

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Funktion und Interaktion von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin bei der Regulation der
Nahrungsaufnahme in männlichen Ratten“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tobias Inhoff

aus Herne

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Kobelt
2. Prof. Dr. Dipl.-Psych. P. Enck
3. Prof. Dr. med. M. Kreis

Datum der Promotion: 01.02.2013

*„In some ways we feel that we are as confused as ever,
but we think we are confused on a higher level
and about more important things.“*

Earl Clarence Kelley

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Zielsetzung	11
3 Methoden	12
3.1 Versuchstiere	12
3.2 Peptide	12
3.3 Die Fixierung und Präparation des Hirngewebes	12
3.4 Publikation 1: Die Untersuchung zur Aktivierung von hypothalamischen Neuronen nach peripherer Injektion von Ghrelin in verschiedenen Nuclei des Hypothalamus	13
3.4.1 Versuchsdesign	13
3.4.2 Die c-Fos-Immunhistochemie	13
3.4.3 Die Doppelfärbung von c-Fos und AgRP	13
3.4.4 Die Doppelfärbung von NPY und AgRP	14
3.4.5 Datenauswertung	14
3.5 Publikation 2: Die Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme und das neuronale Aktivierungsmuster im Nucleus arcuatus	15
3.5.1 Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme	15
3.5.2 Der Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme bei gefasteten Ratten	15
3.5.3 Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger oder simultaner Injektion auf die c-Fos- und Nesfatin-1-Expression im Nucleus arcuatus	15
3.5.3.1 Die c-Fos-Immunhistochemie	15
3.5.3.2 Die Doppelfärbung gegen c-Fos und Nesfatin-1 im Nucleus arcuatus	16
3.5.4 Datenauswertung	16
3.6 Publikation 3: Eine Untersuchung zum Verteilungsmuster von Nesfatin-1, pmTOR, CART und NPY in Nervenzellen des Nucleus arcuatus	17
3.6.1 Versuchsdesign	17
3.6.2 Datenauswertung	18
4 Ergebnisse	19
4.1 Publikation 1	19
4.1.1 Die Effekte von Ghrelin auf die c-Fos-Expression im Nucleus arcuatus und im dorsomedialen Hypothalamus	19
4.1.2 Die Doppelfärbungen gegen c-Fos und AgRP sowie gegen AgRP und NPY im dorsomedialen Hypothalamus	19
4.2 Publikation 2	19
4.2.1 Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger und nach simultaner Injektion auf die Nahrungsaufnahme	19
4.2.2 Der Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme in gefasteten Tieren	20
4.2.3 Die Modulation der c-Fos-Expression im Nucleus arcuatus durch Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger oder simultaner Injektion	20
4.2.4 Die Doppelfärbung gegen c-Fos und Nesfatin-1	20
4.3 Publikation 3	21
4.3.1 Die Doppelfärbungen gegen CART und pmTOR, Nesfatin-1 und CART, pmTOR und Nesfatin-1, NPY und Nesfatin-1 sowie NPY und pmTOR	21
5 Diskussion	22
6 Referenzen	26
7 Anteilserklärung	31

8	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	32
	<i>Publikation 1</i>	32
	<i>Publikation 2</i>	33
	<i>Publikation 3</i>	34
9	Lebenslauf	35
10	Komplette Publikationsliste	36
11	Selbständigkeitserklärung	38
12	Danksagung	39

Abstract

Das in den X/A-ähnlichen Zellen des Magens synthetisierte Peptidhormon Ghrelin und sein Metabolit Desacyl-Ghrelin sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme in Menschen und Nagern beteiligt. Ghrelin induziert nach intraperitonealer Injektion sowohl einen Anstieg der Nahrungsaufnahme wie auch einen signifikanten Anstieg der Anzahl der c-Fos-positiven Neurone als Marker für neuronale Aktivierung in drei hypothalamischen Nuclei. Im Einzelnen sind dies der Nucleus arcuatus, der dorsomediale Hypothalamus und der Nucleus paraventricularis. Die Ghrelin-Effekte auf die Nahrungsaufnahme werden über Neuropeptid Y-/Agouti related peptide-immunreaktive Neurone vermittelt. Eine simultane Injektion von Desacyl-Ghrelin, welches sich von Ghrelin durch das Fehlen einer Octanoyl-Gruppe unterscheidet, und Ghrelin bewirkt eine Blockade des Ghrelin-Effekts auf die Nahrungsaufnahme. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Anzahl c-Fos-positiver Neurone im Nucleus arcuatus nach simultaner Injektion der Peptide signifikant erniedrigt ist im Vergleich zur alleinigen Ghrelin-Injektion. Die singuläre Injektion von Desacyl-Ghrelin hat keine Suppression der Nahrungsaufnahme zur Folge. Etwa die Hälfte der aktiven Neurone nach simultaner Injektion der beiden Peptide ließ sich mittels immunhistochemischer Doppelfärbungen als Nesfatin-1-positiv darstellen. Das anorexinogen wirksame Peptid Nesfatin-1 ist hierbei vermutlich an der Vermittlung des inhibitorischen Effekts von Desacyl-Ghrelin auf die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Serin-Threonin-Kinase mammalian target of Rapamycin lässt sich im Hypothalamus in Neuronen des Nucleus arcuatus nachweisen. Eine erhöhte Konzentration der aktivierten, phosphorylierten Form dieses Proteins im Nucleus arcuatus unterdrückt die Nahrungsaufnahme. Das Neuropeptid cocaine and amphetamine regulated transcript ist ebenfalls an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Es bewirkt nach peripherer Injektion, genau wie Nesfatin-1, eine Inhibition der Nahrungsaufnahme. In einer Studie dieser Forschungsarbeit konnte durch Doppelfärbungen gezeigt werden, dass die genannten Peptide intrazellulär kolokalisiert sind. Denkbar sind hier sowohl modulatorische als auch additive Effekte im Zusammenspiel dieser anorexinogenen neuronalen Hormone.

Stichworte: Ghrelin, Desacyl-Ghrelin, c-Fos, Hypothalamus, Nahrungsaufnahme, Nesfatin-1

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AgRP	Agouti related peptide
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Area postrema
ARC	Nucleus arcuatus hypothalami
BSA	Bovines Serumalbumin
CART	cocaine and amphetamine related transcript
CCK-8S	sulfatiertes Cholecystokinin
cLSM	konfokales Laser Scanning Mikroskop
CRF	corticotropin releasing factor
DABCO	1,4-Diazabicyklo-(2.2.2)-oktan
DAPI	4'-6'-Diamidin-2-phenylindol
DMH	dorsomedialer Hypothalamus
ebd.	ebenda
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GH	growth hormone
GHS-R1a	growth hormone secretagogue-Rezeptor 1a
GOAT	Ghrelin-O-Acyltransferase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunden
icv	Intrazerebroventrikulär
IgG	Immunglobulin G
ip	Intraperitoneal
ir	Immunreaktiv
iv	Intravenös
KG	Körpergewicht
M	mol/l
m/v	Masse pro Volumen
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mTOR	mammalian target of rapamycin
n	Anzahl
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NDS	normal donkey serum
NGS	normal goat serum
NPY	Neuropeptid Y

NTS	Nucleus tractus solitarii
NUCB2	Nucleobindin-2
p	Signifikanzniveau
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
pmTOR	phosphorylated mammalian target of rapamycin
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Nucleus paraventricularis hypothalami
RT	Raumtemperatur
SEM	standard error of the mean
TORC1	TOR signaling complex 1
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
VMH	ventromedialer Hypothalamus
vs.	Versus
v/v	Volumen pro Volumen

1 Einleitung

Die Regulation der Nahrungsaufnahme der Säugetiere unterliegt vielfältigen kurz- und langfristigen Steuerungsmechanismen. Es existieren zahlreiche Signalwege, die den Gastrointestinaltrakt mit zentralnervösen Zentren, die die Nahrungsaufnahme regulieren, verbinden. Die Beeinflussung erfolgt sowohl von zentral nach peripher als auch umgekehrt: Efferenzen mit Ursprung im zentralen Nervensystem (ZNS) beeinflussen gastrointestinale Funktionen, und Stimuli aus dem Gastrointestinaltrakt wiederum wirken über afferente Bahnen auf das zentrale Nervensystem ein. Auch auf humoralem Weg erreichen Signale aus dem ZNS den Magen-Darm-Trakt und umgekehrt (Konturek et al., 2004; Moran, 2004; Näslund und Hellström, 2007). Heutzutage sind zahlreiche periphere Effektoren bekannt, die eine anorexinogene Wirkung im Organismus entfalten, hingegen mit Ghrelin lediglich ein einziges Peptid, welches orexinogen wirkt (Kojima et al., 1999). Die Gesamtheit der Signalwege wird als „brain-gut“-Achse bezeichnet.

In dieser Forschungsarbeit liegt ein besonderes Augenmerk auf der Rolle gastrointestinaler Peptidhormone, die abhängig von der metabolischen Situation des Organismus über humorale und neuronale Signalwege kurzfristig die Nahrungsaufnahme beeinflussen.

