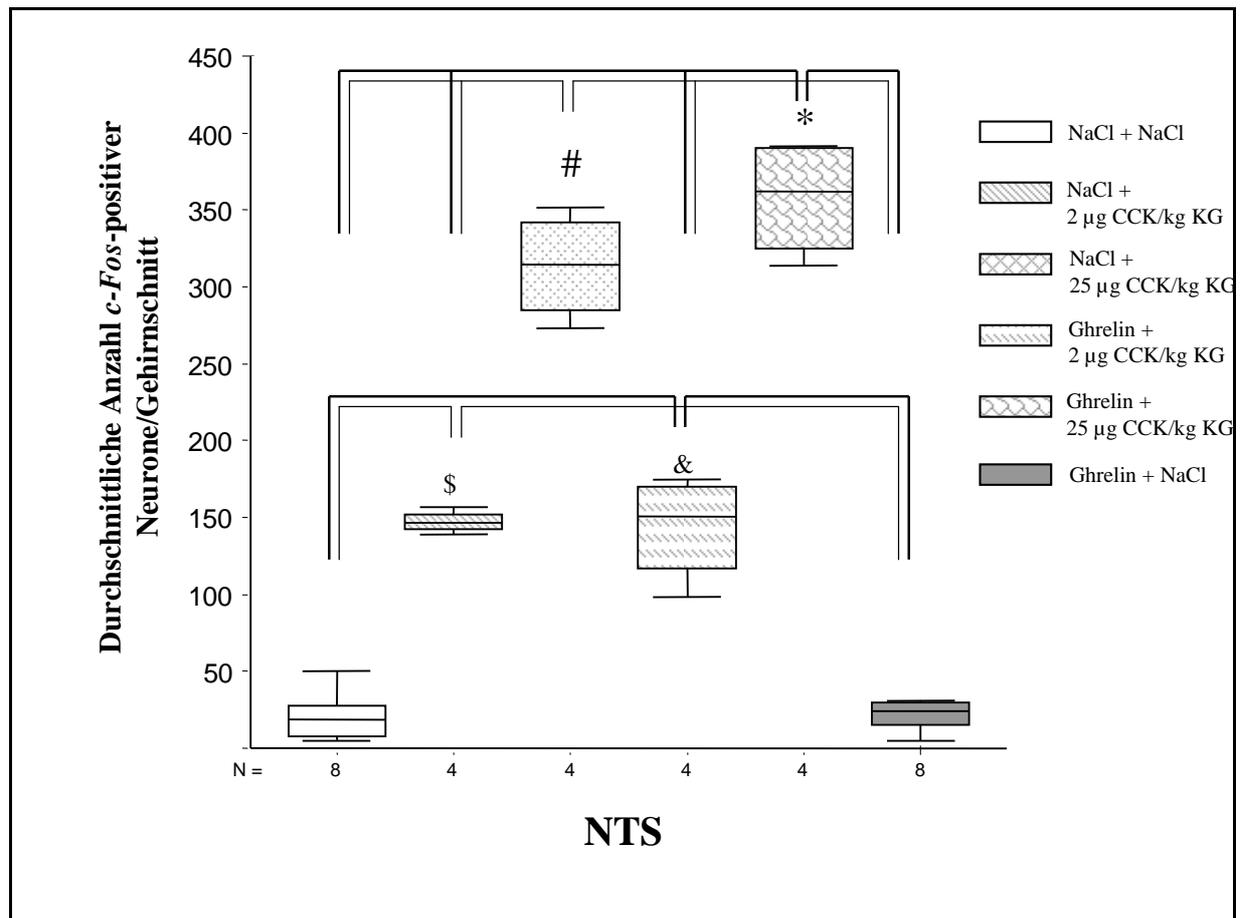
**Mikroskopische Darstellung der *c-Fos*-Expression im NTS**

CC = Canalis centralis, AP = Area postrema

**Abbildung 3.6,** Repräsentative Gehirnschnitte

*c-Fos*-positive Neurone (grüne Signale) nach intraperitonealer Injektion von 13 µg Ghrelin + Vehikel **A**, Vehikel + 2 µg CCK-8S **B**, Vehikel + 25 µg CCK-8S **C**, 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-8S **G**, 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-8S **H** und Vehikel + Vehikel **I** Gegenfärbung mit Propidiumiodid zur Lokalisation des NTS (rote Signale): 13 µg Ghrelin + Vehikel **D**, Vehikel + 2 µg CCK-8S **E**, Vehikel + 25 µg CCK-8S **F**, 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-8S **J**, 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-8S **K** und Vehikel + Vehikel **L** Die weiße Linie markiert die Region des NTS. Der weiße Balken entspricht 100 µm.

### Quantitative Darstellung der *c-Fos*-Expression im NTS



**Abbildung 3.7**

Effekte von Ghrelin und CCK-8S auf die *c-Fos*-Expression im NTS (Durchschnittliche Anzahl der *c-Fos*-positiven Neurone/Hirnschnitt).

Ghrelin (13 µg/kg) hat keinen signifikanten Effekt auf die Neuronenaktivierung im NTS. Sowohl die alleinige Applikation von CCK-8S (2 µg/kg) als auch die simultane Verabreichung von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 µg/kg) induzieren einen signifikanten Anstieg der *c-Fos*-Expression im NTS verglichen mit den Gruppen 13 µg Ghrelin + Vehikel und Vehikel + Vehikel (Vehikel + 2 µg CCK-Gruppe: §  $p < 0,05$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und Vehikel + Vehikel, 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK-Gruppe: &  $p < 0,05$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel und Vehikel + Vehikel). Die Injektion von CCK-8S in hoher Dosierung allein (25 µg/kg) und die gleichzeitige Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (25 µg/kg) steigern die Anzahl der *c-Fos*-positiven Neurone um das Doppelte. Beide Gruppen unterscheiden sich signifikant von allen anderen Gruppen (Vehikel + 25 µg CCK-Gruppe: #  $p < 0,05$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel, Vehikel + Vehikel, Vehikel + 2 µg CCK und 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; 13 µg Ghrelin + 25 µg CCK-Gruppe: \*  $p < 0,05$  vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel, Vehikel + Vehikel, Vehikel + 2 µg CCK und 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK, genaue p-Werte siehe *Tabelle 3.2*).

Die Grafik zeigt Box- und Whiskersplots (Beschreibung siehe *Abbildung 3.3*). N = Anzahl der Tiere

i.p. Behandlung	13 µg Ghrelin/kg + Vehikel (0,15 M NaCl)	Vehikel (0,15 M NaCl) + 2 µg CCK-8S/kg	Vehikel (0,15 M NaCl) + 25 µg CCK-8S/kg	13 µg Ghrelin/kg + 2 µg CCK-8S/kg	13 µg Ghrelin/kg + 25 µg CCK-8S/kg	Vehikel (0,15 M NaCl) + Vehikel (0,15 M NaCl)
<i>c-Fos</i> -positive Zellen im ARC/ Gehirnschnitt <sup>#</sup>	31,35 * <sup>&amp;</sup> % <sup>§§</sup>	5,33	11,21	13,33	12,87	9,86
<i>c-Fos</i> -positive Zellen im PVN/ Gehirnschnitt <sup>#</sup>	50,56 <sup>x</sup>	141,38 <sup>0Δ</sup>	312,27 <sup>∞+□</sup>	144,69 <sup>•◦</sup>	275,36 <sup>▲♦£</sup>	20,25
<i>c-Fos</i> -positive Zellen im NTS/ Gehirnschnitt <sup>#</sup>	24,29	146,5 <sup>αβ</sup>	314,44 <sup>γδεκ</sup>	150,52 <sup>λμ</sup>	362,24 <sup>νζπ</sup>	18,85

**Tabelle 3.2**

Im Vergleich: Anzahl der *c-Fos*-positiven Signale in den Hirnregionen ARC, PVN und NTS in den einzelnen Versuchsgruppen ( <sup>#</sup> als Median angegeben)

Im ARC:

\* p = 0,0001 vs. Vehikel + Vehikel; & p = 0,004 vs. Vehikel + 2 µg CCK; % p = 0,004 vs. Vehikel + 25 µg CCK; § p = 0,008 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; § p = 0,004 vs. 13 µg Ghrelin vs. 25 µg CCK

Im PVN:

<sup>x</sup> p = 0,016 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>0</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>Δ</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>∞</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>+</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>□</sup> p = 0,028 vs. Vehikel + 2 µg CCK; <sup>•</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>◦</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>▲</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>♦</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>£</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK

Im NTS:

<sup>α</sup> p = 0,004 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>β</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>γ</sup> p = 0,004 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>δ</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>ε</sup> p = 0,028 vs. Vehikel + 2 µg CCK; <sup>κ</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK; <sup>λ</sup> p = 0,004 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>μ</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>ν</sup> p = 0,004 vs. 13 µg Ghrelin + Vehikel; <sup>◦</sup> p = 0,004 vs. Vehikel + Vehikel; <sup>π</sup> p = 0,028 vs. Vehikel + 2 µg CCK; <sup>ρ</sup> p = 0,028 vs. 13 µg Ghrelin + 2 µg CCK

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In den verhaltensbiologischen Untersuchungen zur Nahrungsaufnahme induzierte die intraperitoneale Applikation von 13 µg/kg Ghrelin gegenüber allen anderen Versuchsgruppen innerhalb des Messzeitraums von einer Stunde eine signifikante Zunahme der aufgenommenen Nahrungsmenge in den Tieren. Dieser Effekt wurde über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Stunden durch die simultane Verabreichung mit CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) unterdrückt. CCK-8S inhibierte somit die orexigene Wirkung von Ghrelin. Die gleichzeitige Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in niedriger Konzentration (2 µg/kg) hemmte die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme sogar stärker als die simultane Gabe von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S in hoher Dosierung (25 µg/kg). Allerdings erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz.

Im zweiten immunhistologischen Teil dieser Studie führte Ghrelin (13 µg/kg) zu einer signifikant gesteigerten Neuronenaktivierung im ARC. Diese Zunahme in der *c-Fos*-Expression wurde durch die simultane Applikation mit CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) supprimiert. CCK-8S allein (2 oder 25 µg/kg) zeigte keinen Effekt auf die Neuronenaktivität im ARC.

Die Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) hatte eine signifikante Zunahme der *c-Fos*-Signaldichte im PVN, nicht aber im NTS zur Folge. CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) induzierte dosisabhängig einen signifikanten Anstieg der Anzahl an *c-Fos*-immunreaktiven Zellen im PVN und im NTS. Diese CCK-8S-aktivierten Neuronendichten zeigten nach gleichzeitiger Verabreichung von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK-8S (2 oder 25 µg/kg) keine signifikante Veränderung. CCK-8S hemmte somit auch auf zentral neuronaler Ebene die Ghrelin-gesteigerte Neuronenaktivierung im ARC, während Ghrelin keinen Einfluss auf die CCK-8S-aktivierte *c-Fos*-Expression im PVN und im NTS nahm.

## **DISKUSSION**

Das Nahrungsverhalten von Mensch und Tier wird durch viele verschiedene Peptidhormone beeinflusst. Zu ihnen gehören sowohl kurzzeit- als auch langzeitregulierende Signale, die entweder eine Nahrungsaufnahme initiieren oder beenden. Zentrale Mechanismen sind ebenfalls an der Nahrungsregulation mitbeteiligt. Es besteht daher die Annahme, dass komplexe Interaktionen zwischen dem peripheren und zentralen Nervensystem über die sogenannte „*Brain-Gut-Axis*“ das Nahrungsverhalten bestimmen.

Zu den peripheren Signalen zählen u.a. die aus dem Gastrointestinaltrakt sezernierten Peptidhormone Ghrelin und Cholezystokinin (CCK), die an der Kurzregulation des Nahrungsverhaltens beteiligt sind. Sie üben antagonistische Effekte auf die Nahrungsaufnahme aus.

Das Ziel dieser Studie war, die Interaktion zwischen dem orexigen wirkenden Ghrelin und dem anorexigen wirkenden CCK in nicht gefasteten Ratten zu untersuchen. Es sollte geprüft werden, ob CCK den orexigenen Effekt von Ghrelin beeinflusst.

Im ersten Teil der Experimente wurde das Nahrungsverhalten über einen Messzeitraum von zwei Stunden nach intraperitonealer Einzelapplikation von Ghrelin und von CCK-8S in den unterschiedlichen Konzentrationen und nach simultaner Injektion von Ghrelin und CCK-8S in den verschiedenen Dosierungen beobachtet. Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde die Neuronenaktivierung nach alleiniger Gabe von Ghrelin und von CCK-8S in den unterschiedlichen Dosen und nach gleichzeitiger Injektion von Ghrelin und ansteigender Konzentrationen von CCK-8S in den Hirnregionen ARC, PVN und NTS untersucht. Der Nachweis der Neuronenaktivierung erfolgte durch die Detektierung des *c-Fos*-Proteins.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Studie zeigten, dass CCK-8S die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme in den Tieren blockierte. Ghrelin allein führte zu einem signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme. Die simultane Applikation von Ghrelin und CCK-8S in den verschiedenen Dosierungen hingegen inhibierte diesen orexigenen Effekt von Ghrelin.

Im zweiten Teil der Studie steigerte Ghrelin allein signifikant die Neuronenaktivität im ARC. Die hohe *c-Fos*-Expression im ARC wurde nach gleichzeitiger Gabe von Ghrelin und CCK-8S in den unterschiedlichen Konzentrationen dosisunabhängig aufgehoben. Die Applikation von CCK-8S allein in ansteigender Dosierung führte konzentrationsabhängig zu einer

signifikanten Zunahme der *c-Fos*-immunreaktiven Neurone im PVN und im NTS. Diese CCK-8S-induzierten *c-Fos*-Signaldichten im PVN und im NTS veränderten sich nicht nach simultaner Injektion mit Ghrelin.

Insgesamt weisen die Resultate dieser Studie nach, dass intraperitoneal appliziertes CCK-8S die durch peripheres Ghrelin stimulierenden Effekte auf die Nahrungsaufnahme und die Neuronenaktivierung im ARC in nicht gefasteten Ratten inhibiert.

#### 4.1 Effekte von Ghrelin und CCK auf die Nahrungsaufnahme

In Übereinstimmung mit bereits bekannten Studienergebnissen (Nakazato *et al.*, 2001; Tschöp *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2001 a) führte intraperitoneal injiziertes Ghrelin auch in dieser Arbeit zu einer orexigenen Wirkung in frei gefütterten Ratten. Die minimalste Konzentration, die innerhalb von zwei Stunden die Nahrungsaufnahme signifikant steigert, beträgt 1 nmol Ghrelin pro Ratte (Wren *et al.*, 2001 a). Die in dieser Studie eingesetzte Dosierung von Ghrelin (13 µg/kg) entsprach ~ 1 nmol Ghrelin pro Ratte und induzierte einen signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme in den Versuchstieren.

Ferner zeigte die Verhaltensbiologie zur Nahrungsaufnahme, dass CCK-8S in beiden Konzentrationen (2 und 25 µg/kg) den auf die Nahrungsaufnahme stimulierenden Effekt von Ghrelin sowohl kurzfristig (innerhalb der ersten halben Stunde *post injectio*) als auch über einen längeren Zeitraum (zwei Stunden *post injectio*) hemmt. Interessanterweise war diese reduzierte Nahrungsaufnahme nach gleichzeitiger Applikation von Ghrelin und CCK-8S in beiden unterschiedlichen Konzentrationen wesentlich ausgeprägter und langfristiger als nach alleiniger CCK-8S-Gabe.

Mehrere Untersuchungen ergaben, dass sich durch CCK das Verhaltensmuster nach Eintritt der Sättigung verändert. CCK wirkte sich negativ auf die explorative Reaktion und die Spontanaktivität in Ratten aus (Antin *et al.*, 1975). In einer weiteren Studie von Billig *et al.* wurde bei Frettchen nach intravenöser Injektion von CCK-8 in den Dosierungen von 1, 5, 10 und 50 µg/kg progressive Nausea-Symptomatik beobachtet (Billig *et al.*, 2001). Außerdem konnte Morley zeigen, dass intraperitoneal applizierte Konzentrationen ab 8 µg CCK bei Versuchstieren unspezifische Effekte wie Nausea und Nahrungsaversion auslösten. Geringere Dosen als 8 µg CCK hingegen induzierten keine unspezifischen Reaktionen (Morley, 1987). So kann die in dieser Arbeit beobachtete Wirkung von 2 µg/kg CCK-8S auf die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme als peptidspezifisch bezeichnet werden.

Möglicherweise wird das nach Simultanapplikation beider Peptidhormone ausgelöste Nahrungsverhalten durch Mechanismen im Hypothalamus vermittelt. Ghrelin und CCK führen zu einer Neuronenaktivierung in verschiedenen für die Nahrungsregulation relevanten Hypothalamuskernen. Diese Unterschiede in der Neuronenaktivität konnten durch Veränderungen in der *c-Fos*-Expression nachgewiesen werden. Um die genauen Mechanismen und Wege allerdings besser verstehen zu können, sind hierzu weitere ausführlichere Studien notwendig.

