

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

Dissertation

**Untersuchung zur Fos-Expression im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus nach
peripherer Ghrelinadministration in männlichen Ratten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Yesim Avsar
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. H. Mönnikes
2. Prof. Dr. med. P. Holzer
3. Priv.-Doz. M. Z. Strowski

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Brain-Gut-Achse	1
1.2 An der Sättigungsregulation beteiligte Hirnkerne	4
1.2.1 Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus	4
1.2.2 Der Nucleus arcuatus	5
1.2.3 Der Dorsale Vagale Komplex	6
1.3 Ghrelin	9
1.3.1 Entdeckung von Ghrelin	9
1.3.2 Struktur von Ghrelin	11
1.3.3 Bildungsort von Ghrelin	13
1.3.4 Growth-Hormone-Releasing-Aktivität von Ghrelin	13
1.3.5 Orexigene Wirkung von Ghrelin	15
1.3.6 Gastrointestinale Wirkung von Ghrelin	16
1.3.7 Die Rolle des Nervus vagus für die Wirkung von Ghrelin	17
1.3.8 Zentrale Wirkung von Ghrelin	19
1.4 Der neuronale Marker Fos	20
1.5 Ziele dieser Studie	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien, Geräte und Materialien	22
2.2 Arbeitslösungen	26
2.2.1 Antifading-Substanzlösung	26
2.2.2 Blockierpuffer	26
2.2.3 Natriumazidlösung	26
2.2.4 Natriumborhydridlösung	26
2.2.5 Plasmaexpander	26
2.2.6 Pikrinsäure-(Trinitrophenol) Lösung	27
2.2.7 Herstellung der Fixierlösung	27
2.2.8 Zusammensetzung des Phosphatpuffers	27
2.2.9 Herstellung der Propidiumjodidlösung	27
2.2.10 Herstellung von Saccharoselösung	27

2.2.11	Triton X-Lösung	27
2.3	Ghrelin	28
2.4	Versuchstiere	28
2.5	Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	29
2.6	Die Wirkung von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die Fos –Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm	30
2.6.1	Intraperitoneale Injektion von Ghrelin bzw. Vehikel und Narkose	30
2.6.2	Präparation des Herzens	31
2.6.3	Durchführung der Perfusionsfixierung	31
2.6.4	Vorbereitung und Aufbewahrung der Gehirne	33
2.6.4.1	Dehydrierung der Gehirne und Unterteilung in weiterzuverarbeitende Gewebeblöcke	34
2.6.4.2	Aufblockung und Aufbewahrung der Gehirne	36
2.6.4.3	Anfertigung der Gefrierschnitte	36
2.6.4.4	Allgemeines zu den Färbeprotokollen	36
2.6.5	Immunhistologische Färbung	37
2.6.5.1	Immunhistologisches Protokoll zur Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid	37
2.6.5.2	Immunhistochemisches Protokoll zur Doppelfärbung für Fos- und Corticotropin-Releasing-Hormone-Immunreaktivität	38
2.6.5.3	Immunhistologisches Protokoll zur Fos- und NPY-Färbung	41
2.7	Statistische Analyse	43
2.7.1	Statistische Auswertung der verhaltensbiologischen Experimente	43
2.7.2	Mikroskopische Auswertung (Immunhistochemie)	43
2.7.3	Mikroskopische Auswertung der immunhistologischen Experimente	44
2.7.4	Statistische Auswertung der immunhistologischen Experimente	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	45
3.2	Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm	46

3.3 Qualitative Charakterisierung des neuropeptidergen Phänotyps von aktivierten PVN-Neuronen sowie die Bestimmung des neuropeptidergen Phänotyps umgebender Nervenfasern nach intraperitonealer Ghrelin-Injektion	51
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
3.4.1 Versuche zur Nahrungsaufnahme nach intraperitonealer Verabreichung von Ghrelin	53
3.4.2 Immunhistochemische Versuche zur Fos-Expression im Hypothalamus und im Hirnstamm nach intraperitonealer Applikation von Ghrelin	53
4. Diskussion	55
4.1 Einleitung	56
4.2 Einfluss von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	56
4.3 Wirkung von intraperitoneal verabreichtem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm	56
4.4 Die Phänotypisierung der Fos-positiven Neurone im PVN	58
4.5 Die Bedeutung von CRH für die Regulierung der Nahrungsaufnahme	59
4.6 Die Bedeutung von NPY-positiven Fasern im Hypothalamus und im Hirnstamm	60
4.7 Mögliche direkte Aktivierung des PVN durch Ghrelin	61
4.8 Der Einfluss des Nervus vagus auf die Ghrelinwirkung	62
4.9 Mögliche Fos-Expression durch unspezifische Stimuli	64
4.10 Einfluss der Versuchsmethoden auf die Ergebnisse	65
4.11 Fazit	66
5. Zusammenfassung	67
6. Literatur	70
6.1 Referenzliste	70
6.2 Eigene Publikation	82
7. Anhang	83
7.1 Abkürzungsverzeichnis	83
7.2 Erklärung	84
7.3 Lebenslauf	86
7.4 Danksagung	88

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1 „Brain - Gut“ - Achse

Die Funktionen des Gastrointestinaltraktes unterliegen einer komplexen regulatorischen Kontrolle durch das Zentrale Nervensystem (ZNS). Beide Systeme kommunizieren miteinander über den Sympathikus und den Parasympathikus. Afferente Nervenendigungen im Gastrointestinaltrakt sind mit zahlreichen Mechano-, Chemo- und Nozirezeptoren ausgestattet, deren Aktivierung eine Vielzahl viszeraler Reflexe reguliert, die gastrointestinale Funktionen regulieren. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass an dieser regulatorischen Kontrolle gastrointestinaler Funktionen Peptide im ZNS und im Gastrointestinaltrakt beteiligt sind. Diese Peptide entfalten ihren Einfluss auf spezifische gastrointestinale Funktionen über bestimmte Hirnkerne im autonomen Nervensystem.

Verschiedene periphere und zentrale Peptide bzw. Proteine mit unterschiedlichen Funktionen wurden bisher isoliert. Leptin und Insulin gehören zu den bekanntesten Peptiden, die an der Regulation der Energiehomöostase beteiligt sind. Leptin aktiviert hauptsächlich katabole Mechanismen (Lee, W. N. et al. 2000; Lee, Y. et al. 2001), während Insulin in erster Linie anabole Wirkungen hat (Steffens, A. B. 1975). Die Bildung von Insulin in β -Zellen des Pankreas (Scott, D. A. and Fisher, A. M. 1938) und die Freisetzung von Leptin von Adipozyten (Leroy, P. et al. 1996; Rentsch, J. and Chiesi, M. 1996) ist eng assoziiert mit dem Body-Mass-Index (BMI) (Polonsky, K. S. et al. 1988; Considine, R. V. et al. 1996). Mit steigendem BMI steigt deren Sekretion (Polonsky, K. S. et al. 1988; Considine, R. V. et al. 1996), wobei der Körperfettanteil ausschlaggebend ist und weniger das absolute Körpergewicht (Hauner, H. and Pfeiffer, E. F. 1988; Shimizu, H. et al. 1997).

Beide Peptide entfalten ihre Wirkung über ihre jeweiligen Rezeptoren, die sich u.a. auf Neuronen im hypothalamischen Nucleus arcuatus (NARC) befinden (van Houten, M. et al. 1980; Schwartz, M. W. et al. 1996). Neurone des NARC bilden die orexigenen Peptide Neuropeptide Y (NPY) (Smith, Y. et al. 1985) und das Agouti Related Protein (AgRP) (Kim, M. S. et al. 2000) und die anorexigenen Pro-Opiomelanocortin-(POMC) Derivate α -Melanocyte Stimulating Hormone (α -MSH) (Olszewski, P. K. et al. 2001) und Cocaine-and Amphetamine-Regulated Transcript (CART) (Thim, L. et al. 1998). Leptin und Insulin beeinflussen die Freisetzung beider Peptidgruppen (Cheung, C. C. et al. 1997; Schwartz, M. W. et al. 2000). Dieser Regelkreis ist an der Langzeitregulation der Nahrungsaufnahme beteiligt.

1. Einleitung

Zusätzlich wird die Nahrungsaufnahme über die kurzzeitige sogenannte „meal-to-meal“ Regulation von gastrointestinalen Peptiden gesteuert (Schwartz, M. W. *et al.* 2000). Zu diesen Peptiden gehören Cholezystokinin (CCK) (Muurahainen, N. *et al.* 1988), Peptide YY (PYY) (Batterham, R. L. *et al.* 2002) und Oxyntomodulin (OXM) (Bataille, D. *et al.* 1981). Diese Peptide werden von endokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes gebildet und nach Nahrungsaufnahme freigesetzt. Sie wirken über G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf afferente Nerven oder direkt auf Neuronen des NARC und induzieren ein subjektives Sättigungsgefühl (Konturek, S. J. *et al.* 2004).

Zwei andere anorexigene Peptide sind das Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) (Holst, J. J. *et al.* 1977) und das Bombesin (Erspamer, V. *et al.* 1974). Auch diese Peptide werden im Gastrointestinaltrakt gebildet und freigesetzt (Holst, J. J. *et al.* 1977; McDonald, T. J. *et al.* 1978). Die anorexigene Wirkung wird allerdings hauptsächlich über die Aktivierung der Neurone des Hirnstamms vermittelt (Ladenheim, E. E. and Ritter, R. C. 1993; Tang-Christensen, M. *et al.* 2001).

Bei Nahrungskarenz hingegen wird im Gastrointestinaltrakt das orexigene Peptid Ghrelin freigesetzt (Asakawa, A. *et al.* 2001). Ghrelin hat auf NPY/AGRP-Neurone und POMC-Neurone einen entgegengesetzten Effekt als Leptin und Insulin. Während von Leptin und Insulin inhibierte NARC-Neurone (NPY/AGRP-Neurone) von Ghrelin stimuliert werden, werden von Leptin und Insulin aktivierte POMC-positive Neurone des NARC von Ghrelin inhibiert (Kamegai, J. *et al.* 2001; Shintani, M. *et al.* 2001), (Tabelle 1.1.).

Gleichgewicht und Interaktion zwischen orexigenen und anorexigenen Faktoren spielen eine wichtige Rolle in der regulatorischen Kontrolle der Nahrungsaufnahme. Eine Störung der Balance im Zusammenspiel dieser Peptide könnte die Ursache für Krankheiten des Verdauungstraktes (Ferguson, A. V. *et al.* 1988) oder für Veränderungen der Nahrungsaufnahme mit resultierender Adipositas (Aravich, P. F. and Scalfani, A. 1983) bzw. Kachexie sein (Broberger, C. *et al.* 1997).

1. Einleitung

<u>Pankreas</u>	<u>Magen</u>	<u>Darm</u>	<u>Fettgewebe</u>	<u>Gehirn</u>
Amylin (↓)	Ghrelin (↑) ¹	CCK (↓)	Leptin (↓)	Orexin (↑)
Insulin (↓)	Bombesin (↓)	GLP-1 (↓)		NPY (↑)
Glucagon (↓)	GRP (↓)	Peptid YY (↓)		AgRP (↑)
Ghrelin (↑) ²		Enterostatin (↓)		CRH (↓)
				TRH (↓)
				MSH (↓)
				Serotonin (↓)
				POMC (↓)

Tabelle 1.1: Zusammenfassung nahrungsregulatorischer Substanzen.

Der fördernde oder hemmende Einfluss der Substanzen auf die Nahrungsaufnahme ist mit entsprechenden Pfeilsymbolen gekennzeichnet. Modifiziert nach J.C. Halford 2001; J.J Hillebrand *et al.* 2002; S.C. Woods 2004

1.2 An der Sättigungsregulation beteiligte Hirnkerne

Nach Integration von Informationen über den Funktionszustand des Organismus im Gehirn erfolgt die neuronale Modulation gastrointestinaler Funktionen durch Änderungen des Funktionszustandes des autonomen Nervensystems. Innerhalb des zentralen autonomen Netzwerkes, einem System von Nervenkernen im Gehirn, das Integration und Regulation sämtlicher neuroendokriner Vorgänge des Organismus gewährleistet, gibt es einige wichtige Hirnkerne, die von entscheidender Bedeutung für die ZNS-Kontrolle gastrointestinaler Funktionen sind. Die Bedeutung dieser Hirnkerne in der Interaktion von Gehirn und Verdauungstrakt ergibt sich aus den Besonderheiten ihrer neuroanatomischen Projektionen und physiologischen Funktionen. Drei dieser anatomischen Strukturen sind der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus (Aravich, P. F. and Sclafani, A. 1983), der Dorsale Vagale Komplex (Rossiter, C. D. *et al.* 1990) und der Nucleus arcuatus (Broberger, C. *et al.* 1999).

1.2.1 Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus

Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus (PVN) besteht aus einer Anhäufung kleinerer und größerer Neurone in einem kapillarreichen Gebiet in der Wand des dritten Gehirnvventrikels. Er ist für die Regulation und Integration neuroendokriner Vorgänge des Organismus von zentraler Bedeutung. Neurone des PVN projizieren direkt zur Adeno- und Neurohypophyse. Hier werden durch Freisetzung von Neurohormonen bzw. -transmittern, wie Corticotropin Releasing Hormone (CRH), Thyreotropin Releasing Hormone (TRH), Oxytocin und Antidiuretischem Hormon (ADH) verschiedene endokrine Systeme reguliert. PVN Neurone projizieren auch zu präganglionären sympathischen und parasymphatischen Zentren im Hirnstamm und im Rückenmark, über die eine Modulation der Aktivität des vegetativen Nervensystems erfolgt (Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. 1980). Verschiedene Untersuchungen zeigten eine Beteiligung des PVN in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme. So verursachen Läsionen des PVN in Versuchstieren eine Hyperphagie und eine signifikante Gewichtszunahme (Aravich, P. F. and Sclafani, A. 1983). Intrazerebroventrikuläre Mikroinjektionen von orexigen wirkenden Substanzen wie NPY (Stanley, B. G. *et al.* 1985) und Orexin (Dube, M. G. *et al.* 1999) stimulierten die Nahrungsaufnahme.

1. Einleitung

Die intrazerebroventrikuläre Mikroinjektion der anorexigenen Substanzen CRH (Krahn, D. D. *et al.* 1988) und Leptin (Yokosuka, M. *et al.* 1998) hemmt die Nahrungsaufnahme. Nach Applikation des orexigenen Peptides NPY (Li, B. H. *et al.* 1994) und des anorexigenen Signalmoleküls Leptin (Schwartz, M. W. *et al.* 1996) konnte eine Aktivierung des „immediate early gene“-Markers Fos im Hypothalamus nachgewiesen werden. Als Reaktion auf Nahrungskarenz und vor Initiation der Nahrungsaufnahme wurde bei Ratten die Freisetzung des orexigenen Peptids NPY aus Neuronen des PVN beobachtet (Kalra, S. P. *et al.* 1991). Vermutlich wird im PVN durch Interaktion von Neurotransmittern/-modulatoren die Freisetzung von NPY aktiviert bzw. gehemmt und dadurch die Nahrungsaufnahme reguliert (Kalra, S. P. *et al.* 1999).

1.2.2 Der Nucleus arcuatus

Der Nucleus arcuatus (NARC) ist am Boden des dritten Ventrikels lokalisiert und liegt lateral über der Eminentia mediana. Bestehend aus einer länglichen Ansammlung von Neuronen, erstreckt sich der NARC fast über die halbe Länge des Hypothalamus (Williams, G. *et al.* 2001). Seine Neuronen sind unterteilt in verschiedene funktionale Einheiten. So sind beispielsweise die orexigenen Signalmoleküle Neuropeptide Y (NPY) und Agouti Related Protein (AgRP) in einer Neuronenpopulation kolokalisiert (Broberger, C. *et al.* 1998), während in einer benachbarten Neuronengruppe die anorexigenen Derivate des Pro-Opiomelanocortin (POMC) α -Melanocyte-Stimulating Hormone (α -MSH) (Dube, D. *et al.* 1978) und Cocaine- and Amphetamine-regulated transcript (CART) (Elias, C. F. *et al.* 1998) lokalisiert sind. Beide Neuronenpopulationen interagieren miteinander über kürzere Projektionsfasern innerhalb des NARC (Meister, B. 2000) und über eine lokale NPY-Freisetzung (Williams, G. *et al.* 2001). Lokal freigesetztes NPY beeinflusst die Aktivität spezifischer NARC Neurone, einschließlich der NPY-Neurone selbst und die der POMC-Neurone (Williams, G. *et al.* 2001).

Es bestehen auch Verbindungen zwischen dem NARC und anderen Regionen des Hypothalamus. NPY/AgRP-Neurone projizieren über dorsale und anteriore Fasern in den Paraventriculären Nucleus (PVN), den Dorsomedialen Nucleus (DMH), die Laterale Hypothalamische Region (LHA), den Ventromedialen Nucleus und in die Mediale Preoptische Region (MPO) (Bai, F. L. *et al.* 1985). Ventrale Fasern der NPY/AgRP-Neurone projizieren zur Eminentia mediana (Bai, F. L. *et al.* 1985).

1. Einleitung

Die Kapillaren der Eminentia mediana sind fenestriert und ermöglichen zirkulierenden Signalmolekülen wie Leptin und Insulin, die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen (Broadwell, R. D. and Brightman, M. W. 1976). Diese und andere Substanzen, wie beispielsweise Glucose, haben somit durch Diffusion aus der Zerebrospinalflüssigkeit durch das Ependym in den Dritten Ventrikel Zugang zum NARC (Elmqvist, J. K. *et al.* 1998).

Eine Isoform des Leptinrezeptors (Ob-Rb) ist kolokalisiert mit NPY/AgRP und POMC/CART in Neuronen des ventromedialen und ventrolateralen NARC und mit Melanin-Concentrating Hormone (MCH) im LHA. Diese Neurotransmitter vermitteln vermutlich die Wirkung von Leptin auf den Hypothalamus (Meister, B. *et al.* 1989).

1.2.3 Der Dorsale Vagale Komplex

Der Dorsale Vagale Komplex (DVK) besteht aus einem motorischen Anteil, dem Dorsalen Motornucleus des Vagus (DMV), ein ausgedehnter Kernkomplex im zentralen Höhlengrau der Medulla oblongata, einem sensorischen Teil, dem Nucleus tractus solitarii (NTS), der sich von kaudal nach rostral durch die gesamte Medulla oblongata erstreckt und aus der Area Postrema (AP) (Cheng, S. B. and Lu, G. Q. 1996). Präganglionäre parasymphatische Fasern des DMV wandern mit dem Nervus Vagus zu gastrointestinalen Organen bis einschließlich dem Colon transversum beim Menschen bzw. bis zum Colon descendens bei der Ratte (Takayama, K. *et al.* 1982) und beeinflussen durch Veränderungen der vagalen Aktivität deren Funktionen (Pagani, F. D. *et al.* 1985).

Im NTS erfolgt die Umschaltung der viszerosensiblen Afferenzen aus dem respiratorischem, kardiovaskulärem und dem gastrointestinalem System (Hopkins, D. A. *et al.* 1984; Shapiro, R. E. and Miselis, R. R. 1985). Zusätzlich zu diesen peripheren Afferenzen erhält der NTS zahlreiche zentralnervöse Afferenzen, unter anderem aus der AP und aus dem Hypothalamus (Holstege, G. 1987; Hay, M. and Bishop, V. S. 1991). Reziproke Verbindungen zum DMV bilden die neuroanatomische Basis für die Vermittlung vago-vagaler Reflexe über den NTS (Rinaman, L. and Miselis, R. R. 1987). Projektionen des NTS zu anderen Regionen des Gehirns gewährleisten eine Integration afferenter Informationen in die zentralnervöse Kontrolle des Gastrointestinaltraktes durch andere Kernregionen, insbesondere auch Anteile des zentralen autonomen Netzwerkes (Ross, C. A. *et al.* 1985).

1. Einleitung

Die AP gehört zu den zirkumventrikulären Organen (Weindl, A. and Joynt, R. J. 1973). Die zirkumventrikulären Organe zeichnen sich durch kleine, hochpermeable und fenestrierte Kapillaren aus, die eine Umgehung der Blut-Hirn-Schranke erlauben (Weindl, A. and Joynt, R. J. 1973). Sie ermöglichen hypothalamischen Polypeptiden in den Blutkreislauf zu gelangen, und im Blut zirkulierenden Substanzen, welche die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, Gehirnfunktionen zu beeinflussen (Ganong, W. F. 2000). Die Neurone der AP werden von Chemorezeptoren aus dem Verdauungstrakt über afferente vagale Fasern, aber auch direkt durch zirkulierende Stoffe im Blut erregt (Yamamoto, H. *et al.* 2003). Bekannt als Chemorezeptortriggerzone reagiert die AP auf verschiedene emetische Substanzen und induziert über die Aktivierung des NTS Erbrechen (Borison, H. L. 1989). Neben dem NTS ist die AP über wechselseitige Projektionen auch mit dem DMV verbunden (Hyde, T. M. and Miselis, R. R. 1983). Der Funktionszustand von NTS und DMV kann somit indirekt durch humorale Einflussfaktoren auf die AP verändert werden (Hay, M. and Bishop, V. S. 1991). Untersuchungen zeigen, dass sich in mehreren Bereichen des DVK Bindungsstellen für postprandial freigesetzte gastrointestinale Peptidhormone finden (Chen, C. H. and Rogers, R. C. 1995; McLean, K. J. *et al.* 1996).

1. Einleitung

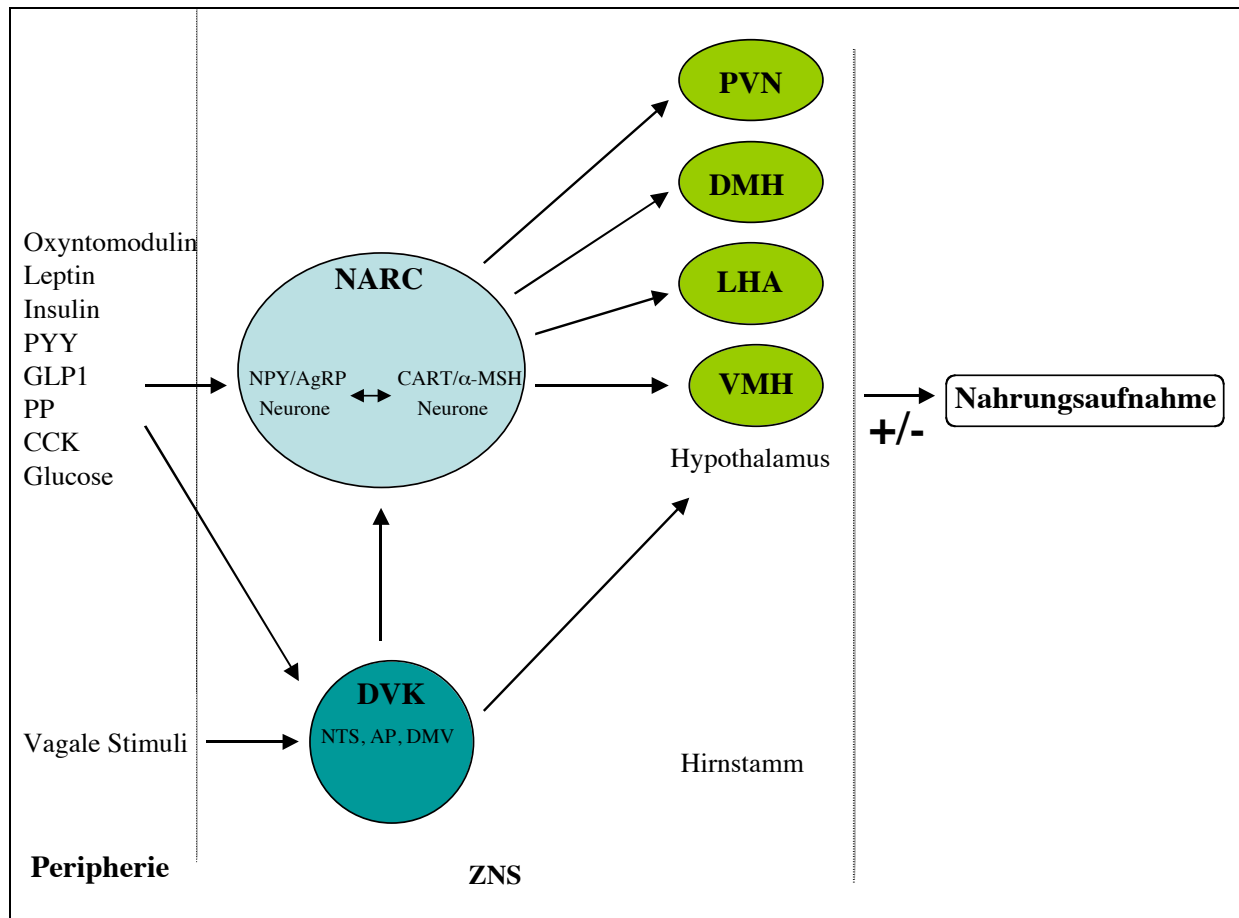


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen unterschiedlicher Gehirnregionen bei der Regulierung der Nahrungsaufnahme.

Periphere Signalmoleküle und vagale Signale aktivieren Neurone des NARC und des NTS. Diese stehen über Projektionen sowohl untereinander, als auch mit Kernen des Hypothalamus in Verbindung. Abhängig von der aktivierten Neuronenpopulation wird die Nahrungsaufnahme gehemmt bzw. stimuliert.

1.3 Ghrelin

1.3.1 Entdeckung von Ghrelin

Auf der Suche nach einem endogenen Faktor, der die Freisetzung von Wachstumshormon stimuliert, entdeckten Bowers 1977 *et al.*, dass synthetische Peptidanalogue des Opiats Met-Enkephalin *in vitro* die Wachstumshormonfreisetzung stimulieren (Bowers 1977). 1980 berichtete Bowers vom ersten sogenannten Growth Hormon-Releasing Peptide (GHRP)-6, ein synthetisches Hexapeptid, das sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die Wachstumshormonsekretion stimuliert (Bowers, C. Y. *et al.* 1980). GHRP-6 diente, da es selbst noch schlecht bioverfügbar und nur kurz wirksam war, als Ausgangssubstanz für die Entwicklung anderer Growth Hormon Secretagogues (GHS). Der Begriff GHS fasst eine Gruppe kleiner synthetischer Peptid- (GHRP-1, GHRP-2, Hexarelin, Ipamorelin), und Nichtpeptidmoleküle (MK0677, NN703, L692, L429) zusammen, die die Freisetzung von Wachstumshormon *in vivo* stimuliert (Korbonits, M. and Grossman, A. B. 1996). Zahlreiche GHS wurden seither entwickelt, von denen einige starke Growth-Hormon-Releasing-Aktivität besitzen, dabei die Freisetzung anderer Hypophysenhormone kaum beeinflussen und oral gut bioverfügbar sind (Hansen, T. K. *et al.* 1998; Raun, K. *et al.* 1998). Wichtigster Vertreter der Nichtpeptid-GHS ist das Spiroindoline MK0677. Seine gute orale Bioverfügbarkeit und lange Wirkungsaktivität, die es ermöglicht, mit einer Einzeldosis die Wachstumshormonsekretion für 24 Stunden zu erhöhen, machte MK0677 zum Mittel der Wahl bei der Behandlung von juvenilem Wachstumshormonmangel und der anabolen Intervention bei älteren Personen (Smith, R. G. *et al.* 1997).