Das in den X/A-ähnlichen Zellen des Magens synthetisierte Peptidhormon Ghrelin als orexinogen wirksamer Effektor der „brain-gut“-Achse besteht aus 28 Aminosäuren (Kojima et al., 1999; Dornonville de la Cour et al., 2001; Kojima und Kangawa, 2005; Zhu et al., 2006). Das Peptid ist – wie erwähnt – das einzige bisher bekannte peripher produzierte Hormon mit zentraler orexinogener Wirkung (Kojima et al., 1999). Das Enzym Ghrelin-O-Acyltransferase (GOAT) verestert posttranslational eine Octanoyl-Kette an die Aminosäure Serin in Position 3 des Moleküls (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008). Kein anderes Enzym vermag diese Modifikation zu katalysieren, und Ghrelin ist als sein alleiniges Substrat beschrieben (ebd.). Diese Acylgruppe ist essentiell für die Bindung von Ghrelin an seinen Rezeptor, den growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a) (Hosoda et al., 2000; van der Lely et al., 2004). Dieser Rezeptor lässt sich – neben anderen – auf Neuronen hypothalamischer Hirnkerne nachweisen, welche an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind (Guan et al., 1997).

Ghrelin steigert unter Beteiligung vagaler Afferenzen und auch auf humoralem Weg die Nahrungsaufnahme und die Expression des Transkriptionsfaktor c-Fos im Hypothalamus, insbesondere im Nucleus arcuatus (ARC; Hewson und Dickson, 2000). Dieser Hirnkern ist im Säuger bedeutsam bei der Regulation der Nahrungsaufnahme (Lawrence et al., 2002). Der Transkriptionsfaktor c-Fos wird hierbei als Parameter für neuronale Aktivierung durch periphere Stimuli verwendet (Dragunow und Faull, 1989; Hoffman et al., 1993). Zur Aufklärung der auf hypothalamischer Ebene beteiligten Netzwerke dient die neuropeptidgerge Charakterisierung der aktivierten Neuronengruppen. Der die Nahrungsaufnahme induzierende Effekt von Ghrelin wird über Neuropeptid Y- (NPY) positive und Agouti related peptide- (AgRP) positive Neuronen vermittelt (Chen

et al., 2004). Damit in Einklang steht, dass der Ghrelin-Rezeptor (GHS-R1a) auf hypothalamischen Neuronen gefunden werden konnte, die NPY und AgRP exprimieren (Willeßen et al., 1999).

Desacyl-Ghrelin unterscheidet sich von Ghrelin durch das Fehlen der Octanoylkette am Serin 3. Es ist zurzeit Gegenstand der Diskussion, ob die deacylierte Form des Moleküls, die im peripheren Blut deutlich überwiegt (Hosoda et al., 2000), eher als Vorstufe oder als Abbauprodukt aufzufassen ist (Zhu et al., 2007; Yang et al., 2008). Die Studienlage zur Funktion von Desacyl-Ghrelin und seinem Effekt auf die Nahrungsaufnahme ist derzeit uneinheitlich. Es gibt Hinweise darauf, dass Desacyl-Ghrelin nach intraperitonealer (ip) oder intrazerebroventrikulärer (icv) Injektion anorexinogene Wirkung entfaltet (Asakawa et al., 2005). Möglicherweise moduliert es auf zentralnervöser Ebene die Effekte von Ghrelin (Matsuda et al., 2006). Diese Wirkung von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme wird wahrscheinlich von Neuronen im ARC vermittelt (Chen et al., 2005).

Im ARC sind besonders zwei Proteine Gegenstand der Forschung: die genetisch hoch konservierte Serin-Threonin-Kinase mTOR, welche Teil des TORC1- und TORC2-Signalweges ist (Cota et al., 2006; Laplante und Sabatini, 2009) und das Peptid Nesfatin-1 (Oh-I et al., 2006). Diese übernehmen sehr wahrscheinlich eine modulatorische Funktion bei der Regulation der Nahrungsaufnahme. Die aktive, phosphorylierte Form von mTOR (pmTOR), kann im ARC in engem Bezug zu NPY nachgewiesen werden (Shimizu et al., 2010), und die Arbeitsgruppe von Seeley konnte zeigen, dass die pmTOR-Konzentration in gefasteten Versuchstieren vermindert ist (Cota et al., 2006).

Nesfatin-1 ist das N-terminale posttranslationale Spaltprodukt des Nucleobindin-2 (NUCB2) und dessen einziges Spaltprodukt mit bekannter biologischer Funktion (Miura et al., 1992; Oh-I et al., 2006; Shimizu et al., 2009). Die Aminosäuresequenzen von NUCB2 des Menschen, der Maus und der Ratte weisen eine hohe Homologie auf (Miura et al., 1992). NUCB2 besteht aus einem Signalpeptid von 24 Aminosäuren (AS) Länge sowie einem Prohormon mit einer Länge von insgesamt 396 Aminosäuren. Dieses wird durch posttranslationale Proteolyse in die Peptide Nesfatin-1 (AS 1–82), Nesfatin-2 (AS 85–163) und Nesfatin-3 (AS 166–396) gespalten; nur für Nesfatin-1 ließ sich ein Effekt auf die Nahrungsaufnahme nachweisen (Oh-I et al., 2006). Nesfatin-1 inhibiert die Nahrungsaufnahme in Nagern sowohl nach peripherer als auch nach intrazerebroventrikulärer Injektion (Oh-I et al., 2006; Shimizu et al., 2009). Nesfatin-1 kann in verschiedenen Geweben, wie der Magenmukosa (Stengel et al., 2009), dem Fettgewebe (Ramanjaneya et al., 2010) und dem ZNS (Foo, Brismar und Broberger, 2008) nachgewiesen werden, und es passiert ungehindert die Blut-Hirn-Schranke (Pan, Hsueh und Kastin, 2007). Nesfatin-1-positive Neurone im ARC sind kolokalisiert mit CART-Neuronen (Oh-I et al., 2006). Anhand funktioneller Studien an Gewebeschnitten konnte gezeigt werden, dass NPY-/AgRP-Neurone durch Nesfatin-1-Applikation elektrophysiologisch gehemmt werden (Price, Samson und Ferguson, 2008). Diese Neuronenpopulation wiederum wird für den stimulatorischen Effekt von Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme verantwortlich gemacht (Chen et al., 2004).

2 Zielstellung

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war, Funktion und Interaktion von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin bei der Regulation der Nahrungsaufnahme in männlichen Ratten zu untersuchen.

Die in der ersten Publikation gezeigten Daten dienten dazu, die zentralnervösen Strukturen zu identifizieren, welche die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin vermitteln. Ferner sollte eine neuropeptiderge Charakterisierung der daran beteiligten Neuronenpopulationen erfolgen.

In den Experimenten, welche in der zweiten Publikation dargestellt sind, sollte die biologische Funktion von Desacyl-Ghrelin und dessen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme vor dem Hintergrund der unklaren und zum Teil kontroversen Studienlage genauer erforscht werden. Ein besonderer Fokus lag darauf, ob Desacyl-Ghrelin eine Wirkung auf den orexinogenen Effekt von peripher appliziertem Ghrelin hat. Es sollte ferner aufgeklärt werden, ob für mögliche modulatorische Effekte auf die Nahrungsaufnahme auf zentralnervöser Ebene morphologische und funktionelle Korrelate existieren.

Die Studien, welche die dritte Publikation wiedergibt, dienten der Phänotypisierung der auf hypothalamischer Ebene beteiligten orexinogenen und anorexinogenen Neuronenpopulationen. Hierbei lag ein besonderes Augenmerk auf der potentiellen Interaktion mit weiteren Neuropeptiden oder intrazellulären Regulatorproteinen, die anorexinogene Wirkung entfalten, insbesondere dem phosphorylierten mammalian target of rapamycin und dem erst kürzlich identifizierten Nesfatin-1 in Neuronen des Nucleus arcuatus.

3 Methoden

In den Abschnitten 3.1 bis 3.3 werden Arbeitsschritte beschrieben, welche in allen Experimenten in ähnlicher Weise durchgeführt wurden. Die Hersteller der Materialien werden bei der ersten Erwähnung vollständig angegeben, danach nur noch mit dem Namen. Alle Materialien, für die keine Hersteller angegeben sind, wurden in *pro analysi*-Qualität von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.1 Versuchstiere

In allen Versuchen wurden männliche Ratten des Stamms Sprague-Dawley (Harlan-Winkelmann Co., Borchon, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 g bezogen und vor Beginn der Versuche 21 Tage lang unter kontrollierten Bedingungen (Tag-Nachtzyklus im Verhältnis 12:12 Stunden, Beleuchtung von 06:30 h bis 18:30 h, 60% Luftfeuchtigkeit, 20 ± 2 °C Raumtemperatur) in Gruppen von 4 Tieren in Makrolon-Typ-IV-Käfigen unter *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Standard-Rattenfutter (R/M-H Extrudat, ssniff, Soest, Deutschland) gehalten. Nach einer Eingewöhnungsphase von sieben Tagen wurden die Tiere während der folgenden 14 Tage vor Beginn der Experimente durch regelmäßiges Training an den Kontakt mit dem Menschen gewöhnt, und die Versuchstiere wurden in die zur intraperitonealen Injektion notwendige dorsale Position gebracht, um die Bedingungen während der Versuche zu simulieren. Diese Maßnahmen sollten die Stressantwort der Tiere minimieren.