## 4.2 Nahrungsregulationszentren im ZNS

Verschiedene medulläre und hypothalamische Hirnkerne scheinen an der Übermittlung von nahrungsregulierenden Signalen vom Gastrointestinaltrakt zum Gehirn involviert zu sein (Elmquist *et al.*, 1999; Flier und Maratos-Flier, 1998; Woods *et al.*, 1998). Untersuchungen ergaben, dass Läsionen des ventromedialen Hypothalamus zu einer Hyperphagie und zu einer Fettsucht führten. Läsionen des lateralen Hypothalamus hingegen lösten eine Hypophagie und einen Gewichtsverlust aus (Bray *et al.*, 1990; Flier und Maratos-Flier, 1998; Schwartz *et al.*, 2000). Somit entstand die Vorstellung, dass das ventromediale Areal des Hypothalamus für die Vermittlung eines Sättigungs-, das laterale Areal für die eines Appetitgefühls verantwortlich ist.

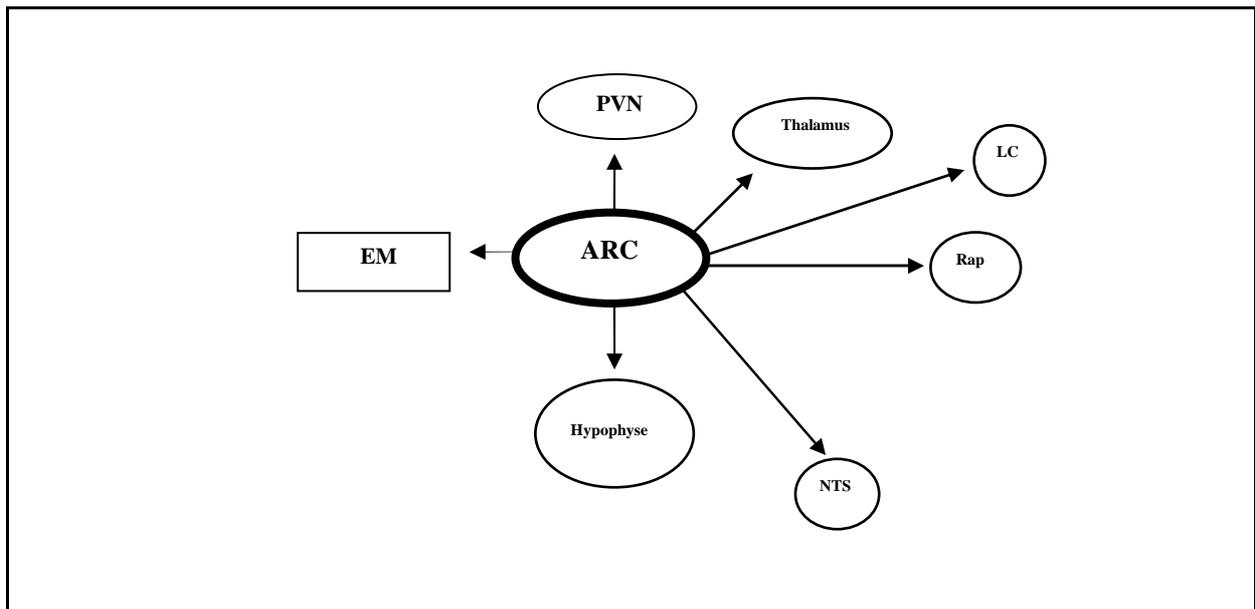
Die aus dem Gastrointestinaltrakt sezernierten Peptidhormone Ghrelin und CCK regulieren das Nahrungsverhalten, indem sie die Neuronenaktivität bestimmter Hirnkerne beeinflussen. Die Neuronenaktivierung kann durch spezifische *c-Fos*-Muster im Gehirn dargestellt werden. *c-Fos* gehört zu den „*immediately early genes*“, die nach extrazellulärer Stimulation das intranukleäre *c-Fos*-Protein exprimieren. Anhand dieser *c-Fos*-Signalexpression wird Neuronenaktivierung detektiert.

Da Ghrelin und CCK jeweils in bestimmten Hirnregionen *c-Fos*-Proteine exprimieren, besteht die Annahme, dass die nahrungsregulierende Interaktion zwischen diesen beiden Peptidhormonen zu Veränderungen in ihren spezifischen neuronalen Aktivierungsmustern im Hypothalamus und Hirnstamm führt. Im Mittelpunkt dieser Studie stehen die Kerngebiete ARC, PVN und NTS.

#### 4.2.1 Der Nucleus arcuatus (ARC)

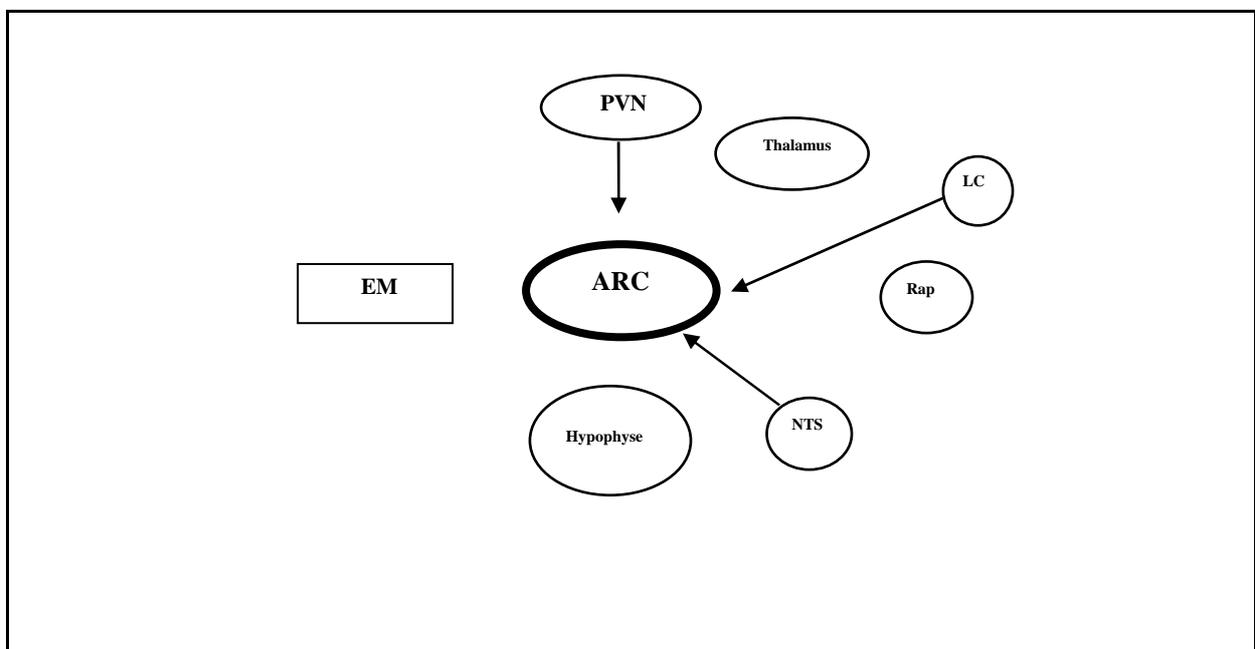
Der ARC liegt am Boden des ventralen Teils des dritten Ventrikels und umschließt die Eminentia mediana (Chronwall, 1985; Luiten *et al.*, 1985). Diese Kernregion enthält vor allem parvozelluläre Zellen und lässt sich in drei Zellgruppen einteilen: dorsomedial, ventromedial und ventrodorsal (Meister *et al.*, 1989). Sie unterscheiden sich in ihren Transmittern, zu denen Neuropeptide wie Dopamin, Somatostatin, Neurotensin, GABA, POMC, alpha-MSH, CART, AgrP und NPY gehören.

Der ARC projiziert zu vielen anderen Hirnkernen. Es bestehen besonders viele Verbindungen zum PVN, die unter dem Begriff der *Arcuato-Paraventriculären Achse* zusammengefasst werden (Bai *et al.*, 1985; Baker und Herkenham, 1995; Bell *et al.*, 2000; Legradi und Lechan, 1998). Sie ist für die Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigung mitverantwortlich. Weitere Efferenzen des ARC existieren zur Hypophyse und zur Eminentia mediana (Koenig, 1990; Larsen *et al.*, 1994; Williams, 1996), zu den Nuclei raphe dorsalis, magnus und pallidus, zum Locus coeruleus, zu den Nuclei tractus solitarius, dorsalis n. vagi und parabrachialis, zum limbischen System und zum Thalamus (Grijalva und Novin, 1990; Lantos *et al.*, 1995; Sim und Joseph, 1991, siehe *Abbildung 4.1*). Seine Afferenzen erhält der ARC vom PVN, vom limbischen System und von dem im Hirnstamm gelegenen Locus coeruleus und dorsalen vagalen Komplex (DVC) (Chronwall, 1985; Grijalva und Novin, 1990; Gruber *et al.*, 1987; Magoul *et al.*, 1993, siehe *Abbildung 4.2*). Außerdem wird angenommen, dass der ARC selbst über Afferenzen mit seinen bilateralen Nuclei verknüpft ist (Grundy, 1994).



**Abbildung 4.1**

Schematische Darstellung der Efferenzen des ARC

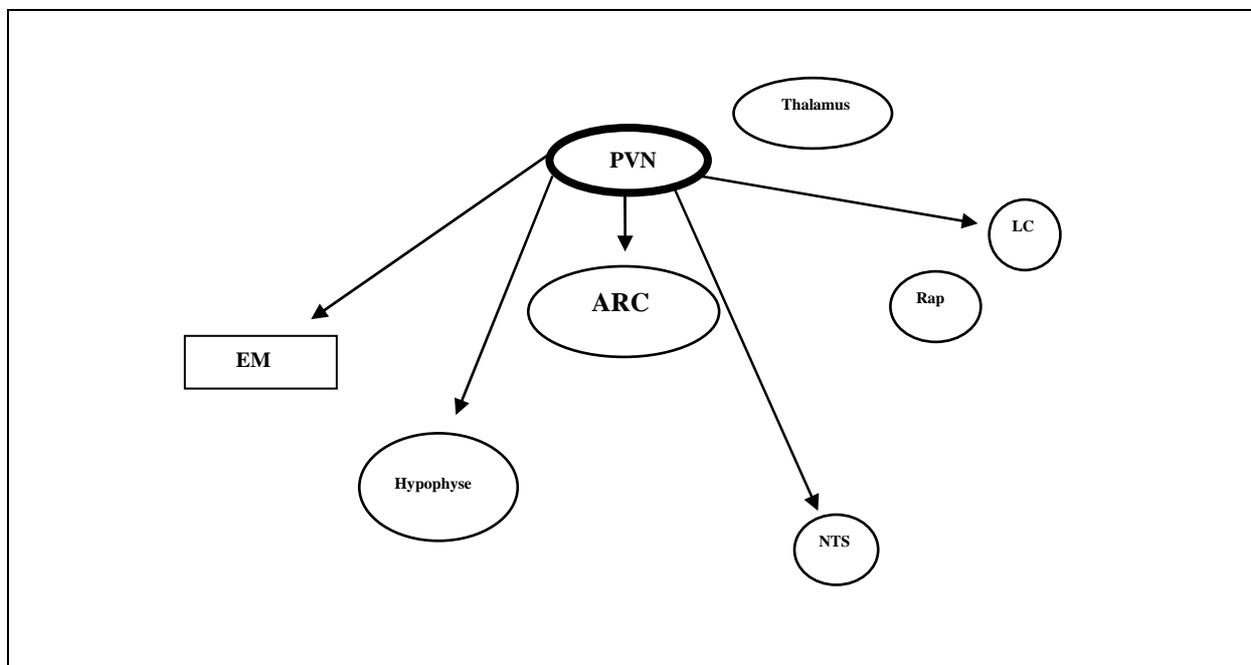


**Abbildung 4.2**

Schematische Darstellung der Afferenzen des ARC

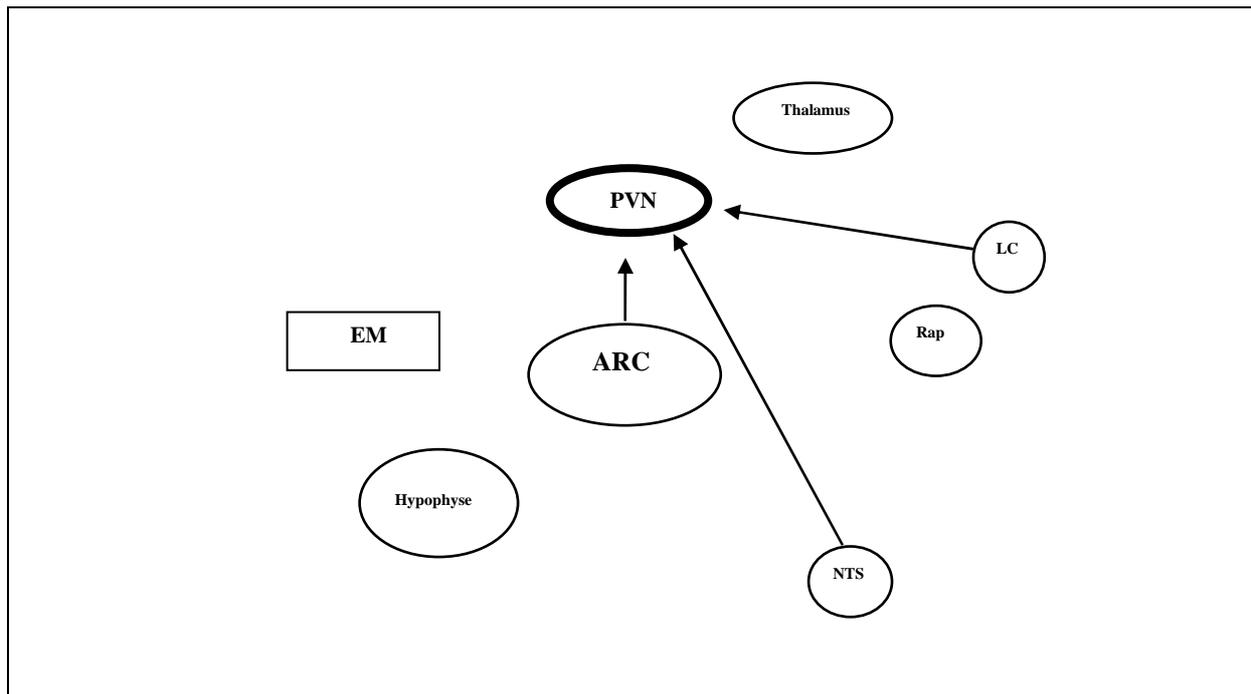
#### 4.2.2 Der Nucleus paraventricularis (PVN)

Der PVN liegt an der basalen Seitenwand des dritten Ventrikels und lässt sich in magno- und parvozelluläre Zellen unterscheiden. Die magnozellulären Zellen befinden sich anteromedial, besitzen Verbindungen zur Neurohypophyse und enthalten Neurotransmitter wie Oxytocin und Vasopressin (Armstrong, 1995; Ferguson *et al.*, 1984). Die parvozellulären Zellen werden in eine mediale und eine posteriore Gruppe eingeteilt. Der mediale Teil projiziert zur Eminentia mediana und enthält die Neuropeptide CRF (*Corticotropin-Releasing Factor*), TRH (*Thyreoida-Releasing Hormone*) und Arginin-Vasopressin (Armstrong, 1995; Daikoku *et al.*, 1989). Die posteriore Gruppe besitzt Verbindungen zum Locus coeruleus, zum DVC und zu präganglionären autonomen Neuronen des Rückenmarks (Armstrong, 1995; Grijalva und Novin, 1990; Lang *et al.*, 1983; Mönnikes *et al.*, 1994, siehe *Abbildung 4.3*). Wie bereits beschrieben bestehen Projektionen zum ARC. Afferenzen erhält der PVN vom ARC, vom Locus coeruleus, vom Hirnstamm und vom NTS (Armstrong, 1995; Bai *et al.*, 1985; Jain *et al.*, 1998; Sawchenko *et al.*, 1985; Ter Horst *et al.*, 1989, siehe *Abbildung 4.4*).



