

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

DISSERTATION

Peripher injiziertes sulfatiertes Cholezystokinin-Oktapeptid
aktiviert *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*-
immunreaktive Neurone des *Nucleus paraventricularis* in Ratten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Peter

aus Adenau

Datum der Promotion: 5. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Regulation der Nahrungsaufnahme	1
1.2	Die zentrale Nahrungsregulation im Hypothalamus und Hirnstamm	2
1.2.1	Der Nucleus arcuatus	5
1.2.2	Der Nucleus paraventricularis	6
1.2.3	Der Nucleus tractus solitarius	7
1.3	Die nahrungsregulierenden Botenstoffe	8
1.3.1	Die peripheren nahrungsregulierenden Botenstoffe	9
1.3.1.1	Das Peptidhormon Cholezystokinin	10
1.3.1.1.1	Die Entdeckung von Cholezystokinin	10
1.3.1.1.2	Die molekulare Struktur des Cholezystokinin	10
1.3.1.1.3	Die Wirkung von Cholezystokinin auf die Nahrungsaufnahme	11
1.3.1.1.4	Die Cholezystokinin-Rezeptoren	12
1.3.1.1.5	Die nervale Informationsvermittlung von Cholezystokinin	12
1.3.1.1.6	Das zentrale Nervensystem als Wirkungsort des Cholezystokinin	13
1.3.1.1.7	Die weiteren Funktionen des Cholezystokinin	14
1.3.2	Die zentralen nahrungsregulierende Botenstoffe	14
1.3.2.1	Der Neuromodulator Cocaine- and amphetamine-regulated transcript	16
1.3.2.1.1	Die Lokalisation des CART-Peptids	16
1.3.2.1.2	Die Wirkung des CART-Peptids auf die Nahrungsaufnahme	18
1.3.2.1.3	Die weiteren Funktionen des CART-Peptids und der CART-mRNA	18
1.3.2.2	Das Peptidhormon Corticotropin-releasing factor	19
1.3.2.3	Das Peptidhormon Oxytocin	20
1.4	Das Protoonkogen c-Fos als Marker neuronaler Aktivität	21
1.5	Die Zielsetzung	22

Inhaltsverzeichnis

2.	Material und Methoden	24
2.1	Materialien	24
2.1.1	Die Versuchsmaterialien	24
2.1.1.1	Die Antikörper und Seren für die Immunhistochemie	24
2.1.1.2	Die Chemikalien der Immunhistochemie	25
2.1.1.3	Sonstige Chemikalien	25
2.1.1.4	Die Medikamente	26
2.1.1.5	Das Peptid	26
2.1.1.6	Die Geräte	26
2.1.1.7	Verschiedene Materialien	27
2.1.2	Die Versuchstiere	28
2.1.3	Die Herstellung der Versuchslösungen	28
2.1.3.1	Die Herstellung der Fixierlösung	28
2.1.3.2	Die Herstellung des Narkosemittels	29
2.1.3.3	Die Herstellung der Peptid-Lösung	29
2.1.3.4	Die Herstellung des Phosphatpuffers	29
2.1.3.5	Die Herstellung der Saccharose-Lösungen	30
2.2	Methoden	30
2.2.1	Die Applikation des Peptides	30
2.2.2	Die Durchführung der transkardialen Perfusion	31
2.2.3	Die Entnahme der Gehirne	31
2.2.4	Die Anfertigung der Gehirnschnitte	32
2.2.5	Die immunhistologischen Färbungen	33
2.2.5.1	Allgemeines zu den immunhistologischen Protokollen	33
2.2.5.2	Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- Immunreaktivität	36
2.2.5.3	Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und CART-Immunreaktivität	36
2.2.5.4	Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und CRF-Immunreaktivität	37
2.2.5.5	Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und Oxytocin-Immunreaktivität	38
2.2.5.6	Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von Immunreaktivität für CART und Oxytocin sowie für CART und CRF	39

Inhaltsverzeichnis

2.2.6	Die mikroskopische Auswertung	39
2.2.7	Die statistische Auswertung	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Die Effekte von CCK-8S auf die neuronale Aktivierung im Nucleus arcuatus, Nucleus paraventricularis und Nucleus tractus solitarius	42
3.2	Die Effekte von CCK-8S auf die CART-, CRF- und Oxytocin-immunreaktiven Neurone und deren Aktivierung im Nucleus paraventricularis	45
3.2.1	Die Effekte von intraperitoneal injizierten CCK-8S auf die CART-, CRF- sowie Oxytocin-immunreaktiven Neurone und deren Aktivierung im PVN	46
3.2.2	Die Lokalisation der CART-, CRF-, Oxytocin- und c-Fos-Immunreaktivität in den Neuronen und im Gebiet des PVN	53
4.	Diskussion	56
4.1	Die Rolle des Nucleus arcuatus in den Versuchen	57
4.2	Die Rolle des Nucleus paraventricularis in der nahrungsregulatorischen Wirkung von Cholezystokinin-Oktapeptid	58
4.2.1	Die mögliche Beteiligung anorexigener Neuropeptide im PVN an der Wirkungsvermittlung von CCK	58
4.3	Die Rolle der Afferenzen und Efferenzen des Nucleus tractus solitarius in der nahrungsregulatorischen Wirkungsübermittlung von CCK	63
4.4	Die Wirkung von CART und Cholezystokinin auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	66
4.4.1	Das CART-Peptid – Ein Botenstoff mit orexigener und anorexigener Wirkung?	68
5.	Literaturverzeichnis	75
6.	Eidesstattliche Erklärung	93
7.	Lebenslauf	95
8.	Publikationen	96
9.	Danksagung	97

Abstract

Das gastrointestinale Hormon Cholezystokinin (CCK) spielt eine Rolle in der Sättigungsregulation. CCK inhibiert die kurzfristige Nahrungsaufnahme. Auch die intrazerebroventrikuläre Injektion des Neuropeptids *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART)-Peptid hat eine inhibierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme. CART konnte unter anderem im *Nucleus paraventricularis* (PVN) nachgewiesen werden. Die im Hypothalamus gelegenen Kerngebiete PVN und *Nucleus arcuatus* (ARC) sowie der *Nucleus tractus solitarius* (NTS) des Hirnstamms zählen zu den nahrungsregulierenden Hirnzentren.