Sämtliche Tierversuche wurden von der zuständigen Kommission beim Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Tierversuchsnummer G0053/06).

3.2 Peptide

Ratten-Ghrelin (Peptides International, Louisville, USA, Publikation 1 und Tocris, Ellisville, USA, Publikation 3) wurde in destilliertem Wasser gelöst (1 mg/ml) und bei -20° C in Aliquots zu 50 µl gelagert. Desacyl-Ghrelin (Peptides International) wurde analog zubereitet und in der Konzentration 0,5 mg/ml gelagert. Unmittelbar vor Beginn der Versuche wurden die Peptide mit steriler Vehikellösung (0,15 M NaCl, Braun, Melsungen, Deutschland) auf die in den einzelnen Versuchen verwendeten Konzentrationen diluiert und bis zur Injektion auf Eis aufbewahrt.

3.3 Die Fixierung und Präparation des Hirngewebes

Für alle Versuche, in denen immunhistochemische Färbungen von neuronalem Gewebe durchgeführt wurden, erfolgte, mit oder ohne vorherige periphere Injektion von Hormonen, eine intraperitoneale Narkose (100 mg Ketamin/kg Körpergewicht (KG) (DeltaSelect, Dreieich, Deutschland) und 10 mg Xylazin/kg KG (Bayer, Leverkusen, Deutschland)) und dann die transkardiale Perfusionsfixierung der Versuchstiere nach dem Protokoll von Kobelt et al. (2004). Nach der Präparation der Gehirne wurden diese in je vier koronare Blöcke geteilt, dehydriert, kryokonserviert und bei -80° C gelagert. Für alle Färbungen wurden koronare Gewebeschnitte (Schichtdicke 25 µm) verwendet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte einzeln in Multiwell-Platten und frei flottierend in

Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS). Die anatomische Orientierung und Zuordnung der hypothalamischen Hirnkerne zu den koronaren Blöcken erfolgte anhand der Darstellungen im Atlas von Paxinos & Watson (1997).

3.4 Publikation 1: Die Untersuchung zur Aktivierung von hypothalamischen Neuronen nach peripherer Injektion von Ghrelin in verschiedenen Nuclei des Hypothalamus

3.4.1 Versuchsdesign

Den Versuchstieren wurde Ghrelin (3 nmol/Tier, n=5) oder Vehikellösung (0,15 M NaCl, n=5) mit einem Gesamtvolumen von 0,5 ml ip injiziert. Anschließend wurde ihnen die Nahrung entzogen, bei *ad libitum* Zugang zu Trinkwasserwasser. 90 min nach Injektion der Peptide erfolgte die unter 3.3 beschriebene Fixierung und Präparation der Gewebe.

3.4.2 Die c-Fos-Immunhistochemie

Die Färbung erfolgte im „free-floating“-Verfahren (Schrell und Sofroniew, 1982; Kobelt et al., 2004). Zur Vorbereitung wurden die Hirnschnitte für 15 min mit NaBH₄ (1% m/v in PBS) behandelt, um die Aldehyd-induzierte Autofluoreszenz im Gewebe zu vermindern. Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte eine Inkubation für 60 min mit BSA (Sigma, St. Louis, USA) (5% m/v) und Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland; 0,3% v/v, alle in PBS) zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindung im Gewebe. Nachfolgend wurde der Primärantikörper appliziert (rabbit Anti-rat c-Fos (Oncogene Research Products, Boston, USA) 1:4000 v/v in 5% m/v BSA (Sigma), 0,3% v/v Triton X-100 (Serva), 0,1% m/v NaN₃ in PBS, 42 h bei RT). Nach dreimaligem Auswaschen der Primärantikörper mit PBS wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben (FITC-markierter goat-Anti-rabbit IgG (Sigma) gelöst 1:600 in 5% m/v BSA (Sigma), in PBS, 12 h bei RT). Auf erneutes 3-maliges Waschen mit PBS folgte eine Färbung des Zellchromatins mit Propidiumiodid (2,5 µg/ml in PBS für 15 min), um eine Orientierung im Gewebe zu ermöglichen. Zuletzt wurden die Schnitte eingebettet in einer Antifading-Lösung, um ein Ausbleichen der verwendeten Fluorochrome zu vermindern (Sigma; 100 mg/ml in 90% Glycerin, 10% PBS, pH 7,4). Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop (cLSM 510, Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

3.4.3 Die Doppelfärbung von c-Fos und AgRP

Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte wie in 3.4.2 beschrieben, jedoch mit NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA; 5% m/v in PBS) anstelle von BSA. Die Gewebeschnitte wurden mit beiden Primärantikörper (rabbit Anti-c-Fos (Oncogene Research Products) 1:2000, Lösungsmittel wie in 3.4.2 und goat Anti-AgRP (Neuromics, Edina, USA) 1:500 gelöst in 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS) für 42 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung mit 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS für 2 h. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Sekundärantikörper hinzugegeben, zunächst der erste, TRITC-markierte donkey Anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) für 12 h bei

Raumtemperatur (1:200 in 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in PBS), danach dreimaliges Waschen und Inkubation mit 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN_3 in PBS für 2 h. Anschließend wurde der zweite Sekundärantikörper zugegeben (goat biotin-SP-konjugierter Anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:1000 in 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% NaN_3 in PBS; 12 h bei Raumtemperatur). Nach dreimaligem Waschen folgte die Behandlung mit Avidin-D-konjugiertem Fluorescein (Vector Laboratories, Burlingame, USA, in Sørensenpuffer (pH 8,0) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 h bei RT). Zuletzt wurde dreimal mit Sørensenpuffer gewaschen und es erfolgte die Chromatinfärbung mit DAPI (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) für 10 min. Das Einbetten der Hirnschnitte und die mikroskopischen Analysen wurden analog 3.4.2. durchgeführt.

3.4.4 Die Doppelfärbung von NPY und AgRP

Die Vorbereitung der Hirnschnitte wurde analog 3.4.2 und 3.4.3 durchgeführt. Anschließend erfolgte das Aufbringen der Primärantikörper (guinea pig Anti-NPY (Abcam, Cambridge, UK) 1:500 und goat Anti-AgRP (Neuromics) 1:500 in 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN_3 in PBS für 42 h bei RT). Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurde dann mit 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN_3 in PBS für 2 h inkubiert, danach wurden die Sekundärantikörper hinzugegeben (FITC-markierter donkey Anti-goat IgG und TRITC-markierter donkey Anti-guinea pig (beide Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) beide 1:200 in 5% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in PBS für 12 h bei RT). Zuletzt erfolgte erneut dreimaliges Waschen, danach die Chromatinfärbung, das Einbetten und die mikroskopische Auswertung wie in 3.4.3 beschrieben.

3.4.5 Datenauswertung

Die Bewertung der Aktivität der Neurone erfolgte anhand der c-Fos-Immunreaktivität. Es wurde die absolute Anzahl der c-Fos-positiven Zellen in jedem dritten koronaren Schnitt in fünf hypothalamischen Nuclei (Nucleus paraventricularis (PVN), Nucleus arcuatus (ARC), ventromedialer Hypothalamus (VMH), dorsomedialer Hypothalamus (DMH), Nucleus tractus solitarii (NTS), jeweils bilateral) sowie in der Area postrema (AP, unilateral) ermittelt. Die anatomische Zuordnung erfolgte anhand des stereotaktischen Atlas' von Paxinos und Watson (2007). Die Auswertung der c-Fos-Immunreaktivität erfolgte verblindet. Alle Ergebnisse wurden angegeben als Mittelwert \pm SEM, eine Überprüfung der Daten hinsichtlich ihrer Normalverteilung erfolgte mittels Varianzanalyse. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Student-t-Test berechnet, $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3.5 *Publikation 2: Die Untersuchung der Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme und das neuronale Aktivierungsmuster im Nucleus arcuatus*

Die Akklimatisierungsphase der Versuchstiere und die Vorbereitung der Peptide erfolgten wie in 3.1 und 3.2 beschrieben.

3.5.1 *Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme*

Die Untersuchungen wurden 2,5 h nach Beginn der Tagphase durchgeführt. Den 6 Versuchsgruppen wurden folgende Lösungen in einer Gesamtmenge von je 0,5 ml pro Tier intraperitoneal injiziert: Vehikellösung (0,15 M NaCl, n=13), Ghrelin (13 µg/kg KG, entsprechend 4 nmol/kg KG, n=12), Desacyl-Ghrelin (64 µg/kg KG, entsprechend 20 nmol/kg KG, n = 13; oder 127 µg/kg KG Desacyl-Ghrelin, entsprechend 40 nmol/kg KG, n=10), sowie Ghrelin und Desacyl-Ghrelin simultan (13 µg/kg KG Ghrelin mit 64 µg/kg KG Desacyl-Ghrelin oder 127 µg/kg KG Desacyl-Ghrelin; alle n= 12). Nach Injektion der Versuchslösungen wurden die Tiere vereinzelt, erhielten zu jeder Zeit *ad libitum*-Zugang zu Wasser sowie definierte Mengen an Futter, um so nachfolgend die kumulative Nahrungsaufnahme zu messen. Die Nahrungsaufnahme wurde dann für 5 h in den Intervallen 30 min, 1, 2, 3, 4 und 5 h erfasst.