**Abbildung 4.3**

Schematische Darstellung der Efferenzen des PVN



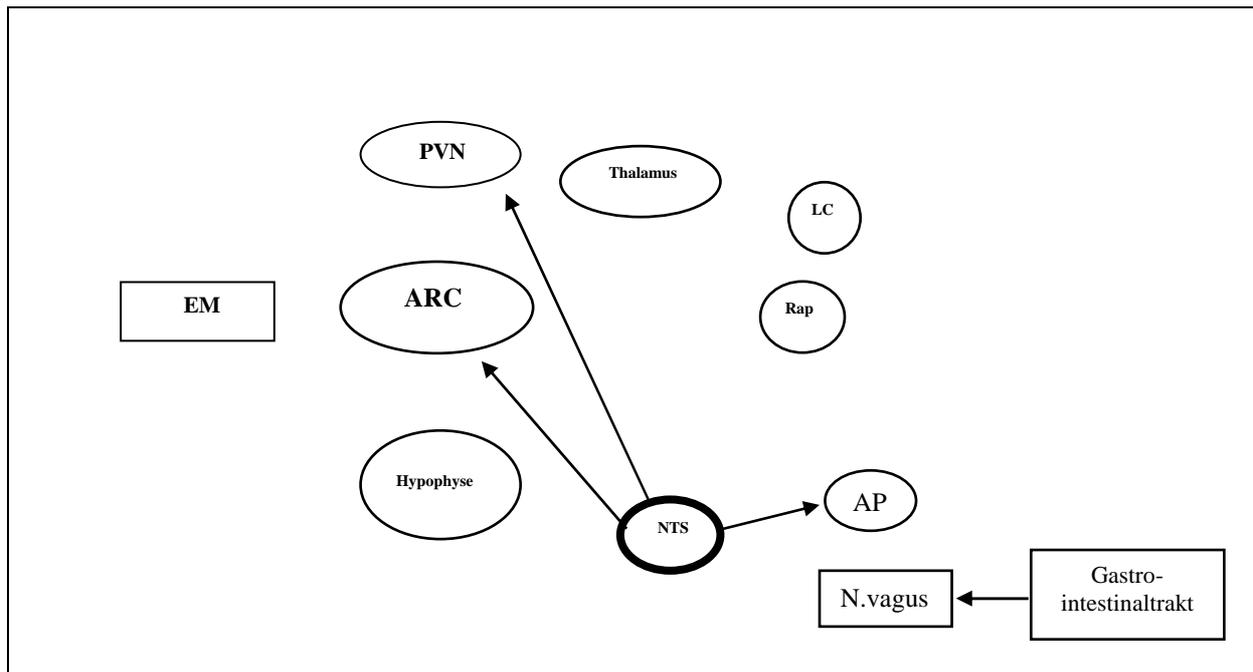
**Abbildung 4.4**

Schematische Darstellung der Afferenzen des PVN

### 4.2.3 Der Nucleus tractus solitarius (NTS)

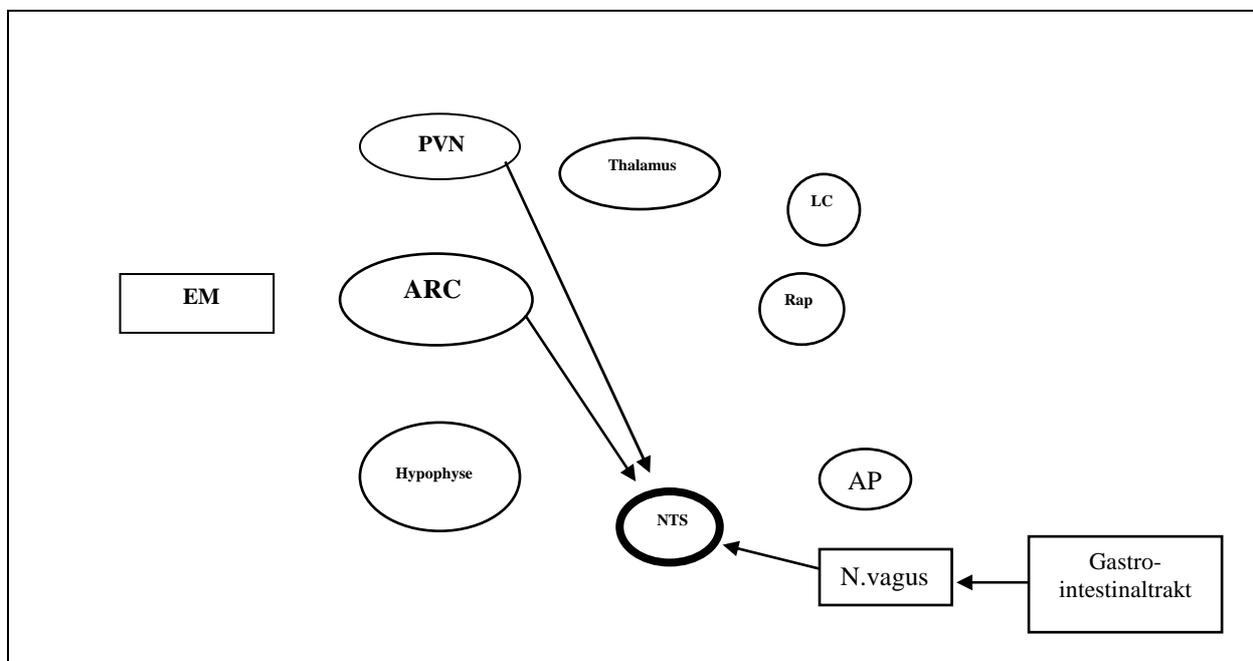
Der NTS liegt im Hirnstamm und erhält Afferenzen des N.vagus. Der N.vagus gilt als die parasympathische Hauptverbindung zwischen dem zentralen Nervensystem und dem Gastrointestinaltrakt. Der N.vagus beeinflusst neben der Motilität und Sphinkterfunktion des Gastrointestinaltrakts, die Sekretion des Magens, des Darms, des Pankreas, der Leber und der Lunge. Er enthält zu 75% afferente viszerale und zu 25% efferente Fasern, dessen Ursprünge im Ncl. ambiguus und im DVC zu finden sind. Dem DVC gehören der Ncl. dorsalis n.vagi, die Area postrema und der NTS an.

Im NTS enden die Axone der afferenten Fasern des N.vagus, die Informationen von Mechano- und Chemorezeptoren des Gastrointestinaltrakts tragen. Weitere Verbindungen existieren zur AP (Hay und Bishop, 1991) und zum Hypothalamus (Holstege, 1987; Olson *et al.*, 1992). Bei den letztgenannten handelt es sich um reziproke Projektionen zwischen NTS und den Hypothalamuskernen ARC und PVN (Sawchenko *et al.*, 1985; Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1984; Ter Horst *et al.*, 1984 und 1989, siehe *Abbildungen 4.5/4.6*).



**Abbildung 4.5**

Schematische Darstellung der Efferenzen des NTS



**Abbildung 4.6**

Schematische Darstellung der Afferenzen des NTS

### 4.3 Effekte von Ghrelin und CCK auf die Neuronenaktivität

Während Ghrelin eine *c-Fos*-Expression in den Hirnkernen ARC (Hewson und Dickson, 2000) und PVN (Rüter *et al.*, 2003) induziert, stimuliert CCK eine neuronale Aktivierung im PVN (Olson *et al.*, 1992) und NTS (Chen *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1994; Mönnikes *et al.*, 1997). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass intraperitoneal injiziertes Ghrelin keinen Einfluss auf die intraperitoneal applizierte CCK-induzierte *c-Fos*-Expression im PVN und im NTS hat. Wie bereits beschrieben (Rüter *et al.*, 2003), führte Ghrelin allein auch hier nicht zu einer Neuronenaktivierung im NTS. CCK-8S in den verwendeten Konzentrationen von 2 und 25 µg/kg hingegen reduzierte signifikant 90 Minuten *post injectio* den durch intraperitoneal appliziertes Ghrelin-stimulierten Anstieg der *c-Fos*-Dichte im ARC. Sowohl die Injektion von Ghrelin mit der niedrigeren als auch mit der höheren CCK-8S-Dosierung führten quantitativ zu einem ähnlichen positiven *c-Fos*-Signalmuster im ARC. Eine geringe Dosis von CCK scheint ausreichend zu sein, um die Ghrelin-induzierte Zunahme der *c-Fos*-positiven Neurone im ARC zu hemmen.

Die Wirkung von Ghrelin auf Neurone im ARC wurde in weiteren Studien untersucht. Wie bereits erwähnt, zeigten Hewson und Dickson, dass die periphere Applikation von Ghrelin bei Ratten zu einem Anstieg der *c-Fos*-positiven Neurone im ARC führte (Hewson und Dickson, 2000). In Untersuchungen mit Mäusen wurde in der Mehrheit der nach Ghrelin-Applikation *c-Fos*-positiv markierten ARC-Neurone das Neuropeptid Y (NPY) nachgewiesen (Wang *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Kollokalisierung scheint der ARC an der Initiation der Nahrungsaufnahme beteiligt zu sein. NPY wird in Neuronen des ARC produziert, über Projektionen zum PVN weitergeleitet und dort sezerniert. Dieses orexigen wirkende Peptid führt nach zentraler Gabe zu einer Zunahme der Nahrungsmenge und des Körpergewichts (Clark *et al.*, 1984; Kalra und Kalra, 2003; Stanley *et al.*, 1989). Während sechs verschiedene NPY-Rezeptortypen (Y1-Y6) existieren, kann eine Nahrungsaufnahme nur über die Bindung an die Subtypen Y1 und Y5 induziert werden (Stanley *et al.*, 1992).

Zusätzlich trägt das *Agouti-related Protein* (AgrP) zur Nahrungsregulation durch Ghrelin bei. AgrP weist ebenfalls eine Kollokalisierung mit NPY im ARC auf (Kamegai *et al.*, 2001; Seoane *et al.*, 2003). Dieser endogene Melanocortin-4-Antagonist supprimiert den anorexigenen Effekt des  $\alpha$ -Melanocyten-stimulierenden Hormons (Yang und Harmon, 2003; Rowland, 2004) und führt somit zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme. Die Vorbehandlung mit NPY-/AgrP-Antikörpern und -Antagonisten hob die Ghrelin-gesteigerte Nahrungsaufnahme in Ratten auf (Nakazato *et al.*, 2001). Eine CCK-vermittelte Inhibition dieser orexigen

wirkenden NPY-/AgrP-Neurone im ARC könnte eine Ursache sein, dass CCK die Ghrelin-stimulierte Nahrungsaufnahme unterdrückt. Die Arbeitsgruppe um Pages beobachtete, dass intraperitoneal appliziertes CCK-8S die NPY-Expression im Hypothalamus reduziert (Pages *et al.*, 1990). Außerdem führte die Applikation von CCK-8S zu einer Aktivierung von anorexigen wirkenden POMC-enthaltenen Neurone im NTS (Fan *et al.*, 2004). Weitere elektrophysiologische Studien zeigten, dass Ghrelin die sättigungsvermittelnden POMC-Neurone im ARC inaktiviert (Riediger *et al.*, 2003). Es bleibt jedoch weiterhin unklar, welche Signalwege und Mechanismen definitiv dem Effekt von Ghrelin auf den ARC zugrunde liegen.

Diese Studie konnte nachweisen, dass die verwendeten CCK-8S-Konzentrationen (2 und 25 µg/kg) sowohl den Ghrelin-induzierten Anstieg der *c-Fos*-Expression im ARC als auch die Ghrelin-stimulierte Nahrungsaufnahme reduzierten. Grill und Smith stellten in ihren Untersuchungen fest, dass der Effekt von CCK auf die Nahrungsaufnahme über Hirnstamm-Mechanismen vermittelt wird (Grill und Smith, 1988). Hirnkern-Schädigungen im Hirnstamm und Hypothalamus veränderten das CCK-induzierte Nahrungverhalten. Nach bilateraler Trennung des ventral vom NTS gelegenen Mittelhirns blieb die Nahrungsaufnahme-inhibierende Wirkung von CCK aus (Crawley *et al.*, 1984). Die Destruktion des PVN (Crawley und Kiss, 1985) oder des hypothalamischen dorsomedialen Nucleus (Bellinger und Bernadis, 1984; Bellinger *et al.*, 1983) führte zu einer Abschwächung der CCK-inhibierenden Wirkung auf die Nahrungsaufnahme.

In Übereinstimmung mit vorherigen Studien (Olson *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1993; Day *et al.*, 1994; Rinaman *et al.*, 1995; Mönnikes *et al.*, 1997) induzierte CCK-8S auch in dieser Arbeit 90 Minuten *post injectio* einen signifikanten Anstieg der *c-Fos*-Expression im PVN und im NTS. Diese Kerngebiete scheinen eine hemmende Wirkung auf die Neuronenaktivierung im ARC zu haben. Sowohl der PVN als auch der NTS besitzen direkte Projektionen zum ARC (Chronwall, 1985; Grijalva und Novin, 1990; Gruber *et al.*, 1987; Magoul *et al.*, 1993). Möglicherweise wird der inhibierende Einfluss von CCK auf die Ghrelin-induzierte Neuronenaktivierung im ARC durch Afferenzen vom PVN und/oder NTS vermittelt.

#### 4.4 Die Rolle des N.vagus und der Blut-Hirn-Schranke

Neuere Studien zeigen, dass der N.vagus eine wichtige Rolle in der Signalübermittlung zwischen peripherem Ghrelin und dem ARC spielt. Die Arbeitsgruppe um Date wies nach, dass sowohl eine subdiaphragmatische oder gastrale Vagotomie als auch eine perivagale Capsaicin-Behandlung den nach intravenöser Ghrelin-Applikation induzierten Anstieg der *c-Fos*-Dichte im ARC abschwächten. In diesen vagotomierten Tieren nahm ebenfalls nach Injektion von Ghrelin die Nahrungsaufnahme signifikant ab (Date *et al.*, 2001).

Auch der sättigende Effekt von niedrigdosiertem CCK wird über vagale Afferenzen vermittelt. Sowohl eine abdominal durchgeführte Vagotomie (Smith *et al.*, 1981) als auch eine Vorbehandlung mit Capsaicin (Ritter und Ladenheim, 1999) reduzierten den inhibierenden Effekt von CCK auf die Nahrungsaufnahme.

Der Arbeitsgruppe um Date gelang der immunhistochemische Nachweis der Kolo-kalisation von GHS-Rezeptoren und CCK-A-Rezeptoren in afferenten Fasern des N.vagus (Date *et al.*, 2005). Der N.vagus scheint somit die Schlüsselfigur in der Interaktion von Ghrelin und CCK zu sein, die in dieser Arbeit nach Simultanapplikation von Ghrelin und CCK zu einer CCK inhibierenden Wirkung von Ghrelin geführt haben könnte. Elektrophysiologische Studien zeigten gegensätzliche Effekte von Ghrelin und CCK auf Neuronenentladungen in gastralen vagalen Afferenzen. Normalerweise entladen sich die vagal afferenten Fasern, die unter dem Einfluss von sensorischen Inputs stehen, kontinuierlich niedrig-frequent und spontan (Iggo, 1955). Während Ghrelin in einer appetitstimulierenden Konzentration diese vagalen Neuronenentladungen unterdrückt (Date *et al.*, 2001), steigert CCK die Rate dieser afferenten Neuronenentladungen (Gibbs und Smith, 1988; Schwartz *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen zur Auswirkung auf gastrale vagal afferente Einheiten ergaben, dass Ghrelin sowohl einen hemmenden als auch stimulierenden Effekt auf die vagal afferente Neuronenaktivität besitzt, während CCK eine konstante stimulierende Wirkung ausübt (Adelson *et al.*, 2004).

Neben dem vagal afferenten Signalweg stellt die Blut-Hirn-Schranke einen weiteren möglichen Mechanismus bezüglich der Interaktion zwischen Ghrelin und CCK dar. Die Blut-Hirn-Schranke ist für bestimmte Moleküle durchlässig. Verantwortlich hierfür sind u.a. selektive Transportsysteme in den Kapillarendothelien (Strader und Woods, 2005). Banks *et al.* zeigten in ihrer Studie, dass humanes oktanoyliertes Ghrelin über ein Transportsystem die Blut-Hirn-Schranke bei Mäusen überschreiten kann (Banks *et al.*, 2002). Zusätzlich wird angenommen, dass Ghrelin über die Eminentia mediana, einer Hirnstruktur mit defizienter

Blut-Hirn-Schranke, das Gehirn erreicht. Ghrelin würde somit als direkter Mediator Neurone im ARC aktivieren. Ein Transportmechanismus für CCK über die Blut-Hirn-Schranke hingegen ist noch nicht gefunden worden. Burdakov und Ashcroft konnten aber *in vitro* an Mäuse-Gehirnschnitten nachweisen, dass bereits niedrige CCK-Konzentrationen (im picomolaren Bereich) zu einer rapiden und reversiblen Verlangsamung der Impulsrate von Typ C-Neuronen des ARC führen (Burdakov und Ashcroft, 2002). Wie für Ghrelin angenommen, erreicht CCK ebenfalls über die Eminentia mediana das Gehirn. Allerdings sind auch hier weitere elektrophysiologische Studien nötig, um zeigen können, dass peripheres CCK tatsächlich direkt zentrale Ghrelin-sensitive ARC-Neurone inhibiert. Die Ergebnisse dieser Studie haben belegt, dass peripheres CCK die Aktivierung von Ghrelin-induzierten ARC-Neuronen hemmt. Dieser hypothalamische Mechanismus könnte eine Ursache für die Aufhebung der Ghrelin-induzierten Nahrungsaufnahme sein.