Das Ziel dieser Studie ist herauszufinden, ob und inwiefern eine intraperitoneale Injektion von Cholezystokinin-Oktapeptid (CCK-8S) in zwei unterschiedlichen Dosierungen die neuronale Aktivität von CART-exprimierenden Neuronen im PVN beeinflusst. Zusätzlich sollte die Anzahl der aktivierten *Corticotropin-Releasing-Factor* (CRF)- und Oxytocin-Neuronen in Abhängigkeit von den beiden CCK-8S-Dosierung im PVN quantifiziert werden.

Hierzu wurden *Sprague-Dawley* Ratten intraperitoneal 6 µg/kg CCK-8S, 10 µg/kg CCK-8S oder als Kontrolle Vehikellösung (0,15 M NaCl) injiziert. Im Anschluss wurde in immunhistologischen Färbungen gegen c-Fos die neuronale Aktivierung im PVN, ARC und NTS erfasst.

Im PVN bewirkte die Injektion von CCK-8S im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anzahl c-Fos-immunreaktiver (-ir)-Neurone (Mittelwert der aktivierten Neurone/Hirnschnitt ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM): Vehikel 18 ± 8; 6 µg/kg CCK-8S 102 ± 6; 10 µg/kg CCK-8S 150 ± 5, $p < 0,05$). Eine signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone wurde auch im NTS beobachtet (Mittelwert der aktivierten Neurone/Hirnschnitt ± SEM: Vehikel 7 ± 1; 6 µg/kg CCK-8S 65 ± 13; 10 µg/kg CCK-8S 182 ± 16; $p < 0,05$). Im ARC wurde kein Effekt von CCK-8S auf die Anzahl aktivierter Neuronen festgestellt (Mittelwert der aktivierten Neurone/Hirnschnitt ± SEM des Mittelwert: Vehikel 24 ± 3; 6 µg/kg CCK-8S 25 ± 2; 10 µg/kg CCK8-S 26 ± 4; $p > 0,05$).

Die immunhistologische Doppelfärbung gegen CART-Peptid und c-Fos zeigte eine signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter CART-Neurone im

Abstract

PVN (Mittelwert der aktivierten CART-ir Neurone/Hirnschnitt \pm SEM: Vehikel 1 ± 0 ; 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 19 ± 3 ; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 29 ± 4 ; $p < 0,05$). Zusätzlich induzierte CCK-8S eine signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter CRF- (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 8-fach, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 12-fach, $p < 0,05$) sowie aktivierter Oxytocin-Neurone (6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 20-fach; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 36-fach, $p < 0,05$) im PVN.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S eine dosisabhängige Steigerung der aktivierten CART-, der aktivierten CRF- sowie der aktivierten Oxytocin-Neuronen im PVN bewirkt. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Neuropeptide CART, CRF und Oxytocin eine Rolle in der Wirkungsvermittlung von peripher sezerniertem Cholezystokinin spielen.

Abstract

Cholecystokinin is a gastrointestinal hormone that plays a role in short-time inhibition of food intake. It was shown that intracerebroventricular administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-peptide inhibits food intake in rodents. The CART-peptide has been detected in the Nucleus paraventricularis (PVN) and in other hypothalamic nuclei. Hypothalamic PVN and nucleus arcuatus (ARC) as well as nucleus tractus solitarius (NTS) take part in the central regulation of food intake.

The aim of this study is to determine whether and to what extent the peripheral injection of cholecystokinin-octapeptide (CCK-8S) in two different dosages affects neuronal activity in CART-neurons in the PVN. A further task is to quantify the number of activated corticotropin-releasing-factor (CRF)- and oxytocin-neurons within the PVN.

To achieve results on the effects of CCK-8S, Sprague–Dawley rats received an intraperitoneal injection of 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ or 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S. For control purposes only the vehicle of 0,15 M NaCl ($n = 4/\text{group}$) was injected alternatively. Immunohistochemistry for c-Fos was used to determine the number of activated neurons in the PVN, ARC and NTS.

Compared to the vehicle, CCK-8S induced a significant dose-dependent increase in the number of c-Fos-positive neurons in the PVN (mean of activated neurons \pm standard error of the mean (SEM): vehicle 18 ± 8 ; 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 102 ± 6 ; 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S 150 ± 5 , $p < 0,05$). Both dosing units of CCK-8S increased the number of c-Fos-positive neurons in the NTS (mean of activated neurons \pm SEM: vehicle 7 ± 1 ; 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ CCK-8S

Abstract

65 ± 13 ; $10 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 182 ± 16 ; $p < 0,05$). No effect on the number of c-Fos-positive neurons was observed in the ARC (mean of activated neurons \pm SEM: vehicle 24 ± 3 ; $6 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 25 ± 2 ; $10 \mu\text{g/kg}$ CCK8-S 26 ± 4 ; $p > 0,05$).