3.5.2 *Der Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme bei gefasteten Ratten*

Den Versuchstieren wurde 12 h vor Beginn der Untersuchung das Futter entzogen und sie wurden in Einzelkäfigen separiert. Drei Versuchsgruppen erhielten zu Beginn der Tagphase folgende Lösungen: 0,15 M NaCl (n=7) und Desacyl-Ghrelin (64 (n=9) oder 127 (n=6) µg/kg KG). Die Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme erfolgte wie in 3.5.1.

3.5.3 *Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger oder simultaner Injektion auf die c-Fos- und Nesfatin-1-Expression im Nucleus arcuatus*

Es wurden vier Versuchsgruppen, ähnlich dem Studiendesign wie unter 3.5.1 beschrieben, gebildet. Gruppe 1 erhielt Ghrelin (13 µg/kg KG), Gruppe 2 erhielt Desacyl-Ghrelin (64 µg/kg KG), Gruppe 3 erhielt beide Peptide simultan (13 und 94 µg/kg KG) und Gruppe 4 erhielt als Kontrollgruppe NaCl (alle n=4). Nach der ip Injektion der Versuchslösungen wurde den Tieren die Nahrung, nicht jedoch das Trinkwasser entzogen. 90 min nach Injektion erfolgte die Organfixierung durch eine transkardiale Perfusion und die Präparation des Gehirns wie unter 3.3 beschrieben.

3.5.3.1 *Die c-Fos-Immunhistochemie*

Die Vorbereitung der Hirnschnitte erfolgte wie unter 3.4.2 beschrieben. Die Gewebeschnitte wurden für 24 h mit dem Primärantikörper (rabbit Anti-c-Fos (Oncogene Research Products) 1:8000 gelöst in 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS) bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und 1-stündiger Inkubation mit 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS wurde mit dem Sekundärantikörper (goat biotin-SP-konjugierter Anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:1000 in 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v

NaN₃ in PBS) für 12 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS, danach eine 5-stündige Inkubation mit ABC-Komplex (Vector Laboratories, 1:1000 v/v in PBS), gefolgt von erneutem dreimaligen Waschen mit PBS. Nun wurde für 10 min die Behandlung mit dem Chromogen durchgeführt (0,6 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin, 9,3 mg/ml Ammoniumnickelsulfat, 2,3 mg/ml Ammoniumchlorid und 2,3 mg/ml Kobalt-(II)-Chloridhexahydrat). Die Peroxidase-Reaktion wurde mit 0,3% H₂O₂ gestartet und nach 15 min durch dreimalige PBS-Spülung beendet. Die Gegenfärbung mit Propidiumiodid erfolgte wie in 3.4.2. Die gefärbten Schnitte wurden auf Chrom-Aluminium-Gelatine-behandelte Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet (im Inkubationsschrank bei 35° C) und mittels aufsteigender Ethanol-Reihe sowie Xylen dehydriert. Nach Eindecken mit Entellan Neu erfolgte die mikroskopische Analyse mit einem Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop (Axiophot 1, Carl Zeiss).

3.5.3.2 Die Doppelfärbung gegen c-Fos und Nesfatin-1 im Nucleus arcuatus

Die Vorbereitung der Schnitte wurde wie in 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Applikation des Primärantikörpers (rabbit Anti-c-Fos (Oncogene Research Products) 1:8000 gelöst in 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% NaN₃ in PBS) erfolgte für 24 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen und einstündiger Inkubation mit 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS folgte der erste Sekundärantikörper (goat Biotin-SP-konjugierter Anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:2000 in 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in PBS) für 12 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 5 h mit ABC-Komplex (1:1000 in PBS; Vector Laboratories) inkubiert, danach dreimaliges Waschen mit TNT-Waschpuffer (0,1 M Trizma Hydrochlorid, 0,15 M v/v NaCl und 0,05% v/v Tween 20; pH 7,5). Anschließend wurde Fluorescein-Tyramide (in der mitgelieferten Verstärkerlösung; PerkinElmer, Waltham, USA) für 10 min bei RT hinzugegeben, danach dreimaliges Waschen mit TNT-Waschpuffer. Es folgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (Anti-rabbit-nesfatin-1 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, USA) 1:500 in 1% NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) in PBS; 24 h bei RT). Wieder dreimaliges Waschen mit TNT, sodann erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Sekundärantikörper (TRITC-markierter donkey Anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:200 in PBS; 12 h bei RT). Zuletzt wurde dreimal mit PBS gewaschen, die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI und das Gewebe wurde eingebettet in Antifading-Lösung. Die mikroskopische Analyse wurde analog 3.4.2 und 3.4.3 durchgeführt.

3.5.4 Datenauswertung

Die Ergebnisse der Messung der kumulativen Nahrungsaufnahme wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben und mit dem Kruskal-Wallis One Way ANOVA statistisch untersucht. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Dunn's Test ermittelt, p<0,05 wurde als signifikant angesehen. Die Bewertung der c-Fos-Immunreaktivität im VMH und im ARC erfolgte analog 3.4.4, jedoch in jedem vierten Schnitt. Die durchschnittliche Anzahl der c-Fos-positiven Neurone für die jeweiligen Kerne wurde in jeweils 10 Schnitten von 4 Tieren ermittelt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SEM angegeben, die Analyse erfolgte mittels ANOVA, Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit der Fisher LSD-Methode ermittelt, p<0,05 wurde als signifikant

angesehen. Der Untersucher war beim Quantifizieren der c-Fos-positiven Neurone in Bezug auf die vorherige Behandlung der Versuchstiere verblindet. Die Auswertung der Doppelfärbungen erfolgte durch Auszählen aller c-Fos-immunreaktiven Neurone sowie derjenigen, die zusätzlich Nesfatin-1-ir waren (n=3/Gruppe). Die Darstellung aller Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung.

3.6 Publikation 3: Eine Untersuchung zum Verteilungsmuster von Nesfatin-1, pmTOR, CART und NPY in Nervenzellen des Nucleus arcuatus

3.6.1 Versuchsdesign

Die Haltung der Versuchstiere und die Gewinnung und des Gewebes erfolgte analog 3.1 und 3.3. Es wurden Gewebe von Tieren (n=4) verwendet, die *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter hatten und die zu Beginn der Tagphase mittels transkardialer Perfusionsfixierung geopfert wurden. Die koronaren 25 μ m-Schnitte wurden zunächst für 15 min mit NaN₃ (1% m/v in PBS) behandelt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit H₂O₂ (3% v/v in PBS) zur Blockade endogener Peroxidaseaktivität. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Waschpuffer (0,1 M Trizma Hydrochlorid, 0,15 M NaCl und 0,05% v/v Tween 20; pH 7,5) wurde für 1 h TNT Blockierpuffer (0,1 M Trizma Hydrochlorid, 0,15 M NaCl und 1% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), pH 7,5) auf die Schnitte gegeben. Es folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (rabbit Anti-CART (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) 1:2000; oder rabbit Anti-Phospho-mTOR (pmTOR, CellSignaling Technology Inc., Danvers, USA, 1:100; oder rabbit Anti-NPY, Phoenix Pharmaceuticals, 1:500; jeweils in TNT-Blockierpuffer) für 48 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Waschpuffer und Inkubation mit 3% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) und 0,1% m/v NaN₃ in TNT-Puffer für 1 h folgte der Sekundärantikörper (goat biotin-SP-konjugierter Anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) 1:2000 in TNT, 12 h bei RT). Anschließend wurde dreimal mit TNT Waschpuffer gespült, danach folgte eine 5-stündige Inkubation mit dem ABC-Komplex (1:1000, Vector Laboratories), zuletzt erneut dreimaliges Waschen mit TNT-Waschpuffer. Nun erfolgte die Inkubation mit TSA-Fluorescein oder Tetramethyl-Rhodamin-Tyramide (PerkinElmer) für 10 min bei RT. Nach dreimaligem Auswaschen mit TNT-Waschpuffer wurde nun mit dem zweiten Primärantikörper inkubiert (rabbit Anti-Nesfatin-1, 1:500, oder rabbit Anti-CART, USA, 1:400, oder rabbit Anti-NPY, 1:500; jeweils in PBS mit 1% m/v NDS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.); jeweils 48 h bei RT, alle Antikörper Phoenix Pharmaceuticals Inc.). Nun erfolgte die Applikation des zweiten Sekundärantikörpers (FITC-markierter donkey Anti-rabbit IgG, 1:200; oder TRITC-markierter donkey Anti-rabbit IgG, 1:200; beide Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; jeweils in 1% m/v NGS (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) mit 0,1% NaN₃ in PBS, 12 h bei RT). Die weiteren Schritte (Auswaschen der Sekundärantikörper, Chromatinfärbung, Einbetten und mikroskopische Analyse) wurden wie in 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben durchgeführt.