Mit der Entdeckung der hypothalamischen Peptide Growth Hormone Releasing Hormone (Frohman, L. A. *et al.* 1980) und Somatostatin (Krush, L. *et al.* 1968) rückte das Interesse für GHS zunächst in den Hintergrund, da man glaubte, die endogenen Faktoren der Wachstumsregulation gefunden zu haben. GHRH stimuliert und Somatostatin hemmt die Freisetzung von Wachstumshormon (McCann, S. M. *et al.* 1972; Brazeau, P. *et al.* 1974). Nähere Untersuchungen ergaben aber, dass GHRH und GHS an unterschiedlichen G-Protein gekoppelten Rezeptoren binden und synergistische statt additive Wirkung haben. Signaltransduktionsmechanismen, die durch GHS aktiviert wurden, resultierten in einem Anstieg von intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Hypophysenzellen, während GHRH die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) erhöhte. Mittels radioaktiv markiertem MK0677 konnte der GHS-Rezeptor, der schon durch frühere Untersuchungen von

1. Einleitung

GHS-Bindungsstellen im Hypothalamus und in der Hypophyse von Ratten und Schweinen vermutet wurde (Codd, E. E. *et al.* 1989), identifiziert werden (Pong, S. S. *et al.* 1996). Der GHS-Rezeptor ist G-Protein-gekoppelt und aktiviert Phospholipase C und Phosphokinase C und mobilisiert damit intrazelluläres Kalzium (Pong, S. S. *et al.* 1996). Bisher sind zwei Formen des GHS-Rezeptors bekannt, GHS-R Typ 1a und GHS-R Typ 1b. Der GHRH-Rezeptor aktiviert dagegen die Adenylatzyklase und erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration (Howard, A. D. *et al.* 1996). Die Somatostatin-Rezeptoren 2 und 5, die Subtypen, die für die Hemmung der Wachstumshormonsekretion zuständig sind, hemmen die Adenylatzyklase und aktivieren den „Phospholipase C/Phosphokinase C second messenger“-Regelkreis (Day, R. *et al.* 1995).

Diese Erkenntnisse führten zu der Überlegung, dass es einen endogenen Liganden für den GHS-Rezeptor geben muss, der über einen dritten Kontrollmechanismus unabhängig von GHRH und Somatostatin an der Regulierung der Wachstumshormonsekretion beteiligt ist. 1999 entwickelte die Arbeitsgruppe von Kangara eine „Chinese Hamster“-Ovarienzelllinie, die klonierte GHS-Rezeptoren exprimierte, um verschiedene Rattengewebe nach einem potentiellen endogenen Liganden zu durchsuchen. Kalziumkonzentrationsänderungen in den Ovarienzellen wurden in Abhängigkeit vom Kontakt zu den unterschiedlichen Gewebearten gemessen. Der stärkste Kalziumeinstrom wurde beim Magengewebe beobachtet. Schließlich wurde aus dem Magengewebe der Ratte erstmals ein endogener Ligand isoliert und identifiziert, der spezifisch am GHS-Rezeptor Typ 1a bindet. Der entdeckte Ligand wurde Ghrelin genannt, „ghre“ ist die Proto-Indo-Europäische Wurzel des Wortes „grow“ und „relin“ steht für den Growth Hormon-Releasing Effekt. Ghrelin wurde identifiziert als ein aus 28 Aminosäuren bestehendes Peptid, dass an seiner N-terminalen dritten Aminosäure Serin eine Octanoylgruppe trägt (Kojima, M. *et al.* 1999), (Abbildung 1.2).

Zeitgleich hat eine andere Arbeitsgruppe mRNA aus Magengewebe der Ratte isoliert, die für ein dem Motilin ähnliches Peptid kodierte, das sie daher Motilin-Related-Peptide nannten (Tomasetto, C. *et al.* 2000). Später stellte sich heraus, dass es sich beim Motilin-Related-Peptide und Ghrelin um identische Peptide handelte (Coulie, B. J. and Miller, L. J. 2001). Tatsächlich sind Motilin und Ghrelin sehr ähnliche Peptide. Beide werden im oberen Gastrointestinaltrakt gebildet und wirken auf diesen motilitätssteigernd, auch die Wachstumshormonfreisetzung aus der Hypophyse wird von beiden stimuliert (Asakawa, A. *et al.* 2001). Die Rezeptoren und die genetischen Strukturen unterscheiden sich nur gering voneinander (Smith, R. G. *et al.* 2001).

Während normalerweise der Entwicklung synthetischer Analoge, die Entdeckung endogener Faktoren vorausgeht, ist der Fall Ghrelin ein Beispiel von „Reversed Pharmacology“. Erst die

1. Einleitung

Entwicklung synthetischer Analoge führte über die Identifizierung des natürlichen Rezeptors zur Isolierung des endogenen Liganden.

1.3.2 Struktur von Ghrelin

Das menschliche Ghrelin - Gen ist lokalisiert auf Chromosom 3 (3p 25-26). Das Ghrelin - Gen besteht aus vier Exons und drei Introns an den Positionen 141 (2000bp), 258 (3000bp) und 367 (800bp) der 511 Basenpaare langen cDNA (Wajnrajch M.P., T. I. S., Gertner R.L., Leibel R. 2000). Die beschriebene cDNA kodiert für ein 117 Aminosäuren langes Preproghrelin, das sich aus einem 23-Aminosäuren-Signalpeptid und dem 94-Aminosäuren Proghrelin zusammensetzt. Das Proghrelin enthält das Ghrelin, das aus 28 Aminosäuren besteht (Abbildung 1.2) und einen zusätzlichen 66-Aminosäurenrest. (Kojima, M. *et al.* 1999). Ghrelin wird zunächst als desacyl-Ghrelin gebildet, das ursprünglich für biologisch inaktiv gehalten wurde (Kojima, M. *et al.* 1999). Neuere Studien zeigen aber auch biologische Effekte des desacyl-Ghrelin, wie z.B. proliferative Effekte auf hypophysäre Zellen bei Ratten (Nanzer, A. M. *et al.* 2004) oder kardiale (Bedendi, I. *et al.* 2003) und adipogene (Thompson, N. M. *et al.* 2004). Effekte, die über einen GHS-Rezeptor übertragen werden, der sich vom Rezeptor der klassischen GHS unterscheidet (Muccioli, G. *et al.* 2002).

Posttranslational durchläuft das Desoctanoylghrelin eine Modifikation, die essentiell für seine Bindung am GHS-Rezeptor ist (Kojima, M. *et al.* 1999). Dabei wird das Wasserstoffatom der dritten N-terminalen Aminosäure Serin ersetzt durch eine Acylgruppe ($C_7H_{15}CO$), es entsteht Octanoylghrelin (Kojima, M. *et al.* 1999).

Es sind Splicevarianten von Ghrelin mit 27 Aminosäuren bekannt, denen die Aminosäure Glutamin an 14. Stelle bzw. Arginin an 28. Stelle fehlt, oder biologisch aktive Analoge mit Acylketten mit zehn oder elf Kohlenstoffatomen (Hosoda, H. *et al.* 2000). Acylierungen des Serin³ mit längeren aliphatischen Ketten beeinflussen die Aktivität von Ghrelin nicht, während kürzere weniger lipophile Acylgruppen die Aktivität deutlich mindern. Die N-Octanoylierung des Serin² statt des Serin³ ergibt ein Peptid, dessen biologische Aktivität ähnlich der des natürlichen Ghrelins ist (Tomasetto, C. *et al.* 2000).

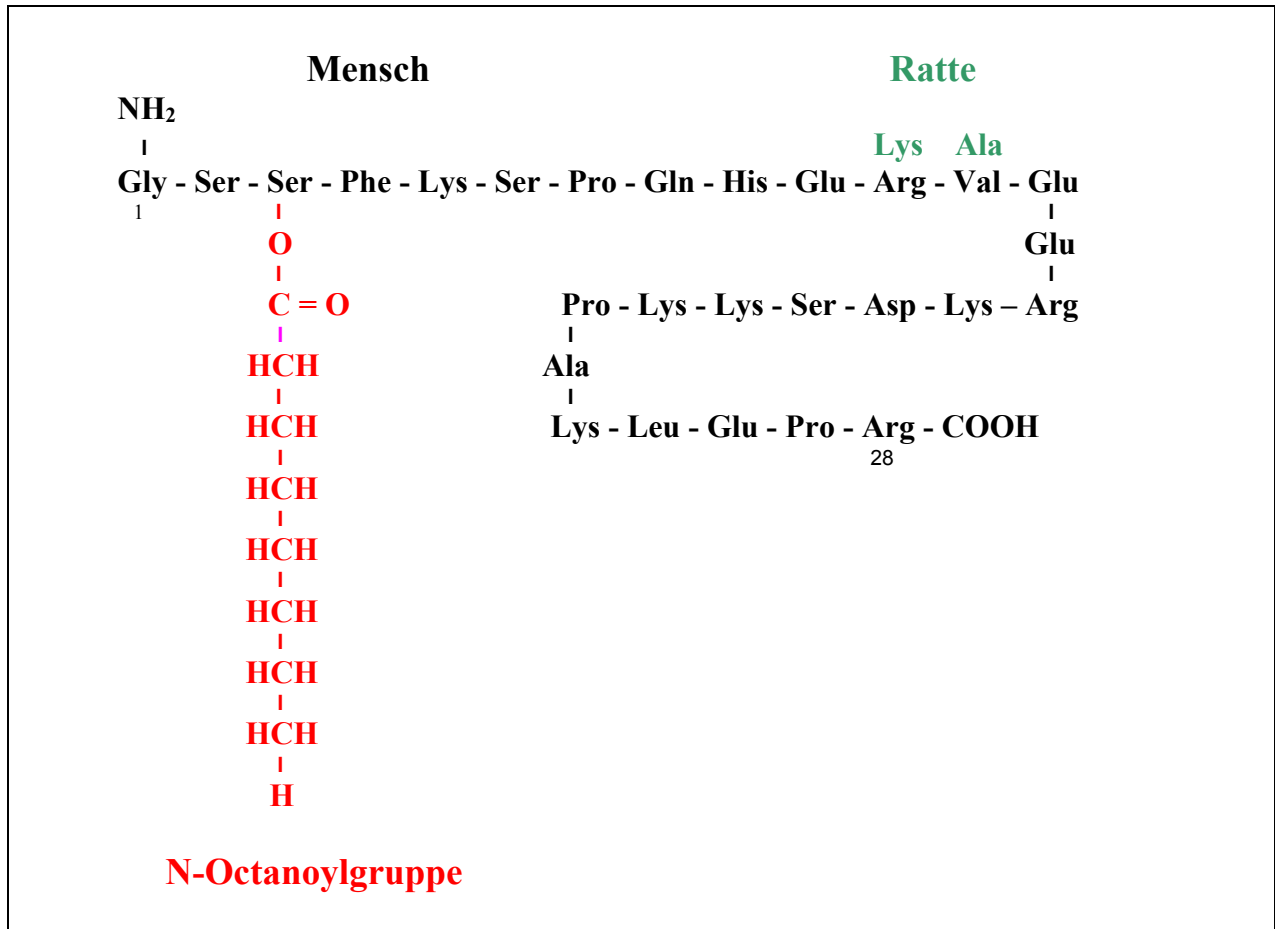


Abbildung 1.2: Aminosäuresequenz vom Ghrelin des Menschen und der Ratte

Das Ghrelin der Ratte unterscheidet sich vom menschlichen Ghrelin durch zwei Aminosäuren. Sowohl beim menschlichen Ghrelin als auch beim Ghrelin der Ratte bindet das Serin in Position 3 kovalent eine Acylgruppe. Modifiziert nach Kojima *et al.* (Kojima *et al* 2005).

1.3.3 Bildungsort von Ghrelin

Die Bildung von Ghrelin erfolgt hauptsächlich in Parietalzellen im Magenfundus. 80% des zirkulierenden Ghrelins wird hier gebildet (Date, Y. *et al.* 2000). Ursprünglich als „X/A like cells“ bezeichnete Zellen, deren hormonelles Produkt man zunächst nicht kannte (Sasaki, H. *et al.* 1975), wurden später als Ghrelinzellen identifiziert (Date, Y. *et al.* 2000). Die Bildungszellen des Ghrelin sind rund- bis ovoidförmige Zellen mit runden, kompakten, elektronendichten Granula. Diese Zellen sind hauptsächlich lokalisiert im Magenfundus, wo sie 20% der neuroendokrinen Parietalzellen bilden (Date, Y. *et al.* 2000).

In geringerem Umfang finden sich Ghrelinzellen auch in der Mucosa von Duodenum, Ileum, Coecum und Colon mit distalwärts absteigender Zelldichte. Es existieren zwei Formen von Ghrelinzellen, „closed-type cells“, kleine, runde Zellen, die keinen Kontakt zum Organlumen aufweisen und „opened-type cells“, triangulär bzw. länglich geformte Zellen, die über apikale zytoplasmatische Fortsätze einen Kontakt zum Organlumen herstellen. 60% aller Ghrelinzellen sind „opened-type cells“. Im Magenfundus findet man nur „closed-type cells“. Die Ghrelinzellen stehen in enger Nachbarschaft zum Kapillarnetz der Lamina Propria, die es ermöglicht, dass freigesetztes Ghrelin in den Blutkreislauf gelangt und seine klassisch endokrine Wirkung entfaltet. Distal des Magens sind neben „closed-type cells“ auch „opened-type cells“ zu finden, deren Zelldichte distalwärts zunimmt (Sakata, I. *et al.* 2002).

Neben dem Gastrointestinaltrakt wird Ghrelin auch in anderen Organen, wie z.B. Hypothalamus, Hypophyse (Korbonits, M. *et al.* 2001), Immunzellen (Hattori, N. *et al.* 2001), Lunge (Volante, M. *et al.* 2002), Nieren (Mori, K. *et al.* 2000), Herz (Iglesias, M. J. *et al.* 2004) und Pankreas (Volante, M. *et al.* 2002) gebildet.

1.3.4 Growth Hormone-Releasing-Aktivität von Ghrelin

Die Funktion von Ghrelin als endogener Ligand für den GHS-Rezeptor Typ 1a und die damit verbundene regulatorische Wirkung auf die Wachstumshormonfreisetzung war die erste bekannte Wirkung von Ghrelin. Ghrelin stimuliert die Sekretion von Wachstumshormon über einen Regelkreislauf, an dem der Hypothalamus und die Hypophyse beteiligt sind. In *in vitro* Versuchen mit Rattenhypophysenzellen aktiviert Ghrelin direkt und spezifisch GHS-Rezeptoren und stimuliert damit die Freisetzung von Wachstumshormon, ohne dabei die Sekretion anderer

1. Einleitung

Hypophysenhormone zu beeinflussen (Kojima, M. *et al.* 1999). *In vivo* Studien zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der Wachstumshormonsekretion bei Menschen (Peino, R. *et al.* 2000), Ratten (Date, Y. *et al.* 2000) und Mäusen (Tschop, M. *et al.* 2000) nach intravenöser, intraperitonealer bzw. intrazerebroventrikulärer Injektion von Ghrelin. Im Gegensatz zu *in vitro* Versuchen war hier die Ghrelinwirkung nicht wachstumshormonspezifisch. Zusätzlich war ein Anstieg von ACTH und Prolaktin zu verzeichnen ohne eine Änderung der Gonadotropin- und TSH-Spiegel, was eine Regulierung dieser Hypophysenhormone auf Hypothalamusebene vermuten lässt (Arvat, E. *et al.* 2000). Die stimulierende Wirkung von Ghrelin auf die Freisetzung von Wachstumshormon scheint GHRH abhängig zu sein. Sie konnte deutlich gesenkt werden durch die Verabreichung von Anti-GHRH-Serum bei Ratten (Bercu, B. B. *et al.* 1992) und GHRH-Antagonisten bei Menschen (Pandya, N. *et al.* 1998). Hypophysenstielverletzungen führen zu einer Beeinträchtigung der Ghrelinwirkung. Diese Beeinträchtigung fällt geringer aus, wenn die Verletzung erst kurze Zeit zurückliegt, und die Hypophysenzellen noch nicht durch einen langzeitigen GHRH-Mangel atrophiert sind (Popovic, V. *et al.* 1995). 25% der Zellen im Nucleus arcuatus des Hypothalamus exprimieren den GHS-Rezeptor und vermitteln vermutlich die direkte Wirkung von Ghrelin auf den Hypothalamus (Tannenbaum, G. S. *et al.* 1998). In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Ghrelin direkt Hypothalamusgewebe von Ratten aktivierte und die Sekretion von GHRH erhöhte, während die Somatostatinsekretion unbeeinflusst blieb (Wren, A. M. *et al.* 2002). Für den Erfolg der Ghrelinwirkung ist das Zeitmuster der Verabreichung sehr wichtig. Intermittierende Infusionen (dreistündlich) über sieben Tage bewirkten eine Wachstumshormonsekretion, während kontinuierliche Infusionen die Freisetzung von Wachstumshormon hemmte und die Bildung von Somatostatin-mRNA im paraventrikulären Nucleus des Hypothalamus stimulierte (Wells, T. and Houston, P. A. 2001).

Die wachstumshormonfreisetzende Wirkung von Ghrelin wird mit steigendem Alter schwächer, die Wirkung auf die ACTH- und Prolaktinspiegel ist altersunabhängig (Broglio, F. *et al.* 2003). Adipöse Personen reagieren auf Ghrelin mit einem geringeren Anstieg des Wachstumshormonspiegels als Normalgewichtige (Tassone, F. *et al.* 2003).

Während die stimulatorische Wirkung von Ghrelin auf die Wachstumshormonsekretion zweifelsfrei bewiesen ist, ist seine physiologische Bedeutung in der Regulierung der Wachstumshormonspiegel nicht eindeutig geklärt. Die physiologische Freisetzung von Ghrelin erfolgt pulsatil mit höheren Plasmaspiegeln in der Nacht und niedrigeren Werten am Tage (Tolle, V. *et al.* 2002). Bei vergleichenden Studien über das Zeitmuster der Freisetzung von

1. Einleitung

Wachstumshormon und Ghrelin konnte keine synchrone Pulsatilität gezeigt werden (Tolle, V. *et al.* 2002). Immunneutralisation von Ghrelin schwächt dessen Wirkung auf Wachstumshormon ab, lässt aber die endogene pulsatile Freisetzung von Wachstumshormon unbeeinflusst, während die Immunneutralisation von GHRH die gesamte endogene Wachstumshormonpulsatilität hemmt (Tannenbaum, G. S. and Bowers, C. Y. 2001). Die Verabreichung eines GHRH-Antagonisten hemmt die Freisetzung von Wachstumshormon, ohne dabei den Ghrelinspiegel zu verändern (Barkan, A. L. *et al.* 2003). Dies könnten Hinweise darauf sein, dass nicht Ghrelin, sondern GHRH die Pulsatilität von Wachstumshormon steuert, und dass die Wirkung Ghrelins auf die Wachstumshormonfreisetzung GHRH-abhängig ist. Untersuchungen zur Abhängigkeit des Ghrelinspiegels von exogenem Wachstumshormon lieferten kontroverse Ergebnisse. Eine kurzfristige Behandlung mit Wachstumshormon senkte den Ghrelinspiegel bei Patienten mit Wachstumshormonmangel (Dall, R. *et al.* 2002). In einer anderen Untersuchung konnte nach einjähriger Wachstumshormonsubstitution bei Patienten mit Wachstumshormonmangel keine Veränderung des Ghrelinspiegels beobachtet werden (Janssen, J. A. *et al.* 2001). In einer darauf folgenden Untersuchung senkte eine neunmonatige Behandlung mit Wachstumshormon den Ghrelinspiegel um 29% (Eden Engstrom, B. *et al.* 2003)). Nach Magenbypassoperation hatten Patienten normale Wachstumshormonspiegel bei sehr niedrigen Ghrelinspiegeln (Cummings, D. E. *et al.* 2002). Patienten, die aufgrund eines Pankreastumors einen 50-fach höheren Ghrelinspiegel und eine damit assoziierte „Downregulation“ der GHS-Rezeptoren hatten, hatten normale Wachstumshormonspiegel (Corbetta, S. *et al.* 2003). Untersuchungen an einem transgenen Mausmodell ergaben, dass „GHS-R-Knockout“-Mäuse durch ein niedriges Körpergewicht auffallen (Sun, Y. *et al.* 2004), während das Körpergewicht von „Ghrelin-Knockout“-Mäusen im normalen Bereich liegt (Sun, Y. *et al.* 2003).

Ob Ghrelin unter physiologischen Bedingungen wichtig in der Regulierung des Wachstumshormonspiegels ist, oder ob es nur in Phasen der negativen Energiebilanz an Bedeutung gewinnt, ist noch nicht eindeutig geklärt (Tannenbaum, G. S. *et al.* 2003).

1.3.5 Orexigene Wirkung von Ghrelin

Unabhängig von seiner Wirkung auf die Freisetzung von Wachstumshormon in der Hypophyse, wirkt Ghrelin als orexigenes Hormon (Wren, A. M. *et al.* 2000). Als „brain-gut“-Peptid hat es eine stimulierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme und beeinflusst positiv die Energiebilanz

1. Einleitung

in Ratten (Wren, A. M. *et al.* 2000), Mäusen (Asakawa, A. *et al.* 2001) und Menschen (Wren, A. M. *et al.* 2001). Der endogene Ghrelinspiegel ist abhängig sowohl vom akuten, als auch vom chronischen Ernährungszustand. Bei Nahrungskarenz steigt der Ghrelinspiegel an und erreicht höchste Werte kurz vor Nahrungsaufnahme und während der Nacht (Cummings, D. E. *et al.* 2001). Mit Beginn der Nahrungsaufnahme sinkt der Ghrelinspiegel, mit niedrigsten Werten 60 – 120 Minuten postprandial (Cummings, D. E. *et al.* 2001). Die Suppression des Ghrelinspiegels ist proportional zur aufgenommenen Kalorienmenge (Callahan, H. S. *et al.* 2004). Der Vergleich adipöser Personen bzw. Anorexia nervosa Patienten mit normalgewichtigen Personen zeigt eine Abhängigkeit des Ghrelinspiegels vom Body Mass Index (BMI). In verschiedenen Untersuchungen maß man niedrige Ghrelinspiegel bei Personen mit hohem BMI (Ikezaki, A. *et al.* 2002) und höhere Ghrelinspiegel bei Personen mit niedrigem BMI (Broglia, F. *et al.* 2004). Neben dem BMI spielt auch die Energiebilanz eine große Rolle bei der Regulierung des Ghrelinspiegels. In Phasen der Gewichtsreduktion steigen die Ghrelinspiegel adipöser Personen (Hansen, T. K. *et al.* 2002), und in Phasen der Gewichtszunahme bei Anorexia nervosa Patienten sinken die Ghrelinspiegel (Otto, B. *et al.* 2001).

Die Annahme, dass Ghrelin eine wichtige Rolle bei der Initiation der Nahrungsaufnahme spielt, wird zusätzlich unterstützt durch Verhaltensstudien, in denen Ghrelin zentral (intrazerebroventrikulär) (Tschop, M. *et al.* 2000) und peripher (intraperitoneal und intravenös) (Asakawa, A. *et al.* 2001; Wren, A. M. *et al.* 2001) verabreicht bei Ratten, intraperitoneal appliziert bei Mäusen (Wang, L. *et al.* 2002) und intravenös injiziert bei Menschen (Wren, A. M. *et al.* 2001) eine Zunahme der Nahrungsaufnahme bewirkte.

1.3.6 Gastrointestinale Wirkung von Ghrelin

Die Isolierung Ghrelins erstmals aus Magengewebe und die strukturelle Ähnlichkeit zu Motilin (Kojima, M. *et al.* 1999) führten zu Untersuchungen zu dessen Wirkung auf den Magen selbst. Die Magensäuresekretion wird durch zentral und peripher verabreichtes Ghrelin erhöht. Intravenös injiziertes Ghrelin erhöht die Amplitude und die Frequenz der Magenmotilität (Masuda, Y. *et al.* 2000). Durch Vagotomie oder Blockierung des Nervus vagus mit Atropin werden diese Wirkungen gehemmt (Masuda, Y. *et al.* 2000). Die prokinetische Wirkung von Ghrelin hebt auch postoperative Magenentleerungsstörungen bei Ratten auf (Trudel, L. *et al.* 2002). Ghrelin stimuliert die motorische Aktivität des Gastrointestinaltraktes über einen

1. Einleitung

zentralen und einen peripheren Wirkungsmechanismus. Der zentrale Mechanismus entfaltet seine Wirkung über den Nervus vagus und aktiviert NPY-positive Nervenendigungen im Hirnstamm und Hypothalamus. (Date, Y. *et al.* 2002). Der periphere Mechanismus ist vagusunabhängig und induziert Fos in Neuronen des unteren Olivenkerns (Zhang, W. *et al.* 2003). Dieser spielt eine wichtige Rolle in der viszeralen Motilitätskoordination. Ghrelin besitzt eine protektive Wirkung gegen ethanolinduzierte Magenulzera. Dieser Effekt scheint vagusunabhängig über stickstoffmonoxidabhängige zentrale Mechanismen zu funktionieren (Sibilia, V. *et al.* 2003). Der Vergleich Helicobacter pylorus - positiver und - negativer Personen zeigt keinen Unterschied der Plasmaghrelinspiegel in beiden Gruppen (Gokcel, A. *et al.* 2003).

Während Ghrelin stimulierend auf die Magensäuresekretion wirkt, hemmt es die totale Protein- und Amylasesekretion des Pankreas in anästhesierten Ratten *in vivo* und in Pankreaslobuli *in vitro* (Zhang, W. *et al.* 2001).

Obwohl Ghrelin die Freisetzung von Wachstumshormon stimuliert, gibt es keine Hinweise dafür, dass Wachstumshormon die Magenmotilität steigert, d.h. Ghrelin übt seine stimulierende Wirkung auf die Magenmotilität nicht sekundär über eine Wachstumshormonfreisetzung aus (St-Pierre, D. H. *et al.* 2003).