The immunohistochemistry of the CART-peptide and c-Fos revealed a significant and dose-dependent increase in the number of activated CART-neurons in the PVN (mean of activated CART-neurons \pm SEM: vehicle 1 ± 0 ; $6 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 19 ± 3 ; $10 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 29 ± 4 ; $p < 0,5$). Furthermore, the injection of CCK-8S dose-dependently increased the amount of c-Fos-positive CRF-neurons ($6 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 8-fold, $10 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 12-fold, $p < 0,05$) and the number of c-Fos-positive oxytocin-neurons ($6 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 20-fold; $10 \mu\text{g/kg}$ CCK-8S 36-fold, $p < 0,05$) in the PVN.

The observations show that CCK-8S induces an increase in the number of activated CART-, CRF- and oxytocin-neurons in the PVN. These results of the study suggest that the neuropeptides CART, CRF and oxytocin play a key role in central regulation of food intake mediated via peripheral CCK.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

3 V	dritter Hirnventrikel
4 V	vierter Hirnventrikel
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgrP	<i>Agouti-related protein</i>
α -MSH	<i>α-Melanocyte stimulating hormone</i>
AP	<i>Area postrema</i>
ARC	<i>Nucleus arcuatus</i>
AS	Aminosäuren
Asp	Asparaginsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CART	<i>Cocaine- and amphetamine-regulated transcript</i>
CCK	Cholezystokinin
CCK-8S	sulfatiertes Cholezystokinin-Oktapeptid
CRF	<i>Corticotropin-releasing factor</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVC	<i>Dorsal vagal complex</i>
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
GLP-1	<i>Glucagon like peptide-1</i>
Gly	Glycin
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
ip	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LH	lateraler Hypothalamus
M	molare Masse
MCH	<i>Melanin concentrating hormone</i>
MDMA	3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
Met	Methionin
mRNA	<i>Messenger ribonuclein acid</i>

Abkürzungsverzeichnis

mTOR	<i>Serine-threonine-kinase mammalian target of rapamycin</i>
n	Anzahl
NDS	<i>Normal donkey serum</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
-NH ₂	Aminogruppe
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid Y
NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
N.vagus	<i>Nervus vagus</i>
OXM	Oxyntomodulin
p	Signifikanzniveau
PACAP 6-38	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide</i> Fragment 6-38
PBS	Phosphatpuffer
PFA	perifornikales Gebiet
PHE	Phenylalanin
POMC	Proopiomelanocortin
PP	Pankreatisches Polypeptid
PVN	<i>Nucleus paraventricularis</i>
PYY	Peptid YY
RbNS	<i>Normal rabbit serum</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TRH	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TRITC	<i>Tetramethyl rhodamine isothiocyanate</i>
TSA™	<i>Tyramide signal amplification</i>
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Regulation der Nahrungsaufnahme

Die Nahrungsaufnahme zählt zu den körperlichen Grundbedürfnissen des Menschen. Die wiederkehrende Empfindung von Hunger und Sättigung veranlasst die Aufnahme von Nahrung oder bewirkt die Beendigung der Nahrungszufuhr.

Die Regulation der Nahrungsaufnahme ist ein komplexer physiologischer Vorgang, der von Variablen wie Emotionen, sozialen Faktoren, Tageszeiten, aber auch von körperinternen Regulationsmechanismen beeinflusst wird. Das körpereigene Regulationssystem ist durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher Botenstoffe charakterisiert. Diese Botenstoffe wirken unter anderem auf der Ebene der *Brain-Gut*-Achse regulierend auf die Nahrungsaufnahme. Während die Verdauung und Absorption von Nährstoffen im Gastrointestinaltrakt stattfinden, hat das Gefühl von Hunger und Sättigung seinen Ursprung im zentralen Nervensystem (ZNS) (Chaudhri, Salem et al. 2008). Der Hypothalamus und der Hirnstamm erhalten kontinuierlich über humorale und neuronale Wege Informationen über die Energiehomöostase aus der Peripherie des Körpers (Chaudhri, Salem et al. 2008; Machleidt und Lehnert 2011).

Während der Nahrungsaufnahme schüttet der Gastrointestinaltrakt Botenstoffe aus, die ihre Wirkung direkt an ihrem Sekretionsort entfalten und über vagale Afferenzen sowie über die Bluthirnschranke an der Sättigungsregulation im Gehirn beteiligt sind. Einer dieser gastrointestinalen Botenstoffe ist das Peptidhormon Cholezystokinin (CCK).

Neben den auf die kurzfristige Nahrungsregulation wirkenden Sättigungssignalen gibt es auch die aus der Peripherie stammenden Adipositassignale, wie Leptin und Insulin, die maßgeblich in der langfristigen Regulation der Nahrungszufuhr eine Rolle spielen.

Im Folgenden wird ein Überblick der an der Nahrungsregulation beteiligten Hirnregionen und Botenstoffen gegeben. Hierbei wird im Speziellen auf den hypothalamischen *Nucleus arcuatus* (ARC) und *Nucleus paraventricularis* (PVN), den im Hirnstamm gelegenen *Nucleus tractus solitarius* (NTS), das gastrointestinale Peptid CCK und die Neuropeptide *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART), *Corticotropin-releasing factor* (CRF) sowie Oxytocin eingegangen, da diese Hauptgegenstand der Versuche sind. Darauf folgt eine Erläuterung des verwendeten Markers für neuronale Aktivierung, c-Fos, und schließlich die Fragestellung und Zielsetzung.