Die erst vor kurzem veröffentlichte Studie von Date *et al.* untersuchte die Interaktion von Ghrelin und CCK sowohl in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)- als auch in Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO)-Ratten. In OLETF-Ratten, die defekte CCK-A-Rezeptoren aufweisen, führte die intravenöse Applikation von CCK im Vergleich zu LETO-Ratten, welche intakte CCK-A-Rezeptoren besitzen, nicht zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme. Intravenös verabreichtes Ghrelin hingegen steigerte in den nachfolgenden zwei Stunden die aufgenommene Nahrungsmenge in beiden Gruppen. Während die Vorbehandlung mit CCK in LETO-Ratten die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme blockierte, blieb diese in OLETF-Ratten aus. Andersrum schwächte die Vorbehandlung mit Ghrelin in LETO-Ratten die CCK-reduzierte Nahrungsaufnahme ab. Ferner bestätigte die Arbeitsgruppe um Date das in dieser Studie herausgearbeitete Ergebnis, dass die periphere simultane Injektion von Ghrelin und CCK die Ghrelin-induzierte *c-Fos*-Expression im ARC inhibiert. Wie bereits erwähnt, gelang ihnen zuvor der immunhistochemische Nachweis der Kolo-kalisation von GHS-Rezeptoren und CCK-A-Rezeptoren in afferenten Fasern des N.vagus (Date *et al.*, 2005). Diese Resultate sprechen für eine nicht unbedeutende Beteiligung des N.vagus an der Nahrungsregulation. Als weitere nahrungsregulierende Faktoren kommen vermutlich das Gleichgewicht der Plasmakonzentrationen von Ghrelin und CCK und die Wechselwirkung zwischen GHS-R und CCK-A-R in Frage.

#### 4.5 Durchführung der Studie mit gefasteten versus nicht gefasteten Tieren

Um Verfälschungen der *c-Fos*-Expression im Gehirn allein durch die Nahrungsaufnahme zu vermeiden (Wang *et al.*, 2002), erhielten die Tiere in dieser Studie über einen Zeitraum von 90 Minuten nach Peptidapplikation keine Nahrung.

Cullinan *et al.* zeigten, dass akuter Stress (Schwimmen) einen Anstieg der *c-Fos*-Expression besonders im lateralen Teil des ARC hervorruft (Cullinan *et al.*, 1995). Dass Nahrungsentzug zu einer stressinduzierten Erhöhung der *c-Fos*-Expression im ARC führt, ist unwahrscheinlich. Diese vorliegende Arbeit bestätigte die Ergebnisse anderer Gruppen (Hewson und Dickson, 2002; Wang *et al.*, 2002), dass nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin eine vermehrte *c-Fos*-Expression, insbesondere im medialen ARC, aber auch in geringerem Maße im lateralen ARC zu beobachten war.

Ein anorexigener Effekt von CCK fand nur unter bestimmten Versuchsbedingungen wie 16-stündiges Fasten vor Experimentbeginn statt (Silver und Morley, 1991; Voigt *et al.*, 1996). Der verhaltensbiologische Teil dieser Arbeit bezüglich Initiation und Beenden der Nahrungsaufnahme wurde in nicht gefasteten Ratten durchgeführt. Während der ersten halben Stunde nach CCK-Gabe konnte zwar eine Reduktion in der Nahrungsaufnahme beobachtet werden, die allerdings nicht von statistischer Signifikanz war. In der Mehrzahl von Experimenten, in denen sich eine inhibierende Wirkung von peripherem CCK zeigte, sind gefastete Tiere eingesetzt worden, um nach Nahrungsangebot ein Beenden einer Hyperphagie zu erzielen (Barrachina *et al.*, 1997; McMinn *et al.*, 2000). Daher ist der nicht gefastete Zustand der Tiere in dieser Arbeit eine mögliche Ursache für das Fehlen einer signifikanten Reduktion der Nahrungsaufnahme nach Applikation beider CCK-8S-Dosierungen. Allerdings war die Durchführung dieser Studie mit nicht gefasteten Tieren notwendig. Nur unter diesen Experimentbedingungen konnte ein Ghrelin-Stimulus ausgelöst werden (Wren *et al.*, 2000).

#### 4.6 Interaktion mit anderen Neuropeptiden

Einige Studien unterstützen die Annahme, dass peripheres Ghrelin nicht nur mit CCK-verwandten Mechanismen in der Nahrungsregulation, sondern auch mit weiteren an der Energiehomöostase beteiligten Neuropeptiden interagiert. Die Arbeitsgruppe um Hewson beobachtete nach der intravenösen Verabreichung vom *Growth-Hormone Releasing Peptide* (GHRP-6) einen Anstieg der *c-Fos*-positiven Neurone im ARC. Dieser Effekt von GHRP-6, einem synthetischen *Growth-Hormone Secretagogue*, wurde durch die zentrale Gabe von Leptin reduziert (Hewson *et al.*, 2002). Die Neurone im ARC, die sich nach der peripheren Applikation von Ghrelin als *c-Fos*-positiv herausstellten, tragen neben dem NPY den Leptin Rezeptor (Ob-R). Ferner konnte elektrophysiologisch gezeigt werden, dass Ghrelin die elektrische Aktivität in einem Großteil der ARC-Neurone stimulierte, Leptin hingegen diese inhibierte (Träbert *et al.*, 2002). Diese Tatsachen weisen verstärkt auf eine Interaktion zwischen Ghrelin und Leptin in der Nahrungsregulation hin. Leptin zählt zu den Langzeitregulatoren in Bezug auf Nahrungsverhalten und Körpergewicht. Seine Plasmakonzentration korreliert mit der Körperfettmasse. Es wird in Adipozyten gebildet (Zhang *et al.*, 1994), an die Blutbahn sezerniert und erreicht nach Penetration der Blut-Hirn-Schranke über einen gesättigten Transportmechanismus den Hypothalamus (Banks *et al.*, 1996). Hier bindet Leptin an seinen Ob-Rezeptor und löst eine anorexigene Wirkung aus. In einer Studie von Nakazato *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass in frei gefütterten Ratten die intrazerebroventrikuläre Applikation von Leptin die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme inhibiert. In mit Leptin vorbehandelten Tieren hingegen hob Ghrelin die Leptin-vermittelte Reduktion in der Nahrungsaufnahme auf (Nakazato *et al.*, 2001). Somit scheint Ghrelin den Leptin-Effekt über das NPY-System zu antagonisieren. Leptin hemmt NPY- und AgrP-haltige Neurone im Hypothalamus (Schwartz *et al.*, 1996, Mizuno und Mobbs, 1999) und aktiviert POMC-Neurone (Mizuno *et al.*, 1998). Diese beschriebenen Effekte von Leptin weisen Parallelen mit CCK auf. CCK wirkt ebenfalls anorexigen, inhibiert NPY-Neurone im Hypothalamus und stimuliert POMC-Neurone im NTS. In dieser Studie führte CCK, wie bereits für Leptin beschrieben, zu einer Blockierung der Ghrelin-stimulierten Nahrungsaufnahme und zu einer Reduktion der Ghrelin-induzierten *c-Fos*-Expression im ARC. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Interaktion von Ghrelin, Leptin und CCK besser verstehen zu können.

In der Nahrungsregulation sind bereits auch synergistische Interaktionen zwischen dem Kurzzeitsignal CCK und dem Langzeitsignal Leptin nachgewiesen worden. Die anorexigene

Wirkung von CCK wurde durch die Koadministration von Leptin gefördert. Neben einer verstärkten Reduktion der kurzzeitigen Nahrungsaufnahme (Barrachina *et al.*, 1997) konnte eine vermehrte Abnahme des Körpergewichts (Matson *et al.*, 2000) beobachtet werden. Außerdem stimulieren CCK und Leptin sich gegenseitig. Nach Applikation von CCK erfolgte eine Freisetzung von Leptin aus den Hauptzellen im Magenfundus (Attoub *et al.*, 1999; Tsunoda *et al.*, 2003), einem weiteren Synthesort von Leptin. Leptin selbst führte zu einer Sekretion von CCK aus endokrinen I-Zellen des Duodenums und des Jejunums (Guilmeau *et al.*, 2003). Elektrophysiologische Studien von Shintani *et al.* zeigten, dass die Koinjektion von CCK und Leptin die Entladungsrate an gastralen vagalen afferenten Nervenendigungen steigert. Diese Simultangabe löste zudem eine Zunahme der neuronalen Aktivität im PVN, im NTS und in der AP aus (Shintani *et al.*, 2001). Der N.vagus könnte für die Interaktion zwischen CCK und Leptin verantwortlich sein. Buyse *et al.* wiesen Leptin-Rezeptoren, die sogenannten Ob-Rezeptoren, im Ganglion nodosum (enthält Zellkörper von vagalen Afferenzen) und im NTS nach (Buyse *et al.*, 2001). Diese würden zusammen mit den CCK-A Rezeptoren, die ebenfalls in vagalen Afferenzen identifiziert worden sind, in Wechselwirkung treten. Ferner scheint CCK auf die Existenz von Leptin und seinen Ob-Rezeptoren angewiesen zu sein. Untersuchungen stellten fest, dass in Leptin-defizienten adipösen ob/ob Mäusen und fa/fa Zucker Ratten mit Missense-Mutation im Leptin-Rezeptor die Nahrungsaufnahme nach peripherer Injektion von CCK nicht frühzeitig beendet wurde (Campfield *et al.*, 1995). Welchen Einfluss Leptin wirklich in der Interaktion zwischen Ghrelin und CCK hat, bleibt in dieser Studie unbeantwortet.

Es existiert ein weiteres Peptidhormon, welches CCK in seinen Effekten sehr ähnelt. Hierbei handelt es sich um *Peptide Tyrosine-Tyrosine* (PYY<sub>3-36</sub>). Wie NPY gehört PYY<sub>3-36</sub> zur Familie der pankreatischen Polypeptide, das in L-Zellen des distalen Ileums und des Kolons gebildet wird. Die Freisetzung erfolgt wie bei CCK nach Nahrungsaufnahme, insbesondere von Lipiden, zunächst in der Form von PYY<sub>1-36</sub>, welches durch das Enzym Dipeptidyl-Peptidase IV in PYY<sub>3-36</sub> umgewandelt wird (Mentlein *et al.*, 1993). Es inhibiert sowohl die gastrointestinale Motilität als auch die Sekretion von Flüssigkeit und Elektrolyten in den Dünndarm (Adrian *et al.*, 1987). PYY kann die Blut-Hirn-Schranke frei passieren (Nonaka *et al.*, 2003) und bindet an den Subtyp Y2 der NPY-Rezeptor Familie, der im Hypothalamuskerngebiet ARC lokalisiert wurde (Larhammar, 1996). Während die intrazerebroventrikuläre Applikation von PYY<sub>3-36</sub> zu einem Anstieg der Nahrungsaufnahme in Ratten führte (Stanley *et al.*, 1985), reduzierte die periphere Gabe von PYY<sub>3-36</sub> die

Nahrungsaufnahme (Batterham *et al.*, 2002). Nach direkter Injektion von PYY<sub>3-36</sub> in den ARC konnte ebenfalls eine Hemmung der Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden. Dieser anorexigene Effekt von PYY<sub>3-36</sub> lässt sich, wie bereits für CCK beschrieben, wahrscheinlich einerseits auf eine Inhibition der NPY-Expression, andererseits auf eine Stimulation der POMC-Expression im ARC zurückführen (Batterham *et al.*, 2002). Die Existenz von Y2-Rezeptoren scheint hier obligat zu sein, da die periphere Injektion von PYY<sub>3-36</sub> an Y2-defiziente Mäuse keine Reduktion der Nahrungsaufnahme induzierte (Batterham und Bloom, 2003). Weiterhin könnte der N.vagus an der sättigenden Vermittlung von PYY<sub>3-36</sub> mitbeteiligt sein. Koda *et al.* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass eine abdominale Vagotomie bei Ratten die anorexigene Wirkung von PYY<sub>3-36</sub> aufhob. Außerdem wiesen sie neben Y2-Rezeptoren im Ganglion nodosum eine Stimulation der gastralen vagalen Afferenzen durch PYY<sub>3-36</sub> nach. Die bilaterale Durchtrennung rostral des NTS führte zu einer Abschwächung der PYY<sub>3-36</sub>-induzierten Reduktion auf die Nahrungsaufnahme (Koda *et al.*, 2005). Somit scheint dieses Peptidhormon sowohl über direktem Wege zum Gehirn als auch indirekt über den N.vagus seine nahrungsregulierende Wirkung zu entfalten.

Die Arbeitsgruppe von Adams *et al.* untersuchten die Interaktion zwischen PYY<sub>3-36</sub> und Ghrelin in Mäusen. Nach Koinjektion beider Peptidhormone unterdrückte PYY<sub>3-36</sub> die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme (Adams *et al.*, 2004). Hierfür könnte der Nachweis, dass PYY Ghrelin-aktivierte Neurone im ARC inhibiert und zu einer geringeren *c-Fos*-Expression im ARC führt, verantwortlich sein (Riediger *et al.*, 2004). Die Beobachtungen der Studie mit Ghrelin und dem anorexigen PYY<sub>3-36</sub> weisen deutliche Parallelen mit den Ergebnissen dieser mit Ghrelin und dem anorexigenen CCK durchgeführten Studie überein. Auch CCK inhibierte sowohl die Ghrelin-stimulierte Nahrungsaufnahme als auch die Ghrelin-induzierte Neuronenaktivierung, bzw. die *c-Fos*-Expression im ARC. Welche genauen hypothalamischen und/oder vagalen Mechanismen in der Wechselwirkung zwischen dem orexigen wirkenden Ghrelin und den anorexigen wirkenden Peptiden CCK und PYY<sub>3-36</sub> zugrunde liegen, bleibt unbekannt.

Eine neue Studie von Kobelt *et al.* untersuchte die Interaktion von Ghrelin und dem anorexigenen Bombesin, einem aus Amphibien extrahierten Peptid. Wie CCK hemmte Bombesin den nahrungsaufnahmesteigernden Effekt von Ghrelin. Es konnte allerdings keine Reduktion der Ghrelin-induzierten *c-Fos*-Expression im ARC festgestellt werden. Dagegen führte die simultane Applikation von Ghrelin und Bombesin zu einer signifikanten erhöhten *c-Fos*-Signaldichte im PVN (Kobelt *et al.*, 2006).

All diese Ergebnisse zeigen, wie komplex das Zusammenspiel allein zwischen den peripheren nahrungsaufnahmesteuernden Peptiden ist. Weitere Studien sind erforderlich, um die multifaktorielle Regulation des Nahrungsverhaltens besser zu verstehen.

#### **4.7 Resumé**

Zusammengefasst zeigt diese vorliegende Arbeit, dass die orexigene Wirkung von peripherem Ghrelin in frei gefütterten Ratten durch peripheres CCK beeinflusst wird. Intraperitoneal injiziertes CCK reduzierte die Ghrelin-induzierte Zunahme der Nahrungsaufnahme und die der Neuronenaktivität im ARC. Die stimulierten Neuronenaktivierungen im PVN und im NTS durch peripheres CCK hingegen wurden nicht durch Ghrelin beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von ARC-Neuronen sowohl in der Übermittlung der Ghrelin-induzierten Steigerung in der Nahrungsaufnahme als auch der durch peripheres CCK-vermittelten inhibierenden Wirkung auf die Ghrelin-stimulierte Zunahme der Nahrungsmenge. Ob der Einfluss von peripherem CCK auf die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme und Neuronenaktivität im Hypothalamus über periphere Afferenzen wie der N.vagus, über zentrale Mechanismen (u.a. NPY-Neurone) oder über beide Signalwege vermittelt wird, bleibt unbekannt.

## **ZUSAMMENFASSUNG**

Das Nahrungsverhalten bei Mensch und Tier wird über komplexe periphere als auch zentrale Mechanismen reguliert, die über die sogenannte „*Brain-Gut-Axis*“ kommunizieren.

Zu den peripheren Signalen gehören u.a. die aus dem Gastrointestinaltrakt sezernierten Peptidhormone Ghrelin und Cholezystokinin (CCK), die beide einen antagonistischen Effekt hinsichtlich der Nahrungsaufnahme ausüben.

Das Ziel dieser Studie war es, die Interaktion zwischen dem orexigen wirkenden Ghrelin und dem anorexigen wirkenden CCK in nicht gefasteten Ratten zu untersuchen. Nach simultaner intraperitonealer Applikation beider Peptide wurde einerseits die kumulative Nahrungsaufnahme über einen Messzeitraum von zwei Stunden beobachtet, andererseits erfolgte eine Darstellung der neuronalen Aktivierung mittels *c-Fos*-Immunhistochemie im Hypothalamus (ARC, PVN) und im Hirnstamm (NTS).