3.6.2 Datenauswertung

Jeder achte koronare 25 μm -Schnitt wurde ausgewertet. Es wurden Nesfatin-1-, Phospho-mTOR-, NPY-, and CART-ir Neurone und alle doppelt markierten Neurone (CART + pmTOR; Nesfatin-1 + CART; pmTOR + Nesfatin-1; NPY + Nesfatin-1; NPY + pmTOR) bilateral im ARC gezählt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Publikation 1

4.1.1 *Die Effekte von Ghrelin auf die c-Fos-Expression im Nucleus arcuatus und im dorsomedialen Hypothalamus*

Nach intraperitonealer Injektion von 3 nmol Ghrelin pro Versuchstier (entsprechend 10 µg) findet sich im ARC eine Verdopplung der Anzahl der c-Fos-positiven Neuronen im Vergleich zur Kontrollgruppe (49 ± 2 vs. 23 ± 2 Neurone/Schnitt, $p=0,001$). Diese Neurone sind hauptsächlich im medialen Abschnitt des ARC lokalisiert. Im PVN erhöht sich diese Anzahl ebenfalls um das 2-fache (69 ± 5 vs. 34 ± 3 Neurone/Schnitt, $p=0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch im DMH induziert Ghrelin eine signifikante Steigerung der Anzahl der c-Fos-positiven Neurone im Vergleich mit der Kontrollgruppe (142 ± 5 vs. 83 ± 5 , $p < 0,001$). Hier sind nach Injektion von Ghrelin die meisten c-Fos-positiven Neurone im ventralen Subnukleus des DMH lokalisiert (87 ± 6 Neurone/Schnitt). Im VMH, im NTS und in der AP fand sich keine signifikante Zunahme der Anzahl der c-Fos-positiven Neurone nach Ghrelin-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe (VMH: 53 ± 3 vs. 48 ± 3 , $p=0,177$; NTS: 42 ± 2 vs. 40 ± 3 , $p=0,603$; AP: 7 ± 1 vs. 5 ± 1 , $p=0,096$; Neurone/Schnitt).

4.1.2 *Die Doppelfärbungen gegen c-Fos und AgRP sowie gegen AgRP und NPY im dorsomedialen Hypothalamus*

Die Doppelfärbungen mit Anti-c-Fos und Anti-AgRP ergaben, dass ein Großteil derjenigen Neurone, die nach Ghrelin-Injektion aktiviert sind, eine enge morphologische Beziehung zu AgRP-positiven Fasern hat. Zusätzlich dazu ergaben die Doppelfärbungen mit Anti-AgRP und Anti-NPY, dass zahlreiche AgRP- und NPY-ir Fasern im DMH kolokalisiert waren.

4.2 Publikation 2

4.2.1 *Die Effekte von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger und nach simultaner Injektion auf die Nahrungsaufnahme*

Nach peripherer ip Injektion von Ghrelin (13 µg/kg KG) ließ sich erwartungsgemäß im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der kumulativen Nahrungsaufnahme nachweisen. Dieser Effekt zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum und war zu jedem Zeitpunkt statistisch signifikant (nach 30 min: $6,20 \pm 0,56$ vs. $1,49 \pm 0,72$ g/kg KG, $p < 0,05$; nach 1 h: $7,28 \pm 1,0$ vs. $1,49 \pm 0,72$ g/kg KG, $p < 0,05$; nach 2 h: $7,73 \pm 1,06$ vs. $2,65 \pm 0,93$ g/kg KG, $p < 0,05$). Simultan dazu verabreichtes Desacyl-Ghrelin vermochte in beiden Dosierungen (64 und 127 µg/kg KG) die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme zu blockieren. Auch hier war die kumulative Nahrungsaufnahme zu allen Beobachtungszeitpunkten signifikant erniedrigt gegenüber den Versuchsgruppen, die ausschließlich Ghrelin erhalten hatten (nach 30 min: $2,44 \pm 0,77$ und $2,50 \pm$

0,86 g/kg KG, $p < 0,05$; nach 1 h: $2,44 \pm 1,10$ g/kg KG, $p < 0,05$ und $3,02 \pm 1,10$ g/kg KG, $p < 0,05$; nach 2 h: $2,44 \pm 0,77$ g/kg KG, $p < 0,05$ und $3,02 \pm 1,10$ g/kg KG, $p < 0,05$).

Desacyl-Ghrelin allein konnte zu keinem Zeitpunkt im Vergleich zur Kontrollgruppe in den beiden Dosen (64 und 127 $\mu\text{g/kg KG}$) signifikant die kumulative Nahrungsaufnahme beeinflussen (nach 30 min: $0,61 \pm 0,32$ und $1,53 \pm 0,92$ g/kg KG, $p > 0,05$; nach 1 h: $2,05 \pm 0,99$ und $2,34 \pm 1,00$ g/kg KG, $p > 0,05$; nach 2 h: $2,85 \pm 1,45$ und $3,38 \pm 1,77$ g/kg KG, $p > 0,05$).

Nach 3, 4 und 5 h *post* Injektion waren nur noch wenige signifikante Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen nachweisbar.

4.2.2 *Der Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme in gefasteten Tieren*

Desacyl-Ghrelin hatte in keiner der im Versuch verwendeten Dosierungen einen statistisch signifikanten Effekt auf die Nahrungsaufnahme.

4.2.3 *Die Modulation der c-Fos-Expression im Nucleus arcuatus durch Ghrelin und Desacyl-Ghrelin nach alleiniger oder simultaner Injektion*

Nach peripherer ip Injektion von Ghrelin (13 $\mu\text{g/kg KG}$) konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Anzahl an c-Fos-positiven Neuronen im ARC nachgewiesen werden, vor allem im medialen Anteil dieses Kerns (109 ± 10 vs. 29 ± 3 Neurone/Schnitt, $p < 0,001$). Desacyl-Ghrelin (64 $\mu\text{g/kg KG}$) induzierte nach alleiniger Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe eine diffuse Aktivierung von Neuronen im gesamten ARC (77 ± 13 vs. 29 ± 3 Neurone/Schnitt, $p = 0,004$). Der Effekt von peripherem Ghrelin (13 $\mu\text{g/kg KG}$) auf die neuronale Aktivierung im ARC war bei simultaner Injektion von Desacyl-Ghrelin (64 $\mu\text{g/kg KG}$) signifikant reduziert (72 ± 9 Neurone/Schnitt, $p = 0,038$ vs. Ghrelin allein). Die c-Fos-positiven Neurone fanden sich verteilt im gesamten ARC und nicht vermehrt im medialen Anteil des ARC wie nach alleiniger Ghrelin-Injektion (siehe oben). Im VMH ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Effekt der Peptide auf die Anzahl der c-Fos-positiven Neurone nachweisen, weder allein noch in Kombination.

4.2.4 *Die Doppelfärbung gegen c-Fos und Nesfatin-1*

Die Doppelfärbung gegen c-Fos und Nesfatin-1 brachte das Ergebnis, dass $55 \pm 7\%$ der nach simultaner Injektion von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin aktivierten Neurone im ARC zusätzlich immunreaktiv für Nesfatin-1 waren. $43 \pm 4\%$ der allein nach Injektion von Desacyl-Ghrelin aktivierten Neurone waren außerdem Nesfatin-1-ir, nach alleiniger Injektion von Ghrelin waren $18 \pm 3\%$ der c-Fos-ir Neurone auch Nesfatin-1-ir. Nesfatin war hierbei nur im Zytoplasma nachweisbar, wohingegen der Transkriptionsfaktor c-Fos erwartungsgemäß im Zellkern lokalisiert war. Die Nesfatin-1-ir Neurone ließen sich keinem anatomisch-morphologischen Abschnitt des ARC zuordnen.

4.3 **Publikation 3**

4.3.1 *Die Doppelfärbungen gegen CART und pmTOR, Nesfatin-1 und CART, pmTOR und Nesfatin-1, NPY und Nesfatin-1 sowie NPY und pmTOR*

Im ARC konnten durchschnittlich 53 ± 10 CART-ir Neurone/Schnitt nachgewiesen werden (23% der Gesamtzahl der gezählten Neurone), des Weiteren 78 ± 18 pmTOR-ir Neurone/Schnitt (34% der gezählten Neurone). 97 ± 23 Neurone/Schnitt (42% der gezählten Neurone) zeigten Nesfatin-1-Immunreaktivität und 65 ± 22 Neurone/Schnitt (27% der gezählten Neurone, alle n=4 Tiere). waren pmTOR-positiv. Die CART-ir Neurone waren vornehmlich im lateralen Anteil des ARC, die NPY-ir Neurone hingegen hauptsächlich im ventralen Abschnitt des ARC lokalisiert. Die pmTOR-ir Neurone zeigten kein spezifisches Verteilungsmuster, die Nesfatin-1-ir Neurone fanden sich, wie die CART-ir Neurone, ebenfalls gehäuft im lateralen Abschnitt des ARC (vgl. hierzu auch die Abbildungen aus Publikation 3).