1.2 Die zentrale Nahrungsregulation im Hypothalamus und Hirnstamm

Der Hypothalamus und der Hirnstamm stellen die beiden Hauptzentren der Regulation der Nahrungsaufnahme im Gehirn dar (Murphy und Bloom 2006). Phylogenetisch zählt der Hypothalamus zu den ältesten Hirnstrukturen und zeichnet sich durch die Regulation fundamentaler biologischer Prozesse wie beispielsweise der Nahrungsaufnahme aus (Chaudhri, Salem et al. 2008). Im Hirnstamm findet die Integration endokriner und neuronaler Signale der Nahrungsregulation statt (Chaudhri, Salem et al. 2008).

Die orale Aufnahme von Nahrung bewirkt während der Passage des Magendarmtraktes eine mechanische und chemische Stimulation des Magens und Darms sowie eine Ausschüttung regulatorisch wirkender Peptide. Eine inhibitorische Wirkung auf die Nahrungsaufnahme zeigt hierbei unter anderem die Dehnung des Magens (Anand und Pillai 1967). Auch die Ausschüttung von Botenstoffen, wie beispielsweise die Freisetzung von Leptin aus der Magenschleimhaut und den Adipozyten, CCK aus dem Dünndarm oder *Glucagon-like-peptide*, Oxyntomodulin und Peptid YY aus dem Ileum und Kolon hemmen die weitere Aufnahme von Nahrung (Gibbs, Young et al. 1973; Tatemoto und Mutt 1980; Schjoldager, Mortensen et al. 1989; Campfield, Smith et al. 1995; Herrmann, Goke et al. 1995). Insulin sowie das pankreatische Polypeptid (PP) wirken ebenfalls anorexigen (Malaisse-Lagae, Carpentier et al. 1977; Pocai, Lam et al. 2005). Die Botenstoffe aus dem Magendarmtrakt gelangen über den *Nervus vagus* (N.vagus) oder die Bluthirnschranke zum Hypothalamus und Hirnstamm, den zentralen Orten der Nahrungsregulation (Baura, Foster et al. 1993; Day, McKnight et al. 1994).

In dem im Hirnstamm gelegenen NTS werden die sensorischen Informationen aus dem gesamten Gastrointestinaltrakt mit den neuronalen Antworten des Hypothalamus integriert (Schwartz, Woods et al. 2000; Berthoud, Sutton et al. 2006). Der NTS weist reziproke neuronale Verbindungen zum PVN und ARC auf (Ricardo und Koh 1978; Ter Horst, de Boer et al. 1989). Im Kerngebiet des ARC werden die im Blut zirkulierenden Adipositassignale Leptin und Insulin in eine neuronale Antwort umgewandelt (Schwartz, Woods et al. 2000): Leptin steigert in den Neuronen des ARC die Expression der mRNA der anorexigenen Peptide CART und Proopiomelanocortin (POMC) (Schwartz, Seeley et al. 1997; Kristensen, Judge et al. 1998). Hingegen wird die mRNA-Expression der orexigenen Botenstoffe Neuropeptid Y (NPY) und *Agouti-related protein* (AgRP) in den Neuronen des ARC durch Leptin und Insulin gehemmt (Sipols, Baskin et al. 1995;

Einleitung

Schwartz, Baskin et al. 1996; Arvaniti, Huang et al. 2001). Die Axone der POMC/CART- und NPY/AGRP-Neuronen des ARC projizieren zum PVN, in das perifornikale Gebiet (PFA) sowie in den lateralen Hypothalamus (LH) (Bai, Yamano et al. 1985; Baker und Herkenham 1995). Während eine Stimulierung des PVN die Nahrungsaufnahme inhibiert, bewirkt die Stimulation des perifornikalen Gebietes oder des lateralen Hypothalamus das Gegenteil (Stanley, Willett et al. 1993). Die Neuronen des PVN und des lateralen Hypothalamus projizieren wiederum zu den Kerngebieten des ARC und NTS (Ter Horst, de Boer et al. 1989; Olson, Hoffman et al. 1992). Die neuronalen Projektionen aus dem PVN zum NTS unterstützen hierbei katabole Stoffwechselprozesse sowie eine Beendigung der Nahrungsaufnahme (Schwartz, Woods et al. 2000). Der anabole Stoffwechsel wird durch Projektionen des lateralen Hypothalamus zum NTS begünstigt (Schwartz, Woods et al. 2000). Die vagalen Efferenzen des NTS wirken schließlich direkt auf den Gastrointestinaltrakt (Abbildung 1.1), (Kalia und Mesulam 1980; Berthoud 2002).

Studien zeigten, dass Sättigungsfaktoren wie CCK auch eine Beendigung der Nahrungsaufnahme bewirken, wenn alle neuronalen Verbindungen zwischen dem Hirnstamm und Vorderhirn getrennt sind (Grill und Smith 1988). Die grundlegende Regulation der Nahrungsaufnahme kann also auch ohne den Einfluss des Hypothalamus stattfinden (Schwartz, Woods et al. 2000).