In der Verhaltensbiologie steigerte die intraperitoneale Injektion von Ghrelin (13 µg/kg) im Vergleich zur Vehikelgruppe bereits innerhalb der ersten halben (~ 2,3-fach) und der ersten Stunde (~ 2,1-fach) signifikant die Nahrungsaufnahme (nach 30 min: Mittelwert ± SEM =  $2,89 \pm 1,04$  vs.  $1,23 \pm 0,52$  g/kg,  $p = 0,028$ ; nach einer Stunde:  $3,83 \pm 1,15$  vs.  $1,84 \pm 0,73$  g/kg,  $p = 0,044$ ). Die Applikation von CCK-8S (2 und 25 µg/kg) führte verglichen mit der Injektion von Ghrelin innerhalb der ersten 30 min zu einer signifikanten ~ 4,3-, bzw. ~ 57,8-fachen Reduktion der Nahrungsaufnahme (2 µg/kg:  $0,68 \pm 0,4$  g/kg,  $p = 0,004$ ; 25 µg/kg:  $0,05 \pm 0,05$  g/kg,  $p = 0,0002$ ). Nach dem Messzeitraum von einer Stunde nahmen nur noch die mit Vehikel + 25 µg/kg CCK behandelten Tiere signifikant weniger Nahrung auf als die Ghrelin-Gruppe ( $0,31 \pm 0,26$  g/kg,  $p = 0,005$ ).

Die gleichzeitige Applikation von Ghrelin (13 µg/kg) und CCK (2 oder 25 µg/kg) führte gegenüber der Ghrelin-Gruppe innerhalb des gesamten Beobachtungszeitraums zu einem signifikant verminderten Essverhalten (nach 30 min: Ghrelin + 2 µg/kg CCK:  $0,22 \pm 0,13$  g/kg,  $p = 0,001$  und Ghrelin + 25 µg/kg CCK:  $0,33 \pm 0,23$  g/kg,  $p = 0,0008$ ; nach einer Stunde: Ghrelin + 2 µg/kg CCK:  $0,22 \pm 0,13$  g/kg,  $p < 0,0008$  und Ghrelin + 25 µg/kg CCK:  $0,65 \pm 0,42$  g/kg,  $p = 0,0016$ ; nach zwei Stunden: Ghrelin + 2 µg/kg CCK:  $0,83 \pm 0,72$  g/kg,  $p = 0,009$  und Ghrelin + 25 µg/kg CCK:  $1,32 \pm 0,82$  g/kg,  $p = 0,015$ ).

Im immunhistologischen Teil der Arbeit induzierte die intraperitoneale Applikation von Ghrelin (13 µg/kg) im Vergleich zur Vehikelgruppe eine robuste neuronale Aktivierung im

ARC (Median der *c-Fos*-positiven Neurone pro Hirnschnitt: 31,35 vs. 9,86,  $p = 0,0001$ ). Beide CCK-8S Dosen (2 und 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) stimulierten eine geringe Anzahl von ARC-Neuronen (Median der *c-Fos*-positiven Neurone/Gehirnschnitt: 5,33 und 11,21). Nach gemeinsamer Gabe von Ghrelin (13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) und CCK (2 und 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) wurde die Ghrelin-stimulierte *c-Fos*-Expression im ARC supprimiert (Median der *c-Fos*-positiven Neurone/Gehirnschnitt: 13,33 und 12,86). Die durch CCK-induzierten *c-Fos*-Aktivierungen im PVN und im NTS blieben durch Ghrelin unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse sowohl aus der Verhaltens- als auch aus der Molekularbiologie demonstrieren, dass die intraperitoneale simultane Gabe von Ghrelin und CCK die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme und die ebenfalls Ghrelin-stimulierte *c-Fos*-Expression im ARC unterdrückt. Die durch peripheres CCK stimulierte Neuronenaktivierung im PVN und im NTS hingegen wurde nicht durch Ghrelin beeinflusst. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von ARC-Neuronen sowohl an der Übermittlung der Ghrelin-induzierten Steigerung in der Nahrungsaufnahme als auch an der durch peripheres CCK vermittelten inhibierenden Wirkung auf die Ghrelin-stimulierte Zunahme der Nahrungsmenge.

Welche genaueren Mechanismen für diese beschriebenen Auswirkungen verantwortlich sind, ist unbekannt. Viele Netzwerke verschiedener Neurotransmitter und anderen peripheren Signalen scheinen an dieser Interaktion zwischen Ghrelin und CCK involviert zu sein. Eine zentrale Rolle scheinen orexigene NPY-enthaltene Neurone zu spielen, welche sowohl von Ghrelin als auch von CCK Informationen erhalten. Inwieweit der Einfluss von peripherem CCK auf die Ghrelin-induzierten Änderungen im Nahrungsverhalten und in der Neuronenaktivität im Hypothalamus über periphere Afferenzen wie der N.vagus, über zentrale Mechanismen oder über beide Signalwege vermittelt wird, ist in weiteren Studien zu untersuchen.

## **ABSTRACT**

The ingestive behaviour of animals and human beings is regulated by various peptide hormones. Among these, there exist short- and long-term mediated signals, which induce either initiation or termination of meals. Furthermore, central mechanisms may also be involved. Therefore, it is assumable that complex mechanisms between the periphery and the central nervous system are responsible for food regulation, based on the “*brain-gut-axis*”.

Ghrelin and Cholecystokinin (CCK) belong to the peripheral short-term regulators of food intake and satiety. Both peptide hormones derive from the gastrointestinal tract and exert antagonistic effects on ingestive behaviour.

The aim of this study was to investigate interactions between the orexigenic ghrelin and the anorexigenic CCK after simultaneous intraperitoneal injection of both peptides to non-fasted rats. Focuses of interests were the effects on food intake (observed time period: 2 h) and neuronal activity in the hypothalamus (ARC, PVN) and brainstem (NTS), which has been assessed by *c-Fos*-like immunoreactivity (c-FLI).

13 µg/kg bdy wt. (body weight) Ghrelin injected intraperitoneally significantly increased food intake within the first half (~ 2.3-fold) and next half hour (~ 2.1-fold) compared to the vehicle group (after 30 min: mean ± SEM: 2.89 ± 1.04 g/kg vs. 1.23 ± 0.52 g/kg,  $p = 0.028$ ; after 1 h: 3.83 ± 1.15 g/kg vs. 1.84 ± 0.73 g/kg,  $p = 0.044$ ). The animals treated with CCK-8S (2 and 25 µg/kg) significantly ate less than the ghrelin group after 30 min (0.68 ± 0.4 g/kg,  $p = 0.004$  and 0.05 ± 0.05 g/kg,  $p = 0.0002$ ). So did only the 25 µg CCK-8S/kg treated group after 1 h (0.31 ± 0.26 g/kg,  $p = 0.005$ ). Ghrelin (13 µg/kg) and CCK-8S (2 or 25 µg/kg) administered simultaneously blocked the orexigenic effect of ghrelin. Within the entire observed time period of 2 h the food intake of these animals significantly decreased in comparison to the ghrelin group (after 30 min: ghrelin + 2 µg/kg CCK-8S: 0.22 ± 0.13 g/kg,  $p = 0.001$  and ghrelin + 25 µg/kg CCK-8S: 0.33 ± 0.23 g/kg,  $p = 0.0008$ ; after 1 h: ghrelin + 2 µg/kg CCK-8S: 0.22 ± 0.13 g/kg,  $p = 0.0008$  and ghrelin + 25 µg/kg CCK-8S: 0.65 ± 0.42 g/kg,  $p = 0.0016$ ; after 2 h: ghrelin + 2 µg/kg CCK-8S: 0.83 ± 0.72 g/kg,  $p = 0.009$  and ghrelin + 25 µg/kg CCK-8S: 1.32 ± 0.82 g/kg,  $p = 0.015$ ).

Intraperitoneally injected ghrelin (13 µg/kg) definitively increased the number of c-FLI positive neurons/section in the Nucleus arcuatus (ARC) compared to the vehicle group (median: 31.35 vs. 9.86,  $p = 0.0001$ ). Both applied concentrations of CCK-8S hardly induced neuronal activation in the ARC (2 µg/kg: 5.33 and 25 µg/kg: 11.21 c-FLI positive

neurons/section). The simultaneous injection of ghrelin and CCK-8S blocked the ghrelin-mediated increase of *c-Fos* expression in this brain area (ghrelin + 2 µg/kg CCK-8S: 13.33 and ghrelin + 25 µg/kg CCK-8S: 12.86 c-FLI positive neurons/section). The CCK-8S-stimulated *c-Fos* expression in the Nucleus paraventricularis (PVN) and the Nucleus tractus solitarius (NTS) was not affected by peripheral ghrelin.

These results show that after simultaneous intraperitoneal administration of both peptides CCK inhibits ghrelin-induced food intake as well as suppresses ghrelin-stimulated *c-Fos* expression in the ARC. Apparently, CCK seems to abolish ghrelin-mediated increase of food intake through inhibiting neuronal activation in the ARC.

Which specific mechanisms cause these observations remains unknown. Many networks between different neurotransmitters and other peripheral signals may play a role in the interactions between ghrelin and CCK. Anyway, both peptides have effect in the central nervous system, either after passing the blood-brain-barrier or mediating by the N.vagus or being mediated by a combination of both pathways. The central targets could be orexigenic NPY-neurons, which receive information from both ghrelin and CCK. After processing these signals, an appropriate ingestive behaviour will appear. More investigations are needed for a better understanding of ingestive behaviour.

## LITERATUR

### 7.1 Referenzliste

**Adams, S.H., Won, W.B., Schonhoff, S.E., et al.**, Effects of peptide YY [3-36] on short term food intake in mice are not affected by prevailing plasma ghrelin levels, *Endocrinology* **145**, 4967-4975 (2004)

**Adelson, D.W., Million, M., Kanamoto, K., et al.**, Coordinated gastric and sphincter motility evoked by intravenous CCK-8 as monitored by ultrasonomicrometry in rats, *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* **286**, G321-332 (2004)

**Adrian, T.E., Ferri, G.L., Bacarese-Hamilton, A.J., et al.**, Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY, *Gastroenterology* **89**, 1070-1077 (1985)

**Adrian, T.E., Bacarese-Hamilton, A.J., Smith, H.A., et al.**, Distribution and postprandial release of porcine peptide YY, *Journal of Endocrinology* **113**, 11-14 (1987)

**Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M., et al.**, Neuropeptide Y distribution in the rat brain, *Science* **221**, 877-879 (1983)

**Antin, J., Gibbs, J., Holt, J., et al.**, Cholecystokinin elicits the complete behavioural sequence of satiety in rats, *Journal of Comparative Physiology and Psychology* **89**, 784-790 (1975)

**Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., et al.**, Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats, *American Journal of Physiology* **255**, E 255-259 (1988)

**Armstrong, W.E.**, Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei, In: Watson, C., Paxinos, G., editors. *The Rat Nervous System 2<sup>nd</sup> edition*, *Academic Press*, 377-390 (1995)

**Asakawa, A., Inui, A., Yuzuriha, H., et al.**, Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin, *Gastroenterology* **120**, 337-345 (2001)

**Attoub, S., Levasseur, S., Buyse, M., et al.**, Physiological role of cholecystokinin B/gastrin receptor in leptin secretion, *Endocrinology* **140**, 4406-4410 (1999)

**Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., et al.**, The stomach is a source of leptin, *Nature* **394**, 790-793 (1998)

**Bai, F.L., Yamano, M., Shiotani, Y., et al.**, An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat, *Brain Research* **331**, 172-175 (1985)

**Baker, R.A., & Herkenham, M.**, Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat, *Journal of Comparative Neurology* **358**, 518-530 (1995)

**Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., et al.**, Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin, *Peptides* **17**, 305-311 (1996)

- Banks, W.A., Tschöp, M., Robinson, S.M., et al.**, Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **302**, 822-827 (2002)
- Barrachina, M.D., Martinez, V., Wang, L., et al.**, Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **94**, 10455-10460 (1997)
- Barthel, L.K., & Raymond, P.A.**, Improved method for obtaining microns cryosections for immunocytochemistry, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **38**, 1383-1388 (1990)
- Baskin, D.G., Figlewicz, D.P., Lattemann, D., et al.**, Insulin and leptin, dual adiposity signals to the brain for regulation of food intake and body weight, *Brain Research* **848**, 114-123 (1999)
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., et al.**, Gut hormone PYY (3-36) physiologically inhibits food intake, *Nature* **418**, 650-654 (2002)
- Batterham, R.L., & Bloom, S.R.**, The gut hormone peptide YY regulates appetite, *Annual New York Acad Science* **994**, 162-168 (2003)
- Beglinger, C., Degen, L., Matzinger, D., et al.**, Loxiglumide, a CCK-A receptor antagonist, stimulates caloric intake and hunger feelings in humans, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **280**, R 1149-1154 (2001)
- Beinfeld, M.C., & Palkovits, M.**, Distribution of cholecystokinin in the hypothalamic limbic system of the rat, *Neuropeptides* **2**, 123-128 (1981)
- Bell, M.E., Bhatnagar, S., Akana, S.F., et al.**, Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress, *Journal of Neuroscience* **20**, 6707-6713 (2000)
- Bellinger, L.L., Bernadis, L.L., & Williams, F.E.**, Naloxone suppression of food and water intake and cholecystokinin reduction of feeding is attenuated in weanling rats with dorsomedial hypothalamic lesions, *Physiological Behaviour* **31**, 839-846 (1983)
- Bellinger, L.L., & Bernadis, L.L.**, Suppression of feeding by cholecystokinin but not bombesin is attenuated in dorsomedial hypothalamic nuclei lesioned rat, *Peptides* **5**, 547-552 (1984)
- Bellinger, L.L., & Bernadis, L.L.**, The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies, *Physiological Behavior* **76**, 431-442 (2002)
- Bernadis, L.L., & Bellinger, L.L.**, The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update, *Brain Research* **434**, 321-381 (1987)
- Bi, S., & Moran, T.H.**, Actions of CCK in the controls of food intake and body weight: lessons from the CCK-A receptor deficient OLETF rat, *Neuropeptides* **36**, 171-181 (2002)
- Billig, I., Yates, B.J., & Rinaman, L.**, Plasma hormone levels and central c-Fos expression in ferrets after systemic administration of cholecystokinin, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **281**, R 1243-1255 (2001)
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., et al.**, Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth-hormone in vitro, *Endocrinology* **106**, 663-667 (1980)

- Bowers, C.Y., Momany, F.A., Reynolds, G.A., et al.**, On the *in vitro* and *in vivo* activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone, *Endocrinology* **114**, 1537-1545 (1984)
- Bowers, C.Y.**, Xenobiotic growth hormone secretagogues: growth hormone releasing factors, *Growth-Hormone Secretagogues* (Bercu, B.B., & Walker, R.F., Eds), 9-28 (1996)
- Bray, G.A.**, Obesity: historical development of scientific and cultural ideas, *Internal Journal of Obesity* **14**, 909-926 (1990)
- 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, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **95**, 15043-15048 (1998 a)
- Broberger, C., de Lecea, L., Sutcliffe, J.G., et al.**, Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells from distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems, *Journal of Comparative Neurology* **402**, 460-474 (1998 b)
- Broberger, C., Holmberg, K., Kuhar, M.J., et al.**, Cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat vagus nerve: A putative mediator of cholecystokinin-induced satiety, *PNAS* **96**, 13506-13511 (1999)
- Broglia, F., Arvat, E., Benso, A., et al.**, Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 5083-5086 (2001)
- Buchan, A.M., Polak, J.M., Solcia, E., et al.**, Electron immunohistochemical evidence for the human intestinal I cell as the source of CCK, *Gut* **19**, 403-407 (1978)
- Bueno, L., & Fioramonti, J.**, CNS peptidergic regulation of gut motility. In Y. Taché and D.L. Wingate (Eds.) *Brain-Gut Interactions*, CRC Press, Boca Raton, 231-243 (1991)
- Burdakov, D., & Ashcroft, F.M.**, Cholecystokinin tunes firing of an electrically distinct subset of arcuate nucleus neurons by activating A-type potassium channels, *The Journal of Neuroscience* **22**, 6380-6387 (2002)
- Buyse, M., Ovesjö, M., Goiot, H., et al.**, Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve, *European Journal of Neuroscience* **14**, 64-72 (2001)
- Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., et al.**, Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks, *Science* **269**, 546-549 (1995)
- Charney, D.S., & Deutch, A.**, A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders, *Crit.Rev.Neurobiology* **10**, 419-446 (1996)
- Chen, D.Y., Deutsch, J.A., Gonzalez, M.F., et al.**, The induction of *c-fos* expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L 364,718, *Neuroscience Letters* **149**, 91-94 (1993)
- Chen, C., Wu, D., & Clarke, I.J.**, Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs, *Journal of Endocrinology* **148**, 381-386 (1996)