1.3.7 Die Rolle des Nervus vagus für die Wirkung von Ghrelin

Der Nervus vagus ist die neuroanatomische Hauptverbindung zwischen Gastrointestinaltrakt und Gehirn. Er innerviert, bis auf das distale Drittel des Kolons, den gesamten Gastrointestinaltrakt (Kirchgessner, A. L. and Gershon, M. D. 1989). Die Zahl der vagalen Afferenzen, größtenteils nichtmyelinisierte C-Fasern, wird geschätzt auf 16000 bei Ratten und 23000 beim Frettchen (Andrews, P. L. 1986). Bei den meisten untersuchten Säugetieren beträgt das Verhältnis von afferenten zu efferenten Fasern in Höhe des Zwerchfells 8:1 bis 10:1 (Andrews, P. L. 1986). Die Perikarya der afferenten Vagusneurone befinden sich im Ganglion nodosum am Foramen jugulare. Sie bilden Synapsen mit Neuronen zweiter Ordnung in Subnuclei des Nucleus tractus solitarii (NTS) des Hirnstamms, dem sensiblen Hauptnucleus des Nervus Vagus. Die meisten dieser Neurone projizieren zum Nucleus parabrachialis der Pons. Von hier aus zieht ein Teil der Fasern über den ventralen medialen Nucleus des Thalamus zu viszeralem sensorischen kortikalen Arealen, hauptsächlich zum Inselkortex. Ein anderer Teil projiziert direkt zu Gehirnregionen, die wichtig sind für die Regulation von Bewusstsein, Emotionen und autonomen Reaktionen, wie

1. Einleitung

der Locus coeruleus und der Dorsale Motornucleus des Vagus, zwischen denen zahlreiche Verbindungen bestehen zum Hypothalamus, zur Amygdala und zum anterioren Zingulum (Andrews, P. L. and Sanger, G. J. 2002). Im Ganglion nodosum werden Transmitter und Rezeptoren gebildet und zu den Nervenendigungen transportiert. Einige Nahrungsmetabolite, Monoamine, Peptide und mechanische und chemische Reize übertragen ihre sättigenden Signale zum NTS über vagale Afferenzen und zum Hypothalamus über den Blutzirkulation (Andrews, P. L. and Sanger, G. J. 2002).

Ghrelin vermittelt seine Wirkung vermutlich hauptsächlich über den Nervus Vagus. Das zeigen Untersuchungen mit Ratten (Date, Y. *et al.* 2002) und Mäusen (Asakawa, A. *et al.* 2001), in denen peripher verabreichtes Ghrelin bei vagotomierten Tieren keine stimulierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme zeigte. Ebenso wie die orexigene Wirkung, blieb auch die Freisetzung von Wachstumshormon und die Fos Induktion in NPY- und GHRH- (Growth Hormone-Releasing Hormone) positiven Neuronen nach Vagotomie aus (Date, Y. *et al.* 2002). Vagotomie hemmt den physiologischen Anstieg des Ghrelinspiegels bei Nahrungskarenz, beeinflusst aber weder die basalen Plasmaghrelinwerte, noch das Sinken des Ghrelinspiegels nach Nahrungsaufnahme (Williams, D. L. *et al.* 2003). Vermutlich spielt die Vagusaktivität unter metabolisch neutralen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle. Diese Dissoziation zwischen nahrungsaufnahme- und nahrungskarenzassoziiertem Ghrelinspiegel deutet darauf hin, dass in der Regulierung des zirkulierenden Ghrelins Mechanismen beteiligt sind, die getrennt über unterschiedliche anatomische Strukturen ihre Wirkung entfalten. Durch molekularbiologische Methoden konnte aus afferenten Vagusfasern die Ghrelinrezeptor-mRNA isoliert werden. Mittels radioaktiv markiertem Ghrelin wurde dann der Transport von Ghrelinrezeptoren innerhalb der vagalen Afferenzen nachgewiesen (Date, Y. *et al.* 2002). Afferente Vagusfasern haben eine kontinuierliche niedrigfrequente Spontanaktivität, die über sensorische Einflüsse moduliert werden kann. Intravenös verabreichtes Ghrelin senkt diese Aktivität signifikant, im Gegensatz zu anorexigenen Peptiden wie CCK, Bombesin und Leptin, die die Aktivität deutlich erhöhen (Asakawa, A. *et al.* 2001; Date, Y. *et al.* 2002).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Nervus vagus für die Wirkung des Ghrelins auf die Nahrungsaufnahme als Signaltransduktionsweg dient.

1.3.8 Zentrale Wirkung von Ghrelin

Eine zentrale Wirkung von Ghrelin konnte gezeigt werden bei Ratten (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000) und Mäusen (Wang, L. *et al.* 2002) mittels des Nachweises von c-Fos im Hypothalamus und im Hirnstamm. Fos ist ein Produkt des „immediate-early-genes“ *c-fos*, das als Marker für neuronale Aktivität in Neuronen genutzt werden kann. Luckmans Arbeitsgruppe konnte durch intrazerebroventrikuläre Injektion von Ghrelin eine von der Nahrungsaufnahme unabhängige Fos Expression in den Hypothalamuskernen NARC, PVN, DMV und LH und in den Hirnstammarealen AP und NTS nachweisen (Lawrence, C. B. *et al.* 2002). Auch in anderen Untersuchungen konnte nach zentraler Injektion von Ghrelin eine Aktivierung von mehreren Hypothalamuskernen gezeigt werden (Date, Y. *et al.* 2001). Interessanterweise wurde in verschiedenen Untersuchungen, in denen Ghrelin peripher injiziert wurde, eine Fos-Expression nur im NARC des Hypothalamus induziert. Eine Beeinflussung der Aktivität anderer Hypothalamuskernere oder der des Hirnstamms konnten nicht nachgewiesen werden (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000). Ein vom Applikationsweg abhängiges Verteilungsmuster der *c-fos* Expression schien zu existieren.

Die von Ghrelin aktivierten Gehirnareale sind Teile zentraler Netzwerke, die an der Regulierung von Nahrungsaufnahme und Stoffwechsel beteiligt sind (Wilding, J. P. 2002). Besonders wichtig dabei sind der PVN des Hypothalamus und der NARC. Neuronen des NARC enthalten neben anderen Peptiden das orexigene Peptid NPY, wobei sich die NPY-positiven Neurone hauptsächlich im ventromedialen Teil des NARC befinden. Die Neuronen des lateralen Teils des NARC enthalten das anorexigene Peptid POMC (Riediger, T. *et al.* 2003). NPY enthaltende Fasern projizieren vom NARC zum PVN (Bai, F. L. *et al.* 1985). Zentrale NPY-Injektionen induzierten eine Fos-Expression in mehreren Hypothalamuskernen, einschließlich des PVN, die durch NPY-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden konnte (Yokosuka, M. *et al.* 1999). *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass Ghrelin einen exzitatorischen Effekt auf den ventromedialen Teil des NARC ausübte, während der laterale Teil weitgehend gehemmt wurde (Riediger, T. *et al.* 2003). In einer anderen *in vitro* Untersuchung wurde in isolierten NARC-Zellen ein ghrelinabhängiger Anstieg der Kalziumionenkonzentration beobachtet, der durch Proteinkinase A-Inhibitoren bzw. durch Leptin gehemmt werden konnte. Dieser Effekt konnte bei 35% der isolierten Zellen beobachtet werden, von denen wiederum 85% NPY-positiv waren (Kohno, D. *et al.* 2003). Intrazerebroventrikuläre Injektionen von Ghrelin bei Ratten erhöhten sowohl den NPY-mRNA Gehalt der Neuronen des NARC (Kamegai, J. *et al.* 2001), als auch die NPY-

1. Einleitung

Freisetzung aus NARC-Neuronen (Wren, A. M. *et al.* 2002). Die intraperitoneale Injektion von Ghrelin bei Mäusen induzierte eine Fos-Expression ausschließlich im ventromedialen Teil des NARC, und in 90% der aktivierten Neuronen konnte NPY nachgewiesen werden (Wang, L. *et al.* 2002). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine Kolo-kalisation von NPY, Ghrelin-mRNA und GHS-Rezeptoren in Neuronen des NARC (Mondal, M. S. *et al.* 2005).

1.4 Der neuronale Marker Fos

Fos ist ein Protein, das basal in Neuronen vorkommt (Dragunow, M. and Faull, R. 1989). Nach unspezifischer Stimulation lässt sich eine erhöhte Expression von Fos-mRNA in einzelnen Neuronen und Neuronengruppen nachweisen (Dragunow, M. and Faull, R. 1989).

In zahlreichen Studien wurde die Bedeutung von Fos als Transkriptionsfaktor und funktioneller Marker von aktivierten Neuronen untersucht (Hoffman, G. E. *et al.* 1993; Kovacs, K. J. 1998). Die Detektion des „immediate early gene“-Produkts Fos in Zellkernen von Neuronen kann als Marker für Zellaktivierung genutzt werden (Hoffman, G. E. *et al.* 1993). Mit Hilfe von Fos kann die Erregung von polysynaptisch verknüpften Hirnregionen gemessen werden (Sagar, S. M. *et al.* 1988). Dies ermöglicht die Erfassung und Interpretation der Interaktion verschiedener Neuronengruppen (Sagar, S. M. *et al.* 1988). Des Weiteren können Fos-positive Neurone mit Hilfe von immunhistochemischen Doppelfärbungen phänotypisiert werden (Hoffman, G. E. *et al.* 1993). Dies erfolgt durch die Bestimmung zytoplasmatischer Substanzen der Fos-aktivierten Zellen (Hoffman, G. E. *et al.* 1993).

Sowohl mechanische als auch chemische Reize induzieren eine Fos-Expression in Neuronen (Lanteri-Minet, M. *et al.* 1993). Die periphere Injektion von Ghrelin induziert neuronale Aktivität in Hirnregionen, die beteiligt sind an der Regulation von Hunger- und Sättigungsgefühl. So wird nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin eine Fos-Expression im NARC von Ratten und Mäusen induziert (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000; Wang, L. *et al.* 2002). Untersuchungen von Neuronen im NARC ergaben, dass Neuronen, die nach peripherer Ghrelinapplikation Fos-positiv waren, die orexigenen Peptide NPY und AgRP enthielten (Wang, L. *et al.* 2002).

1.5 Ziele dieser Studie

Die intrazerebroventrikuläre Injektion des orexigenen Peptids Ghrelin induziert eine von der Nahrungsaufnahme unabhängige Fos-Expression in den Hypothalamuskernen NARC, PVN, DMV und LH und in den Hirnstammarealen AP und NTS (Lawrence, C. B. *et al.* 2002). In Untersuchungen, in denen Ghrelin peripher injiziert wurde, konnte eine Fos-Expression nur im NARC des Hypothalamus beobachtet werden. Die Aktivität anderer Hypothalamuskernere oder aber von Kernen des Hirnstamms konnte nicht nachgewiesen werden (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000).

Damit stellte sich die Frage, ob das Verteilungsmuster für Fos tatsächlich abhängig vom Applikationsweg des Ghrelins ist. In der vorliegenden Studie wurde evaluiert, ob peripher appliziertes Ghrelin dasselbe neuronale Aktivierungsmuster im PVN hervorruft wie zentral verabreichtes Ghrelin.

Ferner sollten die aktivierten Neurone und die Fasern der entsprechenden Hirnregionen phänotypisiert werden. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben eine enge morphologische Assoziation zwischen NPY-positiven Fasern und CRH-positiven Neuronen im mpPVN (Wahlestedt, C. *et al.* 1987). In anderen Untersuchungen konnten Projektion von NPY-haltigen Fasern vom NARC zu CRH-positiven Neuronen im mpPVN nachgewiesen werden (Li, C. *et al.* 2000). Daher wurde ein Zusammenhang zwischen NPY und CRH und Ghrelin-induzierter neuronaler Aktivität vermutet.

2. Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Geräte und Materialien

Peptid

Ghrelin Bachem Biochemical GmbH, Heidelberg,
Deutschland

Antisera

Bovines Serumalbumin (BSA) Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Goat-Anti-NPY IgG Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Guinea Pig-Anti-CRH Protein Biotrend, Köln, Deutschland
Fos Rabbit Anti-Rat Polyclonal Serum Oncogene Research Products, Boston, USA
FITC-Goat-Anti-Rabbit IgG Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Normal Goat Serum (NGS) Dianova, Forschungsreagenzien,
Immundiagnostik, Hamburg, Deutschland
TRITC-Rabbit-Anti-Guinea Pig IgG Sigma Chemical Co., St. Louis, USA

Medikamente

Heparin (Liquemin®) Hoffman-La Roche, Grenzach-Whylen,
Deutschland
Ketamin (Ketanest®) CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe,
Deutschland
Natriumchloridlösung 0,9% Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland
Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%) Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

Chemikalien

1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
4'-6'-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Einbettmedium (Tissue freezing medium®) Leica instruments GmbH, Nussloch,
Deutschland

2. Material und Methoden

Glutarialdehyd	Carl Roth GmbH +Co, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Sigma Chemical Co, St. Louis, USA
Natriumborhydrid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Nariumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
n-Hexan	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma Chemical Co., St.Louis, USA
Pikrinsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Propidiumjodid	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Saccharose	Sigma Chemical Co., St. Loius, USA
Triton X-100	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
 <u>Geräte</u>	
Druckminderer	Mui Scientific, Missisauga, Ontario, Kanada
Eppendorfpipetten	Netheler-Heinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank (Liebherr Premium –20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (Ultra low freezer –85°C)	New Brunswick Scientific, New Brunswick, Kanada
Konfokales Laser Scanning Mikroskop (cLSM 510)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryotom (HM 500 OM)	Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
Filtersets	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Objektive	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Perfusionsmaschine	Mui Scientific, Missisauga, Ontario,Kanada

2. Material und Methoden

ph-Meter	Wissenschaftlich Technisch Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Horizontalschüttler	Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Janke & Kunkel GmbH & Co, Staufen, Deutschland

Chirurgische Geräte

Anatomische Pinzette	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Arterienklemme	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Chirurgische Pinzette	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Hohlmeißelzange	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Pinzette, gebogen-spitz	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Skalpell (Feather® Nummer 21)	Medizin AG Köln, Deutschland
Schere, spitz-spitz	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland
Wundspreizer	Aesculap AG & Co KG, Tuttlingen, Deutschland

Verschiedenes

Deckgläser, 24 x 46 mm	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk, GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Faltenfilter	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Kanüle (BD Microlance ®, 0,4 mm x 19 mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

2. Material und Methoden

Käfigeinstreu (Lignocel®Hygienic Animal Bedding)	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland
Makrolonkäfig Typ III	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Makrolonkäfig Typ IV	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Messer für Kryotom (16 cm)	Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk, GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
Plexiglas-Gehirnmatrix	Technische Forschungslabore der Charité, Berlin, Deutschland
Polypropylenröhrchen, 50 ml, konisch	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Spritze (BD Plasipak®)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Standard-Rattenfutter (Altromin®)	Lage, Deutschland
Transferpipetten	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Zellkulturplatten (Multiwell® 24 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

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

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

2. Material und Methoden

2.2 Arbeitslösungen

2.2.1 Antifading-Substanzlösung

Diese Lösung wurde verwendet, um das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen unter Fluoreszenzanregungslicht zu verhindern. Hierzu wurden 100mg/ml 1,4-Diazabicyclo(2.2.2)octan (DABCO) in 90% v/v Glycerin und 10% v/v PBS gelöst.

2.2.2 Blockierpuffer

Der Puffer wurde verwendet, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper im Gewebe zu blockieren. Hierzu wurde 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) mit 10% Rinderserum (BSA) w/v und 0,3% v/v Triton X-100 versetzt.

2.2.3 Natriumazidlösung

Zum Konservieren von Lösungen wurde 0,1%iges Natriumazid verwendet. Natriumazid wurde im Verhältnis 1:10 in *aqua bidest.* gelöst

2.2.4 Natriumborhydridlösung

Um eine durch Aldehyde induzierte Eigenfluoreszenz im Gewebe zu mildern, erfolgte die Vorbehandlung des Gewebes mit 1%iger Natriumborhydridlösung. Hierzu wurde Natriumborhydrid im Verhältnis 1:100 in PBS gelöst.

2.2.5 Plasmaexpander

Die Perfusion wurde mit einem Plasmaexpander eingeleitet, um das Blut aus dem Kreislauf möglichst schnell zu entfernen. Es wurden 12g Diäthylbarbitursäure Natriumsalz und 8g Natriumacetat in 1900ml *aqua bidest.* gelöst und der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,6 eingestellt. Im Anschluss wurden 18g Natriumchlorid, 0,6g Kaliumchlorid, 0,4g Kalziumchlorid, 0,1g Magnesiumchlorid, 80g Makrodex, 6,0g Nitroprussid-Natrium hinzugegeben, der pH wurde erneut auf einen Wert von 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit *aqua bidest.* auf 2,0 l aufgefüllt.

2. Material und Methoden

2.2.6 Pikrinsäure- (Trinitrophenol) Lösung

Zum Herstellen der Pikrinsäurelösung wurden in einer ein- bis zwei- Liter Flasche ca. 30 bis 50g Pikrinsäurekristalle mit heißem *aqua bidest.* versetzt und geschüttelt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Lösung dekantiert und durch einen 0,4µm Membranfilter filtriert. In 100ml *aqua bidest.* lösen sich maximal 1,2g Pikrinsäurekristalle.

2.2.7 Herstellung der Fixierlösung

Zur Herstellung der Fixierlösung wurde 80g (4%ig) Paraformaldehyd in 1500ml *aqua bidest.* gelöst, auf 60°C erhitzt und durch Zugabe einiger Tropfen 10M Natriumhydroxidlösung klar gelöst. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 0,1M (27,6 g) Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, 0,05% (0,4ml) Glutaraldehyd und 333ml 0,2%ige gesättigte Pikrinsäure hinzugegeben. Durch weitere Zugabe von *aqua bidest* wurde die Lösung auf Gesamtvolumen von 2000ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,4µm Membranfilter filtriert.

2.2.8 Zusammensetzung des Phosphatpuffers

Zum Herstellen des Phosphatpuffers (PBS) wurden 200g Natriumchlorid, 5g Kaliumchlorid, 5g Natriumhydroxid und 35g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in 2,5l *aqua bidest.* gelöst. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von 10M Natronlauge auf 6,81 eingestellt. Um die gebrauchsfertige Lösung herzustellen wurde die Lösung im Verhältnis 1:10 mit *aqua bidest.* verdünnt.

2.2.9 Herstellung der Propidiumjodidlösung

Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Propidiumjodidlösung verwendet. Die Darstellung der Zellkerne diente zur anatomisch-topografischen Orientierung im Gewebe. Hierzu wurde 2,5µg Propidiumjodid in 1ml PBS gelöst.

2.2.10 Herstellung von Saccharoselösung

Zum Dehydrieren des Gewebes diente 5%ige, 17%ige und 27%ige Saccharoselösung. Zum Herstellen der Saccharoselösungen wurden 250g, 850g oder 1350g Saccharose und 69g Natriumdihydrogenphosphat-Monophosphat in 4500ml *aqua bidest.* gelöst. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf 7,4, wurde die Lösung mit *aqua bidest.* auf 5000ml aufgefüllt und durch einen 0,4µm Membranfilter filtriert.

2. Material und Methoden

2.2.11 Triton X-100-Lösung

Um die Permeabilität des Gewebes zu erhöhen und unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde 0,3%ige Triton X-100-Lösung verwendet. Triton X-100 wurde hierzu im Verhältnis 1:10 in *aqua bidest.* gelöst.

2.3 Ghrelin

1mg Ghrelin der Ratte wurde in 1ml *aqua bidest.* gelöst und anschließend in 50µl Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Direkt vor Versuchsbeginn wurde das Peptid in isotoner Natriumchloridlösung auf die Konzentration 1 bzw. 10nmol/ml eingestellt. Während des Versuches wurde das Peptid auf Eis gelagert.

2.4 Versuchstiere

Sämtliche Experimente erfolgten mit männlichen Sprague-Dawley Ratten, mit einem mittleren Körpergewicht von 300 g. Die Tiere wurden von der Firma Harlan-Winkelmann bezogen.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen des Typ IV mit jeweils vier Ratten pro Käfig unter kontrollierten Umweltbedingungen. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Die Luftfeuchtigkeit lag bei $60\% \pm 4\%$. Der Licht-Dunkel-Zyklus war durch eine Zeitschaltuhr auf 12:12 Stunden eingestellt, mit einem Wechsel um jeweils 6:30 Uhr und 18:30 Uhr. Als Nahrung diente Standarddiättrattenfutter und Wasser *ad libitum*. Unter diesen Bedingungen wurden die Tiere mindestens 14 Tage vor Versuchsbeginn belassen.

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

2.5 Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme

Das Ziel dieses Versuchs war es, zu evaluieren, ob intraperitoneal verabreichtes Ghrelin die Nahrungsaufnahme in Laborratten beeinflusst. Dazu wurden die Versuchstiere in drei Gruppen unterteilt: Zwei Gruppen, die jeweils mit 1 bzw. 10nmol intraperitonealem (ip.) Ghrelin pro Ratte behandelt wurden, sowie eine Kontrollgruppe, in der jedes Tier jeweils 1ml 0,15M Natriumchloridlösung (Vehikellösung) erhielt. Das Volumen der applizierten Testlösungen betrug stets 1ml (Tabelle 2.1).

Alle Versuche begannen zwischen 10:00 und 10:30 Uhr, dreieinhalb bis vier Stunden nach Beginn des Lichtzyklus, um eine höhere Konsistenz der Versuchsbedingungen zu erreichen.

Unmittelbar nach der ip.-Injektion mit den Testlösungen wurden die Ratten in Einzelkäfige gesetzt. Die Versuchstiere erhielten eine vorher abgewogene Menge Standardrattenfutter und *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser.

Während einer vierstündigen Beobachtungszeit wurde das Futter stündlich gewogen. Über die Differenz zur unmittelbar nach der Injektion der Testlösungen bereitgestellten Nahrungsmenge, wurde die kumulative Nahrungsaufnahme bestimmt. Die Messungen erfolgten eine Stunde, zwei Stunden, drei Stunden und vier Stunden nach Administration der Testlösungen

Versuchsgruppe	ip. Injektion	Anzahl
Gruppe 1	Vehikel (0.15M NaCl)	n = 5
Gruppe 2	Ghrelin (1 nmol/Ratte)	n = 5
Gruppe 3	Ghrelin (10 nmol/Ratte)	n = 5

Tabelle 2.1: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Effekte von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme in Laborratten.

2. Material und Methoden

2.6 Die Wirkung von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm

Das Experiment diente der Untersuchung, ob intraperitoneal verabreichtes Ghrelin die Expression von Fos in Neuronen des NARC, PVN, NTS und der AP von Laborratten stimuliert. Hierzu wurden zwei Versuchsgruppen miteinander verglichen. Eine Gruppe erhielt 1nmol Ghrelin pro Versuchstier, während den Tieren der Kontrollgruppe je 1ml isotone Kochsalzlösung appliziert wurde (Tabelle 2.2). In der Ghrelingruppe wurde mit 1nmol Ghrelin pro Versuchstier gearbeitet, da Ghrelin bereits bei dieser Dosierung die Nahrungsaufnahme stimuliert (Wren, A. M. *et al.* 2001).

Versuchsgruppe	ip. Injektion	Anzahl
Gruppe 1	Vehikel (0,15 M NaCl)	n = 4
Gruppe 2	Ghrelin (1 nmol/Ratte)	n = 4

Tabelle 2.2: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Effekte von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und Hirnstamm

2.6.1 Intraperitoneale Injektion von Ghrelin bzw. Vehikel und Narkose

Den Versuchstieren wurde entweder isotone Natriumchloridlösung oder Ghrelin verabreicht. Direkt nach der Injektion wurde den Tieren die Nahrung entzogen. Somit sollte eine sekundäre Fos-Bildung, induziert durch eine Freisetzung gastrointestinaler Sättigungspeptide, vermieden werden. Es bestand freier Zugang zum Trinkwasser.

90 Minuten nach der Injektion wurden die Ratten mit intraperitoneal appliziertem 50mg/kg Ketamin und 30mg/kg Xylazinhydrochlorid narkotisiert. Zusätzlich wurde jedem Versuchstier 2500IU Heparin intraperitoneal appliziert, um eine Thrombenbildung in Hirngefäßen zu vermeiden, und um dadurch Gefäßverschlüssen und einer damit assoziierten Minderperfusion mit der Fixierlösung vorzubeugen

2. Material und Methoden

2.6.2 Präparation des Herzens

Als Vorbereitung für die transkardiale Perfusionsfixierung musste das Herz der Tiere freigelegt werden. Dazu wurden die narkotisierten Ratten dorsal auf der Arbeitsfläche fixiert. Mit einer Gewebeschere wurde das Fell medial vom unteren Bauchbereich bis zum oberen Thoraxbereich eröffnet. Es folgte die Durchtrennung der Bauchmuskulatur medial bis zum sternalen Xyphoid, der oberflächlichen Thoraxmuskulatur, des Diaphragmas und des knöchernen Thorax linkslateral. Der dem Herzen aufsitzende Thymus wurde entfernt, um die Sicht auf die abgehende Aorta zu gewährleisten. Der linke Herzventrikel wurde durch eine Inzision eröffnet, und eine Perfusionskanüle wurde bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer Gefäßklemme fixiert. Es erfolgte der Perfusionsstart und die Eröffnung im Bereich des rechten Herzohres, um den Abfluss der Perfusionslösung zu ermöglichen. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen dem Durchtrennen des Diaphragmas und dem Start der Perfusion die Zeitspanne von zwei Minuten nicht überschritten wurde, um die Hypoxiezeit und die damit verbundene Gewebeschädigung im Gehirn zu minimieren.

2.6.3 Durchführung der Perfusionsfixierung

Die Perfusion wurde eingeleitet mit einem Plasmaexpander. Dieser wurde den Tieren für 20 Sekunden bei einem Druck von 250mbar infundiert, um das Blut aus dem Kreislaufsystem zu entfernen. Der Plasmaexpander erhöht den intravasalen kolloidosmotischen Druck und verhindert damit die Vergrößerung extravasaler Räume. Während des gesamten Versuches befand sich der Plasmaexpander in einem 37°C warmen Wasserbad. Direkt im Anschluss wurde mit Fixierlösung perfundiert, zunächst für fünf Minuten mit einem Druck von 250mbar und weitere 20 Minuten mit einem Druck von 50mbar. Abschließend erfolgte die Perfusion mit 5%iger Saccharoselösung für fünf Minuten bei einem Druck von 150mbar. Um konstante Perfusionsdrücke zu ermöglichen wurden ein Luftkompressor und ein Druckminderer verwendet. Beide standen über ein zuführendes Schlauchsystem mit den Perfusionslösungen in Verbindung. Die Flussrichtung wurde über einen Mehrwegehahn eingestellt. (Abbildung 2.1).