Einleitung

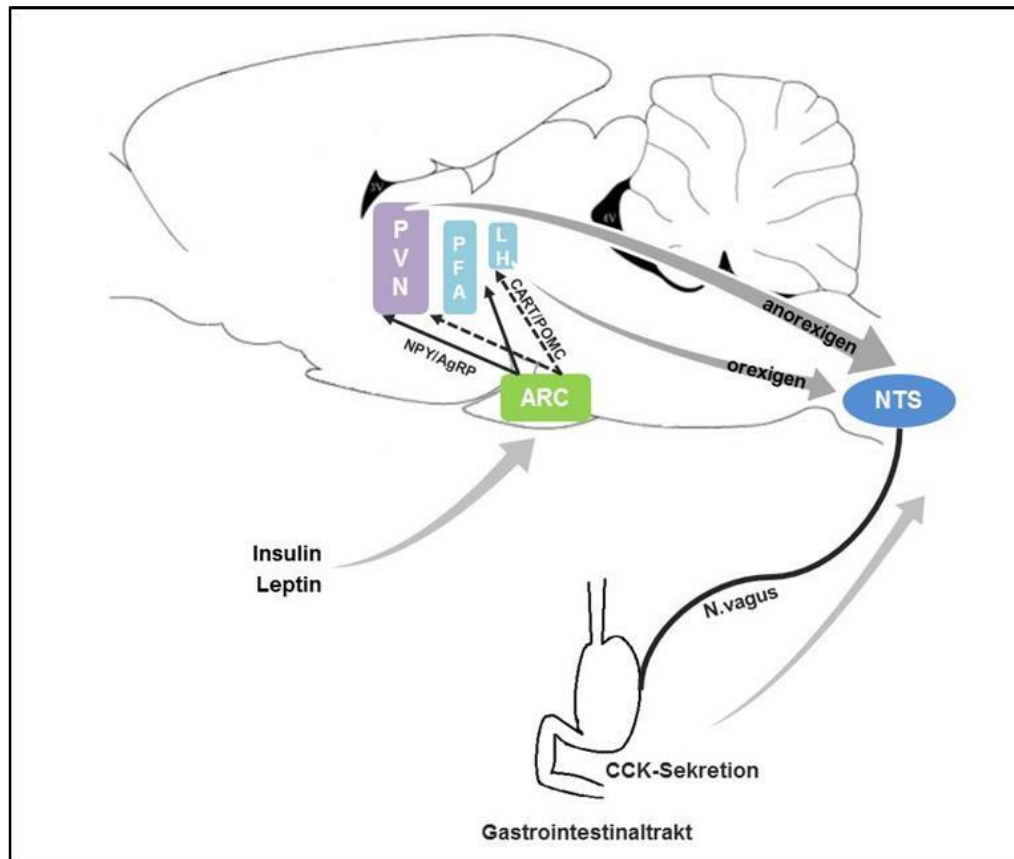


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hauptsignalwege in der Regulation der Sättigung.

Die Adipositasignale Leptin und Insulin erreichen über die Blut-Hirnschranke den ARC (Schwartz, Woods et al. 2000). Dort stimulieren die beiden Hormone orexigene Signalwege über die CART- und POMC-Neuronengruppe (Schwartz, Seeley et al. 1997; Kristensen, Judge et al. 1998). Die anabolen Signalwege der NPY- und AgRP-Neuronen des ARC werden durch Insulin und Leptin inhibiert (Sipols, Baskin et al. 1995; Schwartz, Baskin et al. 1996; Arvaniti, Huang et al. 2001).

Der ARC projiziert in den PVN, in das PFA und in den LH (Bai, Yamano et al. 1985; Baker und Herkenham 1995). Die Stimulierung des PFA und des LH begünstigen katabole Projektionen zum NTS. Hingegen wirkt eine Stimulierung des PVN über anorexigene Projektionen auf den NTS (Stanley, Willett et al. 1993). Der N.vagus übermittelt die Sättigungssignale des Gastrointestinaltraktes (u.a. mechanische und chemische Stimulation, zum Beispiel via Cholezystokinin) in den im Hirnstamm gelegenen NTS (Day, McKnight et al. 1994; Rinaman und Schwartz 2004). Im NTS findet die Integration der gastrointestinalen Informationen mit denen des Hypothalamus statt (Schwartz, Woods et al. 2000; Berthoud, Sutton et al. 2006). Die anorexigenen und orexigenen Effekte des NTS übertragen vagale Efferenzen in den Gastrointestinaltrakt (Kalia und Mesulam 1980; Berthoud 2002). ARC = *Nucleus arcuatus*, AgRP = *Agouti-related protein*, CART = *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*, CCK = Cholezystokinin, LH = lateraler Hypothalamus, NTS = *Nucleus tractus solitarius*, NPY = Neuropeptid Y, N.vagus = *Nervus vagus*, PFA = perifornikales Gebiet, POMC = Proopiomelanocortin, PVN = *Nucleus paraventricularis*. Die gezeigte Abbildung ist an die Arbeit von Schwartz et al. angelehnt (Schwartz, Woods et al. 2000). Die Darstellung des Sagittalschnitts des Rattenhirns wurde dem Atlas von Paxinos und Watson entnommen (Paxinos und Watson 1997).