Die Doppelfärbungen ergaben, dass $59 \pm 5\%$ der pmTOR-positiven Neurone/Schnitt auch Nesfatin-1-immunreaktiv waren, ferner zeigte sich, dass $19 \pm 5\%$ der NPY-positiven Neurone/Schnitt ebenfalls Nesfatin-1-positiv waren, in gleicher Weise zeigte sich, dass $36 \pm 6\%$ der CART-positiven Neurone Nesfatin-1-positiv waren. In den weiteren Doppelfärbungen konnte in $58 \pm 15\%$ Neurone/Schnitt eine Kolo-kalisierung von NPY und pmTOR nachgewiesen werden, und $70 \pm 17\%$ der NPY-Neurone waren ebenfalls pmTOR-immunreaktiv. Die Doppelfärbung gegen CART und pmTOR ergab, dass $38 \pm 5\%$ der CART-Neurone ebenfalls positiv für pmTOR waren.

5 Diskussion

Die periphere Injektion von Ghrelin aktiviert verschiedene hypothalamische Hirnkerne. In den vorliegenden Experimenten konnte erstmalig beobachtet werden, dass Ghrelin die neuronale Aktivität im dorsomedialen Hypothalamus (DMH) signifikant steigert. Ferner ließen sich Ergebnisse anderer Studien reproduzieren, laut derer nach Ghrelin-Injektion Neurone des ARC aktiviert sind (Hewson et al., 2002; Wang et al., 2002; Takayama et al., 2007). Die Tatsache, dass sich im DMH AgRP-ir Fasern in enger anatomischer Beziehung zu aktivierten Neuronen finden, deutet darauf hin, dass die Aktivierung dieser Neurone von AgRP-haltigen Neuronen im ARC vermittelt wird, da dieser hypothalamische Kern als einziger Ort im Gehirn eine AgRP-Synthese betreibt (Broberger et al., 1998). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dem DMH eine Rolle bei der Vermittlung des Ghrelin-Signals zur Induktion der Nahrungsaufnahme zukommt, nicht zuletzt auch deshalb, weil von hier aus Projektionen in den PVN ausgehen (Williams et al., 2001). Der PVN wiederum zeigt nach peripherer Ghrelin-Injektion ebenfalls eine verstärkte c-Fos-Expression (Rüter et al., 2003). Es gibt verschiedene weitere Studien, welche auf eine Beteiligung AgRP-und NPY-positiver Neurone mit Ursprung im ARC bei der Integration orexinogener Signale verweisen (Asakawa et al., 2001; Kamegai et al., 2001; Shintani et al., 2001; Chen et al., 2004). Beispielhaft genannt sei die Publikation von Nakazato et al. (2001), in welcher gezeigt werden konnte, dass Antikörper gegen AgRP die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme inhibieren.

Mögliche Kritik an der Erkenntnis, dass peripher appliziertes Ghrelin Neurone im DMH aktiviert, ergibt sich aus der Tatsache, dass dem DMH ebenfalls eine Funktion bei Stressreaktionen des Organismus beigemessen wird (DiMicco et al. 2002). Obwohl die Tiere durch das während der Akklimatisierungsphase durchgeführte Trainingsprogramm an die Versuchsbedingungen gewöhnt werden, muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der Entzug der Nahrung und die Injektionen selbst möglicherweise eine Stressreaktion der Tiere induzieren, die die Versuchsergebnisse dahingehend verfälschen könnte, dass die c-Fos-Aktivierung ihren Ursprung in erster Linie in der Stressreaktion haben könnte und die postulierte aktivierende Wirkung von Ghrelin hierbei lediglich eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Ergebnisse der Studie zur Aktivierung von Neuronen im DMH durch peripher appliziertes Ghrelin stehen in Teilen in Widerspruch zu vorhergehenden Studien (Wang et al., 2002; Takayama et al., 2007). In diesen konnte keine vermehrte c-Fos-Immunreaktivität im DMH nachgewiesen werden. Hier ist zunächst darauf zu verweisen, dass in dieser Studie die mikroskopischen Analysen der Hirnschnitte an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop bei einer Schnittdicke von 25 µm durchgeführt wurden. Dies erlaubt eine detailliertere und besser aufgelöste Analyse durch die Möglichkeit, verschiedene Ebenen innerhalb desselben Schnitts darzustellen. Bei der von Wang genutzten Durchlichtmikroskopie ist das nicht möglich. Die von Wang et al. (2002) durchgeführten Versuche, in welchen eine Ghrelin-induzierte Steigerung der neuronalen Aktivität im DMH negiert wurde, erfolgten zudem an Mäusen, nicht wie im hier beschriebenen Versuch an Ratten. Takayama et

al. (2007) konnten hingegen bereits eine gesteigerte c-Fos-Immunreaktivität im DMH von Ratten zeigen, diese erreichte in der zitierten Studie jedoch keine statistische Signifikanz, auch dort erfolgte die Auswertung der Hirnschnitte am Durchlichtmikroskop. Zudem arbeiteten beide Gruppen mit einem Enzym-gekoppelten Sekundärantikörper, während in den in Publikation 1 durchgeführten Experimenten Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper zur Anwendung kamen.

In Publikation 2 konnte erstmalig gezeigt werden, dass Desacyl-Ghrelin in Tieren mit *ad libitum* Zugang zu Nahrung am Beginn der Tagphase bei simultaner Injektion mit Ghrelin die bei alleiniger Ghrelin-Injektion induzierbare Nahrungsaufnahme unterdrückt. Ein vergleichbares Versuchsdesign an Mammalia findet sich in der Literatur nicht. Ähnliche Ergebnisse zur Desacyl-Ghrelin-Wirkung lieferten nur die Studien von Matsuda et al. an Goldfischen (2006). Auch hier war nach vorhergehender Injektion von Desacyl-Ghrelin der Ghrelin-Effekt minimiert (ebd.).

Es ist anzunehmen, dass die in der Studie aus Publikation 2 nachgewiesene Wirkung von Desacyl-Ghrelin durch zentrale Mechanismen vermittelt wird. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass Desacyl-Ghrelin die Blut-Hirnschranke überschreiten kann (Banks et al., 2002; Chen et al., 2005) und ebenso dadurch, dass eine chemische periphere Denervierung mittels Capsaicin die Desacyl-Ghrelin-Wirkung nicht aufhebt (Chen et al. 2005).

Es bleibt unklar, warum nach alleiniger peripherer Desacyl-Ghrelin-Injektion bei Tieren nach einer Fastenperiode kein statistisch signifikanter Effekt erzielt werden konnte. Nach 12-stündigem nächtlichen Fasten sind die endogenen Ghrelin-Spiegel am Beginn der Tagphase deutlich erhöht (Bodosi et al., 2004). Eine Unterdrückung des Effekts von endogenem Ghrelin gelang in diesem Experiment jedoch nicht. Eine Erklärung könnte darin gegeben sein, dass der Zeitpunkt der Desacyl-Ghrelin-Administration unmittelbar vor Beginn der Messung nicht optimal, das heißt zu spät, gewählt wurde und so keine humoral vermittelte Implementation der Desacyl-Ghrelin-Wirkung mehr erfolgen konnte. Die endogenen Ghrelin-Spiegel steigen zudem bei nächtlichem Futterentzug kontinuierlich (näherungsweise linear) bis zu einem Maximum am Ende der Nachtphase an (ebd.), wohingegen in der Studie in Publikation 2 das Ghrelin direkt am Beginn der Tagphase als Bolus verabreicht wurde. Auch ist zu berücksichtigen, dass in der hier vorgestellten Studie die simultane Ghrelin- und Desacyl-Ghrelin-Injektion am Beginn der Tagphase ohne vorheriges Fasten vorgenommen wurde. Die metabolische Situation des Gesamtorganismus ist somit nicht die gleiche.

Die Tatsache, dass nach alleiniger peripherer Desacyl-Ghrelin-Injektion kein Effekt auf die Nahrungsaufnahme nachgewiesen werden konnte, ist konkordant mit den Experimenten von Chen et al. Diese konnten in Studien an Wistar-Ratten unter vergleichbaren Versuchsbedingungen ebenfalls keinen Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme zeigen (Chen et al., 2005). Auch die Arbeitsgruppe von Bloom fand in C57Bl6-Mäusen keinen inhibitorischen Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme (Neary et al., 2006). Asakawa et al. wiederum postulieren einen inhibitorischen Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Nahrungsaufnahme in *ddy*-Mäusen (2005). Eine Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse der zitierten Studien kann vordergründig darin

gegeben sein, dass die Dosierungen des Desacyl-Ghrelin sowie die in den Versuchen genutzten Arten und Spezies unterschiedlich waren. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass der Zeitpunkt, an welchem die Versuche durchgeführt werden, großen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Der Abstand zum Beginn der Tagphase (bei Asakawa et al. 3 Stunden, im Artikel von Neary et al. finden sich hierzu keine Angaben, in der in Publikation 2 präsentierten Studie 2,5 Stunden) ist hier möglicherweise ein entscheidender Einflussfaktor.