2. Material und Methoden

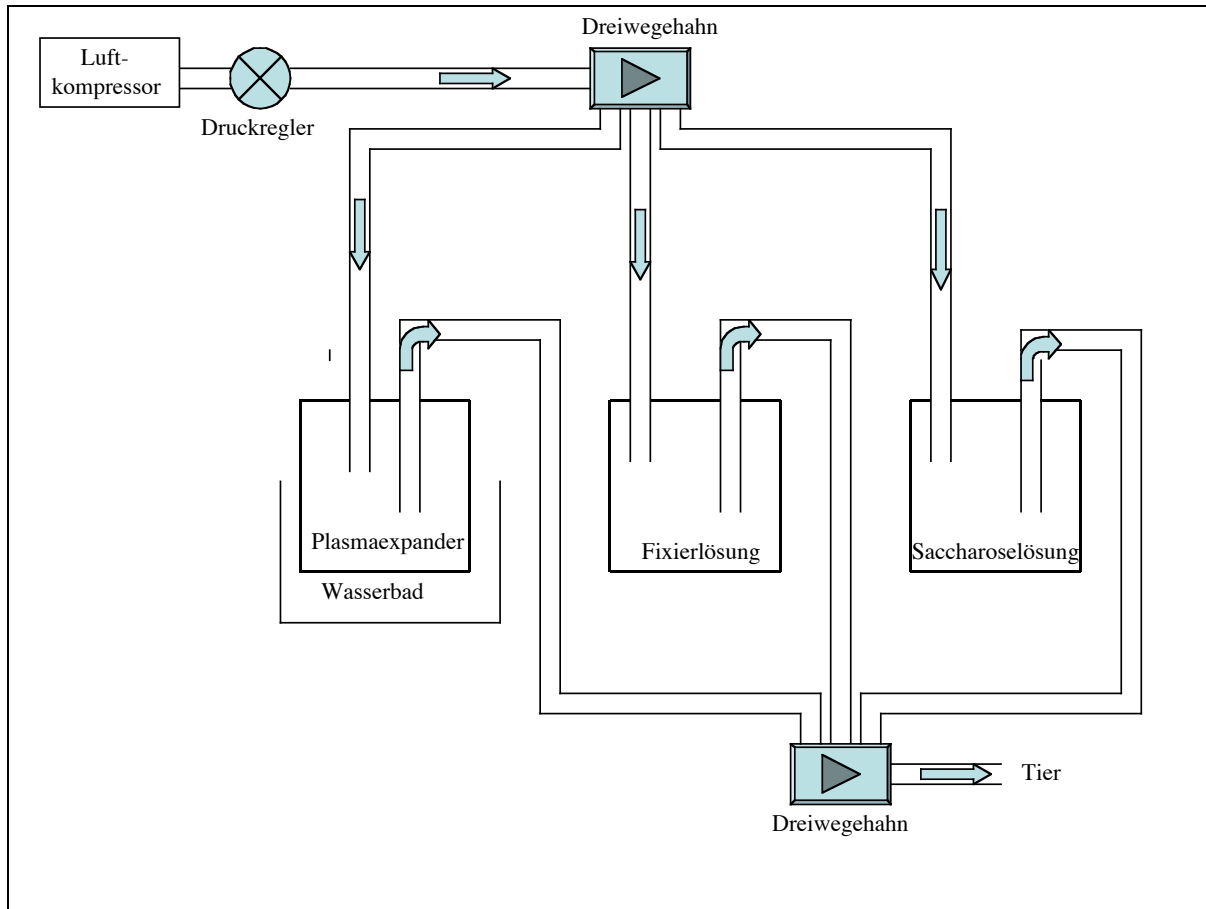


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Perfusionsmaschine

Ein Kompressor erzeugt den Perfusionsdruck. Mit Hilfe eines Druckreglers kann der Druck manuell variiert werden. Weiterhin sind die drei Perfusionslösungen dargestellt, welche nacheinander appliziert werden. Der Perfusionsaufbau mündet in eine Kanüle, dargestellt durch einen Pfeil, die eingebracht in die Aorta ascendens des Tieres, die Perfusionslösungen in dessen Kreislauf leitet.

2.6.4 Vorbereitung und Aufbewahrung der Gehirne

2.6.4.1 Dehydrierung der Gehirne und Unterteilung in weiterzuverarbeitende Gewebeblöcke

Nach erfolgter Perfusionsfixierung wurden die Gehirne der Versuchstiere mit einer Hohlmeißelzange aus dem knöchernen Schädel herauspräpariert. Im Anschluss wurden die Gehirne für zwölf Stunden in 5%iger Saccharoselösung bei 4 - 8°C gelagert.

Um die relevanten Hypothalamus- und Hirnstammregionen zu isolieren, wurden die Gehirne in einer Plexiglasmatrix mit einer Rasierklinge in 1,0 – 4,5mm dicke coronare Blöcke unterteilt, entsprechend nach den Angaben im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson [(G. Paxinos, C. Watson 1997), (Abbildungen 2.2 bis 2.5)].

Zur Weiterführung der Dehydratationsreihe erfolgte eine Umlagerung der Gehirnböcke in 15%ige Saccharoselösung, um die Gewebeblöcke für weitere zwölf Stunden zu dehydrieren. Abschließend fand eine zwölfstündige Dehydrierung in 27,3%iger Saccharoselösung statt.

2. Material und Methoden

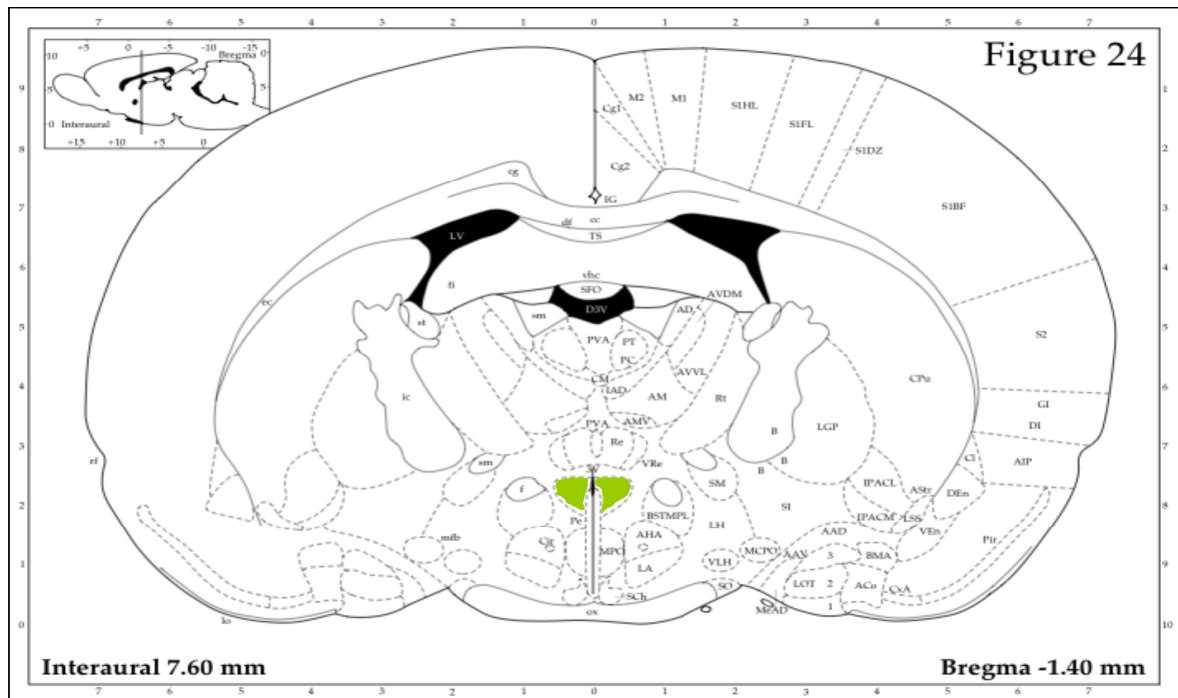


Abbildung 2.2: Horizontalschnitt durch den zentralen Bereich des PVN (grün unterlegt)

Modifiziert nach dem Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997)

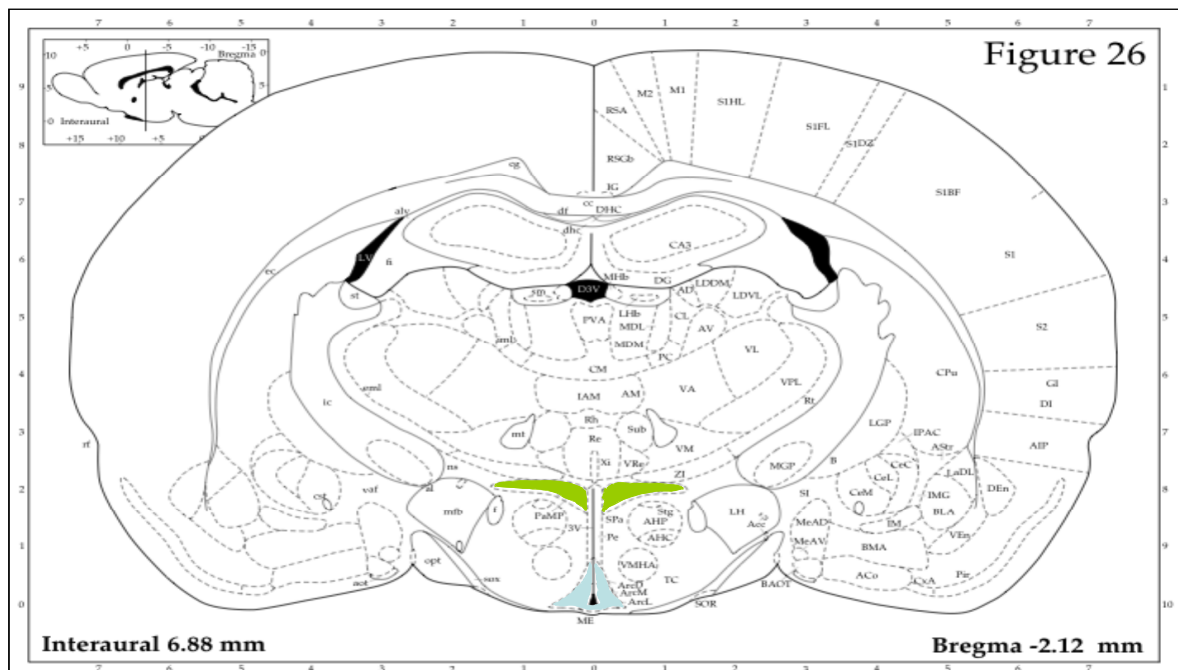


Abbildung 2.3: Horizontalschnitt durch den PVN (grün) und den NARC (blau)

Modifiziert nach dem Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997)

2. Material und Methoden

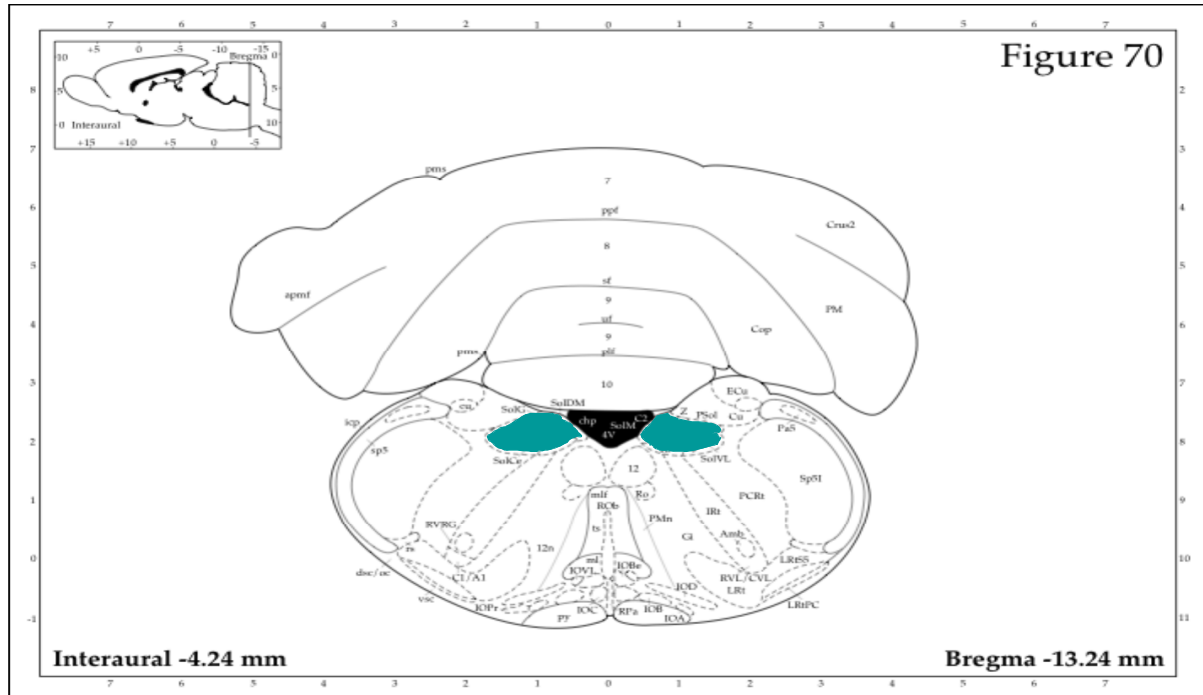


Abbildung 2.4: Horizontalschnitt durch den kaudalen Bereich des NTS (türkis unterlegt)

Modifiziert nach dem Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997)

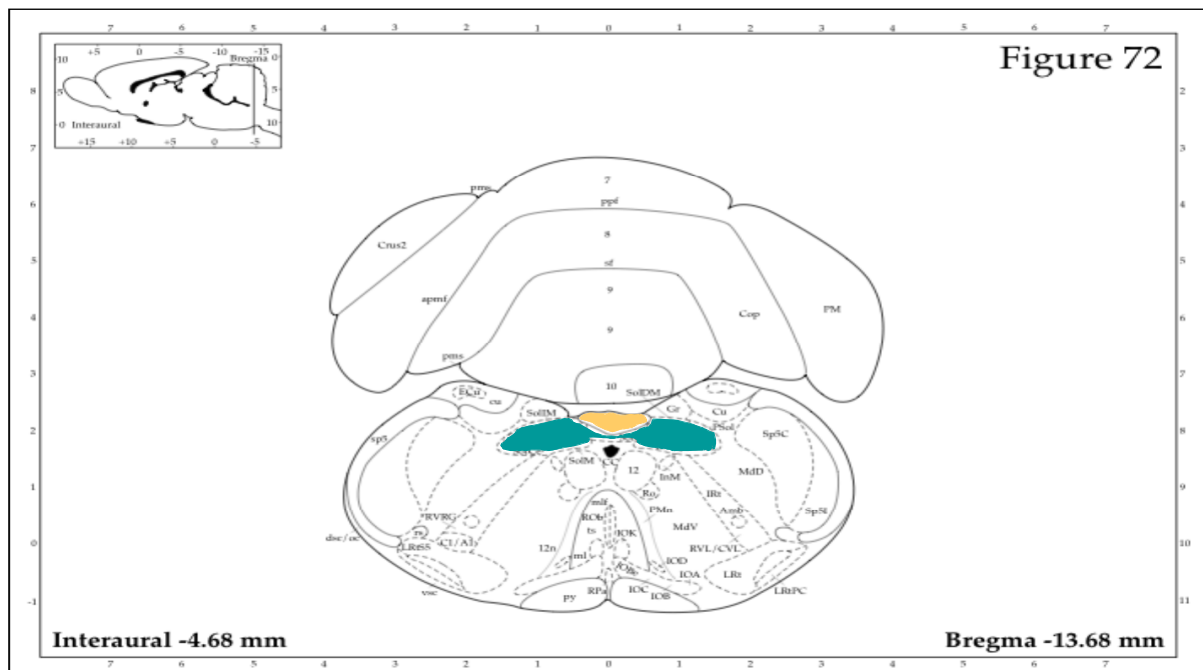


Abbildung 2.5: Horizontalschnitt durch die AP (orange) und den NTS (türkis)

Modifiziert nach dem Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997)

2.6.4.2 Aufblockung und Aufbewahrung der Gehirne

Die dehydrierten Gehirnböcke wurden mit Einbettmedium auf 1mm dicken Korkplättchen fixiert und in n-Hexan bei einer Temperatur von -70°C schockgefroren. Die Kühlung des n-Hexans erfolgte mit Flüssigstickstoff. Zum Abdampfen des Hexans wurden die Gewebelöcke für 30 Minuten bei -20°C gelagert. Die Lagerung der Gehirnböcke erfolgte im Gefrierschrank bei -80°C , in mit fünf ml *aqua bidest.* gefüllten 50ml Polyethylenröhrchen, um das Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

2.6.4.3 Anfertigung der Gefrierschnitte

Für die Anfertigung der Gefrierschnitte wurden die Gewebelöcke mit Tissue Tec auf dem Gefriertisch zentriert. Bei -26°C erfolgte die Verarbeitung der Gehirnböcke zu seriellen $25\mu\text{m}$ dicken Coronalschnitten. Die Präparate wurden frei flottierend in mit PBS gefüllte Gewebekulturschalen aufgenommen.

2.6.4.4 Allgemeines zu den Färbeprotokollen

Alle Färbeschnitte der folgenden Protokolle wurden in Multiwell®-Zellkulturplatten bei frei flottierenden Gehirnschnitten vorgenommen (free-floating-Technik). Diese Technik erlaubt es, dass Antikörper und Sera an einer großen Oberfläche wirken können (Kobelt, P. *et al.* 2004) und eine große Anzahl von Gehirnschnitten simultan gefärbt werden kann.

Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter ständiger Bewegung auf einem Horizontalschüttler. Nach Abschluss der Färbung wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Antifading-Substanz eingedeckt, um ein Ausbleichen der Gewebeschnitte zu vermeiden. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die eingedeckten Gehirnschnitte lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt.

2.6.5 Immunhistologische Färbung

2.6.5.1 Immunhistochemisches Protokoll zur Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid

Zunächst wurden die Gehirnschnitte für fünf Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit Natriumborhydrid vorbehandelt. Es folgte eine Spülung mit PBS für zwei Minuten und zwei Spülungen für jeweils zehn Minuten. Um unspezifische Bindungen der Antikörper im Gewebe zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte in 10% w/v BSA und 0,3% w/v Triton X-100 gelöst in PBS inkubiert. Der zuvor gelöste Primärantikörper Rabbit-Anti-Rat-Fos wurde 1:10000 verdünnt in einer Lösung aus PBS mit 10% w/v BSA, 3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid. Die Gewebeschnitte inkubierten für 24 Stunden mit der Antikörperlösung. Nach dreimaligem Waschen der Gewebeschnitte für zehn, 20 und 40 Minuten mit PBS folgte erneut die Inkubation mit 10% w/v BSA und 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten. Anschließend wurde der Sekundärantikörper FITC-Anti-Rabbit 1:800 verdünnt in einer Lösung aus PBS mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid, in dem die Schnitte zwölf Stunden lichtgeschützt inkubierten. Die Schnitte wurden wieder mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten gewaschen. Um das Zellchromatin gegenzufärben erfolgte die Inkubation mit Propidiumjodid. Nach der letzten Spülung mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Antifading-Lösung eingedeckt, um ein Ausbleichen der Gewebeschnitte zu verhindern.

Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter ständiger Bewegung auf einem Horizontalschüttler. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die eingedeckten Gehirnschnitte lichtgeschützt bei -20°C gelagert (Tabelle 2.3).

2. Material und Methoden

1. Waschen der Gehirnschnitte mit PBS für fünf Minuten
2. Inkubation der Gewebeschnitte in 1% w/v Natriumborhydrid in PBS für 15 Minuten
3. Dreimaliges Waschen der Gehirnschnitte mit PBS für zwei, zehn, zehn Minuten
4. Blockieren mit 10% w/v BSA und 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten
5. Inkubation mit Primärantikörper Rabbit-Anti-Rat-Fos (1:10 000) in 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100, 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 24 Stunden
6. Dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für zehn, 20, 40 Minuten
7. Blockieren mit 10% w/v BSA und 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten
8. Inkubation mit Sekundärantikörper FITC-Anti-Rabbit (1:800) in 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100, 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 12 Stunden
9. Dreimaliges Waschen der Gewebeschnitte mit PBS für zehn, 20, 40 Minuten
10. Inkubation in 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumjodid in PBS für 15 Minuten
11. Dreimaliges Waschen der Gehirnschnitte in PBS für zehn, 20, 40 Minuten
12. Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträger und Eindecken mit Antifading-Lösung

Tabelle 2.3: Immunhistochemisches Protokoll zur Fos-Färbung und Gegenfärbung mit Propidiumjodid

2.6.5.2 Immunhistochemisches Protokoll zur Doppelfärbung für Fos- und Corticotropin-Releasing Hormone-Immunreaktivität

Die Gehirnschnitte wurden für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss an eine Vorbehandlung mit 1% w/v Natriumborhydrid für 15 Minuten, folgte das Waschen der Schnitte mit PBS für zwei Minuten, und zweimal für zehn Minuten. Zur Hemmung der Bindung der Antikörper an unspezifischen Bindungsstellen inkubierten die Gewebeschnitte in 5% w/v PBNS (Phosphate Buffered Normal Goat Serum), 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 60 Minuten. Es folgte die Inkubation mit den Antikörpern Rabbit-Anti-Rat-Fos 1:10 000 und Anti-Guinea-Pig-CRF 1:200 verdünnt in 10% w/v BSA für 24 Stunden. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten und die Inkubation in 3% w/v NGS und 0,3% w/v Triton X-100. für 60 Minuten. Anschließend inkubierten die Gehirnschnitte mit dem Sekundärantikörper Goat-Anti-Rabbit-FITC 1:800

2. Material und Methoden

verdünnt in 10% w/v NGS und 0,2% w/v Natriumazid lichtgeschützt für zwölf Stunden. Die Gewebeschnitte wurden wieder mit PBS für zehn Minuten, 20 Minuten und 40 Minuten gespült und inkubierten für fünf Stunden in 5% w/v BSA, 3% w/v PBNS und 0,3% w/v Triton X-100 in PBS. Der Sekundärantikörper Rabbit-Anti-Guinea-Pig-TRITC 1:600 verdünnt in 10% w/v BSA wurde hinzugegeben und die Schnitte inkubierten lichtgeschützt für weitere zwölf Stunden. Es folgte dreimaliges Waschen mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten. Im Anschluss erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI für 10 Minuten.

Nach den immunhistochemischen Färbungen wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Antifading-Lösung eingedeckt. Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter ständiger Bewegung auf einem Horizontalschüttler. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die eingedeckten Gehirnschnitte lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt (Tabelle 2.4).

2. Material und Methoden

1. Waschen der Gewebeschnitte mit PBS für fünf Minuten
2. Inkubation mit 1% w/v Natriumborhydrid in PBS für 15 Minuten
3. Dreimaliges Waschen der Gehirnschnitte mit PBS für zwei, und zweimal für 10 Minuten
4. Inkubation mit 3% w/v NGS, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 60 Minuten
5. Inkubation mit Rabbit-Anti-Rat-Fos-Antikörper 1:10000 und Guinea-Pig-Anti-CRF 1:200 verdünnt in PBS mit 10% w/v BSA für 24 Stunden
6. Dreimaliges Waschen der Gewebeschnitte mit PBS nach jeweils zehn, 20, 40 Minuten
7. Inkubation mit 3% w/v NGS, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid in PBS für fünf Stunden
8. Inkubation mit Sekundärantikörper Goat-Anti-Rabbit-FITC 1:800 verdünnt in 10% w/v NGS und 0,2% w/v Natriumazid für zwölf Stunden
9. Dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für zehn, 20, 40 Minuten
10. Blockieren mit 5% w/v BSA, 3% w/v NGS, 0,3% w/v Triton X-100, 0,2% w/v Natriumazid in PBS für fünf Stunden
11. Inkubation mit Sekundärantikörper Rabbit-Anti-Guinea-Pig-TRITC 1:600 verdünnt in PBS mit 10% w/v BSA für zwölf Stunden
12. Dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für zehn, 20, 40 Minuten
13. Gegenfärbung mit DAPI für zehn Minuten
14. Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträger und Eindecken mit Antifading-Lösung

Tabelle 2.4: Immunhistochemisches Protokoll zur Doppelfärbung für Fos und CRH

2.6.5.3 Immunhistochemisches Protokoll zur Fos- und NPY-Färbung

Die Gehirnschnitte wurden zunächst für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor eine fünfzehnminütige Vorbehandlung mit 1% w/v Natriumborhydrid erfolgte. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit PBS für je zehn und 20 Minuten. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen inkubierten die Gewebeschnitte in 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten. Anschließend inkubierten die Gewebeschnitte mit den Antikörpern Goat-Anti-Rabbit-Fos 1:10000 und Goat-Anti-NPY 1:200 verdünnt in PBS mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid für 24 Stunden. Im Anschluss an die Inkubation mit den Antikörpern wurden die Schnitte mit PBS dreimal gewaschen für jeweils zehn, 20 und 40 Minuten. Unspezifische Bindungsstellen wurden erneut blockiert mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 60 Minuten.

Der Sekundärantikörper Sheep-Anti-Rabbit-FITC wurde 1:800 gelöst in PBS mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid. Einer zwölfstündigen Inkubationzeit mit dem Antikörper folgte das Waschen der Gewebeschnitte mit PBS für jeweils zehn, 20 und 40 Minuten. Unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert während einer einstündigen Inkubation in PBS mit 10% BSA und 0,3% w/v Triton X-100.

Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Rabbit-Anti-Goat-TRITC 1:200 verdünnt in PBS mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid für zwölf Stunden. Abschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten gewaschen.

Nach den immunhistochemischen Färbungen wurden die Gehirnschnitte auf Objektträger aufgezogen und mit Antifading-Lösung eingedeckt.

Alle Versuchsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter ständiger Bewegung auf einem Horizontalschüttler. Bis zur mikroskopischen Analyse wurden die eingedeckten Gehirnschnitte lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt (Tabelle 2.5)

2. Material und Methoden

1. Waschen der Gehirnschnitte mit PBS für fünf Minuten
2. Inkubation mit 1% w/v Natriumborhydrid für fünf Minuten
3. Waschen mit PBS für zehn Minuten, dann für 20 Minuten
4. Blockieren mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten
5. Inkubation mit den Antikörpern Goat-Anti-Rabbit-Fos 1:10000 und Goat-Anti-NPY 1:200 verdünnt in PBS mit 10% w/v BSA und 0,2% w/v Natriumazid für 24 Stunden
6. Dreimaliges Waschen der Schnitte mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten
7. Blockieren mit 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid in PBS für 60 Minuten
8. Inkubation mit Sekundärantikörper Sheep-Anti-Rabbit-FITC 1:800 verdünnt in 10% w/v BSA, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid für zwölf Stunden
9. Dreimaliges Waschen der Gehirnschnitte mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten
10. Blockieren mit 10% w/v BSA und 0,3% w/v Triton X-100 in PBS für 60 Minuten
11. Inkubation mit Rabbit-Anti-Goat-TRITC-Antikörper 1:200 verdünnt in PBS mit BSA 10% w/v, 0,3% w/v Triton X-100 und 0,2% w/v Natriumazid für zwölf Stunden
12. Dreimaliges Waschen mit PBS für zehn, 20 und 40 Minuten
13. Aufziehen der Gewebeschnitte auf Objektträger und Eindecken mit Antifading-Lösung

Tabelle 2.5: Immunhistochemisches Protokoll zur Fos- und NPY-Färbung

2. Material und Methoden

2.7 Statistische Analyse

2.7.1 Statistische Auswertung der verhaltensbiologischen Experimente

Die Daten von drei Versuchsgruppen mit jeweils fünf Tieren ($n = 5$) wurden ausgewertet. Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde nach der Injektion der Testlösungen stündlich bestimmt über die Ermittlung der Differenz zur unmittelbar nach der Injektion bereitgestellten Nahrungsmenge. Die Messungen erfolgten nach einer Stunde, zwei Stunden, drei Stunden und vier Stunden

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

2.7.2 Mikroskopische Auswertung (Immunhistochemie)

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (cLSM). Der Untersucher war bei der Auszählung der Fos-positiven Neurone am Mikroskop und am Computer geblindet. Die Einstellungen am cLSM zur Signaldetektion der einzelnen Fluorochrome sind in Tabelle 2.6. dargestellt.