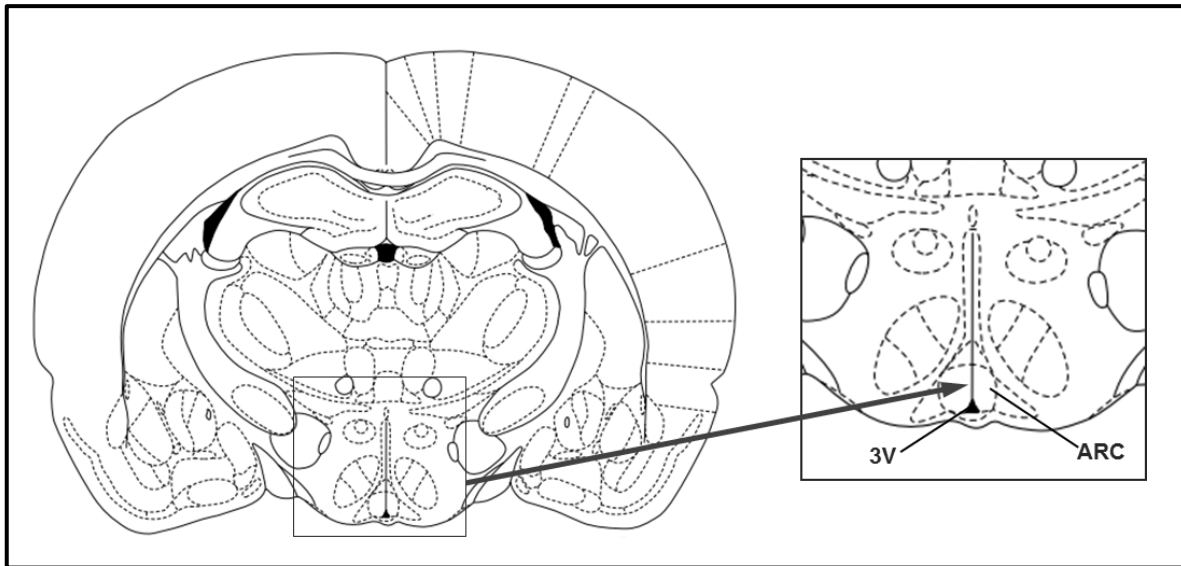


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung des ARC im Rattenhirn.

Dargestellt ist ein Koronarschnitt (Interaural 6,7 mm, Bregma -2,3mm). Die Pfeilspitze weist in der Vergrößerung auf den Bereich des ARC. 3V = Dritter Hirnventrikel, ARC = *Nucleus arcuatus*. Die Abbildung wurde aus dem Atlas von Paxinos und Watson entnommen (Paxinos und Watson 1997).

1.2.1 Der *Nucleus arcuatus*

Das Kerngebiet des *Nucleus arcuatus* (ARC) wird zu der mittleren Hirngruppe des Hypothalamus gezählt (Abbildung 1.2). Der ARC spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme, indem er an der Integration von neuronalen und endokrinen nahrungsregulatorischen Signalen aus dem Blut beteiligt ist (Rosas-Arellano, Solano-Flores et al. 1996; Chaudhri, Salem et al. 2008). Neuronale Verbindungen unterhält der ARC mit dem PVN, dem NTS, dem *Nucleus dorsomedialis hypothalamus* sowie mit dem lateralen und ventromedialen Hypothalamus (Ricardo und Koh 1978; Bai, Yamano et al. 1985; Chronwall, DiMaggio et al. 1985). Die im Blut zirkulierenden nahrungsregulatorischen Faktoren können den ARC durch die anatomische Nähe zu der stark vaskularisierten *Eminentia mediana* und der dortigen Blut-Hirn-Schranke erreichen (Chaudhri, Salem et al. 2008).

Im ARC sind zwei Neuronen-Subpopulationen vertreten: Die erste Gruppe ist gekennzeichnet durch eine gleichzeitige Expressierung von CART und POMC, wovon Letzteres in das anorexigene α -MSH, in das Adrenocorticotrope Hormon (ACTH) und in Endorphine gespalten wird (Elias, Lee et al. 1998). Die CART/POMC-Neurone werden durch Insulin und Leptin aktiviert und fördern die Aktivierung kataboler Stoffwechselprozesse (Elias, Lee et al. 1998; Schwartz, Woods et al. 2000). Die zweite

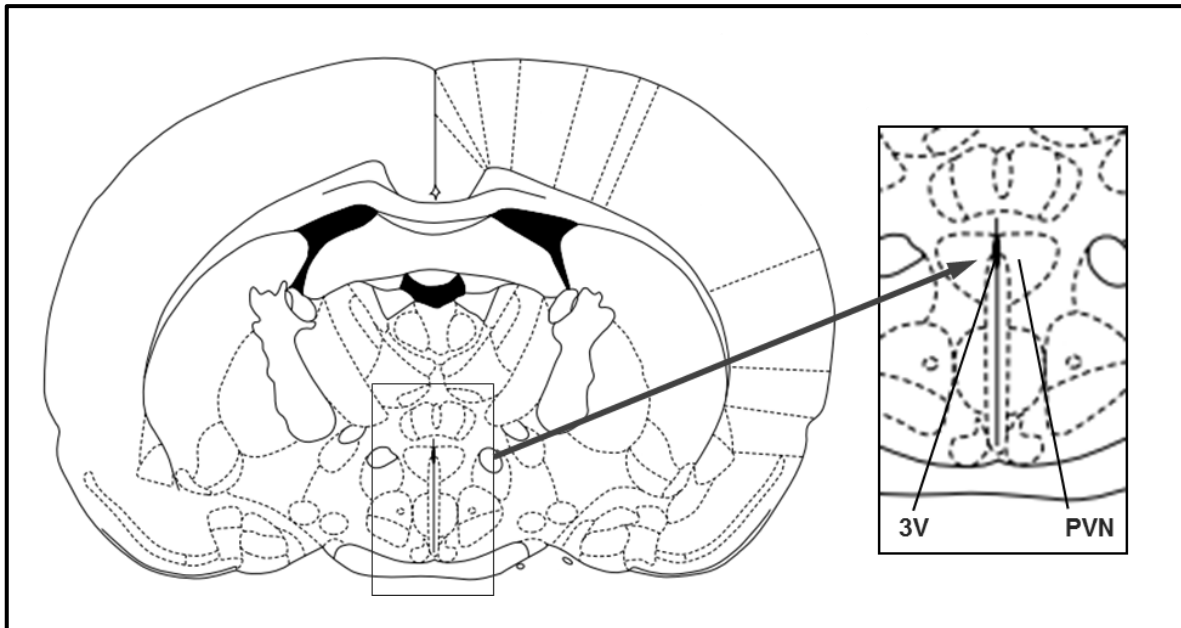


Abbildung 1.3: Darstellung des PVN im Rattenhirn.