Das anorexinogen wirksame Peptid Nesfatin-1 wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen im ARC nachgewiesen (Oh-I et al., 2006; Brailoiu et al., 2007; Foo, Brismar und Broberger, 2008) und zwar in enger Beziehung zu POMC/CART-Neuronen. Diese Neurone sind Teil neuronaler Schaltkreise mit inhibitorischer Wirkung in Bezug auf die Nahrungsaufnahme (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998; Cone, 1999). Bisher wurden jedoch keine Nesfatin-1-positiven Zellen in Kolokalisation mit NPY- und AgRP-Neuronen nachgewiesen, welche Teil von orexinogenen Regulationswegen sind. Nun ließ sich zeigen, dass nach alleiniger ip Desacyl-Ghrelin-Injektion 43% der c-Fos-ir Neurone ebenfalls Nesfatin-1-ir waren, nach simultaner ip Injektion von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin stieg dieser Anteil sogar noch leicht auf 55% an. Nach alleiniger Ghrelin-Injektion hingegen waren lediglich 18% der c-Fos-ir Neurone gleichzeitig Nesfatin-1-positiv. In Zusammenschau mit Studien, die zeigen konnten, dass NPY-Neurone elektrophysiologisch durch Nesfatin-1 inhibiert werden konnte (Price et al., 2008), lässt dies Raum für die Hypothese, dass der inhibitorische Effekt von Desacyl-Ghrelin auf die Ghrelin-induzierte Nahrungsaufnahme durch Nesfatin-1-ir Neurone vermittelt werden könnte, welche ihrerseits inhibitorisch auf NPY- und AgRP-ir Neurone einwirken.

In dem Experiment zur Kolokalisierung von peptidergen Neuromodulatoren und intrazellulären Signalmolekülen (CART und pmTOR, Nesfatin-1 und CART, pmTOR und Nesfatin-1, NPY und Nesfatin-1 sowie NPY und pmTOR) in hypothalamischen ARC-Neuronen aus Publikation 3 konnten frühere Studien bestätigt werden (Cota et al., 2006; Oh-I et al., 2006; Shimizu et al., 2009; zu Nesfatin und kolokalisierten Molekülen siehe auch Review von Palasz et al., 2012). Analog zu den Ergebnissen von Cota et al. (2006) konnte eine Vielzahl von Neuronen identifiziert werden, die phänotypisch NPY und pmTOR gemeinsam exprimieren. Oh-I et al. beschrieben bereits 2006 eine Kolokalisation von Nesfatin-1 und CART (Oh-I et al., 2006). Die bisher nicht beschriebene Kolokalisation von Nesfatin-1-ir und pmTOR-ir Neuronen wirft Fragen nach der physiologischen Funktion dieser Verknüpfung auf. Ein Mechanismus reziproker Beeinflussung wie auch für pmTOR und NPY beschrieben (Cota et al., 2006) ist hier denkbar, wenn nicht sogar wahrscheinlich.

Ebenso interessant ist die Beobachtung, dass bis zu 19% der NPY-ir Neurone gleichzeitig Nesfatin-1-Immunreaktivität zeigen. Auch hier stellt sich die Frage nach der Interaktion dieser neuropeptidergen Systeme. Zunächst untermauert dieses Ergebnis die Hypothese, dass Nesfatin-1 direkt inhibitorisch auf NPY-Neurone einwirken könnte. Daneben wäre auch denkbar, dass über diesen Mechanismus die Integration von Einflüssen wie der Stressreaktion auf die Nahrungsaufnahme erfolgt, da Nesfatin-1-Neurone, wie jüngst beschrieben, bei Anwesenheit externer Stressoren

spezifisch aktiviert werden (Goebel et al., 2009).

An dieser Stelle sei noch eine methodische Schwäche erwähnt, die die Doppelfärbungen betrifft. Es gelingt auf diese Weise nur der Nachweis enger morphologischer Beziehungen zweier Neuronen, beziehungsweise zweier Neuronenpopulationen, wenn die Untersuchungen – wie in den hier dargestellten Experimenten – an konsekutiven Gewebeschnitte von Hirnkernen durchgeführt werden. Es sei ausdrücklich gesagt, dass hiermit kein sicherer Nachweis einer uni- oder bidirektionalen Beeinflussung der entsprechend phänotypisierten Neurone geführt wird. Um diesen Nachweis zu erbringen wären entweder eine elektronenmikroskopische Darstellung von Synapsen oder elektrophysiologische Versuche nötig.

6 Referenzen

- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*. 2001 Feb;120(2):337-45.
- Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M. Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*. 2005 Jan;54(1):18-24.
- Banks WA, Tschöp M, Robinson SM, Heiman ML. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Aug;302(2):822-7.
- Bodosi B, Gardi J, Hajdu I, Szentirmai E, Obal F Jr, Krueger JM. Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Nov;287(5):R1071-9.
- Brailoiu GC, Dun SL, Brailoiu E, Inan S, Yang J, Chang JK, Dun NJ. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):5088-94.
- Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hökfelt T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):15043-8.
- Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M. Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology*. 2005 Jul;129(1):8-25.
- Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Weingarh DT, Adams JR, Frazier EG, Shen Z, Marsh DJ, Feighner SD, Guan XM, Ye Z, Nargund RP, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, MacNeil DJ, Qian S. Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology*. 2004 Jun;145(6):2607-12.
- Cone RD. The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 1999 Aug;10(6):211-216.
- Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, Woods SC, Seeley RJ. Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science*. 2006 May 12;312(5775):927-30.
- DiMicco JA, Samuels BC, Zaretskaia MV, Zaretsky DV. The dorsomedial hypothalamus and the response to stress: part renaissance, part revolution. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002 Mar;71(3):469-80.

- Dornonville de la Cour C, Björkqvist M, Sandvik AK, Bakke I, Zhao CM, Chen D, Håkanson R. A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul Pept.* 2001 Jun 15;99(2-3):141-50.
- Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods.* 1989 Sep;29(3):261-5.
- Foo KS, Brismar H, Broberger C. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience.* 2008 Oct 15;156(3):563-79.
- Goebel M, Stengel A, Wang L, Taché Y. Restraint stress activates nesfatin-1-immunoreactive brain nuclei in rats. *Brain Res.* 2009 Dec 1;1300:114-24.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Aug;48(1):23-9.
- Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 29;105(17):6320-5.
- Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol.* 2000 Nov;12(11):1047-9.
- Hewson AK, Tung LY, Connell DW, Tookman L, Dickson SL. The rat arcuate nucleus integrates peripheral signals provided by leptin, insulin, and a ghrelin mimetic. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3412-9.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 1993 Jul;14(3):173-213.
- Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Dec 29;279(3):909-13.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes.* 2001 Nov;50(11):2438-43.
- Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Bae HG, Rüter J, Klapp BF, Wiedenmann B, Mönnikes H. Two immunocytochemical protocols for immunofluorescent detection of c-Fos positive neurons in the rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004 Apr;13(1):45-52.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999 Dec 9;402(6762):656-60.

- Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev.* 2005 Apr;85(2):495-522.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol.* 2004 Mar;55(1 Pt 2):137-54.
- Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998 May 7;393(6680):72-6.
- Lambert PD, Couceyro PR, McGirr KM, Dall Vechia SE, Smith Y, Kuhar MJ. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse.* 1998 Aug;29(4):293-8.
- Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Oct 15;122(Pt 20):3589-94.
- Lawrence CB, Snape AC, Baudoin FM, Luckman SM. Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology.* 2002 Jan;143(1):155-62.
- Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides.* 2006 Sep;27(9):2321-5.
- Miura K, Titani K, Kurosawa Y, Kanai Y. Molecular cloning of nucleobindin, a novel DNA-binding protein that contains both a signal peptide and a leucine zipper structure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Aug 31;187(1):375-80.
- Moran TH. Gut peptides in the control of food intake: 30 years of ideas. *Physiol Behav.* 2004 Aug;82(1):175-80.
- Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature.* 2001 Jan 11;409(6817):194-8.
- Näslund E, Hellström PM. Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav.* 2007 Sep 10;92(1-2):256-62.
- Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR. Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut.* 2006 Jan;55(1):135.
- Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, Tsuchiya T, Monden T, Horiguchi K, Yamada M, Mori M. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006 Oct 12;443(7112):709-12.
- Pałasz A, Krzystanek M, Worthington J, Czajkowska B, Kostro K, Wiaderkiewicz R, Bajor G. Nesfatin-1, a unique regulatory neuropeptide of the brain. *Neuropeptides.* 2012 Jun;46(3):105-12.
- Pan W, Hsueh H, Kastin AJ. Nesfatin-1 crosses the blood-brain barrier without saturation. *Peptides.* 2007 Nov;28(11):2223-8.