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

Tabelle 2.6: Einstellungen am cLSM zur Detektion der einzelnen Fluorochrome

2.7.3 Mikroskopische Auswertung der immunhistologischen Experimente

Die quantitative Auswertung der Fos-Immunreaktivität (Fos-ir) erfolgte durch das Auszählen der Fos-positiven Zellen. Neurone galten als Fos-positiv, wenn ein grünes Fluoreszenzsignal im Zellkern zu beobachten war. Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid erzeugte ein rotes Fluoreszenzsignal im Zellkern, verursacht durch eine Bindung an das Chromatin, und ermöglichte so die genaue Abgrenzung der zu untersuchenden Gehirnerne zu benachbarten Gehirnstrukturen.

Jeder zweite Gewebeschnitt der relevanten Gehirnregionen Paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus (PVN) und Nucleus tractus solitarii (NTS) wurde bilateral und in der Area postrema (AP) in seiner gesamten rostrocaudalen Ausdehnung unilateral für Fos-positive Zellen ausgezählt. Der Nucleus arcuatus wurde nur qualitativ für eine Fos-Expression ausgewertet, da dessen ghrelininduzierte Aktivierung bereits bekannt war.

Pro Rattengehirn wurden zehn Schnitte des PVN und jeweils 15 Schnitte des NTS und der AP ausgewertet. In allen Versuchsgruppen wurde die gleiche Anzahl an Gehirnen ($n = 4$), untersucht, um eine genauere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen. Das Zählen der Fos-positiven Zellen war einfach geblindet, dem Untersucher war daher nicht bekannt, welche Behandlung das zu untersuchende Versuchstier erhalten hatte. Zur Orientierung und zum Zuordnen der anatomischen Strukturen wurde der stereotaktische Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997) verwendet.

2.7.4 Statistische Auswertung der immunhistologischen Experimente

Für alle Versuchstiere je Gruppe wurde die Anzahl der Fos-positiven Neurone im PVN, NTS und in der AP ermittelt und als Median sowie die mittlere und interquartile Schwankung angegeben. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit der nicht-parametrischen Rangvarianzanalyse (Kruskal-Wallis-ANOVA Median Test) und dem Mann-Whitney-U-Tests ausgewertet, wobei ein $p < 0,05$ als signifikant galt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme

Dieser Versuch diente der Evaluation der Wirkung von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die kumulative Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von vier Stunden.

Die Versuchstiere, die mit Ghrelin behandelt wurden (1nmol bzw. 10nmol/Tier), zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Stunde nach der Injektion keinen signifikanten Anstieg der Nahrungsaufnahme (Median: 0,25g/kg bzw. 0,02g/kg [1nmol bzw. 10nmol Ghrelin/Tier] vs. 0,00g/kg [Kontrollgruppe]; $p > 0,053$; Tabelle 3.1). Nach einer weiteren Stunde zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der vehikelbehandelten Versuchsgruppe und den ghrelinbehandelten Gruppen. Zwei Stunden nach den Injektionen war die aufgenommene Nahrungsmenge verglichen mit den vehikelbehandelten Tieren in der Gruppe 1nmol Ghrelin/Ratte 12,6 mal und in der Gruppe 10nmol Ghrelin/Ratte 2,4 mal höher (Median: 2,40g/kg bzw. 0,46 g/kg [1nmol bzw. 10nmol Ghrelin/Tier] vs. 0,19g/kg [Kontrollgruppe]; $p < 0,05$; Tabelle 3.1). Nach drei Stunden war die Nahrungsmenge um ein 22,1-faches bzw. um ein 21,7-faches erhöht (Median: 4,20g/kg bzw. 4,13g/kg [1nmol bzw. 10nmol Ghrelin/Tier] vs. 0,19g/kg [Kontrollgruppe]; $p < 0,05$, Tabelle 3.1). Nach vier Stunden erhöhte sich die Nahrungsaufnahme in der Gruppe Ghrelin 1nmol/Ratte nur noch gering, sie war um ein 22,7-faches erhöht, während sie sich in der anderen Ghrelingruppe nicht mehr änderte, 21,7-fach (Median: 4,32g/kg bzw. 4,13g/kg [1nmol bzw. 10nmol Ghrelin/Tier] vs. 0,19g/kg [Kontrollgruppe]; $p < 0,05$; Tabelle 3.1). In beiden ghrelinbehandelten Gruppen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Erhöhung der kumulativen vier-Stunden Nahrungsaufnahme beobachtet werden, wobei der Unterschied innerhalb der Ghrelingruppen nicht signifikant war (Tabelle 3.1).

3. Ergebnisse

Zeit (h)	Nahrungsaufnahme in g/kg					
	Vehikel (NaCl)		Ghrelin 1 nmol		Ghrelin 10 nmol	
	Median		Median		Median	
	25.	75.	25.	75.	25.	75.
1	0,00		0,25		0,02	
	0,00	0,07	0,08	1,74	0,00	1,73
2	0,19		2,40*		0,46	
	0,03	0,63	0,38	3,25	0,01	4,17
3	0,19		4,20*		4,13*	
	0,03	2,05	3,31	5,04	2,03	4,87
4	0,19		4,32*		4,13*	
	0,03	2,07	3,32	7,55	2,08	7,12

Tabelle 3.1: Effekt von intraperitoneal injiziertem Ghrelin (1nmol und 10nmol) auf die kumulative Nahrungsaufnahme über einen Zeitraum von vier Stunden. Die Daten wurden angegeben in Median, 25. und 75. Perzentile, * $p < 0,05$ Ghrelin vs. Kontrollgruppe

3.2 Die Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm

Ziel dieses Versuchs war es, die neuronale Aktivität in ausgewählten Hirnkernen im Hypothalamus und im Hirnstamm nach ip. Injektion von 1nmol Ghrelin/Ratte zu prüfen. Zum Nachweis einer neuronalen Aktivierung wurde der metabolische Marker Fos in den zu untersuchenden Gehirnarealen immunhistologisch markiert.

Die Zahl der Fos-positiven Neurone/Gehirnschnitt im PVN war nach Ghrelininjektion verglichen mit der Kontrollgruppe mit einem Medianwert von 41,8 gegenüber 17,5 deutlich erhöht ($p < 0,05$). Dabei fanden sich die Fos-positiven Neurone hauptsächlich im medioparvozellulärem Bereich, während im magnozöllulärem Bereich nur wenige Fos-positve Zellen beobachtet wurden (Abbildung 3.2).

Die qualitative Auswertung des NARC ergab eine erhöhte Fos-Expression in der ghrelinbehandelten Versuchsgruppe verglichen zur Kontrollgruppe (Abbildung 3.1). Der NARC diente zur positiven Kontrolle einer erfolgreichen Fos-Induktion nach Ghrelin-Injektion, da bereits aus früheren Studien bekannt war, dass Ghrelin eine Fos-Expression im NARC induziert. Im NTS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen ghrelinbehandelten Tieren und der Kontrollgruppe ($p > 0,05$; Diagramm 3.1).

3. Ergebnisse

In der AP konnte in der Ghrelingruppe keine signifikante Erhöhung der Zahl der Fos-positiven Neurone gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden ($p > 0,05$; Diagramm 3.1).

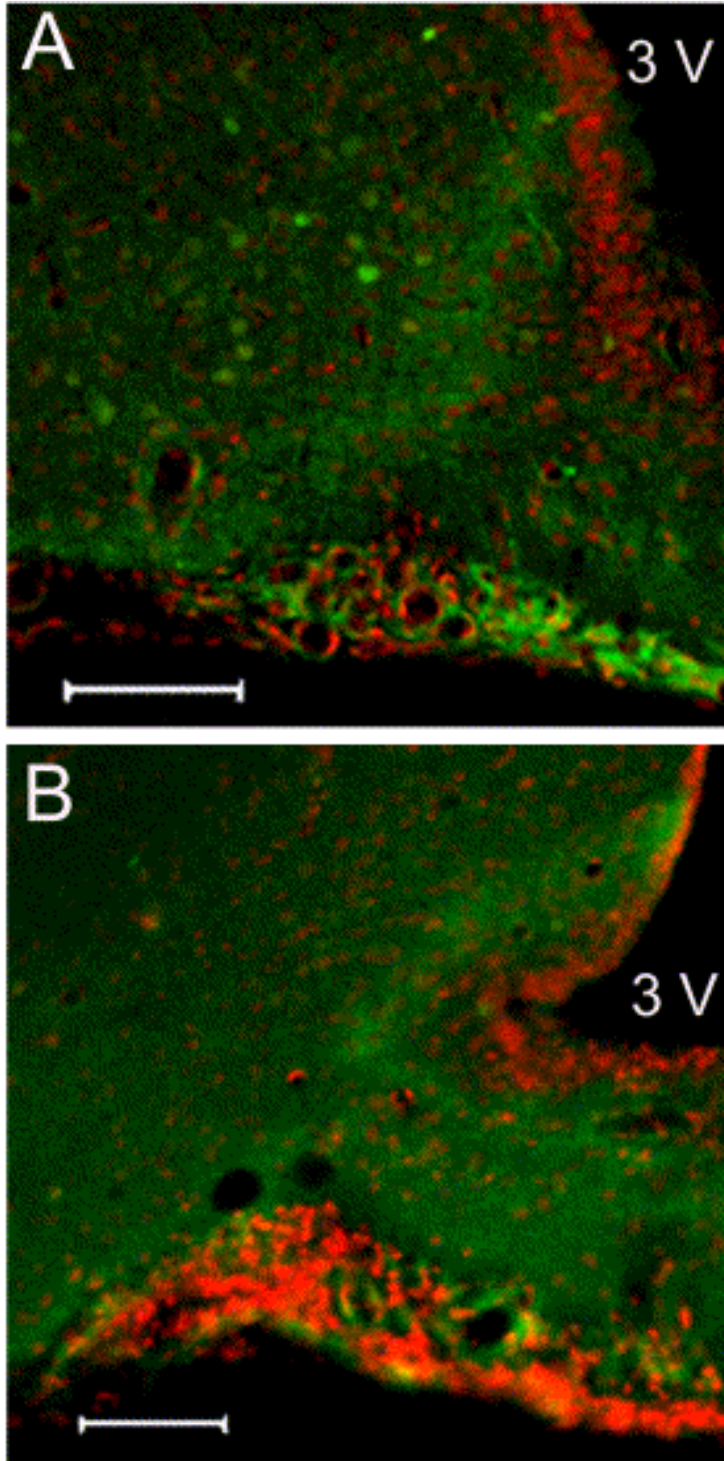


Abbildung 3.1: Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität (Fos-ir) im Nucleus arcuatus des Hypothalamus (NARC)

Der NARC zeigte Fos-positive Neurone (grüne Färbung) 90 Minuten nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin (1nmol/Ratte) (A). Nach Injektion von isotoner Natriumchloridlösung wurden keine oder nur wenige Fos-positive Neurone beobachtet (B). Die Zellkerne sind rot gefärbt als Resultat einer Gegenfärbung mit Propidiumiodid. Die weißen Größenbalken repräsentieren 100 μ m. 3V = Dritter Ventrikel.

3. Ergebnisse

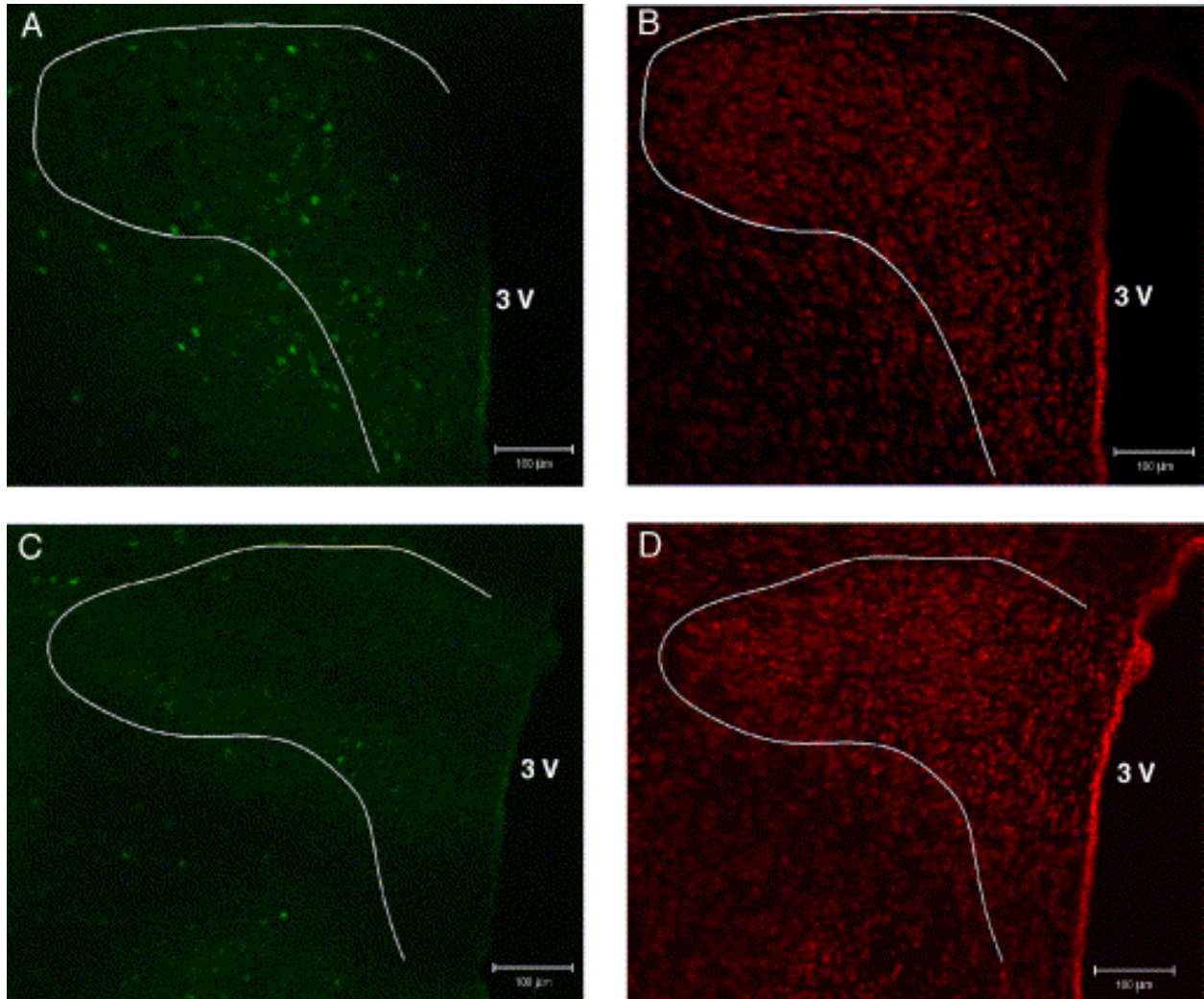


Abbildung 3.2: Intraperitoneal injiziertes Ghrelin induzierte Fos-Immunreaktivität (Fos-ir) im Paraventriculären Nucleus (PVN) des Hypothalamus

Der PVN zeigte eine erhöhte Fos-Expression (grüne Färbung) 90 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von Ghrelin (1nmol) (A). Eine geringere Fos-Expression wurde beobachtet nach intraperitonealer Injektion von physiologischer Natriumchloridlösung (C). In denselben Gewebeschnitten der ghrelin- (B) bzw. vehikelbehandelten (D) Tiere sind die Zellkerne als Resultat einer Gegenfärbung mit Propidiumjodid rot gefärbt. Die weißen Linien markieren die Umrisse des Paraventriculären Nucleus entsprechend den Angaben im stereotaktischen Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997). Die weißen Größenbalken repräsentieren 100µm. 3V = Dritter Ventrikel

3. Ergebnisse

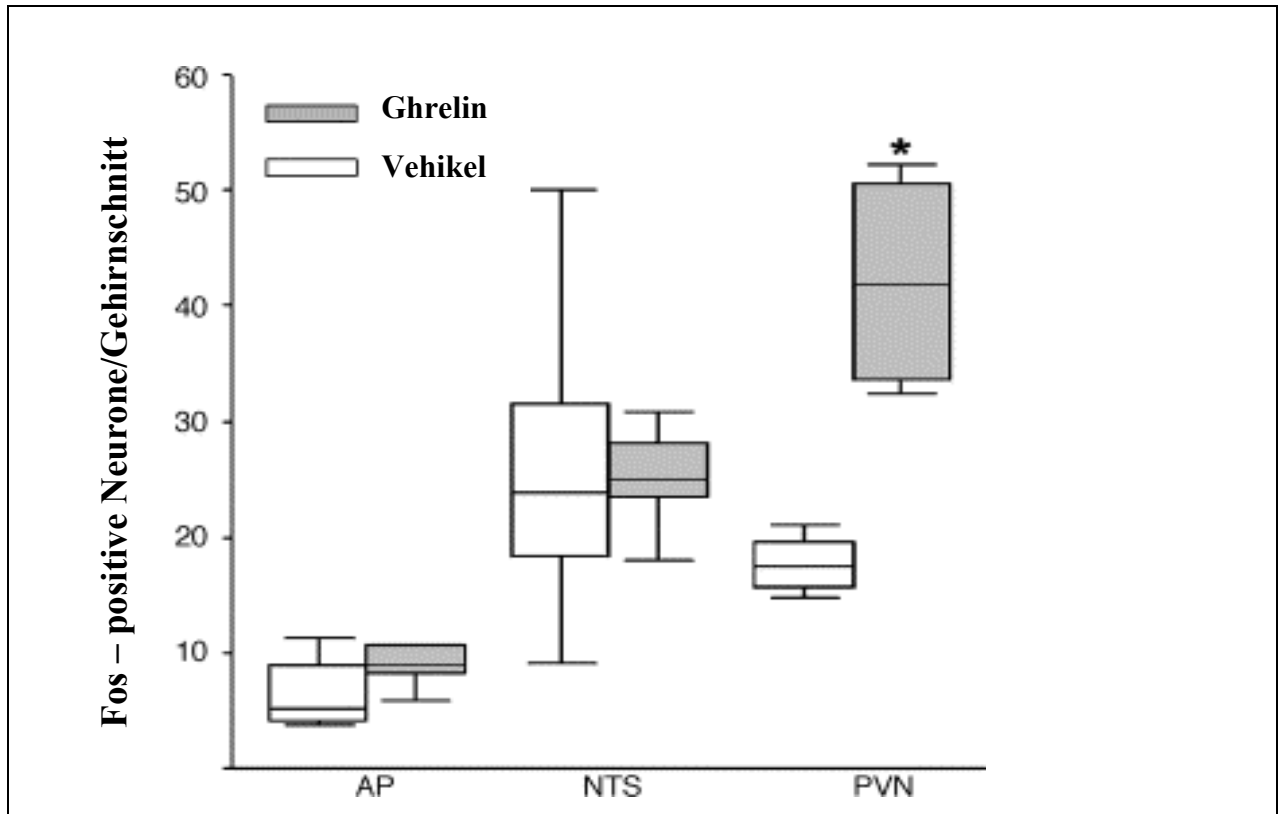


Diagramm 3.1: Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Zahl der Fos-positiven Neurone im PVN, im NTS und in der AP

Den Versuchstieren ($n = 4/\text{Gruppe}$) wurde entweder isotone Natriumchloridlösung oder 1 nmol Ghrelin injiziert. Nach 90 Minuten wurden die Gehirne zum Nachweis von Fos-ir immunhistochemisch untersucht. Die Daten sind dargestellt in einem "box and whiskers" Diagramm. Das obere Ende der Box repräsentiert die 75. und das untere Ende die 25. Perzentile. Der Median ist dargestellt als horizontale Linie innerhalb der Box. Die "whiskers" oberhalb und unterhalb der Boxen repräsentieren die kleinsten und größten gemessenen Werte, die weniger als 1,5 Boxenlängen von den Boxen entfernt sind.* $p < 0,05$ vs. Vehikel; AP: Area postrema, NTS: Nucleus tractus solitarius, PVN: Paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus

3.3 Qualitative Charakterisierung des neuropeptidergen Phänotyps von aktivierten PVN-Neuronen sowie die Bestimmung des neuropeptidergen Phänotyps umgebender Nervenfasern nach intraperitonealer Ghrelin-Injektion

Die Doppelfärbung gegen Neuropeptid Y und Fos ergab, dass die durch Ghrelin aktivierten Neurone in einem sehr dichten Netzwerk aus NPY-positiven Nervenfasern eingebettet waren (Abbildung 3.3). Bei starker mikroskopischer Vergrößerung war dieser enge morphologische Kontakt zwischen den Fos-positiven Neuronen und den NPY-positiven Fasern besonders deutlich sichtbar (Abbildung 3.3A). Ein Hinweis auf synaptische Kontakte zwischen NPY-Fasern und Fos-positiven Neuronen konnte jedoch mit dieser Methode erwartungsgemäß nicht beobachtet werden. Die meisten NPY-haltigen Fasern waren im parvozellulärem Areal des PVN lokalisiert (Abbildung 3.3).

Die immunhistologische Doppelfärbung gegen Fos und CRH im PVN zeigte, dass eine große Anzahl von Fos-positiven Neuronen auch positiv für CRH war. Hierbei war das CRH deutlich im Zytoplasma der Zellen lokalisiert und der Transkriptionsfaktor im Zellkern der aktivierten Zellen (Abbildung 3.3D). Bei starker mikroskopischer Vergrößerung war diese Beobachtung besonders deutlich darstellbar. Die CRH-positiven Neurone konnten sowohl im parvozellulärem, wie auch im magnozellanulärem Areal des PVN beobachtet werden. Neben den Perikarya konnte CRH auch in zahlreichen Axonen immunhistologisch markiert werden (Abbildung 3.3).

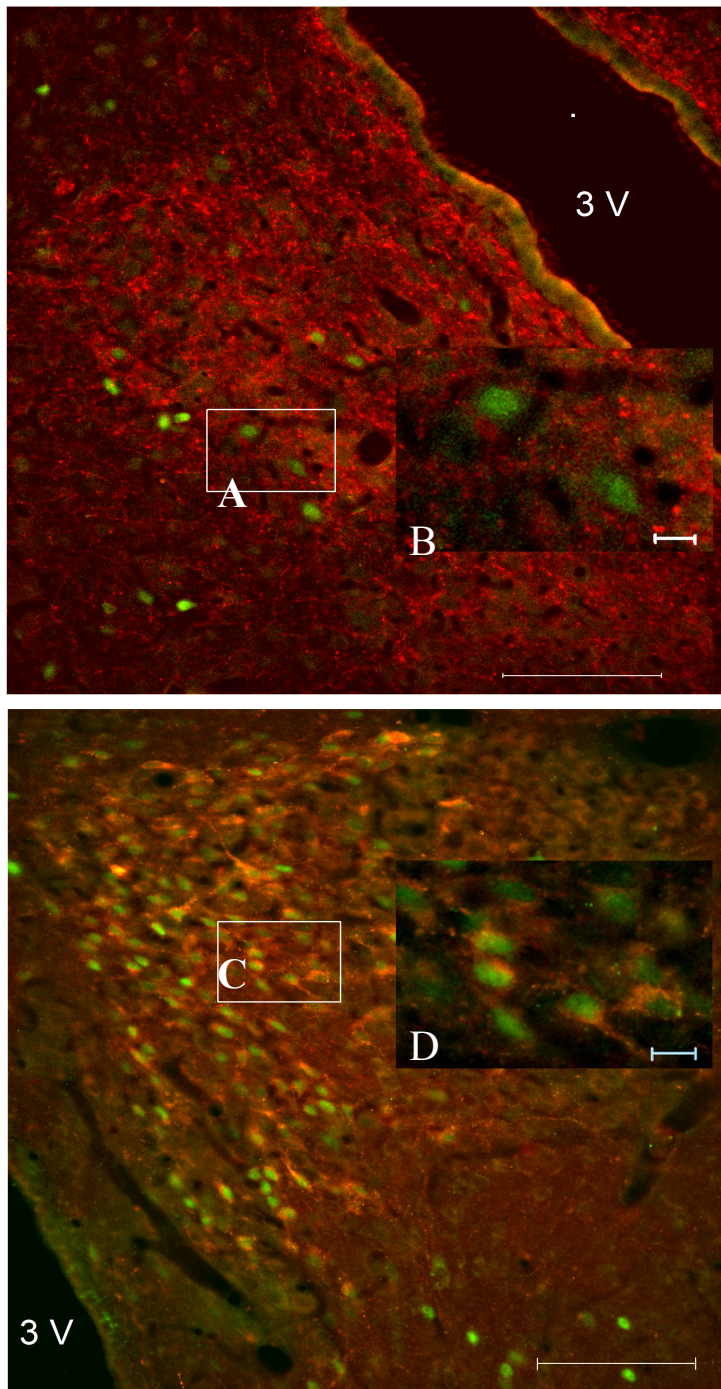


Abbildung 3.3: Doppelfärbung von Fos-positiven Neuronen im PVN mit NPY oder CRH

Fos-positive Neurone (grünes Fluoreszenzsignal) im PVN sind umgeben von einem dichten Netzwerk aus rot angefärbten NPY-Fasern (A). In der Vergrößerung (B) wird die enge Nachbarschaft von NPY-Fasern und Fos-positiven Zellkernen deutlich. In Bild (C) ist CRH-ir in Neuronen des PVN als rotes Signal dargestellt. Die Vergrößerung zeigt deutlich das Verhältnis zwischen Fos-ir in den Zellkernen der Neurone und CRH-ir im Zytoplasma der Zellen und Axone (D). Der Größenbalken repräsentiert 100 μ m in A, C und 10 μ m in B, D. 3V = Dritter Ventrikel

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie sollte untersucht werden, ob das Verteilungsmuster für Fos tatsächlich abhängig vom Applikationsweg des Ghrelins ist. Dazu wurde die neuronale Aktivität im PVN, NTS, in der AP und im NARC durch die Bestimmung von Fos-Expression nach intraperitonealer Applikation von Ghrelin untersucht. Mittels einer Doppelmarkierung gegen Fos und CRH wurde der neuropeptiderge Phänotypus der aktivierten Neurone bestimmt. Die phänotypische Charakterisierung der Axone in den untersuchten Hirnregionen erfolgte mit Hilfe einer Doppelfärbung gegen NPY.

3.4.1 Versuche zur Nahrungsaufnahme nach intraperitonealer Verabreichung von Ghrelin

Die intraperitoneale Applikation von Ghrelin in den Dosen 1nmol bzw. 10nmol/Ratte erhöhte die kumulative Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (Natriumchloridlösung) signifikant. Innerhalb der beiden ghrelinbehandelten Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Nach vier Stunden betrug die kumulative Nahrungsaufnahme 4,32g/kg in der 1nmol Ghrelingruppe bzw. 4,13g/kg in der 10nmol Ghrelingruppe vs. 0,19g/kg in der Kontrollgruppe, wobei $p < 0,05$ als signifikant galt.

3.4.2 Immunhistochemische Versuche zur Fos-Expression im Hypothalamus und im Hirnstamm nach intraperitonealer Applikation von Ghrelin

Die ip. Injektion von Ghrelin aktivierte Neurone des PVN und des NARC bei Ratten. Dabei betrug die Dosis 1nmol/Versuchstier, welche die kleinstmögliche Dosis ist, die eine orexigene Wirkung hervorruft. Die Aktivierung dieser Hirnkerne konnte durch die immunhistologische Markierung von Fos in den entsprechenden Hirnarealen dargestellt werden. Die Fos-Expression im PVN und im NARC war nach Injektion von Ghrelin deutlich höher, als bei der Kontrollgruppe, die mit Natriumchlorid-Lösung behandelt wurde. Während Fos im Nucleus der aktivierten Neurone lokalisiert war, konnte im Zytoplasma derselben Zellen CRH nachgewiesen werden. Die neuropeptiderge Phänotypisierung der Nervenfasern in den aktivierten Arealen des

3. Ergebnisse

PVN ergab, dass die Fos-positiven Neurone in einem Netzwerk NPY-positiver Fasern eingebettet sind.