Schematische Abbildung eines Koronalschnitts (interaaural 7,6 mm, Bregma -1,4 mm). In der vergrößerten Darstellung markiert die Pfeilspitze den Bereich des PVN. 3V = Dritter Hirnventrikel, PVN = *Nucleus paraventricularis*. Die Abbildung wurde aus dem Atlas von Paxinos und Watson entnommen (Paxinos und Watson 1997).

Neuronengruppe des ARC ist durch eine Kolo-kalisation von NPY mit AgRP charakterisiert und wirkt stimulierend auf die Nahrungsaufnahme (Stanley, Kyrkouli et al. 1986; Shutter, Graham et al. 1997; Krashes, Koda et al. 2011). Insulin und Leptin hemmen die Aktivierung dieser Neuronengruppe (Sipols, Baskin et al. 1995; Schwartz, Baskin et al. 1996).

1.2.2 Der *Nucleus paraventricularis*

Der *Nucleus paraventricularis* (PVN) liegt an der basalen Seitenwand des dritten Hirnventrikels in der vorderen Kerngruppe des Hypothalamus (Abbildung 1.3). Das paraventriculäre Kerngebiet ist beteiligt an der Kreislauf- und Thermoregulation sowie an der Regulation der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinde-Achse (HHN-Achse) (Kannan, Hayashida et al. 1989; Leibowitz, Diaz et al. 1989; Amir 1990).

Der PVN spielt auch eine Rolle in der Nahrungsregulation: Studien zeigten, dass eine Verletzung des PVN zu einer gesteigerten Nahrungszufuhr und Adipositas führt (Leibowitz, Hammer et al. 1981). Mikroinjektionen von orexigenen Peptiden in den PVN, wie beispielsweise NPY, fördern die Zufuhr von Nahrung (Stanley, Chin et al. 1985). Hingegen bewirkt die gezielte Injektion von anorexigenen Peptiden, wie zum Beispiel

Einleitung

Corticotropin-releasing factor (CRF), eine Hemmung der Nahrungsaufnahme (Krahn, Gosnell et al. 1988).

Das Kerngebiet des PVN besteht aus einem magnozellulären und einem parvozellulären Anteil. Die Neuronen des magnozellulären Anteils enthalten hauptsächlich Oxytocin und Vasopressin (Swaab, Pool et al. 1975). Projektionen aus dem magnozellulären Subnucleus des PVN in die Neurohypophyse und *Eminentia mediana* wurden nachgewiesen (Laqueur 1954; Antunes, Carmel et al. 1977). Der parvozelluläre Anteil projiziert ebenfalls in die *Eminentia mediana* (Armstrong und Hatton 1980). Die Neuronen des parvozellulären Anteiles enthalten eine Reihe unterschiedlicher Neurotransmitter: Angiotensin II, Atriales natriuretisches Peptid, Bombesin, Vasopressin, CART, CCK, CRF, *Growth hormone-releasing hormone*, γ -Aminobuttersäure, Somatostatin und *Thyreotropin-releasing hormone* (Dierickx und Vandesande 1979; Kilcoyne, Hoffman et al. 1980; Lechan und Jackson 1982; Panula, Yang et al. 1982; Palkovits, Kiss et al. 1984; Sawchenko, Swanson et al. 1984; Zamir, Skofitsch et al. 1986; Bruhn, Anthony et al. 1987; Meister, Hokfelt et al. 1988; Broberger, Johansen et al. 1998). Efferenzen aus dem PVN bestehen neben anderen zum NTS, zum ARC, zur *Area postrema* (AP) und zu sympathischen präganglionären Neuronen des Rückenmarks (Shapiro und Miselis 1985; Onai, Takayama et al. 1987; Ter Horst und Luiten 1987; Hosoya, Sugiura et al. 1991). Afferenzen erhält der PVN unter anderem aus dem *Locus coeruleus*, dem NTS, dem ARC und aus der Amygdala (Ricardo und Koh 1978; Pittman, Blume et al. 1981; Silverman, Hoffman et al. 1981; Sawchenko und Swanson 1982).

1.2.3 Der *Nucleus tractus solitarius*

Der *Nucleus tractus solitarius* (NTS) ist ein im kaudalen Hirnstamm gelegenes Kerngebiet des dorsal vagalen Komplexes (DVC), der sich neben dem NTS aus der AP und dem *Nucleus dorsalis nervi vagi* zusammensetzt (Suzuki, Simpson et al. 2010), (Abbildung 1.4). Der NTS dient als integrative Einheit für Informationen aus Arealen mehrerer Hirnnerven, dem gastrointestinalen Trakt, dem respiratorischen und kardiovaskulären System (Saper 2004).