- Chen, C.Y., Kanamoto, K., Million, M., et al.**, Intracisternal ghrelin stimulates gastric motility, acid secretion, regional blood flow and increases systemic blood pressure through different pathways in rats, *Gastroenterology* **122**, 451 (2002)
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., et al.**, Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein, *Endocrinology* **145**, 2607-2612 (2004)
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., & Steiner, R.A.**, Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus, *Endocrinology* **138**, 4489-4492 (1997)
- Chronwall, B.M.**, Anatomy and physiology of the neuroendocrine arcuate nucleus, *Peptides* **6**, 1-11 (1985)
- Clancy, B., & Cauller, L.J.**, Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion of sodium borohydride, *Journal of Neuroscientific Methods* **83**, 97-102 (1998)
- Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., et al.**, Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats, *Endocrinology* **115**, 427-429 (1984)
- Cohen, M.A., Ellis, S.M., LeRoux, C.W., et al.**, Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88**, 4696-4701 (2003)
- Cone, R.D., Cowley, M.A., Butler, A.A., et al.**, The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis, *Internal Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders* **25**, S 63-67 (2001)
- Crawley, J.N., & Beinfeld, M.C.**, Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin, *Nature* **302**, 703-706 (1983)
- Crawley, J.N., & Schwaber, J.S.**, Abolition of the behavioral effects of cholecystokinin following bilateral radiofrequency lesions of parvocellular subdivisions of the nucleus of solitary tract, *Brain Research* **295**, 289-299 (1984)
- Crawley, J.N., Kiss, J.Z., & Mezey, E.**, Bilateral midbrain transections block the behavioral effects of cholecystokinin on feeding and exploration in rats, *Brain Research* **322**, 316-321 (1984)
- Crawley, J.N., & Kiss, J.Z.**, Paraventricular nucleus lesions abolish the inhibition of feeding induced by systemic cholecystokinin, *Peptides* **6**, 927-935 (1985)
- Crawley, J.N., & Corwin, R.L.**, Biological actions of cholecystokinin, *Peptides* **15**, 731-755 (1994)
- Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., et al.**, Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress, *Neuroscience* **64**, 477-505 (1995)
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., et al.**, A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans, *Diabetes* **50**, 1714-1719 (2001)
- Daikoku, S., Hisano, S., Kawano, H., et al.**, Immunohistochemical approach to the functional morphology of the hypothalamic-hypophysial system, *Brain Dev.* **11**, 73-79 (1989)
- Dakin, C.L., Gunn, I., Small, C.J., et al.**, Oxyntomodulin inhibits food intake in rats, *Endocrinology* **142**, 4244-4250 (2001)

- 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* **141**, 4255-4261 (2000 a)
- Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., et al.,** Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 477-480 (2000 b)
- Date, Y., Nakazato, M., Murakami, N., et al.,** Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 904-907 (2001)
- Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., et al.,** Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulate insulin secretion, *Diabetes* **51**, 124-129 (2002 a)
- 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* **123**, 1120-1128 (2002 b)
- Date, Y., Toshinai, K., Koda, S., et al.,** Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation, *Endocrinology* **146**, 3815-3525 (2005)
- Day, H.E., McKnight, A.T., Poat, J.A., et al.,** Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and the amygdala of the rat by a CCK-A receptor mechanism, *Neuropharmacology* **33**, 719-727 (1994)
- Debas, H.T., Farooq, O., & Grossman, M.I.,** Inhibition of gastric emptying is a physiological action of cholecystokinin, *Gastroenterology* **68**, 1211-1217 (1975)
- Deghenghi, R., Cananzi, M.M., Torsello, A., et al.,** GH-releasing activity of hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats, *Life Science* **54**, 1321-1328 (1994)
- Deschenes, R.J., Lorenz, L.J., Haun, R.S., et al.,** Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **81**, 726-730 (1984)
- Dickson, S.L., & Luckman, S.M.,** Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-Releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-Releasing Peptide-6, *Endocrinology* **138**, 771-777 (1997)
- Dieguez, C., Page, M.D., & Scanlon, M.F.,** Growth hormone neuroregulation and its alterations in disease states, *Clinical Endocrinology (Oxford)* **28**, 109-143 (1988)
- Diop, L., Pascaud, X., Junien, J.L., et al.,** CRF triggers the CNS release of TRH in stress-induced changes in gastric emptying, *American Journal of Physiology* **260**, G39-44 (1991)
- Dodd, P.R., Edwarson, J.A., & Dockray, G.J.,** The depolarisation-induced release of cholecystokinin C-terminal octapeptide (CCK-8) from rat synaptosomes and brain slices, *Regulatory Peptides* **1**, 17-29 (1980)
- Dourish, C.T., Rycroft, W., & Iversen, S.D.,** Postponement of satiety by blockade of brain cholecystokinin (CCK-B) receptors, *Science* **245**, 1509-1511 (1989)
- Dragunow, M., & Robertson, H.A.,** Kindling stimulation induces c-fos protein(s) in granule cells of the rat dentate gyrus, *Nature* **329**, 441-442 (1987)

- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., et al.**, Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area, *Neuron* **23**, 775-786 (1999)
- Elmquist, J.K., Elias, C.F., & Saper, C.B.**, From lesions to leptin: Hypothalamic control of food intake and body weight, *Neuron* **22**, 221-232 (1999)
- Emilsson, V., Liu, Y.L., Cawthorne, M.A., et al.**, Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion, *Diabetes* **46**, 313-316 (1997)
- Emson, P.C., Lee, C.M., & Rehfeld, J.F.**, Cholecystokinin peptides: vesicular localization and calcium-dependent release from rat brain in vitro, *Life Science* **26**, 2157-2162 (1980)
- Ersparmer, V.**, Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin, *Annual Review of Pharmacology* **11**, 327-350 (1971)
- Ewart, W.R.**, Medullary integration of afferent information from the gastrointestinal tract. In Y. Taché and D.L. Wingate (Eds.) *Brain-Gut Interaction*, CRC Press, Boca Raton, 109-121 (1991)
- Eysselein, V.E., Eberlein, G.A., Hesse, W.H., et al.**, Cholecystokinin-58 is the major circulating form of cholecystokinin in canine blood, *The Journal of Biological Chemistry* **262**, 214-217 (1987)
- Fan, W., Ellacott, K.L.J., Halatchev, I.G., et al.**, Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system, *Nature Neuroscience* **7**, 335-356 (2004)
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., et al.**, Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **94**, 7001-7005 (1997)
- Ferguson, A.V., Day, T.A., & Raynaud, L.P.**, Subfornical organ efferents influence the excitability of neurohypophyseal and tuberoinfundibular paraventricular nucleus neurons in the rat, *Neuroendocrinology* **39**, 423-428 (1984)
- Flier, J.S., & Maratos-Flier, E.**, Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways, *Cell* **92**, 437-440 (1998)
- Folwaczny, C., Chang, J.K., & Tschöp, M.**, Ghrelin and motilin: two sides of one coin?, *European Journal of Endocrinology* **144**, R1-3 (2001)
- Fujino, K., Inui, A., Asakawa, A., et al.**, Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats, *Journal of Physiology* **550.1**, 227-240 (2003)
- Garcia de Yebenes, E., Li, S., et al.**, Regulation of proopiomelanocortin gene expression by neuropeptide Y in the rat arcuate nucleus, *Brain Research* **674**, 112-116 (1995)
- Geliebter, A.**, Gastric distension and gastric capacity in relation to food intake in humans, *Physiological Behavior* **44**, 665-668 (1988)
- Gibbs, J., Young, R.C., & Smith, G.P.**, Cholecystokinin decreases food intake in rats, *Journal of Comparative Physiology and Psychology* **84**, 488-495 (1973)
- Gibbs, J., Fauser, D.J., Rowe, E.A., et al.**, Bombesin suppresses feeding in rats, *Nature* **282**, 208-210 (1979)
- Gibbs, J., & Smith, G.P.**, Peptides of digestive system and brain. Model of cholecystokinin, *Annual Journal of Endocrinology* **49**, 113-120 (1988)

- Glatzle, J., Kreis, M.E., Kawano, K., et al.**, Postprandial neuronal activation in the nucleus of the solitary tract is partly mediated by CCK-A receptors, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **281**, R 222-229 (2001)
- Glowa, J.R., Barrett, J.E., Russell, J., et al.**, Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors, *Peptides* **13**, 609-621 (1992)
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., et al.**, The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans, *The Journal of Endocrinology and Metabolism* **87**, 2988-2991 (2002)
- Gray, T.S., & Morley, J.E.**, Neuropeptide Y: anatomical distribution and possible function in mammalian nervous system, *Life Science* **38**, 389-401 (1986)
- Grill, H.J., & Smith, G.P.**, Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats, *American Journal of Physiology* **254**, R 853-856 (1988)
- Grijalva, C.V., & Novin, D.**, The role of the hypothalamus and dorsal vagal complex in gastrointestinal function and pathophysiology, *Annual NY Academic Science* **597**, 207-222 (1990)
- Gruber, K., McRae-Degueurce, A., Wilkin, L.D., et al.**, Forebrain and brainstem afferents to the arcuate nucleus in the rat: potential pathways for the modulation of hypophyseal secretions, *Neuroscience Letters* **75**, 1-5 (1987)
- Grundy, D.**, The afferent side of the story: the role of sensation and perception in gut dysfunction, *Irish Journal of Medical Science* **163**, 562-564 (1994)
- Gualillo, O., Caminos, J.E., Blanco, M., et al.**, Ghrelin, a novel placental-derived hormone, *Endocrinology* **142**, 788-794 (2001)
- Guilmeau, S., Nagain-Domaine, C., Buyse, M., et al.**, Modulation of exocrine pancreatic secretion by leptin through CCK1-receptors and afferent vagal fibres in the rat, *European Journal of Pharmacology* **447**, 99-107 (2002)
- Guilmeau, S., Buyse, M., Tsocas, A., et al.**, Duodenal leptin stimulates cholecystokinin secretion - Evidence of a positive leptin-cholecystokinin feedback loop, *Diabetes* **52**, 1664-1672 (2003)
- Gundlach, A.L., Burazin, T.C., & Larm, J.A.**, Distribution, regulation and role of hypothalamic galanin systems: renewed interest in a pleiotropic peptide family, *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* **28**, 100-105 (2001)
- Gunion, M.W., & Taché, Y.**, Bombesin microinfusion into the paraventricular nucleus suppresses gastric acid secretion in the rat, *Brain Research* **442**, 118-128 (1987 a)
- Gunion, M.W., & Taché, Y.**, Intrahypothalamic microinfusion of corticotropin-releasing factor inhibits gastric acid secretion but increases secretion volume in rats, *Brain Research* **411**, 156-161 (1987 b)
- Gunion, M.W., Kauffman, G.L., & Taché, Y.**, Intrahypothalamic microinfusion of corticotropin-releasing factor elevates gastric bicarbonate secretion and protects against cold-stress ulceration, *American Journal of Physiology* **258**, G 152-157 (1990)
- Gutzwiller, J.P., Goke, B., Drewe, J., et al.**, Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans, *Gut* **44**, 81-86 (1999)
- Hagan, M.M., Rushing, P.A., Pritchard, L.M., et al.**, Long-term orexigenic effects of AgRP-(83-132)-involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade, *American*

*Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **279**, R 47-52 (2000)

**Halaas, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., et al.**, Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **94**, 8878-8883 (1997)

**Hanley, M.R.**, Proto-oncogenesis in the nervous system, *Neuron* **1**, 175-182 (1988)

**Hattori, N., Saito, T., Yagyu, T., et al.**, GH, GH receptor, GH secretagogue receptor and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 4284-4291 (2001)

**Hay, M., & Bishop, V.S.**, Effects of area postrema stimulation on neurons of the nucleus of the solitary tract, *American Journal of Physiology* **260**, H 1359-1364 (1991)

**Herzig, K.H., Wilgus, C., Schon, I., et al.**, Regulation of the action of the novel cholecystokinin-releasing peptide diazepam binding inhibitor by inhibitory hormones and taurocholate, *Regulatory Peptides* **74**, 193-198 (1998)

**Hewson, G., Leighton, G.E., Hill, R.G., et al.**, The cholecystokinin receptor antagonist L 364,718 increases food intake in the rat by attenuation of endogenous cholecystokinin, *British Journal of Pharmacology* **93**, 79-84 (1988)

**Hewson, A.K., & Dickson, S.L.**, Systemic administration of ghrelin induces fos and egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats, *Journal of Neuroendocrinology* **12**, 1047-1049 (2000)

**Hewson, A.K., Tung, L.Y.C., Connell, D.W., et al.**, The rat arcuate nucleus integrates peripheral signals provided by leptin, insulin and a ghrelin mimetic, *Diabetes* **51**, 3412-3419 (2002)

**Hildebrand, P., Petrig, C., Burckhardt, B., et al.**, Hydrolysis of dietary fat by pancreatic lipase stimulates cholecystokinin release, *Gastroenterology* **114**, 123-129 (1998)

**Hill, E.R., Campbell, N.J., Shaw, T.M., et al.**, Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK-antagonists, *Journal of Neuroscience* **7**, 2967-2977 (1987)

**Holstege, G.**, Some anatomical observations on the projections from hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autographic tracing study in cats, *Journal of Comparative Neurology* **260**, 98-126 (1987)

**Honda, T., Wada, E., Battey, J.F., et al.**, Differential gene expression of CKKA and CCKB receptors in the rat brain, *Molecular Cellular Neuroscience* **4**, 143-154 (1993)

**Hornby, P.J., Rossiter, C.D., Kuhn, D.H., et al.**, Neuroactive substances in medullary nuclei that control parasympathetic outflow to the stomach. In Y. Taché and D.L. Wingate (Eds.) *Brain-Gut Interactions*, CRC Press, Boca Raton, 23-43 (1991)

**Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., et al.**, Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance—a hypothalamic perspective, *Endocrinology* **142**, 4163-4169 (2001)

**Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., et al.**, Purification and characterization of rat des-Gln14-ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor, *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 21995-22000 (2000)

**Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., et al.**, A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, *Science* **273**, 974-977 (1996)

- Hunt, S.O., Pini, A., & Evan, G.,** Introduction of *c-fos* like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature* **328**, 632-634 (1987)
- Iggo, A.,** Tension receptors in the stomach and the urinary bladder, *Journal of Physiology* **128**, 593-607 (1955)
- Ikeda, H., West, D.B., Pustek, J.J., et al.,** Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats, *Appetite* **7**, 381-386 (1996)
- Innis, R.B., & Snyder, S.H.,** Distinct cholecystokinin receptors in brain and pancreas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **77**, 6917-6921 (1980)
- Inokuchi, A., Oomura, Y., & Nishimura, H.,** Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior, *Physiological Behavior* **33**, 397-400 (1984)
- Inui, A.,** Neuropeptide Y feeding receptors: are multiple subtypes involved?, *Trends of Pharmacological Science* **20**, 43 (1999)
- Inui, A., Asakawa, A., Bowers, C.Y., et al.,** Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ, *The FASEB Journal* **18**, 439-456 (2004)
- Ito, H., & Seki, M.,** Ascending projections from the area postrema and the nucleus solitarius tract of *Suncus murinus*: anterograde tracing study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin, *Okajimas Folia Anatomy Japan* **75**, 9-31 (1998)
- Itoh, Z.,** Motilin and clinical application, *Peptides* **18**, 593-608 (1997)
- Ivy, A.C., & Oldberg, E.,** Hormone mechanism for gallbladder contraction and oteinevacuation, *American Journal of Physiology* **86**, 599-613 (1928)
- Jain, M.R., Dube, M.G., Kalra, S.P., et al.,** Neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus is decreased during transient hyperphagia induced by microinjection of colchicine into the ventromedial nucleus of rats, *Neuroscience Letters* **256**, 21-24 (1998)
- Johnson, A.K., & Gross, P.M.,** Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways, *FASEB Journal* **7**, 678-686 (1988)
- Kalra, S.P., & Kalra, P.S.,** Neuropeptide Y: a physiological orexigen modulated by the feedback action of ghrelin and leptin, *Endocrine* **22**, 49-56 (2003)
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., et al.,** Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secrectagogue, on hypothalamic peptide gene expression, *Endocrinology* **141**, 4797-4800 (2000)
- 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* **50**, 2438-2443 (2001)
- Kamilaris, T.C., Johnson, E.O., Calogero, A.E., et al.,** Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of Corticotropin releasing hormone, *Endocrinology* **130**, 1764-1774 (1992)
- Katsuura, G., Asakawa, A., & Inui, A.,** Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake, *Peptides* **23**, 323-329 (2002)
- Keim, N.L., Stern, J.S., & Havel, P.J.,** Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women, *American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 794-801 (1998)