In Neuronen des NTS konnte keine signifikante Fos-Expression nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Einleitung

In früheren Studien wurde bereits die kleinstmögliche Ghrelinosis bestimmt, mit der eine Stimulation der Nahrungsaufnahme induziert werden kann. Diese beträgt 1nmol pro Versuchstier bei Ratten (Wren, A. M. *et al.* 2001). In der vorliegenden Studie gingen den immunhistochemischen Untersuchungen zur neuronalen Aktivität verhaltensbiologische Versuche voraus. Dabei wurde die orexigene Wirkung von intraperitoneal injiziertem Ghrelin in zwei unterschiedlichen Dosierungen bestimmt - 1nmol bzw. 10nmol pro Versuchstier im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit isotoner Natriumchloridlösung behandelt wurde. Während Ghrelin in beiden Dosierungen die kumulative Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte, konnte innerhalb der beiden Ghrelingruppen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in den immunhistochemischen Versuchen Ghrelin in einer Dosierung von 1nmol pro Versuchstier verwendet. Somit wurde versucht, so wenig wie möglich von physiologischen Ghrelinkonzentrationen abzuweichen und mögliche Nebenwirkungen zu hoher Dosierungen zu vermeiden.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von intraperitoneal appliziertem Ghrelin auf die neuronale Aktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm untersucht. Des Weiteren wurde der neurochemische Phänotypus der aktivierten Neurone und deren umgebender Fasern im PVN bestimmt.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass intraperitoneal injiziertes Ghrelin in einer orexigen wirkenden Dosis von 1nmol/Versuchstier Neurone des PVN und des NARC, nicht jedoch der AP oder des NTS, aktiviert. Der Nachweis für die neuronale Aktivierung erfolgte durch die immunhistochemische Darstellung von Fos in den entsprechenden Zellkernen. Im Zytoplasma von Fos-positiven Neuronen im PVN wurde das anorexigen wirkende CRH beobachtet. Die umgebenden Fasern in diesem PVN-Bereich hingegen waren positiv für das orexigene Peptid NPY.

4.2 Einfluss von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme

In den verhaltensbiologischen Untersuchungen dieser Studie entfaltete intraperitoneal injiziertes Ghrelin eine orexigene Wirkung bei Ratten bereits bei einer Dosierung von 1nmol pro Tier. Dieser Effekt wurde gezeigt durch den progressiven Anstieg in der kumulativen Nahrungsaufnahme während einer vierstündigen Beobachtungszeit nach intraperitonealer Injektion von 1 bzw. 10nmol Ghrelin pro Versuchstier. Dabei war die kumulative Nahrungsaufnahme nach Injektion von 10 nmol Ghrelin nicht signifikant höher, als nach 1 nmol Ghrelin. Um Nebenwirkungen durch höhere Dosierungen von Ghrelin zu vermeiden, wurde für die weiteren Versuche die niedrigere Dosis verwendet.

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit bisherigen Untersuchungen, in denen unterschiedliche Ghrelindosierungen bezüglich ihrer Wirkung auf die Nahrungsaufnahme verglichen worden sind. Wren *et al.* beschrieben, dass bei intraperitonealer Applikation von Ghrelin bei Ratten, die kleinstmögliche Dosis, um eine signifikante Stimulation der Nahrungsaufnahme zu induzieren, bei 1nmol pro Versuchstier liegt. Dabei konnten sie auch zeigen, dass bei dieser Dosierung die Plasmaghrelinspiegel 15 Minuten nach der Injektion auf Werte sanken, die sonst bei Nahrungskarenz zu beobachten sind (Wren, A. M. *et al.* 2001).

4.3 Wirkung von intraperitoneal verabreichtem Ghrelin auf die Fos-Immunreaktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm

Aufgrund früherer Untersuchungen wird vermutet, dass Ghrelin, nachdem es in die Blutzirkulation abgegeben wird, seine Wirkung auf die Energiehomöostase hauptsächlich über den Growth Hormone Secretagogue (GHS)-Rezeptor, der auf Neuronen des NARC lokalisiert ist, entfaltet (Wang, L. *et al.* 2002). Guan *et al.* beschrieben den NARC als einzige hypothalamische Struktur außerhalb der Blut-Hirn-Schranke, der den GHS-Rezeptor trägt (Guan, X. M. *et al.* 1997). In einer Studie von Tamura *et al.* stimulierte die intravenöse und intrazerebroventrikuläre Injektion von Ghrelin die Nahrungsaufnahme bei gesunden Ratten, nicht jedoch bei Tieren, deren NARC beschädigt war (Tamura, H. *et al.* 2002).

In mehreren anderen Studien wurde die Wirkung von peripherem als auch zentral appliziertem Ghrelin auf die zentrale Fos-Expression untersucht. Die intravenöse Injektion von 1,5 bzw. 3,0nmol Ghrelin induzierte eine Fos-Expression im NARC bei Ratten (Hewson, A. K. and

4. Diskussion

Dickson, S. L. 2000; Date, Y. *et al.* 2002). Durch die intraperitoneale Injektion von Ghrelin konnten Neurone des NARC bei Mäusen aktiviert werden (Traebert, M. *et al.* 2002). Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei Ratten beobachtet (Wang, L. *et al.* 2002).

Date *et al.* untersuchten die Wirkung von intrazerebroventrikulär injiziertem Ghrelin auf die zentrale Fos-Expression. Sie stellten fest, dass zentrale Ghrelininjektionen bei Ratten die Magenmotilität erhöht und eine Fos-Expression im NARC und DMV, nicht jedoch im PVN induziert (Date, Y. *et al.* 2001). Die Arbeitsgruppe von Luckman injizierte Ratten ebenfalls Ghrelin intrazerebroventrikulär und beobachtete eine gesteigerte Nahrungsaufnahme, wie auch eine Induktion der Fos-Expression in mehreren Hypothalamus- und Hirnstammkernen, einschließlich des PVN, NARC, DMH, LH, AP und NTS (Lawrence, C. B. *et al.* 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass intraperitoneal verabreichtes Ghrelin bei der kleinstmöglichen orexigenen Dosierung von 1nmol pro Versuchstier eine Fos-Expression neben dem NARC auch im PVN bei Ratten induziert. Dabei war 90 Minuten nach Injektion von 1nmol Ghrelin, die Anzahl der Fos-positiven Neurone im PVN auf das 2,4-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe gestiegen. Die Fos-Expression war hauptsächlich im medioparvozellulären Teil des PVN lokalisiert. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Unter den gleichen Bedingungen konnten in der Ghrelingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Fos-positiven Neurone im NTS und in der AP festgestellt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Widerspruch zu den oben genannten Untersuchungen. Bisher konnte eine Aktivierung des PVN nur nach zentraler, nicht jedoch nach peripherer Ghrelinapplikation beobachtet werden. Die Induktion von Fos könnte tatsächlich abhängig sein vom Applikationsweg des Ghrelins. Es könnte postuliert werden, dass peripher injiziertes Ghrelin den PVN nicht erreicht, um eine Fos-Expression zu induzieren. Gegen diese Annahme sprechen jedoch unterschiedliche Untersuchungen.

Intraperitoneal bzw. intravenös verabreichtes Ghrelin stimuliert die Nahrungsaufnahme bei Versuchstieren (Asakawa, A. *et al.* 2001; Wren, A. M. *et al.* 2001; Wang, L. *et al.* 2002) und bei Menschen (Wren, A. M. *et al.* 2001). Läsionen des PVN wiederum sind assoziiert mit Veränderungen der Nahrungsaufnahme (Aravich, P. F. and Scalfani, A. 1983). Als Reaktion auf Nahrungskarenz und vor Initiation der Nahrungsaufnahme wird bei Ratten das orexigene Peptid NPY aus PVN-Neuronen freigesetzt (Kalra, S. P. *et al.* 1991). NPY-positive Neurone des NARC (Broberger, C. *et al.* 1998) projizieren über dorsale und anteriore Fasern zum PVN (Bai, F. L. *et al.* 1985). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des PVN in der orexigenen Wirkung

4. Diskussion

von Ghrelin. Suboptimale Versuchsmethoden könnten die Detektion von Fos im PVN in bisherigen Untersuchungen verhindert haben.

4.4 Die Phänotypisierung der Fos-positiven Neurone im PVN

Wren *et al.* haben in ihren Untersuchungen gezeigt, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion von 2nmol Ghrelin bei Ratten Serumspiegel des Hypophysenhormons ACTH erhöhte (Wren, A. M. *et al.* 2000). Dabei stieg 20 Minuten nach der Injektion von Ghrelin der ACTH-Serumspiegel um 38,2ng/ml gegenüber 18,2ng/ml in der Kontrollgruppe, die mit Natriumchloridlösung behandelt wurde. In einer Studie von Asakawa *et al.* erhöhte intraperitoneal verabreichtes Ghrelin die Plasmaspiegel von Kortikosteroiden und induzierte CRH-mRNA im Hypothalamus bei Mäusen (Asakawa, A. *et al.* 2001). Nach intravenöser Injektion von Ghrelin bei Menschen wurden erhöhte Serumwerte für ACTH und für Cortisol beschrieben (Nagaya, N. *et al.* 2001). Von diesen Ergebnissen ausgehend wurde ein Zusammenhang zwischen CRH und der orexigenen Wirkung von Ghrelin vermutet. Dabei wurde angenommen, dass Ghrelin seine orexigene Wirkung über Neurone im PVN entfaltet, die das hypothalamische Hormon CRH enthalten.

Daher war ein weiteres Ziel dieser Studie, den Phänotypus der Fos-positiven Neurone im PVN zu bestimmen und dabei möglicherweise CRH in den aktivierten Hirnarealen nachzuweisen. Dazu wurden nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin bei Ratten Neurone des PVN doppelmarkiert gegen Fos und CRH. Das Ergebnis dieser immunhistologischen Doppelmarkierung war, dass Fos und CRH in denselben Neuronen des medioparvozellulären Teils des PVN exprimiert werden. Um festzustellen, ob die anatomisch dicht beieinander lokalisierten Immunreaktivitäten in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu finden sind, wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop verwendet. Dabei fand sich Fos-Immunreaktivität hauptsächlich im Zellkern während CRH im Zytoplasma lokalisiert war.

Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Annahme, dass Ghrelin und CRH in einem gemeinsamen Regelkreis wirken. Ob allerdings tatsächlich ein Zusammenhang zwischen Ghrelin und CRH besteht, oder ob beide Substanzen unterschiedliche und voneinander unabhängige Wirkungen ausüben, kann mit dieser Studie nicht verifiziert werden.

4.5 Die Bedeutung von CRH für die Regulierung der Nahrungsaufnahme

Eine enge morphologische Assoziation zwischen NPY-positiven Fasern und CRH-positiven Neuronen im mpPVN wurde in unterschiedlichen Untersuchungen beschrieben (Wahlestedt, C. *et al.* 1987; Liposits, Z. *et al.* 1988). Li *et al.* konnten schließlich demonstrieren, dass NPY-positiv gefärbte Fasern vom NARC zu CRH-positiven Neuronen im mpPVN projizieren (Li, C. *et al.* 2000).

Bezüglich der Nahrungsaufnahme wurden für die Neuropeptide CRH und NPY entgegengesetzte zentrale Wirkungen beobachtet. In einer Studie von Heinrichs *et al.* potenzierte die Injektion eines CRH-Antagonisten in den PVN eine NPY-induzierte Hyperphagie (Heinrichs, S. C. *et al.* 1993). Wang *et al.* haben beschrieben, dass die intrazerebroventrikuläre Administration eines CRH-Agonisten bei Ratten sowohl die NPY-induzierte Nahrungsaufnahme, als auch die Fos-Expression im PVN hemmt (Wang, C. *et al.* 2001). Jang und Romsos verglichen die Expression von CRH und NPY im Hypothalamus von ob/ob- und gesunden Mäusen. Gesunde Mäuse reagierten auf einen 24-stündigen Nahrungsentzug mit einer erhöhten NPY- und einer reduzierten CRH-Expression im NARC und PVN. Nach Nahrungsaufnahme sank die NPY-Expression und die Expression von CRH stieg an. Die Beeinflussung der zentralen NPY- und CRH-Expression durch den Nahrungszustand blieb bei den „Leptin-knockout“-Mäusen (ob/ob) aus (Jang, M. and Romsos, D. R. 1998). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der CRH-vermittelte Mechanismus im PVN die stimulatorische Wirkung von NPY auf die Nahrungsaufnahme blockiert.

Andere Untersuchungen zeigten, dass NPY-Injektionen in den PVN eine Erhöhung der Plasmaspiegel von ACTH und Kortikosteroiden hervorrufen (Wahlestedt, C. *et al.* 1987), was darauf hindeutet, dass NPY im PVN die neuronale Aktivität von CRH-Neuronen im PVN beeinflusst und eine CRH-Freisetzung bewirkt. Es wird vermutet, dass CRH im medioparvocellulären Bereich des PVN (mpPVN) Teil eines efferenten Systems ist, das die Wirkung von NPY auf die Nahrungsaufnahme vermittelt (Stanley, B. G. *et al.* 1992).

Die Ergebnisse dieser Studie über die Wirkung von peripherem Ghrelin auf CRH-Neurone im PVN stehen im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Interaktion von NPY und CRH in der NARC-PVN-Achse bei der Nahrungsaufnahme. Eine mögliche Überlegung wäre, dass die Wirkung Ghrelins auf CRH-Neurone im PVN die gegenregulatorischen Interaktionen zwischen dem NPY- und dem CRH-System bei der Nahrungsaufnahme widerspiegeln.

4.6 Die Bedeutung von NPY-positiven Fasern im Hypothalamus und im Hirnstamm

Es ist postuliert worden, dass im zentralnervösen Netzwerk, das in der Kontrolle von Sättigung und Energiehomöostase involviert ist, der PVN eine wichtige Rolle spielt (Horvath, T. L. *et al.* 2001). Informationen aus sowohl dem anorexigenen System mit hauptsächlich melanocortinassozierten Peptiden, als auch aus dem orexigenen System mit NPY und AgRP, scheinen im PVN zusammenzulaufen (Broberger, C. *et al.* 1998; Haskell-Luevano, C. *et al.* 1999). Broberger *et al.* untersuchten die Verteilung von NPY/AgRP-positiven Neuronen und deren Nervenendigungen. Während die Neuronen selbst ausschließlich im NARC lokalisiert waren, konnten deren Nervenendigungen in mehreren Hypothalamuskernen, einschließlich des PVN, nachgewiesen werden (Broberger, C. *et al.* 1998). Haskell-Luevano *et al.* zeigten, dass AgRP-positive und POMC-positive Neurone vom NARC zu Kernen des Hypothalamus projizieren (Haskell-Luevano, C. *et al.* 1999). Bereits in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass NPY-positive Neurone vom NARC zum medioparvozellulären Teil des PVN projizieren (Bai, F. L. *et al.* 1985), und dass peripher injiziertes Ghrelin die Fos-Expression in NPY-positiven Neuronen des NARC induziert (Wang, L. *et al.* 2002). Die Aktivierung von Hirnstammkernen und mehreren Hypothalamuskernen, einschließlich des PVN, durch die intrazerebroventrikuläre Injektion von Ghrelin, konnte durch die Verabreichung eines NPY-Antagonisten gehemmt werden (Lawrence, C. B. *et al.* 2002). Yokosuka *et al.* haben gezeigt, dass NPY zentral appliziert die Nahrungsaufnahme und die Fos-Expression im PVN und anderen Hypothalamuskernen bei Ratten stimuliert (Yokosuka, M. *et al.* 1999). In einer Studie von Bagnasco *et al.* wurde gezeigt, dass eine Injektion von Ghrelin in den NARC die Nahrungsaufnahme stimuliert, die mit einem NPY-Antagonisten gehemmt werden konnte (Bagnasco, M. *et al.* 2003).

Im Unterschied zu früheren Untersuchungen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass peripher appliziertes Ghrelin neben Neuronen im NARC (Wang, L. *et al.* 2002) auch Neuronen im PVN aktiviert. Zusätzlich wurde eine enge morphologische Assoziation zwischen NPY-positiven Fasern und ghrelininduzierter Fos-Expression im PVN beobachtet.

Daher scheint es sinnvoll, anzunehmen, dass peripheres Ghrelin eine Fos-Expression im PVN über NPY-positive Projektionen, die vom NARC ausgehen, induziert. Es sind weitere funktionell-morphologische Studien notwendig, um diese Hypothese über die Interaktion zwischen NPY-positiven Fasern und Fos-positiven Neuronen im PVN zu unterstützen (Abbildung 4.1).

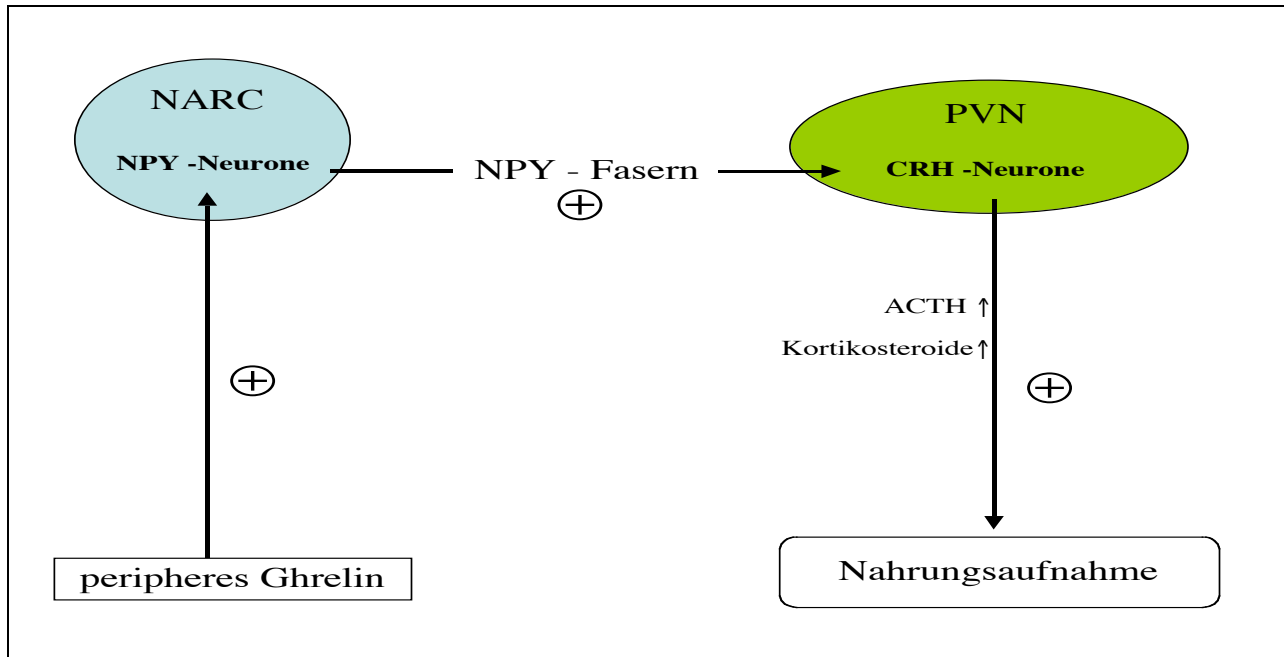


Abbildung 4.1: Hypothetische Wirkung von peripherem Ghrelin auf NPY-Neurone im NARC und CRH-Neurone im PVN

Peripheres Ghrelin aktiviert NPY-Neurone im NARC. Diese aktivieren über NPY-Fasern CRH-Neurone im PVN. CRH wird freigesetzt und stimuliert über eine Erhöhung der ACTH- und Kortikosteroidspiegel die Nahrungsaufnahme.

4.7 Mögliche direkte Aktivierung des PVN durch Ghrelin

Neben der Aktivierung der Neurone des PVN über Projektionen von anderen Hirnkernen, ist auch eine direkte Aktivierung des PVN durch peripher appliziertes Ghrelin möglich. Ghrelin könnte möglicherweise direkt GHS-Rezeptoren im PVN bzw. im NARC aktivieren. Sowohl im PVN als auch im NARC wird GHS-Rezeptor-mRNA exprimiert (Guan, X. M. *et al.* 1997). Beide Hypothalamuskern liegen innerhalb der Blut-Hirn-Schranke. Um den PVN auf direktem Wege aktivieren zu können, müsste Ghrelin die Blut-Hirn-Schranke überqueren können. Bis jetzt ist jedoch noch unklar, ob Ghrelin die Blut-Hirn-Schranke bei Ratten überqueren kann. Pharmakokinetische Studien in diesem Bereich wurden bisher nur mit Maus- oder Humanghrelin an Mäusen durchgeführt (Banks, W. A. *et al.* 2002). Banks *et al.* haben in ihren Untersuchungen festgestellt, dass menschliches Ghrelin bei Mäusen über einen aktiven Transportmechanismus

4. Diskussion

bidirektional die Blut-Hirn-Schranke überquert. Das Ghrelin der Maus hingegen, das sich durch zwei Aminosäuren vom Humanghrelin unterscheidet, wurde nur über die Hirn-Blut-Schranke aktiv transportiert. Der Transport des Mausghrelins aus dem Blut ins Gehirn jedoch erfolgte passiv durch Diffusion (Banks, W. A. *et al.* 2002).

Untersuchungen an Menschen (Korbonits, M. *et al.* 2001) und Ratten (Kamegai, J. *et al.* 2000) demonstrierten, dass Ghrelin-mRNA auch im Hypothalamus lokalisiert ist. Daher ist nicht auszuschließen, dass endogenes, im ZNS exprimiertes, Ghrelin die GHS-Rezeptoren aktiviert hat. In diesem Fall dürfte kein Unterschied in der Fos-Dichte im PVN nach Injektion von Ghrelin bzw. Natriumchlorid-Lösung zu erwarten sein. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit jedoch, war die Fos-Expression in der ghrelinbehandelten Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe. Eine Fos-Induktion ausschließlich durch zentral gebildetes Ghrelin ist daher unwahrscheinlich. Unter experimentellen Bedingungen scheint zentral gebildetes Ghrelin eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Sein Einfluss auf die Regulierung der Nahrungsaufnahme unter physiologischen Umständen dürfte weitaus bedeutender sein, was in den vorliegenden Experimenten nicht widerspiegelt wird.

4.8 Der Einfluss des Nervus vagus auf die Ghrelinwirkung

Peptide des Gastrointestinaltraktes könnten das Energiegleichgewicht, außer durch humorale Mechanismen, auch durch vagale Afferenzen beeinflussen (Schwartz, G. J. 2000). Tatsächlich ist bekannt, dass durch die Schädigung vagaler Afferenzen durch perivagale Capsaicinbehandlung und durch subdiaphragmatische oder gastrische Vagotomie in Ratten (Date, Y. *et al.* 2002) und Mäusen (Asakawa, A. *et al.* 2001) die Wirkung von peripher appliziertem Ghrelins auf die Nahrungsaufnahme und auf die Fos-Expression im NARC aufgehoben werden kann (Asakawa, A. *et al.* 2001). Auch in den vorliegenden Experimenten wurde die Ghrelinwirkung mit großer Wahrscheinlichkeit über den Nervus vagus vermittelt. Andere Studien unterstützen diese Annahme. Afferente Vagusfasern haben eine kontinuierliche niedrigfrequente Spontanaktivität, die über sensorische Einflüsse moduliert werden kann. Intravenös verabreichtes Ghrelin senkt diese Aktivität signifikant, im Gegensatz zu anorexigenen Peptiden wie CCK, Bombesin und Leptin, die die Aktivität deutlich erhöhen (Asakawa, A. *et al.* 2001; Date, Y. *et al.* 2002). Vermutlich übermittelt Ghrelin seine zentrale Wirkung über die Hemmung des Nervus vagus. Durch molekularbiologische Methoden konnte aus afferenten Vagusfasern Ghrelinrezeptor-

4. Diskussion

mRNA isoliert werden. Der Transport von Ghrelinrezeptoren innerhalb der afferenten vagalen Fasern konnte mit Hilfe von radioaktiv markiertem Ghrelin demonstriert werden (Date, Y. *et al.* 2002).

Versuche bei Ratten zeigten, dass nach einer Vagotomie der physiologische Anstieg des Ghrelinspiegels bei Nahrungskarenz gehemmt wird, die basalen Plasmaghrelinwerte und das Sinken des Ghrelinspiegels nach Nahrungsaufnahme jedoch unbeeinflusst bleiben (Williams, D. L. *et al.* 2003). Es besteht also eine Dissoziation zwischen der Regulierung der Ghrelinspiegel bei Nahrungskarenz und bei Nahrungsaufnahme. In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren während der Experimente die Nahrung entzogen. Daraus könnte man theoretisch ableiten, dass Fos im Hypothalamus sekundär zur Nahrungskarenz, vermittelt über den Nervus vagus, exprimiert wurde. Dagegen spricht allerdings die signifikant höhere Fos-Expression in den ghrelinbehandelten Versuchstieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Vermutlich spielt die Vagusaktivität unter metabolisch neutralen Bedingungen nur eine untergeordnete Rolle. Diese Dissoziation zwischen nahrungsaufnahme- und nahrungskarenzassoziiertem Ghrelinspiegel deutet darauf hin, dass in der Regulierung des zirkulierenden Ghrelins Mechanismen beteiligt sind, die getrennt über unterschiedliche anatomische Strukturen ihre Wirkung entfalten.

Afferente Vagusfasern, die viserosensorische Informationen aus dem Gastrointestinaltrakt ins ZNS leiten, terminieren im NTS (Cechetto, D. F. 1987) Es schien daher sinnvoll anzunehmen, dass peripheres Ghrelin eine Fos-Expression im NTS induziert. Wie schon zuvor im Mausmodell gezeigt (Wang, L. *et al.* 2002), wurde auch in dieser Studie keine erhöhte Dichte von Fos-positiven Neuronen im NTS oder in der AP beobachtet. Damit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Das könnte dadurch erklärt werden, dass Ghrelin die Aktivität gastrischer afferenter Vagusfasern senkt (Asakawa, A. *et al.* 2001). Ghrelin scheint einen eher inhibitorischen und weniger einen aktivierenden Effekt auf die afferente vagale Neurotransmission zu haben, der nicht mit einer erhöhten Fos-Expression in Hirnstammneuronen assoziiert sein könnte.

In NPY- und GHRH-positiven Neuronen des NARC jedoch ist der Nervus vagus assoziiert mit einer erhöhten Fos-Expression. Intravenös injiziertes Ghrelin senkt die Aktivität afferenter Vagusfasern und induziert gleichzeitig Fos im NARC bei Ratten. Eine Vagotomie inhibiert diesen Effekt (Date, Y. *et al.* 2002). In beiden Fällen senkt Ghrelin die Aktivität des Vagus, hat aber entgegengesetzte Wirkungen im Hirnstamm und im Hypothalamus. Die Aktivierung des Hypothalamus wird vermutlich mittelbar über andere zusätzliche Mechanismen reguliert.