- Paxinos, G., Watson, C., 1997. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego, USA.
- Price CJ, Samson WK, Ferguson AV. Nesfatin-1 inhibits NPY neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res*. 2008 Sep 16;1230:99-106.
- Ramanjaneya M, Chen J, Brown JE, Tripathi G, Hallschmid M, Patel S, Kern W, Hillhouse EW, Lehnert H, Tan BK, Randeve HS. Identification of nesfatin-1 in human and murine adipose tissue: a novel depot-specific adipokine with increased levels in obesity. *Endocrinology*. 2010 Jul;151(7):3169-80.
- Rüter J, Kobelt P, Tebbe JJ, Avsar Y, Veh R, Wang L, Klapp BF, Wiedenmann B, Taché Y, Mönnikes H. Intraperitoneal injection of ghrelin induces Fos expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *Brain Res*. 2003 Nov 21;991(1-2):26-33.
- Schrell U, Sofroniew MV. Use of serial 1-2 micrometer paraffin sections in neuropeptide immunocytochemistry for sequential analysis of different substances contained within the same neurons. *J Histochem Cytochem*. 1982 Jun;30(6):512-6.
- Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):662-71.
- Shimizu H, Arima H, Ozawa Y, Watanabe M, Banno R, Sugimura Y, Ozaki N, Nagasaki H, Oiso Y. Glucocorticoids increase NPY gene expression in the arcuate nucleus by inhibiting mTOR signaling in rat hypothalamic organotypic cultures. *Peptides*. 2010 Jan;31(1):145-9.
- Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes*. 2001 Feb;50(2):227-32.
- Stengel A, Goebel M, Yakubov I, Wang L, Witcher D, Coskun T, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NW. Identification and characterization of nesfatin-1 immunoreactivity in endocrine cell types of the rat gastric oxyntic mucosa. *Endocrinology*. 2009 Jan;150(1):232-8.
- Takayama K, Johno Y, Hayashi K, Yakabi K, Tanaka T, Ro S. Expression of c-Fos protein in the brain after intravenous injection of ghrelin in rats. *Neurosci Lett*. 2007 May 7;417(3):292-6.
- van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev*. 2004 Jun;25(3):426-57.
- Wang L, Saint-Pierre DH, Taché Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y - synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett*. 2002 May 31;325(1):47-51.

-
- Willesen MG, Kristensen P, Rømer J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*. 1999 Nov;70(5):306-16.
- Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav*. 2001 Nov-Dec;74(4-5):683-701.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):387-96.
- Zhu X, Cao Y, Voogd K, Steiner DF. On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem*. 2006 Dec 15;281(50):38867-70.

7 Anteilserklärung

Tobias Inhoff hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Autoren: Kobelt P*, Wisser AS*, Stengel A, Goebel M, Inhoff T, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.
Titel: Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.
Zeitschrift: Brain Research
Jahr: 2008

20 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Mitarbeit an der Durchführung der Tierexperimente, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Publikation 2:

Autoren: Inhoff T*, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A*, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P
Titel: Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.
Zeitschrift: Peptides
Jahr: 2008

60 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der Tierexperimente, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Auswertung der gewonnenen Daten, Verfassen des Manuskripts

Publikation 3:

Autoren: Inhoff T*, Stengel A*, Peter L, Goebel M, Taché Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P
Titel: Novel insights in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats
Zeitschrift: Peptides
Jahr: 2010

60 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Gewinnen und Auswahl der geeigneten Gewebe, Durchführung der immunhistochemischen Färbungen, Analyse der mikroskopischen Bilder, Mitarbeit an der Erstellung des Manuskripts, Korrektur des Manuskripts

Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

8 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Die ausgewählten Publikationen sind aus rechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Dissertation nicht in Kopie enthalten. Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

Publikation 1

Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.
Kobelt P*, Wisser AS*, Stengel A, Goebel M, **Inhoff T**, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.
Brain Res. 2008 Apr 14;1204:77-86
Impact factor 2008: 2,494

Publikation 2

Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.

Inhoff T*, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A*, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P.

Peptides. 2008 Dec;29(12):2159-68

Impact factor 2008: 2,565

Publikation 3

Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats

Inhoff T*, Stengel A*, Peter L, Goebel M, Taché Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P

Peptides. 2010 Feb;31(2):257–62

Impact factor 2010: 2,654

9 Lebenslauf

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

10 Komplette Publikationsliste

Manuskripte

Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

Sulfated cholecystinin-8 activates phospho-mTOR immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Lembke V*, Goebel M*, Frommelt L, **Inhoff T**, Lommel R, Stengel A, Taché Y, Grötzinger C, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Kobelt P.
Peptides. 2011 Jan;32(1):65-70

Peripherally injected CCK-8S activates CART positive neurons of the paraventricular nucleus in rats.

Peter L*, Stengel A*, Noetzel S, **Inhoff T**, Goebel M, Taché Y, Veh RW, Bannert N, Grötzinger C, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P.
Peptides. 2010 Jun;31(6):1118-23

Novel insights in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats

Inhoff T*, Stengel A*, Peter L, Goebel M, Taché Y, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P
Peptides. 2010 Feb;31(2):257-62

CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem.

Noetzel S*, Stengel A*, **Inhoff T**, Goebel M, Wisser AS, Bannert N, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P.
Regul Pept. 2009 Oct 9;157(1-3):84-91

Is desacyl ghrelin a modulator of food intake?

Inhoff T, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P.
Peptides. 2009 May;30(5):991-4

Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.

Inhoff T*, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A*, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Kobelt P.
Peptides. 2008 Dec;29(12):2159-68

Peripheral obestatin has no effect on feeding behavior and brain Fos expression in rodents.

Kobelt P*, Wisser AS*, Stengel A*, Goebel M, Bannert N, Gourcerol G, **Inhoff T**, Noetzel S, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.
Peptides. 2008 Jun;29(6):1018-27

Peripheral injection of ghrelin induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats.

Kobelt P*, Wisser AS*, Stengel A, Goebel M, **Inhoff T**, Noetzel S, Veh RW, Bannert N, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H.
Brain Res. 2008 Apr 14;1204:77-86

Vorträge:

Novel insight in distribution of nesfatin-1 and phospho-mTOR in the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität
26.03. – 28.03.2010, Freising

Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität
27.03. – 29.03.2009, Hohenkammer

Poster:

Peripheres CCK-8S induziert dosisabhängig neuronale Aktivität in Nesfatin-1 immunreaktiven Zellen des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus in Ratten

Stengel A, Noetzel S, **Inhoff T**, Goebel M, Wisser AS, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H, Kobelt P

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, 30.09. – 03.10.2009, Hamburg

Periphere Injektion von CCK-8S induziert c-Fos in CART-positiven Neuronen des paraventriculären Nucleus des Hypothalamus in Ratten

Kobelt P, Noetzel S, **Inhoff T**, Stengel A, Goebel M, Wisser AS, van der Voort I, Wiedenmann B, Klapp BF, Taché Y, Mönnikes H

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen, 30.09. – 03.10.2009, Hamburg

Peripheral Injection of CCK-8s Activates CART Positive Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus

Andreas Stengel, Steffen Noetzel, **Tobias Inhoff**, Miriam Goebel, Hubert Monnikes, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Tache, Peter Kobelt

Digestive Disease Week 2009, 30.05. – 04.06.2009, Chicago, IL, USA

Des-acyl Ghrelin Inhibits the Orexigenic Effect of Peripherally Injected Ghrelin

Andreas Stengel, Peter Kobelt, **Tobias Inhoff**, Steffen Noetzel, Anna-Sophia Wisser, Miriam Goebel, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Yvette Tache, Hubert Monnikes

Digestive Disease Week 2008, 17.05. – 22.05.2008, San Diego, CA, USA

11 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Tobias Inhoff, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktion und Interaktion von Ghrelin und Desacyl-Ghrelin bei der Regulation der Nahrungsaufnahme 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.“

Tobias Inhoff, Berlin, 18.07.2012

12 Danksagung

In erster Linie gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Kobelt. Peter, Du hast mich während der letzten Jahre kontinuierlich unterstützt, hast mir stets Deine Ratschläge und Deine Erfahrung zur Verfügung gestellt und immer an mich geglaubt. Ohne Dich wäre diese Arbeit niemals entstanden. Ich danke Dir von ganzem Herzen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dipl.-Psych. Hubert Mönnikes, der mich in den Anfangstagen meiner wissenschaftlichen Arbeit begleitet und während meines Studiums großzügig gefördert hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bertram Wiedenmann. Er hat die Arbeit der Forschungsgruppe, dessen Teil ich sein durfte, stets aufmerksam verfolgt und unterstützt. Ihm habe ich es zu verdanken, dass ich heute auch im Klinikalltag wertvolle Erfahrungen sammeln darf.

Danke lieber Steffen. Die vielen Stunden im Labor wären ohne Dich wesentlich schwerer gewesen. Dein Durchhaltevermögen und Deine Gesellschaft habe ich stets sehr geschätzt und schätze sie weiterhin.

Danke liebe Beate. Du bist der beste Beweis dafür, dass kompetente Personen aus dem Laboralltag auch als gute Freunde taugen.

Aufrichtig danken möchte ich meinen Eltern Annette und Helmut sowie meinen beiden Brüdern, Michael und Christian. Ich kann mir keine besseren vorstellen.

Die folgenden Personen sind in den letzten Jahren zu wichtigen Wegbegleitern geworden. Sie sollen ebenfalls erwähnt werden: Laura, Lisa, Robert, Moritz und Rob. Ihr wisst, warum ich mich Euch sehr verbunden fühle.