- Kennedy, A.G.**, The role of the fat depot in the hypothalamic control of food intake in the rat, *Protocol of Royal Society London Biological Science* **140**, 578-592 (1953)
- Kennedy, A.L., & Mawe, G.M.**, Duodenal sensory neurons project to sphincter of Oddi ganglia in guinea pig, *Journal of Neuroscience* **18**, 8065-8073 (1998)
- Kim, M., Yoon, C., Park, K.H., et al.**, Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status, *Neuroreport* **14**, 1317-1320 (2003)
- Kissileff, H.R., Pi-Sunyer, F.X., Thornton, J., et al.**, Cholecystokinin decreases food intake in man, *American Journal of Clinical Nutrition* **34**, 154-160 (1981)
- Kobelt, P., Tebbe, J.J., Tjandra, I., et al.**, Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain, *Brain Research Protocols* **13**, 45-52 (2004)
- Kobelt, P., Goebel, M., Stengel, A., et al.**, Bombesin but not amylin blocks the orexigenic effect of peripheral ghrelin, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291**, R 903-913 (2006)
- Koda, S., Date, Y., Murakami, N., et al.**, The role of the vagal nerve in peripheral PYY<sub>3-36</sub> induced feeding reduction in rats, *Endocrinology* **146**, 2369-2375 (2005)
- Koenig, J.I.**, Regulation of the hypothalamo-pituitary axis by neuropeptide Y, *Annual NY Academic Science* **661**, 317-328 (1990)
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., et al.**, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* **402**, 656-660 (1999)
- Kopin, A.S., Lee, Y.M., McBride, E.W., et al.**, Expression cloning and characterization of the canine parietal cell gastrin receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **89**, 3605-3609 (1992)
- Korbonits, M., Bustin, S.A., Kojima, S., et al.**, The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**, 881-887 (2001)
- Korner, J., Wissig, S., Kim, A., et al.**, Effects of agouti-related protein on metabolism and hypothalamic neuropeptide gene expression, *Journal of Neuroendocrinology* **15**, 1116-1121 (2003)
- Koylu, E.O., Couceyro, P.R., Lambert, P.D., et al.**, Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland, *Journal of Neuroendocrinology* **9**, 823-833 (1997)
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., et al.**, Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin, *Nature* **393**, 2-76 (1998)
- Kyrkouli, S.E., Stanley, B.G., & Leibowitz, S.F.**, Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide, *European Journal of Pharmacology* **122**, 159-160 (1986)
- Lang, R.E., Heil, J., Ganten, D., et al.**, Effects of lesions in the paraventricular nucleus of the hypothalamus on vasopressin and oxytocin contents in brainstem and spinal cord of rats, *Brain Research* **260**, 326-329 (1983)

- Lantos, T.A., Gorcs, T.J., & Palkovits, M.,** Immunohistochemical mapping of neuropeptides in the premammillary region of the hypothalamus in rats, *Brain Research Reviews* **20**, 209-249 (1995)
- Larhammar, D.,** Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide, *Regulatory Peptides* **65**, 165-174 (1996)
- Larsen, P.J., Mikkelsen, J.D., Jessop, D., et al.,** Neonatal monosodium glutamate treatment alters both the activity and the sensitivity of the rat hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis, *Journal of Endocrinology* **141**, 497-503 (1994)
- Larsson, L.I., & Rehfeld, J.F.,** Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing COOH-terminal gastrin immunoreactivity, *Histochemistry* **58**, 23-31 (1978)
- Larsson, L.I., & Rehfeld, J.F.,** Localization and molecular heterogeneity of cholecystokinin in the central and peripheral nervous system, *Brain Research* **165**, 210-218 (1979)
- Legradi, G., & Lechan, R.M.,** The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus, *Endocrinology* **139**, 3262-3270 (1998)
- Levant, J.A., Kun, T.L., Jachna, J., et al.,** The effects of graded doses of C-terminal octapeptide of cholecystokinin on small intestinal transit time in man, *American Journal of Digestion Dis* **19**, 589-593 (1974)
- Li, B.H., Xu, B., Rowland, N.E., et al.,** C-fos expression in the rat brain following central administration of neuropeptide Y and effects of food consumption, *Brain Research* **665**, 277-284 (1994)
- Li, G., Mobbs, C.V., & Scarpace, P.J.,** Central pro-opiomelanocortin gene delivery results in hypophagia, reduced visceral adiposity, and improved insulin sensitivity in genetically obese Zucker rats, *Diabetes* **52**, 1951-1957 (2003)
- Liddle, R.A., Goldfine, I.D., Rosen, M.S., et al.,** Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding and relationship to gallbladder contraction, *Journal of Clinical Investigations* **75**, 1144-1152 (1985)
- Liddle, R.A.,** Cholecystokinin cells, *Annual Rev. Physiology* **59**, 221-242 (1997)
- Lin, T.M.,** Actions of gastrointestinal hormones and related peptides on the motor function of the biliary tract, *Gastroenterology* **69**, 1006-1022 (1975)
- Longin, A., Souchier, C., French, M., et al.,** Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study, **41**, 1833-1840 (1993)
- Luckman, S.L., Rosenzweig, I., & Dickson, S.L.,** Activation of arcuate nucleus neurons by systemic administration of leptin and growth hormone-releasing peptide-6 in normal and fasted rats, *Neuroendocrinology* **70**, 93-100 (1999)
- Luiten, P.G.M., ter Horst, G.J., Karst, H., et al.,** The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord, *Brain Research* **329**, 374-378 (1985)
- Magoul, R., Dubourg, P., Benjelloun, W., et al.,** Direct and indirect enkephalinergic synaptic inputs to the arcuate nucleus studied by combination of retrograde tracing and immunocytochemistry, *Neuroscience* **55**, 1055-1066 (1993)

- Malaisse-Lagae, F., Carpentier, J.L., Patel, Y.C., et al.,** Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse, *Hypothesis.Experientia* **33**, 915-917 (1977)
- Marshall, F.H., Barnes, S., Hughes, J., et al.,** Cholecystokinin modulates the release of dopamine from the anterior and posterior nucleus accumbens by two different mechanisms, *Journal of Neurochemistry* **56**, 917-922 (1991)
- Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., et al.,** Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276**, 905-908 (2000)
- Matson, C.A., Reid, D.F., Cannon, T.A., et al.,** Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **278**, R 882-890 (2000)
- Matsumoto, Y., Watanabe, T., Adachi, Y., et al.,** Galanin-like peptide stimulates food intake in the rat, *Neuroscience Letters* **322**, 67-69 (2002)
- Mayer, J.,** Glucostatic mechanism of regulation of food intake, *National England Journal of Medicine* **249**, 13-16 (1953)
- McMinn, J.E., Sindelar, D.K., Havel, P.J., et al.,** Leptin deficiency induced by fasting impairs satiety response to cholecystokinin, *Endocrinology* **141**, 4442-4448 (2000)
- Meister, B., Ceccatelli, S., Hokfeldt, T., et al.,** Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions, *Experimental Brain Research* **76**, 343-368 (1989)
- Mentlein, R., Dahms, P., Grandt, D., et al.,** Proteolytic processing of neuropeptide Y and peptide YY by dipeptidyl peptidase, *Regulatory Peptides* **49**, 133-144 (1993)
- Miaskiewicz, S.L., Stricker, E.M., & Verbalis, J.G.,** Neurohypophyseal secretion in response to cholecystokinin but not meal-induced gastric distension in humans, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **68**, 837-843 (1989)
- Miyasaka, K., & Funakoshi, A.,** Cholecystokinin and cholecystokinin receptors (Review), *Journal of Gastroenterology* **38**, 1-13 (2003)
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., et al.,** Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin, *Diabetes* **47**, 294-297 (1998)
- Mizuno, T.M., & Mobbs, C.V.,** Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting, *Endocrinology* **140**, 814-817 (1999)
- Mönnikes, H., Schmidt, B.G., Taché, Y., et al.,** Effects of microinfusion of corticotropin-releasing factor (CRF) into the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) on gastric and colonic function, *Gastroenterology* **100**, A 471 (1991)
- Mönnikes, H., Raybould, H.E., Schmidt, B.G., et al.,** CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates colonic motor activity in fasted rats, *Peptides* **14**, 743-747 (1993)
- Mönnikes, H., Schmidt, B.G., Tebbe, J., et al.,** Microinfusion of corticotropin-releasing factor into the locus coeruleus/subcoeruleus nuclei stimulates colonic motor function in rats, *Brain Research* **644**, 101-108 (1994)
- Mönnikes, H., Lauer, G., & Arnold, R.,** Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via casaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat, *Brain Research* **770**, 277-288 (1997)

- Mönnikes, H., Tebbe, J., Grote, C., et al.**, Involvement of CCK in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the CNS regulation of colonic motility, *Digestion* **62**, 178-184 (2000)
- Moran, T.H., Robinson, P.H., Goldrich, M.S., et al.**, Two brain cholecystokinin receptors: implications for behavioral actions, *Brain Research* **362**, 175-179 (1986)
- Moran, T.H., Norgren, R., Crosby, R.J., et al.**, Central and peripheral vagal transport of cholecystokinin binding sites occurs in afferent fibres, *Brain Research*, 95-102 (1990)
- Moran, T.H., Ameglio, P.J., Schwartz, G.J., et al.**, Blockade of type A, but not type B CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK, *American Journal of Physiology* **262**, R 46-50 (1992)
- Moran, T.H., Ameglio, P.J., Peyton, H.J., et al.**, Blockade of type A, not type B, CCK receptors postpones satiety in rhesus monkeys, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **262**, R 46-50 (1993)
- Moran, T.H., & Kinzig, K.P.**, Gastrointestinal satiety signals II. Cholecystokinin, *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* **286**, 183-188 (2004)
- Morgan, J.I., & Curran, T.**, Stimulus transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun, *Annual Review of Neuroscience* **14**, 421-451 (1991)
- Mori, K., Yoshimoto, A., Takaya, K., et al.**, Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin, *Federation of European Biochemical Society* **486**, 213-216 (2000)
- Morley, J.E.**, Neuropeptide regulation of appetite and weight, *Endocrine Reviews* **3**, 256-287 (1987)
- Morris, B.J.**, Neuronal localization of neuropeptide Y gene expression in rat brain, *Journal of Comparative Neurology* **290**, 358-368 (1989)
- Morton, G.J., & Schwartz, M.W.**, The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis, *Internal Journal of Obesity and Related Metabolism Disorders* **25**, S 56-62 (2001)
- Muccioli, G., Tschöp, M., Papotti, M., et al.**, Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity, *European Journal of Pharmacology* **440**, 235-254 (2002)
- Mutt, V., & Jorpes, J.E.**, Structure of porcine cholecystokinin-pancreozymin.I. Cleavage with thrombin and with trypsin, *European Journal of Biochemistry* **6**, 156-162 (1968)
- Mutt, V., & Jorpes, J.E.**, Hormonal polypeptides of the upper intestine, *Biochemical Journal* **125**, 57-58 (1971)
- Muurahainen, N.E., Kissileff, H.R., & Pi-Sunyer, F.X.**, Intravenous infusion of bombesin reduces food intake in humans, *American Journal of Physiology* **264**, R350-354 (1993)
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., et al.**, A role for ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature* **409**, 194-198 (2001)
- Niimi, M., Sato, M., Tamaki, M., et al.**, Induction of Fos protein in the rat hypothalamus elicited by insulin-induced hypoglycemia, *Neuroscience Research* **23**, 361-364 (1995)
- Noble, F., Wank, S.A., Crawley, J.N., et al.**, International Union of Pharmacology XXI: Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors, *Pharmacology Reviews* **51**, 745-781 (1999)

- Nonaka, N., Shioda, S., Niehoff, M.L., et al.**, Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY-36 in mouse, *Journal of Pharmacological and Experimental Therapy* **306**, 948-953 (2003)
- Ohlsson, B., Rehfeld, J.F., & Axelson, J.**, CCK stimulates growth of both the pancreas and the liver, *Internal Journal of Surgical Investigations* **1**, 47-54 (1999)
- Ohtake, M., & Sakaguchi, T.**, Inhibition of gastric acid secretion evoked by activation of the hypothalamic paraventricular nucleus, *Experimental Brain Research* **66**, 222-224 (1987)
- Ohtaki, T., Kumano, S., Ishibashi, Y., et al.**, Isolation and cDNA cloning of a novel galanin-like peptide (GALP) from porcine hypothalamus, *Journal of Biology and Chemistry* **274**, 37041-37045 (1999)
- Olson, B.R., Hoffmann, G.E., Sved, A.F., et al.**, Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex, *Brain Research* **569**, 238-248 (1992)
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., et al.**, Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus, *Nature* **222**, 282-284 (1969)
- Pages, N., Gourch, A., Orosco, M., et al.**, Changes in brain neuropeptide Y induced by cholecystokinin peptides, *Neuropeptides* **17**, 141-145 (1990)
- Papotti, M., Gehe, C., Cassoni, P., et al.**, Growth hormone secretagogues binding sites in peripheral tissues, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**, 3803-3807 (2000)
- Patchett, A.A., Nargund, R.P., Tata, J.R., et al.**, The design and biological activities of L-163,191 (MK-0677): a potent orally active growth hormone secretagogue, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **92**, 7001-7005 (1995)
- Paxinos, G., & Watson, C.**, *The rat brain in stereotaxic coordinates*, San Diego, Academic Press 1997
- Pelletier, G., & Leclerc, R.**, Immunohistochemical localization of adrenocorticotropin in the rat brain, *Endocrinology* **104**, 1426-1433 (1979)
- Perera, A.D., Verbalis, J.G., Mikuma, N., et al.**, Cholecystokinin stimulates gonadotropin-releasing hormone release in the monkey (*Macaca mulatta*), *Endocrinology* **132**, 1723-1728 (1993)
- Pisegna, J.R., De Weerth, A., Huppi, K., et al.**, Molecular cloning of the human brain and gastrin cholecystokinin receptor. Structure, functional expression and chromosomal localization, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **189**, 296-303 (1992)
- Plotsky, P., & Vale, W.W.**, Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophyseal portal circulation in the rat, *Science* **230**, 461-463 (1985)
- Polak, J.M., Bloom, S.R., Rayford, P.L., et al.**, Identification of cholecystokinin-secreting cells, *Lancet* **2**, 1016-1018 (1975)
- Pong, S.S., Chaung, L.Y., Dean, D.C., et al.**, Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues, *Molecular Endocrinology* **10**, 57-61 (1996)
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., et al.**, A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour, *Nature* **380**, 243-247 (1996)
- Ranson, R.N., Motawei, K., Pyner, S., et al.**, The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic

preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion, *Experimental Brain Research* **120**, 164-172 (1998)

**Raybould, H.E., Gayton, R.J., & Dockray, G.J.**, Mechanisms of action of peripherally administered cholecystokinin octapeptide on brain stem neurons in the rat, *The Journal of Neuroscience* **8**, 3018-3024 (1988)

**Reeve, J.R. Jr., Eysselein, V.E., Ho, F.J., et al.**, Natural and synthetic CCK-58: Novel reagents for studying cholecystokinin physiology, *Annual NY Academic Science* **713**, 11-21 (1994)

**Rehfeld, J.F.**, Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters?, *Journal of Neurochemistry* **44**, 1-10 (1985)

**Rehfeld, J.F., Sun, G., Christensen, T., et al.**, The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 251-258 (2001)

**Reidelberger, R.D., & Solomon, T.E.**, Comparative effects of CCK-8S on feeding, sham feeding, and exocrine pancreatic secretion in rats, *American Journal of Physiology* **251**, R 97-105 (1986)

**Reidelberger, R.D., Hernandez, J., Fritsch, B., et al.**, Abdominal vagal mediation of the satiety effects of CCK in rats, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286**, R 1005-1012 (2004)

**Riediger, T., Traebert, M., Schmid, H.A., et al.**, Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus, *Neuroscience Letters* **341**, 151-155 (2003)

**Riediger, T., Bothe, C., Becskei, C., et al.**, Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression, *Neuroendocrinology* **79**, 317-326 (2004)

**Rinaman, L., & Miselis, R.R.**, Monosynaptic contacts within the nucleus tractus solitarius between vagal afferent and efferent neurons innervating the stomach rat, *Society of Neuroscience* **13**, 735, Abstract (1987)

**Rinaman, L., Hoffmann, G.E., Dohanics, J., et al.**, Cholecystokinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats, *Journal of Comparative Neurology* **360**, 246-256 (1995)

**Ritter, R.C., Brenner, L.A., & Tamura, C.S.**, Endogenous CCK and the peripheral neural substrates of intestinal satiety, *Annual NY Academic Science* **713**, 255-267 (1994)

**Ritter, R.C., & Ladenheim, E.E.**, Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food intake by cholecystokinin, *American Journal of Physiology* **248**, R 501-504 (1999)

**Ritter, R.C., Covasa, M., & Matson, C.A.**, Cholecystokinin: proofs and prospects for involvement in control of food intake and body weight, *Neuropeptides* **33**, 387-399 (1999)

**Ritter, S., Dinh, T.T., & Zhang, Y.**, Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose, *Brain Research* **21**, 37-47 (2000)

**Rogers, R.C., & Hermann, G.E.**, Vagal afferent stimulation-evoked gastric secretion suppressed by paraventricular nucleus region, *Journal of the Autonomic Nervous System* **13**, 191-199 (1985)