4.9 Mögliche Fos-Expression durch unspezifische Stimuli

Eine Erhöhung der neuronalen Aktivität im PVN nach peripherer Ghrelinverabreichung passt gut zum Konzept der Sättigungsregulation durch die NARC-PVN-Achse. Es gibt jedoch andere mögliche Gründe für eine erhöhte Fos-Expression in diesem Hirnkern. Verhaltensstudien an Ratten zeigten, dass bei der Induktion eines angstähnlichen Zustands Ghrelin mitbeteiligt ist (Carlini, V. P. *et al.* 2002). Der PVN ist involviert in einem neuronalen Netzwerk, das die autonomen, neuroendokrinen und skelettmotorischen Antworten auf Angst vermittelt (Charney, D. S. and Deutch, A. 1996). Daher könnte eine erhöhte Fos-Expression im PVN nach peripherer Ghrelinverabreichung auch Marker eines Ghrelintransportes ins Gehirn und einer Aktivierung des Hippocampus-Amygdala-Hypothalamus-Netzwerkes sein, das vielmehr in der Regulation von Unruhe und Angst involviert ist, als in der Sättigungsregulation entlang der NARC-PVN-Achse. Tatsächlich konnte in vielen Rattenmodellen gezeigt werden, dass Angst mit einer erhöhten Fos-Expression im PVN assoziiert ist (Duncan, G. E. *et al.* 1996). Im Unterschied zu dieser Studie wurde in den Angstmodellen eine erhöhte Fos-Expression auch in anderen Hirnarealen beobachtet, wie beispielsweise in den Amygdala, im Cingulum, im Nucleus accumbens, im Tectum taenium, im orbitalen und präfrontalen Kortex (Duncan, G. E. *et al.* 1996). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass eine isolierte Fos-Expression im PVN Teil einer diffusen Aktivierung durch Angst ist. Des Weiteren wurden während dieser Experimente keine Verhaltensveränderungen der Versuchstiere festgestellt, die auf Angst oder Unruhe deuten könnten.

Eine andere mögliche Erklärung für eine erhöhte Fos-Expression im PVN könnte hungerbedingter Stress sein. In der vorliegenden Studie wurde den Versuchstieren nach Verabreichung des Ghrelins das Futter entzogen. Es ist möglich, dass ein ghrelininduziertes Hungergefühl assoziiert mit Nahrungskarenz Stress auslöst, und dieser wiederum eine Fos-Expression im PVN induziert.

Diese Annahme könnte man widerlegen, indem man unter sonst gleichen Versuchsbedingungen den Tieren nach der Ghrelinapplikation freien Zugang zu Nahrung gewährleistet. Würde unter solchen Bedingungen eine Fos-Expression im PVN beobachtet werden, könnte eine hungerbedingte Fos-Expression ausgeschlossen werden. Allerdings könnte man in diesem Fall nicht mehr unterscheiden, ob die Fos-Expression induziert wurde direkt durch Ghrelin oder sekundär über die Nahrungsaufnahme und die damit assoziierte Freisetzung von CCK.

4.10 Einfluss der Versuchsmethoden auf die Ergebnisse

Die Aktivierung von Neuronen des PVN durch eine intraperitoneale Verabreichung von Ghrelin steht im Widerspruch zu früheren Studien, in der nach intravenöser Ghrelininjektion bei Ratten im NARC als einzige hypothalamische Struktur eine Fos-Expression nachzuweisen war (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000; Date, Y. *et al.* 2002). Dieser Unterschied könnte durchaus mit den unterschiedlichen Applikationsformen des Ghrelins, intraperitoneal (in der vorliegenden Arbeit) versus intravenös (Hewson, A. K. and Dickson, S. L. 2000; Date, Y. *et al.* 2002) zusammenhängen.

Nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin in anderen Untersuchungen (Traebert, M. *et al.* 2002; Wang, L. *et al.* 2002) wurden ähnliche Ergebnisse beobachtet. Auch in diesen Studien wurde Fos nur im NARC beobachtet. Daher scheinen auch andere Versuchsmethoden, außer der Applikationsform des Ghrelins, die differierenden Ergebnisse zu beeinflussen.

In allen bisherigen Studien wurden zur immunhistologischen Analyse konventionelle Lichtmikroskope verwendet. Die histologische Auswertung der Gewebeschnitte in der vorliegenden Arbeit erfolgte mit einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (cLSM). Das cLSM erfasst auch schwächere Signale, die dem konventionellen Lichtmikroskop möglicherweise entgehen würden. Daher ermöglicht das c-LSM eine genauere quantitative Auswertung der Fos-positiven Neurone.

Ein anderer großer Vorteil des cLSM ist die Möglichkeit der Doppelmarkierung. Mit Lichtmikroskopen ist die Auswertung von Doppelfärbungen limitiert. Stärkere Vergrößerungen gehen einher mit starken Hintergrundsignalen und erschweren die histologische Untersuchung der Gewebeschnitte. Das cLSM hingegen erzeugt auch bei stärkeren Vergrößerungen nur ein schwaches Hintergrundsignal und erlaubt eine zuverlässigere Analyse (Kobelt, P. *et al.* 2004). In dieser Studie konnten durch die Kombination von Fluoreszenzimmunhistochemie und cLSM Signale nachgewiesen werden, die mit einem konventionellen Lichtmikroskop mit großer Wahrscheinlichkeit nicht hätten nachgewiesen werden können.

4.11 Fazit

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass intraperitoneal verabreichtes Ghrelin, in einer orexigenen Dosis, die Fos-Expression im medioparvozellulären PVN stimuliert. Bei einem Grossteil derselben Neurone wurde im Zellplasma CRH-ir beobachtet, während das Fos im Zellkern lokalisiert war. Des Weiteren waren in den entsprechenden Gehirnarealen die Fasern positiv für NPY.

In den verhaltensbiologischen Versuchen dieser Studie erhöhte die intraperitoneale Applikation von Ghrelin die kumulative Nahrungsaufnahme. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen einer Dosierung von 1nmol bzw. 10nmol nachgewiesen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen, wurden die immunhistochemischen Versuche durchgeführt mit 1nmol Ghrelin pro Versuchstier, um die Ghrelinkonzentrationen möglichst physiologisch zu halten.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen eine mögliche Beteiligung des PVN an der Regulierung der Nahrungsaufnahme vermuten, dessen Wirkungen möglicherweise durch NPY vermittelt werden. CRH könnte dabei als Gegenspieler des Ghrelins in der Energiehomöostase mitwirken.

5. Zusammenfassung

Einleitung

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass der PVN an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt ist. Unterschiedliche Neurotransmitter, die die Nahrungsaufnahme regulieren, beeinflussen die neuronale Aktivität dieses Hirnkerns. Das Neuropeptid Ghrelin stimuliert nach zentraler Applikation die Kurzzeitaufnahme bei Nagetieren und aktiviert Neurone des PVN und NPY-positive Neurone des NARC. Injektionen des Peptids NPY in den PVN wiederum beeinflussen die Plasmaspiegel von ACTH und Kortikosteroiden. Andere Studien zeigten die morphologische Assoziation zwischen NPY-positiven Fasern und CRH-positiven Neuronen im mpPVN. Vermutlich wird im PVN durch Interaktion von Neurotransmittern/-modulatoren die Freisetzung von NPY aktiviert bzw. gehemmt und dadurch die Nahrungsaufnahme reguliert. An dieser Regulation ist möglicherweise auch CRH beteiligt. Während die Aktivierung von Neuronen des PVN nach intrazerebroventrikulärer Injektion von Ghrelin demonstriert werden konnte, blieb sie in bisherigen Untersuchungen nach peripherer Applikation aus. In der vorliegenden Studie wurden die Effekte von intraperitoneal injiziertem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme und die neuronale Aktivierung im Hypothalamus und im Hirnstamm bei Ratten untersucht. Ferner wurden die entsprechenden Neurone und Fasern phänotypisiert.

Methoden

Zur Untersuchung des Einflusses von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme erhielten männliche Sprague-Dawley Ratten 1 oder 10nmol Ghrelin oder isotone Natriumchloridlösung intraperitoneal injiziert. Die kumulative Nahrungsaufnahme wurde über vier Stunden gemessen. Um eine neuronale Aktivierung im Hypothalamus und im Hirnstamm durch Ghrelin zu überprüfen, wurden die Gehirne männlicher Sprague-Dawley Ratten nach peripherer Ghrelinverabreichung immunhistologisch aufgearbeitet. Dabei wurde 1nmol Ghrelin intraperitoneal injiziert, die Injektion von 1ml Natriumchlorid-Lösung diente als Kontrolle. Nach einer transkardialen Perfusionsfixierung und der Unterteilung der Gehirne in koronare Gewebeschnitte, erfolgte die immunhistologische Markierung des Gewebes. Dabei diente Fos als

5. Zusammenfassung

Marker für neuronale Aktivität im PVN, NTS und NARC. Die Bestimmung des neuropeptidergen Phänotyps der aktivierten Neurone erfolgte mittels einer Doppelmarkierung gegen CRH. Mit einer weiteren Doppelmarkierung gegen NPY wurde der neuropeptiderge Phänotypus der Nervenfasern in den aktivierten Gehirnarealen bestimmt.

Ergebnisse

Nach ip. Injektion von Ghrelin wurde im Vergleich zur Kontrolle mit Natriumchlorid-Lösung eine signifikant erhöhte kumulative Nahrungsaufnahme beobachtet. Der Vergleich der beiden Versuchsgruppen, die mit 1 bzw. 10nmol Ghrelin/Ratte behandelt wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied in der kumulativen Nahrungsaufnahme.

Die Auswertung der neuronalen Aktivität im Hypothalamus und im Hirnstamm ergab eine erhöhte Fos-Dichte im PVN und NARC und geringfügig auch in der AP nach ip. Injektion von 1nmol Ghrelin im Vergleich zu isotoner Natriumchlorid-Lösung. Die Fos-Expression im NTS blieb unbeeinflusst durch Ghrelin.

Die Doppelmarkierungen zur Bestimmung des neuropeptidergen Phänotypus der Neurone und Axone im PVN demonstrierten im Grossteil der Fos-positiven Neurone eine CRH-Expression in deren Zytoplasma und eine NPY-Expression in den umgebenden Nervenfasern.

Diskussion

Im Gegensatz zu bisherigen Studien, wurde in dieser Arbeit die Aktivierung des PVN nach peripherer Injektion von Ghrelin demonstriert. Da in früheren Studien das Ghrelin intravenös, in der vorliegenden Arbeit jedoch intraperitoneal verabreicht wurde, kann eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die unterschiedlichen Applikationswege nicht ausgeschlossen werden. Zum Nachweis der neuronalen Aktivität wurde der Marker Fos genutzt. Da Fos ein unspezifischer Marker ist, kommen andere Faktoren als Ghrelin, wie z.B. Nahrungsaufnahme oder Stress, für seine Induktion in Frage. Um eine sekundäre Fos-Bildung durch Nahrungsaufnahme zu verhindern, wurde den Versuchstieren während der Experimente die Nahrung entzogen. Ob die Versuchstiere starkem Stress ausgesetzt waren, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Somit könnte Angst oder durch Hunger ausgelöster Stress bei den Versuchstieren Fos induziert haben.

5. Zusammenfassung

Was jedoch dagegen spricht ist die signifikant höhere Fos-Expression im PVN der ghrelinbehandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle mit Natriumchloridlösung. Der Nachweis von CRH und NPY in aktivierten Arealen des PVN lässt ein Zusammenspiel dieser Peptide mit Ghrelin vermuten. Dabei aktiviert Ghrelin möglicherweise Neurone des PVN indirekt über NPY-positive Projektionen zwischen dem NARC und dem PVN. Ferner wird angenommen, dass Ghrelin die Nahrungsaufnahme durch die Beeinflussung des CRH-Spiegels stimuliert. Um diese Hypothese zu bekräftigen, müssten weitere histochemische Untersuchungen und Tracingstudien durchgeführt werden. Die Bedeutung vagaler Afferenzen bezüglich der Wirkung von peripherem Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

6. Literatur

6.1. Referenzliste

- 1 Andrews, P. L. (1986). "Vagal afferent innervation of the gastrointestinal tract." Prog Brain Res **67**: 65-86.
- 2 Andrews, P. L., G. J. Sanger (2002). "Abdominal vagal afferent neurones: an important target for the treatment of gastrointestinal dysfunction." Curr Opin Pharmacol **2**(6): 650-6.
- 3 Aravich, P. F., A. Scalfani (1983). "Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes." Behav Neurosci **97**(6): 970-83.
- 4 Arvat, E., L. Di Vito, F. Broglio, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F. F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo (2000). "Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans." J Endocrinol Invest **23**(8): 493-5.
- 5 Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, M. Fujimiya, G. Katsuura, S. Makino, M. A. Fujino, M. Kasuga (2001). "A role of ghrelin in neuroendocrine and behavioral responses to stress in mice." Neuroendocrinology **74**(3): 143-7.
- 6 Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Niiijima, M. A. Fujino, M. Kasuga (2001). "Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin." Gastroenterology **120**(2): 337-45.
- 7 Bagnasco, M., G. Tulipano, M. R. Melis, A. Argiolas, D. Cocchi, E. E. Muller (2003). "Endogenous ghrelin is an orexigenic peptide acting in the arcuate nucleus in response to fasting." Regul Pept **111**(1-3): 161-7.
- 8 Bai, F. L., M. Yamano, Y. Shiotani, P. C. Emson, A. D. Smith, J. F. Powell, M. Tohyama (1985). "An arcuate-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat." Brain Res **331**(1): 172-5.
- 9 Banks, W. A., M. Tschop, S. M. Robinson, M. L. Heiman (2002). "Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure." J Pharmacol Exp Ther **302**(2): 822-7.
- 10 Barkan, A. L., E. V. Dimaraki, S. K. Jessup, K. V. Symons, M. Ermolenko, C. A. Jaffe (2003). "Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2180-4.
- 11 Bataille, D., K. Tatemoto, A. M. Coudray, G. Rosselin, V. Mutt (1981). "[Bioactive "enteroglucagon" (oxyntomodulin): evidence for a C-terminal extension of the glucagon molecule]." C R Seances Acad Sci III **293**(6): 323-8.
- 12 Batterham, R. L., M. A. Cowley, C. J. Small, H. Herzog, M. A. Cohen, C. L. Dakin, A. M. Wren, A. E. Brynes, M. J. Low, M. A. Ghatei, R. D. Cone, S. R. Bloom (2002). "Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake." Nature **418**(6898): 650-4.
- 13 Bedendi, I., G. Alloatti, A. Marcantoni, D. Malan, F. Catapano, C. Ghe, R. Deghenghi, E. Ghigo, G. Muccioli (2003). "Cardiac effects of ghrelin and its endogenous derivatives des-octanoyl ghrelin and des-Gln14-ghrelin." Eur J Pharmacol **476**(1-2): 87-95.
- 14 Bercu, B. B., S. W. Yang, R. Masuda, R. F. Walker (1992). "Role of selected endogenous peptides in growth hormone-releasing hexapeptide activity: analysis of growth hormone-releasing hormone, thyroid hormone-releasing hormone, and gonadotropin-releasing hormone." Endocrinology **130**(5): 2579-86.

6. Literatur

- 15 Borison, H. L. (1989). "Area postrema: chemoreceptor circumventricular organ of the medulla oblongata." Prog Neurobiol **32**(5): 351-90.
- 16 Bowers (1977). "Effect of the enkephalins and enkephalin analogues on release of pituitary hormones in vitro." Mol. Endocrinol.: 287-292.
- 17 Bowers, C. Y., F. Momany, G. A. Reynolds, D. Chang, A. Hong, K. Chang (1980). "Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro." Endocrinology **106**(3): 663-7.
- 18 Brazeau, P., W. Vale, J. Rivier, R. Guillemin (1974). "Biological potency of synthetic somatostatin in the oxidized and reduced form on the inhibition of secretion of growth hormone." Life Sci **15**(2): 351-7.
- 19 Broadwell, R. D., M. W. Brightman (1976). "Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood." J Comp Neurol **166**(3): 257-83.
- 20 Broberger, C., J. Johansen, H. Brismar, C. Johansson, M. Schalling, T. Hokfelt (1999). "Changes in neuropeptide Y receptors and pro-opiomelanocortin in the anorexia (anx/anx) mouse hypothalamus." J Neurosci **19**(16): 7130-9.
- 21 Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling, T. Hokfelt (1998). "The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 15043-8.
- 22 Broberger, C., J. Johansen, M. Schalling, T. Hokfelt (1997). "Hypothalamic neurohistochemistry of the murine anorexia (anx/anx) mutation: altered processing of neuropeptide Y in the arcuate nucleus." J Comp Neurol **387**(1): 124-35.
- 23 Broglio, F., A. Benso, C. Castiglioni, C. Gottero, F. Prodam, S. Destefanis, C. Gauna, A. J. van der Lely, R. Deghenghi, M. Bo, E. Arvat, E. Ghigo (2003). "The endocrine response to ghrelin as a function of gender in humans in young and elderly subjects." J Clin Endocrinol Metab **88**(4): 1537-42.
- 24 Broglio, F., L. Gianotti, S. Destefanis, S. Fassino, G. Abbate Daga, V. Mondelli, F. Lanfranco, C. Gottero, C. Gauna, L. Hofland, A. J. Van der Lely, E. Ghigo (2004). "The endocrine response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin hypersecretory state." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(5): 592-9.
- 25 Callahan, H. S., D. E. Cummings, M. S. Pepe, P. A. Breen, C. C. Matthys, D. S. Weigle (2004). "Postprandial suppression of plasma ghrelin level is proportional to ingested caloric load but does not predict intermeal interval in humans." J Clin Endocrinol Metab **89**(3): 1319-24.
- 26 Carlini, V. P., M. E. Monzon, M. M. Varas, A. B. Cagnolini, H. B. Schioth, T. N. Scimonelli, S. R. de Barioglio (2002). "Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats." Biochem Biophys Res Commun **299**(5): 739-43.
- 27 Cechetto, D. F. (1987). "Central representation of visceral function." Fed Proc **46**(1): 17-23.
- 28 Charney, D. S., A. Deutch (1996). "A functional neuroanatomy of anxiety and fear: implications for the pathophysiology and treatment of anxiety disorders." Crit Rev Neurobiol **10**(3-4): 419-46.
- 29 Chen, C. H., R. C. Rogers (1995). "Central inhibitory action of peptide YY on gastric motility in rats." Am J Physiol **269**(4 Pt 2): R787-92.
- 30 Cheng, S. B., G. Q. Lu (1996). "[Progress in the study of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve]." Sheng Li Ke Xue Jin Zhan **27**(1): 13-8.
- 31 Cheung, C. C., D. K. Clifton, R. A. Steiner (1997). "Pro-opiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus." Endocrinology **138**(10): 4489-92.

6. Literatur

- 32Codd, E. E., A. Y. Shu, R. F. Walker (1989). "Binding of a growth hormone releasing hexapeptide to specific hypothalamic and pituitary binding sites." Neuropharmacology **28**(10): 1139-44.
- 33Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman, A. Kriauciunas, T. W. Stephens, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, C. C. Marco, L. J. McKee, T. L. Bauer, et al. (1996). "Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans." N Engl J Med **334**(5): 292-5.
- 34Corbetta, S., M. Peracchi, V. Cappiello, A. Lania, E. Lauri, L. Vago, P. Beck-Peccoz, A. Spada (2003). "Circulating ghrelin levels in patients with pancreatic and gastrointestinal neuroendocrine tumors: identification of one pancreatic ghrelinoma." J Clin Endocrinol Metab **88**(7): 3117-20.
- 35Coulie, B. J., L. J. Miller (2001). "Identification of motilin-related peptide." Gastroenterology **120**(2): 588-9.
- 36Cummings, D. E., J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse, D. S. Weigle (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." Diabetes **50**(8): 1714-9.
- 37Cummings, D. E., D. S. Weigle, R. S. Frayo, P. A. Breen, M. K. Ma, E. P. Dellinger, J. Q. Purnell (2002). "Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery." N Engl J Med **346**(21): 1623-30.
- 38Dall, R., J. Kanaley, T. K. Hansen, N. Moller, J. S. Christiansen, H. Hosoda, K. Kangawa, J. O. Jorgensen (2002). "Plasma ghrelin levels during exercise in healthy subjects and in growth hormone-deficient patients." Eur J Endocrinol **147**(1): 65-70.
- 39Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "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**(11): 4255-61.
- 40Date, Y., N. Murakami, M. Kojima, T. Kuroiwa, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats." Biochem Biophys Res Commun **275**(2): 477-80.
- 41Date, Y., N. Murakami, K. Toshinai, S. Matsukura, A. Nijima, H. Matsuo, K. Kangawa, M. Nakazato (2002). "The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats." Gastroenterology **123**(4): 1120-8.
- 42Date, Y., M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion." Biochem Biophys Res Commun **280**(3): 904-7.
- 43Day, R., W. Dong, R. Panetta, J. Kraicer, M. T. Greenwood, Y. C. Patel (1995). "Expression of mRNA for somatostatin receptor (sstr) types 2 and 5 in individual rat pituitary cells. A double labeling in situ hybridization analysis." Endocrinology **136**(11): 5232-5.
- 44Dragunow, M., R. Faull (1989). "The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing." J Neurosci Methods **29**(3): 261-5.
- 45Dube, D., J. C. Lissitzky, R. Leclerc, G. Pelletier (1978). "Localization of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rat brain and pituitary." Endocrinology **102**(4): 1283-91.
- 46Dube, M. G., S. P. Kalra, P. S. Kalra (1999). "Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action." Brain Res **842**(2): 473-7.
- 47Duncan, G. E., D. J. Knapp, G. R. Breese (1996). "Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety." Brain Res **713**(1-2): 79-91.

- 48Eden Engstrom, B., P. Burman, C. Holdstock, F. A. Karlsson (2003). "Effects of growth hormone (GH) on ghrelin, leptin, and adiponectin in GH-deficient patients." J Clin Endocrinol Metab **88**(11): 5193-8.
- 49Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper, J. K. Elmquist (1998). "Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord." Neuron **21**(6): 1375-85.
- 50Elmquist, J. K., R. S. Ahima, C. F. Elias, J. S. Flier, C. B. Saper (1998). "Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(2): 741-6.
- 51Erspamer, V., G. Improta, P. Melchiorri, N. Sopranzi (1974). "Evidence of cholecystokinin release by bombesin in the dog." Br J Pharmacol **52**(2): 227-32.
- 52Ferguson, A. V., P. Marcus, J. Spencer, J. L. Wallace (1988). "Paraventricular nucleus stimulation causes gastroduodenal mucosal necrosis in the rat." Am J Physiol **255**(5 Pt 2): R861-5.
- 53Frohman, L. A., M. Szabo, M. Berelowitz, M. E. Stachura (1980). "Partial purification and characterization of a peptide with growth hormone-releasing activity from extrapituitary tumors in patients with acromegaly." J Clin Invest **65**(1): 43-54.
- 54Ganong, W. F. (2000). "Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(5-6): 422-7.
- 55Gokcel, A., Y. Gumurdulu, F. Kayaselcuk, E. Serin, B. Ozer, A. K. Ozsahin, N. Guvener (2003). "Helicobacter pylori has no effect on plasma ghrelin levels." Eur J Endocrinol **148**(4): 423-6.
- 56Guan, X. M., H. Yu, O. C. Palyha, K. K. McKee, S. D. Feighner, D. J. Sirinathsinghji, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg, A. D. Howard (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." Brain Res Mol Brain Res **48**(1): 23-9.
- 57Hansen, T. K., M. Ankersen, B. S. Hansen, K. Raun, K. K. Nielsen, J. Lau, B. Peschke, B. F. Lundt, H. Thogersen, N. L. Johansen, K. Madsen, P. H. Andersen (1998). "Novel orally active growth hormone secretagogues." J Med Chem **41**(19): 3705-14.
- 58Hansen, T. K., R. Dall, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, J. S. Christiansen, J. O. Jorgensen (2002). "Weight loss increases circulating levels of ghrelin in human obesity." Clin Endocrinol (Oxf) **56**(2): 203-6.
- 59Haskell-Luevano, C., P. Chen, C. Li, K. Chang, M. S. Smith, J. L. Cameron, R. D. Cone (1999). "Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat." Endocrinology **140**(3): 1408-15.
- 60Hattori, N., T. Saito, T. Yagyu, B. H. Jiang, K. Kitagawa, C. Inagaki (2001). "GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils." J Clin Endocrinol Metab **86**(9): 4284-91.
- 61Hauner, H., E. F. Pfeiffer (1988). "[Relation between body fat distribution, insulin levels and glucose tolerance in obese females]." Klin Wochenschr **66**(5): 216-22.
- 62Hay, M., V. S. Bishop (1991). "Effects of area postrema stimulation on neurons of the nucleus of the solitary tract." Am J Physiol **260**(4 Pt 2): H1359-64.
- 63Hay, M., V. S. Bishop (1991). "Interactions of area postrema and solitary tract in the nucleus tractus solitarius." Am J Physiol **260**(5 Pt 2): H1466-73.
- 64Heinrichs, S. C., F. Menzaghi, E. M. Pich, R. L. Hauger, G. F. Koob (1993). "Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuro peptide Y." Brain Res **611**(1): 18-24.

6. Literatur

- 65Hewson, A. K., S. L. Dickson (2000). "Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats." J Neuroendocrinol **12**(11): 1047-9.
- 66Hoffman, G. E., M. S. Smith, J. G. Verbalis (1993). "c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems." Front Neuroendocrinol **14**(3): 173-213.
- 67Holst, J. J., O. G. Madsen, J. Knop, A. Schmidt (1977). "The effect of intraportal and peripheral infusions of glucagon on insulin and glucose concentrations and glucose tolerance in normal man." Diabetologia **13**(5): 487-90.
- 68Holstege, G. (1987). "Some anatomical observations on the projections from the hypothalamus to brainstem and spinal cord: an HRP and autoradiographic tracing study in the cat." J Comp Neurol **260**(1): 98-126.
- 69Hopkins, D. A., P. M. Gootman, N. Gootman, S. M. Di Russo, M. E. Zeballos (1984). "Brainstem cells of origin of the cervical vagus and cardiopulmonary nerves in the neonatal pig (*Sus scrofa*)." Brain Res **306**(1-2): 63-72.
- 70Horvath, T. L., S. Diano, P. Sotonyi, M. Heiman, M. Tschop (2001). "Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance--a hypothalamic perspective." Endocrinology **142**(10): 4163-9.
- 71Hosoda, H., M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa (2000). "Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor." J Biol Chem **275**(29): 21995-2000.
- 72Howard, A. D., S. D. Feighner, D. F. Cully, J. P. Arena, P. A. Liberato, C. I. Rosenblum, M. Hamelin, D. L. Hreniuk, O. C. Palyha, J. Anderson, P. S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K. K. Liu, K. K. McKee, S. S. Pong, L. Y. Chaung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D. J. Sirinathsinghji, D. C. Dean, D. G. Melillo, A. A. Patchett, R. Nargund, P. R. Griffin, J. A. DeMartino, S. K. Gupta, J. M. Schaeffer, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg (1996). "A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release." Science **273**(5277): 974-7.
- 73Hyde, T. M., R. R. Miselis (1983). "Effects of area postrema/caudal medial nucleus of solitary tract lesions on food intake and body weight." Am J Physiol **244**(4): R577-87.
- 74Iglesias, M. J., R. Pineiro, M. Blanco, R. Gallego, C. Dieguez, O. Gualillo, J. R. Gonzalez-Juanatey, F. Lago (2004). "Growth hormone releasing peptide (ghrelin) is synthesized and secreted by cardiomyocytes." Cardiovasc Res **62**(3): 481-8.
- 75Ikezaki, A., H. Hosoda, K. Ito, S. Iwama, N. Miura, H. Matsuoka, C. Kondo, M. Kojima, K. Kangawa, S. Sugihara (2002). "Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents." Diabetes **51**(12): 3408-11.
- 76Jang, M., D. R. Romsos (1998). "Neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone concentrations within specific hypothalamic regions of lean but not ob/ob mice respond to food-deprivation and refeeding." J Nutr **128**(12): 2520-5.
- 77Janssen, J. A., F. M. van der Toorn, L. J. Hofland, P. van Koetsveld, F. Broglio, E. Ghigo, S. W. Lamberts, A. Jan van der Lely (2001). "Systemic ghrelin levels in subjects with growth hormone deficiency are not modified by one year of growth hormone replacement therapy." Eur J Endocrinol **145**(6): 711-6.
- 78Kalra, S. P., M. G. Dube, S. Pu, B. Xu, T. L. Horvath, P. S. Kalra (1999). "Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight." Endocr Rev **20**(1): 68-100.

6. Literatur

- 79Kalra, S. P., M. G. Dube, A. Sahu, C. P. Phelps, P. S. Kalra (1991). "Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10931-5.
- 80Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, I. Wakabayashi (2000). "Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression." Endocrinology **141**(12): 4797-800.
- 81Kamegai, J., H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, I. Wakabayashi (2001). "Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats." Diabetes **50**(11): 2438-43.
- 82Kim, M. S., M. Rossi, S. Abusnana, D. Sunter, D. G. Morgan, C. J. Small, C. M. Edwards, M. M. Heath, S. A. Stanley, L. J. Seal, J. R. Bhatti, D. M. Smith, M. A. Ghatei, S. R. Bloom (2000). "Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone." Diabetes **49**(2): 177-82.
- 83Kirchgessner, A. L., M. D. Gershon (1989). "Identification of vagal efferent fibers and putative target neurons in the enteric nervous system of the rat." J Comp Neurol **285**(1): 38-53.
- 84Kobelt, P., J. J. Tebbe, I. Tjandra, H. G. Bae, J. Ruter, B. F. Klapp, B. Wiedenmann, H. Monnikes (2004). "Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain." Brain Res Brain Res Protoc **13**(1): 45-52.
- 85Kohno, D., H. Z. Gao, S. Muroya, S. Kikuyama, T. Yada (2003). "Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin." Diabetes **52**(4): 948-56.
- 86Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." Nature **402**(6762): 656-60.
- 87Konturek, S. J., J. W. Konturek, T. Pawlik, T. Brzozowski (2004). "Brain-gut axis and its role in the control of food intake." J Physiol Pharmacol **55**(1 Pt 2): 137-54.
- 88Korbonits, M., S. A. Bustin, M. Kojima, S. Jordan, E. F. Adams, D. G. Lowe, K. Kangawa, A. B. Grossman (2001). "The expression of the growth hormone secretagogue receptor ligand ghrelin in normal and abnormal human pituitary and other neuroendocrine tumors." J Clin Endocrinol Metab **86**(2): 881-7.
- 89Korbonits, M., A. B. Grossman (1996). "[Growth hormone-releasing peptides (GHRP) and their analogues]." Orv Hetil **137**(45): 2503-9.
- 90Kovacs, K. J. (1998). "c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map." Neurochem Int **33**(4): 287-97.
- 91Krahn, D. D., B. A. Gosnell, A. S. Levine, J. E. Morley (1988). "Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects." Brain Res **443**(1-2): 63-9.
- 92Krulich, L., A. P. Dhariwal, S. M. McCann (1968). "Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro." Endocrinology **83**(4): 783-90.
- 93Ladenheim, E. E., R. C. Ritter (1993). "Caudal hindbrain participation in the suppression of feeding by central and peripheral bombesin." Am J Physiol **264**(6 Pt 2): R1229-34.
- 94Lanteri-Minet, M., P. Isnardon, J. de Pommery, D. Menetrey (1993). "Spinal and hindbrain structures involved in visceroreception and visceronociception as revealed by the expression of Fos, Jun and Krox-24 proteins." Neuroscience **55**(3): 737-53.
- 95Lawrence, C. B., A. C. Snape, F. M. Baudoin, S. M. Luckman (2002). "Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers." Endocrinology **143**(1): 155-62.

6. Literatur

- 96Lee, W. N., S. Bassilian, S. Lim, L. G. Boros (2000). "Loss of regulation of lipogenesis in the Zucker diabetic (ZDF) rat." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(2): E425-32.
- 97Lee, Y., M. Y. Wang, T. Kakuma, Z. W. Wang, E. Babcock, K. McCorkle, M. Higa, Y. T. Zhou, R. H. Unger (2001). "Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia." J Biol Chem **276**(8): 5629-35.
- 98Leroy, P., S. Dessolin, P. Villageois, B. C. Moon, J. M. Friedman, G. Ailhaud, C. Dani (1996). "Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin." J Biol Chem **271**(5): 2365-8.
- 99Li, B. H., B. Xu, N. E. Rowland, S. P. Kalra (1994). "c-fos expression in the rat brain following central administration of neuropeptide Y and effects of food consumption." Brain Res **665**(2): 277-84.
- 100Li, C., P. Chen, M. S. Smith (2000). "Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study." Brain Res **854**(1-2): 122-9.
- 101Liposits, Z., L. Sievers, W. K. Paull (1988). "Neuropeptide-Y and ACTH-immunoreactive innervation of corticotropin releasing factor (CRF)-synthesizing neurons in the hypothalamus of the rat. An immunocytochemical analysis at the light and electron microscopic levels." Histochemistry **88**(3-6): 227-34.
- 102Masuda, Y., T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa (2000). "Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats." Biochem Biophys Res Commun **276**(3): 905-8.
- 103McCann, S. M., L. Krulich, P. Illner, M. Quijada, K. Ajika, C. P. Fawcett (1972). "The adenyohypophysial response to stress and its hypothalamic control." Adv Exp Med Biol **33**(0): 157-64.
- 104McDonald, T. J., G. Nilsson, M. Vagne, M. Ghatei, S. R. Bloom, V. Mutt (1978). "A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue." Gut **19**(9): 767-74.
- 105McLean, K. J., B. Jarrott, A. J. Lawrence (1996). "Neuropeptide Y gene expression and receptor autoradiography in hypertensive and normotensive rat brain." Brain Res Mol Brain Res **35**(1-2): 249-59.
- 106Meister, B. (2000). "Control of food intake via leptin receptors in the hypothalamus." Vitam Horm **59**: 265-304.
- 107Meister, B., S. Ceccatelli, T. Hokfelt, N. E. Anden, M. Anden, E. Theodorsson (1989). "Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions." Exp Brain Res **76**(2): 343-68.
- 108Mondal, M. S., Y. Date, H. Yamaguchi, K. Toshinai, T. Tsuruta, K. Kangawa, M. Nakazato (2005). "Identification of ghrelin and its receptor in neurons of the rat arcuate nucleus." Regul Pept **126**(1-2): 55-9.
- 109Mori, K., A. Yoshimoto, K. Takaya, K. Hosoda, H. Ariyasu, K. Yahata, M. Mukoyama, A. Sugawara, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2000). "Kidney produces a novel acylated peptide, ghrelin." FEBS Lett **486**(3): 213-6.
- 110Muccioli, G., M. Tschop, M. Papotti, R. Deghenghi, M. Heiman, E. Ghigo (2002). "Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity." Eur J Pharmacol **440**(2-3): 235-54.
- 111Muurahainen, N., H. R. Kissileff, A. J. Derogatis, F. X. Pi-Sunyer (1988). "Effects of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8) on food intake and gastric emptying in man." Physiol Behav **44**(4-5): 645-9.
- 112Nagaya, N., K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori, K. Kangawa (2001). "Hemodynamic, renal, and hormonal effects of

6. Literatur

- ghrelin infusion in patients with chronic heart failure." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5854-9.
- 113Nanzer, A. M., S. Khalaf, A. M. Mozid, R. C. Fowkes, M. V. Patel, J. M. Burrin, A. B. Grossman, M. Korbonits (2004). "Ghrelin exerts a proliferative effect on a rat pituitary somatotroph cell line via the mitogen-activated protein kinase pathway." Eur J Endocrinol **151**(2): 233-40.
- 114Olszewski, P. K., M. M. Wirth, T. J. Shaw, M. K. Grace, C. J. Billington, S. Q. Giraud, A. S. Levine (2001). "Role of alpha-MSH in the regulation of consummatory behavior: immunohistochemical evidence." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(2): R673-80.
- 115Otto, B., U. Cuntz, E. Fruehauf, R. Wawarta, C. Folwaczny, R. L. Riepl, M. L. Heiman, P. Lehnert, M. Fichter, M. Tschop (2001). "Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations of patients with anorexia nervosa." Eur J Endocrinol **145**(5): 669-73.
- 116Pagani, F. D., W. P. Norman, D. K. Kasbekar, R. A. Gillis (1985). "Localization of sites within dorsal motor nucleus of vagus that affect gastric motility." Am J Physiol **249**(1 Pt 1): G73-84.
- 117Pandya, N., R. DeMott-Friberg, C. Y. Bowers, A. L. Barkan, C. A. Jaffe (1998). "Growth hormone (GH)-releasing peptide-6 requires endogenous hypothalamic GH-releasing hormone for maximal GH stimulation." J Clin Endocrinol Metab **83**(4): 1186-9.
- 118Peino, R., R. Baldelli, J. Rodriguez-Garcia, S. Rodriguez-Segade, M. Kojima, K. Kangawa, E. Arvat, E. Ghigo, C. Dieguez, F. F. Casanueva (2000). "Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans." Eur J Endocrinol **143**(6): R11-4.
- 119Polonsky, K. S., B. D. Given, L. Hirsch, E. T. Shapiro, H. Tillil, C. Beebe, J. A. Galloway, B. H. Frank, T. Karrison, E. Van Cauter (1988). "Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects." J Clin Invest **81**(2): 435-41.
- 120Pong, S. S., L. Y. Chung, D. C. Dean, R. P. Nargund, A. A. Patchett, R. G. Smith (1996). "Identification of a new G-protein-linked receptor for growth hormone secretagogues." Mol Endocrinol **10**(1): 57-61.
- 121Popovic, V., S. Damjanovic, D. Micic, M. Djurovic, C. Dieguez, F. F. Casanueva (1995). "Blocked growth hormone-releasing peptide (GHRP-6)-induced GH secretion and absence of the synergic action of GHRP-6 plus GH-releasing hormone in patients with hypothalamopituitary disconnection: evidence that GHRP-6 main action is exerted at the hypothalamic level." J Clin Endocrinol Metab **80**(3): 942-7.
- 122Raun, K., B. S. Hansen, N. L. Johansen, H. Thogersen, K. Madsen, M. Ankersen, P. H. Andersen (1998). "Ipamorelin, the first selective growth hormone secretagogue." Eur J Endocrinol **139**(5): 552-61.
- 123Rentsch, J., M. Chiesi (1996). "Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes." FEBS Lett **379**(1): 55-9.
- 124Riediger, T., M. Traebert, H. A. Schmid, C. Scheel, T. A. Lutz, E. Scharrer (2003). "Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus." Neurosci Lett **341**(2): 151-5.
- 125Rinaman, L., R. R. Miselis (1987). "The organization of vagal innervation of rat pancreas using cholera toxin-horseradish peroxidase conjugate." J Auton Nerv Syst **21**(2-3): 109-25.
- 126Ross, C. A., D. A. Ruggiero, D. J. Reis (1985). "Projections from the nucleus tractus solitarius to the rostral ventrolateral medulla." J Comp Neurol **242**(4): 511-34.
- 127Rossiter, C. D., W. P. Norman, M. Jain, P. J. Hornby, S. Benjamin, R. A. Gillis (1990). "Control of lower esophageal sphincter pressure by two sites in dorsal motor nucleus of the vagus." Am J Physiol **259**(6 Pt 1): G899-906.

- 128 Sagar, S. M., F. R. Sharp, T. Curran (1988). "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level." *Science* **240**(4857): 1328-31.
- 129 Sakata, I., K. Nakamura, M. Yamazaki, M. Matsubara, Y. Hayashi, K. Kangawa, T. Sakai (2002). "Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract." *Peptides* **23**(3): 531-6.
- 130 Sasaki, H., B. Rubalcava, D. Baetens, E. Blazquez, C. B. Srikant, L. Orci, R. H. Unger (1975). "Identification of glucagon in the gastrointestinal tract." *J Clin Invest* **56**(1): 135-45.
- 131 Schwartz, G. J. (2000). "The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects." *Nutrition* **16**(10): 866-73.
- 132 Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn, D. G. Baskin (1996). "Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus." *J Clin Invest* **98**(5): 1101-6.
- 133 Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley, D. G. Baskin (2000). "Central nervous system control of food intake." *Nature* **404**(6778): 661-71.
- 134 Scott, D. A., A. M. Fisher (1938). "The Insulin and the Zinc Content of Normal and Diabetic Pancreas." *J Clin Invest* **17**(6): 725-8.
- 135 Shapiro, R. E., R. R. Miselis (1985). "The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat." *J Comp Neurol* **238**(4): 473-88.
- 136 Shimizu, H., Y. Shimomura, R. Hayashi, K. Ohtani, N. Sato, T. Futawatari, M. Mori (1997). "Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution." *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(7): 536-41.
- 137 Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." *Diabetes* **50**(2): 227-32.
- 138 Sibilio, V., G. Rindi, F. Pagani, D. Rapetti, V. Locatelli, A. Torsello, N. Campanini, R. Deghenghi, C. Netti (2003). "Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats: studies on the mechanisms of action." *Endocrinology* **144**(1): 353-9.
- 139 Smith, R. G., R. Leonard, A. R. Bailey, O. Palyha, S. Feighner, C. Tan, K. K. McKee, S. S. Pong, P. Griffin, A. Howard (2001). "Growth hormone secretagogue receptor family members and ligands." *Endocrine* **14**(1): 9-14.
- 140 Smith, R. G., L. H. Van der Ploeg, A. D. Howard, S. D. Feighner, K. Cheng, G. J. Hickey, M. J. Wyvrat, Jr., M. H. Fisher, R. P. Nargund, A. A. Patchett (1997). "Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion." *Endocr Rev* **18**(5): 621-45.
- 141 Smith, Y., A. Parent, L. Kerkerian, G. Pelletier (1985). "Distribution of neuropeptide Y immunoreactivity in the basal forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*)." *J Comp Neurol* **236**(1): 71-89.
- 142 St-Pierre, D. H., L. Wang, Y. Tache (2003). "Ghrelin: a novel player in the gut-brain regulation of growth hormone and energy balance." *News Physiol Sci* **18**: 242-6.
- 143 Stanley, B. G., D. R. Daniel, A. S. Chin, S. F. Leibowitz (1985). "Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion." *Peptides* **6**(6): 1205-11.
- 144 Stanley, B. G., W. Magdalin, A. Seirafi, M. M. Nguyen, S. F. Leibowitz (1992). "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**(3): 581-7.
- 145 Steffens, A. B. (1975). "Influence of reversible obesity on eating behavior, blood glucose, and insulin in the rat." *Am J Physiol* **228**(6): 1738-44.

- 146 Sun, Y., S. Ahmed, R. G. Smith (2003). "Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite." *Mol Cell Biol* **23**(22): 7973-81.
- 147 Sun, Y., P. Wang, H. Zheng, R. G. Smith (2004). "Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(13): 4679-84.
- 148 Swanson, L. W., P. E. Sawchenko (1980). "Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms." *Neuroendocrinology* **31**(6): 410-7.
- 149 Takayama, K., N. Ishikawa, M. Miura (1982). "Sites of origin and termination of gastric vagus preganglionic neurons: an HRP study in the rat." *J Auton Nerv Syst* **6**(2): 211-23.
- 150 Tamura, H., J. Kamegai, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, S. Oikawa (2002). "Ghrelin stimulates GH but not food intake in arcuate nucleus ablated rats." *Endocrinology* **143**(9): 3268-75.
- 151 Tang-Christensen, M., N. Vrang, P. J. Larsen (2001). "Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour." *Int J Obes Relat Metab Disord* **25 Suppl 5**: S42-7.
- 152 Tannenbaum, G. S., C. Y. Bowers (2001). "Interactions of growth hormone secretagogues and growth hormone-releasing hormone/somatostatin." *Endocrine* **14**(1): 21-7.
- 153 Tannenbaum, G. S., J. Epelbaum, C. Y. Bowers (2003). "Interrelationship between the novel peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion." *Endocrinology* **144**(3): 967-74.
- 154 Tannenbaum, G. S., M. Lapointe, A. Beaudet, A. D. Howard (1998). "Expression of growth hormone secretagogue-receptors by growth hormone-releasing hormone neurons in the mediobasal hypothalamus." *Endocrinology* **139**(10): 4420-3.
- 155 Tassone, F., F. Broglio, S. Destefanis, S. Rovere, A. Benso, C. Gottero, F. Prodam, R. Rossetto, C. Gauna, A. J. van der Lely, E. Ghigo, M. Maccario (2003). "Neuroendocrine and metabolic effects of acute ghrelin administration in human obesity." *J Clin Endocrinol Metab* **88**(11): 5478-83.
- 156 Thim, L., P. Kristensen, P. J. Larsen, B. S. Wulff (1998). "CART, a new anorectic peptide." *Int J Biochem Cell Biol* **30**(12): 1281-4.
- 157 Thompson, N. M., D. A. Gill, R. Davies, N. Loveridge, P. A. Houston, I. C. Robinson, T. Wells (2004). "Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor." *Endocrinology* **145**(1): 234-42.
- 158 Tolle, V., M. H. Bassant, P. Zizzari, F. Poindessous-Jazat, C. Tomasetto, J. Epelbaum, M. T. Bluet-Pajot (2002). "Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats." *Endocrinology* **143**(4): 1353-61.
- 159 Tomasetto, C., S. M. Karam, S. Ribieras, R. Masson, O. Lefebvre, A. Staub, G. Alexander, M. P. Chenard, M. C. Rio (2000). "Identification and characterization of a novel gastric peptide hormone: the motilin-related peptide." *Gastroenterology* **119**(2): 395-405.
- 160 Traebert, M., T. Riediger, S. Whitebread, E. Scharrer, H. A. Schmid (2002). "Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus." *J Neuroendocrinol* **14**(7): 580-6.
- 161 Trudel, L., C. Tomasetto, M. C. Rio, M. Bouin, V. Plourde, P. Eberling, P. Poitras (2002). "Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**(6): G948-52.
- 162 Tschop, M., D. L. Smiley, M. L. Heiman (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." *Nature* **407**(6806): 908-13.
- 163 van Houten, M., B. I. Posner, B. M. Kopriwa, J. R. Brawer (1980). "Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus." *Science* **207**(4435): 1081-3.

6. Literatur

- 164 Volante, M., E. Allia, P. Gugliotta, A. Funaro, F. Broglio, R. Deghenghi, G. Muccioli, E. Ghigo, M. Papotti (2002). "Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors." J Clin Endocrinol Metab **87**(3): 1300-8.
- 165 Volante, M., E. Fulcheri, E. Allia, M. Cerrato, A. Pucci, M. Papotti (2002). "Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung." J Histochem Cytochem **50**(8): 1013-21.
- 166 Wahlestedt, C., G. Skagerberg, R. Ekman, M. Heilig, F. Sundler, R. Hakanson (1987). "Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat." Brain Res **417**(1): 33-8.
- 167 Wajnrajch M.P., T. I. S., Gertner R.L., Leibel R. (2000). "Genomic organisation of the human ghrelin gene." J. Endocr. Genetics: 231-233.
- 168 Wang, C., M. A. Mullet, M. J. Glass, C. J. Billington, A. S. Levine, C. M. Kotz (2001). "Feeding inhibition by urocortin in the rat hypothalamic paraventricular nucleus." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **280**(2): R473-80.
- 169 Wang, L., D. H. Saint-Pierre, Y. Tache (2002). "Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus." Neurosci Lett **325**(1): 47-51.
- 170 Weindl, A., R. J. Joynt (1973). "Barrier properties of the subcommissural organ." Arch Neurol **29**(1): 16-22.
- 171 Wells, T., P. A. Houston (2001). "Skeletal growth acceleration with growth hormone secretagogues in transgenic growth retarded rats: pattern-dependent effects and mechanisms of desensitization." J Neuroendocrinol **13**(6): 496-504.
- 172 Wilding, J. P. (2002). "Neuropeptides and appetite control." Diabet Med **19**(8): 619-27.
- 173 Williams, D. L., H. J. Grill, D. E. Cummings, J. M. Kaplan (2003). "Vagotomy dissociates short- and long-term controls of circulating ghrelin." Endocrinology **144**(12): 5184-7.
- 174 Williams, G., C. Bing, X. J. Cai, J. A. Harrold, P. J. King, X. H. Liu (2001). "The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes." Physiol Behav **74**(4-5): 683-701.
- 175 Wren, A. M., L. J. Seal, M. A. Cohen, A. E. Brynes, G. S. Frost, K. G. Murphy, W. S. Dhillo, M. A. Ghatei, S. R. Bloom (2001). "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5992.
- 176 Wren, A. M., C. J. Small, C. R. Abbott, W. S. Dhillo, L. J. Seal, M. A. Cohen, R. L. Batterham, S. Taheri, S. A. Stanley, M. A. Ghatei, S. R. Bloom (2001). "Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats." Diabetes **50**(11): 2540-7.
- 177 Wren, A. M., C. J. Small, C. V. Fribbens, N. M. Neary, H. L. Ward, L. J. Seal, M. A. Ghatei, S. R. Bloom (2002). "The hypothalamic mechanisms of the hypophysiotropic action of ghrelin." Neuroendocrinology **76**(5): 316-24.
- 178 Wren, A. M., C. J. Small, H. L. Ward, K. G. Murphy, C. L. Dakin, S. Taheri, A. R. Kennedy, G. H. Roberts, D. G. Morgan, M. A. Ghatei, S. R. Bloom (2000). "The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion." Endocrinology **141**(11): 4325-8.
- 179 Yamamoto, H., T. Kishi, C. E. Lee, B. J. Choi, H. Fang, A. N. Hollenberg, D. J. Drucker, J. K. Elmquist (2003). "Glucagon-like peptide-1-responsive catecholamine neurons in the area postrema link peripheral glucagon-like peptide-1 with central autonomic control sites." J Neurosci **23**(7): 2939-46.
- 180 Yokosuka, M., P. S. Kalra, S. P. Kalra (1999). "Inhibition of neuropeptide Y (NPY)-induced feeding and c-Fos response in magnocellular paraventricular nucleus by a NPY receptor antagonist: a site of NPY action." Endocrinology **140**(10): 4494-500.

6. Literatur

- 181Yokosuka, M., B. Xu, S. Pu, P. S. Kalra,S. P. Kalra (1998). "Neural substrates for leptin and neuropeptide Y (NPY) interaction: hypothalamic sites associated with inhibition of NPY-induced food intake." Physiol Behav **64**(3): 331-8.
- 182Zhang, W., M. Chen, X. Chen, B. J. Segura,M. W. Mulholland (2001). "Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat." J Physiol **537**(Pt 1): 231-6.
- 183Zhang, W., T. R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zhao,M. W. Mulholland (2003). "Activation of c-fos expression in the rat inferior olivary nucleus by ghrelin." Neurosci Lett **353**(3): 157-60.

Atlas des Rattengehirns von Paxinos und Watson (G. Paxinos, C. Watson 1997)

6.2 Eigene Publikationen

Jens Rüter, Peter Kobelt, Johannes Tebbe, **Yesim Avsar**, Rüdiger Veh, Lixin Wang, Burghard F. Klapp, Bertram Wiedenmann, Yvette Taché, Hubert Mönnikes
„*Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus the hypothalamus of rats*“. Brain Research 2003;991(1-2):26-33

Ding Jianqiang, **Avsar Yesim**, Zhou Hong Chao, Roy-Chowdhury Jayanta, Guha Chandan , Roy-Chowdhury Namita
„*Hepatic X-irradiation-based repopulation by transplanted hepatocytes requires P21 induction in the host liver.*“ Hepatology. 2009 Oct; 50(4 (suppl)): 641-642.
AASLD poster presentation

Zhou Hong Chao, Ding Jianqiang, **Avsar Yesim**, Wang Xia, Roy-Chowdhury Jayanta, Roy-Chowdhury Namita, Guha Chandan
„*Repopulation of individual liver lobes by transplanted hepatocytes using regiospecific hepatic irradiation cures jaundice in the Gunn rat model of Crigler-Najjar syndrome type I.*“
Hepatology. 2009 Oct; 50(4 (suppl)): 303-304.
AASLD oral presentation

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
α -MSH	α -Melanocyte Stimulating Hormone
AgRP	Agouti Related Peptide
AP	Area postrema
<i>aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovines Serumalbumin
CART	Cocaine- and Amphetamine Regulated Transcript
CCK	Cholezystokinin
cLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
DABCO	1,4,-Diazabicyclo(2.2.2)octan
DMV	Dorsaler Motornucleus des Vagus
DVK	Dorsaler Vagaler Komplex
<i>et al.</i>	<i>et alumni</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fos-ir	Fos-Immunreaktivität
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone
GLP	Glucagon Like Peptide
GRP	Gastrin Releasing Peptide
GHS	Growth Hormone Setratogue
IgG	Immunglobulin
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LH	Lateraler Hypothalamus
M	Mol
mRNA	Messenger Ribonuclease Nucleic Acid
MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon

7. Anhang

n	Anzahl
NARC	Nucleus arcuatus
NGS	Normal Goat Serum
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
OXM	Oxyntomodulin
PBNS	Phosphate Buffered Normal Goat Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
PgPik	Paraformaldehyd-Glutardialdehyd-Pikrinsäure
POMC	Pro-Opiomelanocortin
PVN	Paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
PYY	Peptid YY
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TRH	Thyroidea stimulierendes Hormon Releasing Hormone
TRITC	Tetramethylrhodamminisothiocyanat
ZNS	zentrales Nervensystem

7.2 Erklärung

„Ich, Yesim Avsar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Untersuchung zur Fos-Expression im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus nach
peripherer Ghrelinadministration in männlichen Ratten“ selbst verfasst und keine anderen als die
angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und
auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

7.3 Lebenslauf

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

7.4 Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Psych. Hubert Mönnikes für die Überlassung des Themas und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er gewährte mir jederzeit seine freundliche Unterstützung und Beratung und hatte stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme.

Ein besonderes Dankeswort gilt Herrn Dr. rer. nat. Peter Kobelt, der mit unermüdlicher Geduld und seiner fortwährenden und hervorragenden Betreuung mir in allen Phasen dieser Arbeit unterstützend zur Seite stand.