- Rogers, R.C., & Hermann, G.E.**, Hypothalamic paraventricular nucleus stimulation-induced gastric acid secretion and bradycardia suppressed by oxytocin antagonist, *Peptides* **7**, 695-700 (1986)
- Romijn, H.J., van Uum, J.F., Breedijk, I., et al.**, Double immunolabeling of neuropeptides in the human hypothalamus as analyzed by confocal laser scanning fluorescence microscopy, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**, 229-236 (1999)
- Rowland, N.E.**, What do “eating peptides” really control? Potent stimulation of food acquisition by AgRP, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **286**, R 16-17 (2004)
- Rüter, J., Kobelt, P., Tebbe, J.J., et al.**, Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats, *Brain Research* **991**, 26-33 (2003)
- Saad, M.F., Bernaba, B., & Hwu, C.M.**, Insulin regulates plasma ghrelin concentration, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87**, 3997-4000 (2002)
- Sagar, S.M., Sharp, F.R., & Curran, T.**, Expression of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level, *Science* **240**, 1328-1331 (1988)
- Sakaguchi, T., & Ohtake, M.**, Inhibition of gastric motility induced by activation of the hypothalamic paraventricular nucleus, *Brain Research* **335**, 365-367 (1985)
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., et al.**, Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-Coupled receptors that regulate feeding behavior, *Cell* **92**, 573-585 (1998)
- Saladin, R., DeVos, P. Guerre-Millo, M., et al.**, Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration, *Nature* **377**, 527-529 (1995)
- Samson, W.K., Lumpkin, M.D., Nilaver, G., et al.**, Motilin: a novel growth hormone releasing agent, *Brain Research Bulletin* **12**, 57-62 (1984)
- Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., Grzanna, R., et al.**, Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *Journal of Comparative Neurology* **241**, 138-153 (1985)
- Schwanzel-Fukuda, M., Morell, J.I., & Pfaff, D.W.**, Localization of forebrain neurons which project directly to the medulla and spinal cord of the rat by retrograde tracing with wheat germ agglutinin, *Journal of Comparative Neurology* **226**, 1-20 (1984)
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., et al.**, Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in *ob/ob* mice, *Diabetes* **45**, 531-535 (1996)
- Schwartz, G.J., Moran, T.H., White, W.O., et al.**, Relationships between gastric motility and gastric vagal afferent responses to CCK and GRP in rats differ, *American Journal of Physiology* **272**, R1726-1733 (1997)
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D.J., et al.**, Central nervous system control of food intake, *Nature* **404**, 661-671 (2000)
- Seoane, L.M., Lopez, M., Tovar, S., et al.**, Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and the somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus, *Endocrinology* **144**, 544-551 (2003)

- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., et al.**, Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway, *Diabetes* **50**, 227-232 (2001)
- Silver, A.J., & Morley, J.E.**, Role of CCK in regulation of food intake, *Prog Neurobiology* **36**, 23-24 (1991)
- Sim, L.J., & Joseph, S.A.**, Arcuate nucleus projections to brainstem regions which modulate nociception, *Journal of Chemical Neuroanatomy* **4**, 97-109 (1991)
- Simasko, S.M., & Ritter, R.C.**, Cholecystokinin activates both A- and C- type vagal afferent neurons, *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* **285**, G 1204-1213 (2003)
- Smith, G.P., Jerome, C., Cushin, R., et al.**, Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat, *Science* **213**, 1036-1037 (1981)
- Smith, R.G., Cheng, K., Schoen, W.R., et al.**, A nonpeptidyl growth hormone secretagogue, *Science* **260**, 1640-1643 (1993)
- Smith, G.P., & Epstein, A.N.**, Increased feeding in response to decreased glucose utilization in the rat and monkey, *American Journal of Physiology* **217**, 1083-1087 (1996)
- Smith, R.G., Palyha, O.C., Feighner, S.D., et al.**, Growth hormone releasing substances: types and receptors, *Hormone Research* **51**, 1-8 (1999)
- Sobhani, I., Buyse, M., Goiot, H., et al.**, Vagal stimulation rapidly increases leptin secretion in human stomach, *Gastroenterology* **122**, 259-263 (2002)
- Song, Z., Levin, B.E., McArdle, J.J., et al.**, Convergence of pre- and postsynaptic influences on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus, *Diabetes* **50**, 2673-2681 (2001)
- Spannagel, A.W., Green, G.M., Guan, D., et al.**, Purification and characterization of a luminal cholecystokinin-releasing factor from rat intestinal secretion, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **93**, 4415-4420 (1996)
- Stanley, B.G., Daniel, D.R., Chin, A.S., et al.**, Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion, *Peptides* **6**, 1205-1211 (1985)
- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., et al.**, Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity, *Peptides* **7**, 1189-1192 (1989)
- Stanley, B.G., Magdalin, W., Seifari, A., et al.**, Evidence for neuropeptide Y mediation of eating produced by food deprivation and for a variant of the Y1 receptor mediating this peptide's effect, *Peptides* **13**, 581-587 (1992)
- Stewart, J.J., & Burks, T.F.**, Actions of cholecystokinin octapeptide on smooth muscle of isolated dog intestine, *American Journal of Physiology* **232**, E 306-310 (1977)
- Strader, A.D., & Woods, S.C.**, Gastrointestinal hormones and food intake, *Gastroenterology* **128**, 175-191 (2005)
- Taché, Y., Yang, H., & Yanagisawa, K.**, Brain regulation of gastric acid secretion by neuropeptides, In Y. Taché and D.L. Wingate (Eds.) *Brain-Gut Interactions*, CRC Press, Boca Raton, 169-186 (1991)

- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., et al.**, Ghrelin strongly stimulates growth hormone (GH) release in humans, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85**, 4908-4911 (2000)
- Tartaglia, L.A.**, The leptin receptor, *Journal of Biological Chemistry* **272**, 6093-6096 (1997)
- Tatemoto, K., Carlquist, M. & Mutt, V.**, Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide, *Nature* **296**, 659-660 (1982)
- Tena-Sempere, M., Barreiro, M.L., Gonzalez, L.C., et al.**, Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis, *Endocrinology* **143**, 717-725 (2002)
- Ter Horst, G.J., Luiten, P.G., & Kuipers, F.**, Descending pathways from hypothalamus to dorsal motor vagus and ambiguous nuclei in the rat, *Journal of Autonomous Nervous System* **11**, 59-75 (1984)
- Ter Horst, G.J., de Boer, P., Luiten, P.G., et al.**, Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat, *Neuroscience* **31**, 785-797 (1989)
- Thompson, D.A., & Campbell, R.G.**, Hunger induced by 2-deoxy-D-glucose: glucoprivic control of taste preference and food intake, *Science* **198**, 1065-1068 (1977)
- Thorsell, A., & Heilig, M.**, Diverse functions of neuropeptide Y revealed using genetically modified animals, *Neuropeptides* **36**, 182-193 (2002)
- Timofeeva, E., & Richard, D.**, Functional activation of CRH neurons and expression of the genes encoding CRH and its receptors in food-deprived lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats, *Neuroendocrinology* **41**, 327-340 (1997)
- Tomasetto, C., Karam, S.M., Ribieras, S., et al.**, Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide, *Gastroenterology* **119**, 395-405 (2000)
- Träbert, M., Riediger, T., Whitbread, S., et al.**, Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus, *Journal of Neuroendocrinology* **14**, 580-586 (2002)
- Travers, J.B., Travers, S.P., & Norgren, R.**, Gustatory neural processing in the hindbrain, *Annual Review of Neuroscience* **10**, 595-632 (1987)
- Tschöp, M., Smiley, D.L., & Heiman, M.L.**, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature* **407**, 908- 913 (2000)
- Tschöp, M., Weyer, C., Tataranni, A., et al.**, Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity, *Diabetes* **50**, 707-709 (2001)
- Tsunoda, Y., You, H., Park, J., et al.**, Cholecystokinin synthesizes and secretes leptin in isolated canine gastric chief cells, *Biochemical and Biophysical Research Community* **310**, 681-684 (2003)
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., et al.**, A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding, *Nature* **379**, 69-72 (1996)
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., et al.**, Orexigen-sensitive NPY/AgrP pacemaker neurons in hypothalamic arcuate nucleus, *Nature Neuroscience* **7**, 493-494 (2004)
- Vaughan, J.M., Fischer, W.H., Hoeger, C., et al.**, Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus, *Endocrinology* **125**, 1660-1665 (1989)

- Verbalis, J.G., McCann, M.J., McHale, C.M., et al.**, Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety, *Science* **232**, 1417-1419 (1986)
- Verbalis, J.G., Richardson, D.W., & Stricker, E.M.**, Vasopressin release in response to nausea producing agents and cholecystokinin in monkeys, *American Journal of Physiology* **252**, R 749-753 (1987)
- Vergoni, A.V., & Bertolini, A.**, Role of melanocortins in the central control of feeding, *European Journal of Pharmacology* **405**, 25-32 (2000)
- Voigt, J.P., Huston, J.P., Voits, M., et al.**, Effects of cholecystokinin-octapeptide CCK-8 on food intake in adult and aged rats under different feeding conditions, *Peptides* **17**, 1313-1315 (1996)
- Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., et al.**, Expression of ghrelin and the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors, *The Journal of Endocrinology and Metabolism* **87**, 1300-1308 (2002)
- Wang, Y.H., Taché, Y., Sheibel, A.B., et al.**, Two types of leptin-responsive gastric vagal afferents terminals: an *in vitro* single-unit study in rats, *American Journal of Physiology* **273**, R 833- 837 (1997)
- Wang, L., Martinez, V., Barrachina, M.D., et al.**, Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice, *Brain Research* **791**, 157-166 (1998)
- Wang, L., Saint-Pierre, D.H., & Taché, Y.**, Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus, *Neuroscience Letters* **325**, 47-51 (2002)
- Wank, S.A., Harkins, R.T., Jensen, R.T., et al.**, Purification, molecular cloning, and functional expression of the cholecystokinin receptors from the pancreas rat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **89**, 3605-3609 (1992 a)
- Wank, S.A., Pisegna, J.R., & DeWeerth, A.**, Brain and gastrointestinal cholecystokinin receptor family: structure and functional expression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* **89**, 8691-8695 (1992 b)
- Weems, W.A., Seidel, E.R., & Johnson, L.R.**, Induction *in vitro* of a specific pattern of jejunal propulsive behavior by cholecystokinin, *American Journal of Physiology* **248**, G 470-478 (1985)
- Weindl, A., & Joynt, R.J.**, Barrier properties of the subcommisural organ, *Arch Neurology* **29**, 16-22 (1973)
- Weller, A., Corp, E.S., Tyrka, A., et al.**, Trypsin inhibitor and maternal reunion increase plasma cholecystokinin in neonatal rats, *Peptides* **13**, 939-941 (1992)
- West, D.B., Fey, D., & Woods, S.C.**, Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food-intake in free-feeding rats, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **246**, R 776-787 (1984)
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., et al.**, The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas, *Regulatory Peptides* **107**, 63-69 (2002)
- Willensen, M.G., Kristensen, P., & Rømer, J.**, Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat, *Neuroendocrinology* **70**, 306-316 (1999)

- Williams, P.L.**, Nervous-System-Hypothalamus, In: Anonymous Grays Anatomy, 38th edition. New York: *Churchill-Livingston*, 1100-1106 (1996)
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., et al.**, The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes, *Journal of Physiological Behaviour* **74**, 683-701 (2001)
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D.J., et al.**, Signals that regulate food intake and energy homeostasis, *Science* **280**, 1378-1383 (1998)
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., et al.**, The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion, *Endocrinology* **141**, 4325-4328 (2000)
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., et al.**, Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats, *Diabetes* **50**, 2540-2547 (2001 a)
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., et al.**, Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86**, 5992 (2001 b)
- Yang, Y.K., & Harmon, C.M.**, Recent developments in our understanding of melanocortin system in the regulation of food intake, *Obesity reviews* **4**, 239-248 (2003)
- Zarbin, M.A., Wamsley, J.K., Innis, R.B., et al.**, Cholecystokinin receptors: presence and axonal flow in the rat vagus nerve, *Life Science* **29**, 697-705 (1981)
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., et al.**, Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue, *Nature* **372**, 425-432 (1994)
- Zittel, T.T., Glatzle, J., Kreis, M.E., et al.**, C-fos expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats, *Brain Research* **846**, 1-11 (1999)

## 7.2 Eigene Publikationen

**Kobelt, P., Tebbe, J.J., Tjandra, I., Stengel, A., Bae, H.G., Andresen, V., van der Voort, I., Veh, R.W., Werner, C.R., Klapp, B.F., Wiedenmann, B., Wang, L., Taché, Y., & Mönnikes, H.**, CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin, *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R 751-758 (2005)

**Kobelt, P., Tebbe, J.J., Tjandra, I., Bae, H.G., Rüter, J., Klapp, B.F., Wiedenmann, B., & Mönnikes, H.**, Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain, *Brain Research Protocols* **13**, 45-52 (2004)

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

3 V.....	III. Ventrikel
ACTH.....	Adrenocorticotropes Hormon
AgrP.....	<i>Agouti-related Protein</i>
$\alpha$ -MSH.....	alpha-Melanocyten-stimulierendes Hormon
ANOVA.....	<i>Analysis of Variance</i>
AP.....	Area postrema
APUD.....	<i>Amin Precursor Uptake and Decarboxylation</i>
<i>aqua bidest</i> .....	bidestilliertes Wasser
ARC.....	Nucleus arcuatus
AS.....	Aminosäure
BSA.....	<i>Bovine Serum Albumine</i> , Rinderserumalbumin
CART.....	<i>Cocaine and Amphetamine Regulating Transcript</i>
CC.....	Canalis centralis
CCK.....	Cholezystokinin
CCK-8S.....	Cholezystokinin-Oktapeptid
CCK-R.....	Cholezystokinin-Rezeptor
cLSM.....	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CRF.....	<i>Corticotropin-Releasing Factor</i>
DABCO.....	1,4-Diazabicyklo-[2.2.2]-oktan
DAG.....	Diazylglyzerol
DBI.....	<i>Dendiazepam-Binding Inhibitor</i>
DMH.....	Dorsomedialer Hypothalamus
DVC.....	Dorsaler vagaler Komplex
EM.....	Eminentia mediana
FITC.....	Fluoreszeinthiozyanat
FSH.....	Follikel-stimulierendes Hormon
GABA.....	<i>Gamma-Amino-Butter-Acid</i>
GH.....	<i>Growth-Hormone</i>
GHRH.....	<i>Growth-Hormone-Releasing Hormone</i>
GHRP-6.....	<i>Growth-Hormone-Releasing-Peptide-6</i>
GHS.....	<i>Growth-Hormone-Secretagogues</i>
GHSR.....	<i>Growth-Hormone-Secretagogues Rezeptor</i>

---

GLP-1.....	<i>Glukagon-Like Peptide-1</i>
h.....	Stunde
IP <sub>3</sub> .....	Inositoltrisphosphat
i.p.....	intraperitoneal
KG.....	Körpergewicht
LC.....	Nucleus locus coeruleus
LCRF.....	<i>Luminal CCK-Releasing Factor</i>
LETO.....	Long-Evans Tokushima Otsuka
LH.....	Lateraler Hypothalamus
LH.....	Luteinisierendes Hormon
MAPK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCH.....	<i>Melanin-Concentrating Hormone</i>
MCR.....	Melanocortin-Rezeptoren
ME.....	Mediana eminentia
mRNA.....	<i>m-Ribo-Nuclein-Acid</i>
NaCl.....	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O.....	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
2NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O.....	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaN <sub>3</sub> .....	Natriumazid
NaOH.....	Natriumhydroxid
NPY.....	Neuropeptid Y
NTS.....	Nucleus tractus solitarius
Ob-R.....	Leptin-Rezeptor
OLETF.....	Otsuka Long Evans Tokushima Fatty
PBS.....	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphatpuffer
PFLH.....	Perifornikale Area/lateraler Hypothalamus
PI.....	Propidiumiodid
PP.....	<i>Pancreatic Polypeptide</i>
POMC.....	Pro-opiomelanocortin
PVN.....	Nucleus paraventricularis
PYY.....	<i>Peptide Tyrosine-Tyrosine</i>
RAP.....	Nuclei raphe dorsalis, magnus und pallidus
SC.....	Nucleus subcoeruleus
TRH.....	<i>Thyreoid-Releasing Hormone</i>

TSH.....	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
U.....	<i>Unit</i> , Enzymeinheit
VMH.....	Ventromedialer Hypothalamus
vs. ....	versus

## **ANHANG**

### **8.1 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertationsschrift mit dem Titel „Untersuchungen zur Interaktion zwischen Ghrelin und Cholezystokinin (CCK) bei der Appetitregulation“ selbst verfasst und keine unzulässige Hilfe Dritter in Anspruch genommen habe. Ich habe weiterhin auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dargestellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt.

Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden unter dem Titel “CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin“ im *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **288**, R 751-758 (2005) veröffentlicht.

Rellingen, Februar 2007

Ines Tjandra

## **8.2 Lebenslauf**

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

### **8.3 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Psych. Hubert Mönnikes für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit, in seiner Forschungsgruppe wissenschaftlich zu arbeiten. Er begleitete meine Arbeit stets mit Interesse und förderte diese mit konstruktiver Kritik.

Herrn Dr. rer. nat. Peter Kobelt danke ich für seine intensive und wissenschaftliche Betreuung. Während der gesamten Durchführung dieser Studie war er mit seinen Erfahrungen und seinem Engagement eine große Stütze. Außerdem gilt ihm mein besonderer Dank für die kritische Durchsicht und Diskussion dieses Manuskripts.

Ich danke auch meiner Familie für ihr Verständnis und ihre Unterstützung über die gesamte Zeit des Entstehens dieser Arbeit.

Ines Tjandra