Im NTS enden die viszerosensiblen Fasern des N.vagus, die Informationen über die Sensibilität der Atemwege, der Barorezeptoren der Aorta und des *Sinus caroticus*, des Ösophagus und des Gastrointestinaltraktes vermitteln (Gabriel und Seller 1970; von Euler, Hayward et al. 1973; Fryszak, Zenker et al. 1984). Außerdem erhält der NTS

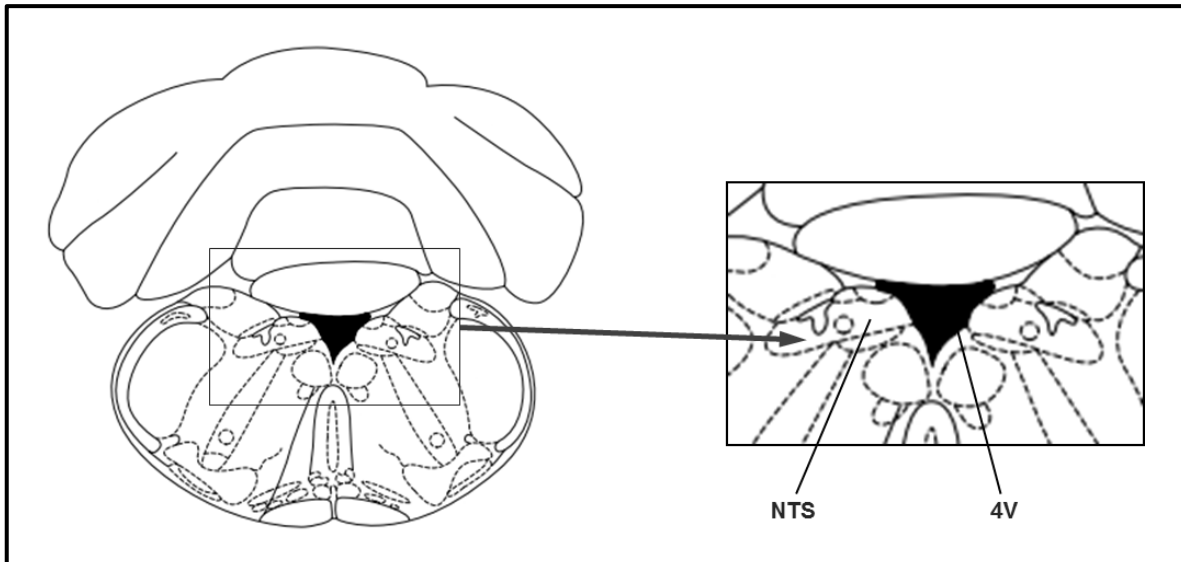


Abbildung 1.4: Veranschaulichung des NTS im Rattenhirn.

Darstellung eines Koronalschnitts (Interaural -4,3 mm, Bregma -13,3 mm). Das Kerngebiet des NTS wird in der vergrößerten Abbildung durch den Pfeil markiert. 4V = Vierter Hirnventrikel, NTS = *Nucleus tractus solitarius*. Die Abbildung wurde aus dem Atlas von Paxinos und Watson entnommen (Paxinos und Watson 1997).

primäre viszerale Afferenzen und Signale aus den glossopharyngealen-, trigeminalen-, fazialen- und spinal-afferenten Systemen (Beckstead und Norgren 1979; Menetrey und Basbaum 1987).

Der kaudal-mediale Anteil des NTS enthält fenestrierte Kapillaren (Gross, Wall et al. 1990). Die Fenestrierung der Kapillaren ermöglicht, dass Faktoren aus dem Blut, wie Hormone oder Zytokine, den Hirnstamm erreichen (Cunningham, Miselis et al. 1994). Efferenzen des NTS innervieren autonome präganglionäre Neurone, wie den *Nucleus dorsalis nervi vagi*, den *Nucleus ambiguus* und die *Formatio reticularis* (Loewy und Burton 1978; Ricardo und Koh 1978; Dobbins und Feldman 1994). Der NTS projiziert ebenfalls zu Kerngebieten des Hypothalamus, wie beispielsweise dem PVN und ARC (Ricardo und Koh 1978; Saper 2004).

1.3 Die nahrungsregulierenden Botenstoffe

Die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligten Botenstoffe werden an unterschiedlichen Orten im Körper synthetisiert und sezerniert. Die zentralen oder neurogenen Signalstoffe sind im ZNS lokalisiert. Die peripheren Botenstoffe stammen partiell aus dem Verdauungstrakt und gelangen direkt über die Bluthirnschranke oder

indirekt über vagale Afferenzen in das ZNS und können dort mit zentralen Peptiden interagieren.

Die nahrungsregulierenden Mediatoren können orexigen wirken, indem sie die Nahrungsaufnahme über die Empfindung „Hunger“ stimulieren. Das Einsetzen des Sättigungsgefühls mit dem Ziel der Beendigung der Nahrungsaufnahme wird hingegen durch anorexigene Botenstoffe vermittelt.

1.3.1 Die peripheren nahrungsregulierenden Botenstoffe

Die nahrungsregulierenden Botenstoffe aus der Peripherie wirken alle, mit Ausnahme von Ghrelin, hemmend auf die Nahrungsaufnahme. In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten peripheren Botenstoffe, deren Wirkung in Bezug auf die Nahrungsaufnahme, der jeweilige Syntheseort und die Art der Wirkungsvermittlung aufgeführt.

Tabelle 1.1: Übersicht der wichtigsten peripheren Botenstoffe, die an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind.

Botenstoff	Wirkung	Syntheseort	Wirkungs- vermittlung	Referenzen
Amylin	anorexigen	β-Zellen des Pankreas	humoral	(Asai, Nakazato et al. 1989; Chance, Balasubramaniam et al. 1993)
Cholezystokinin (CCK)	anorexigen	I-Zellen des Dünndarms	vagal	(Antin, Gibbs et al. 1975; Buffa, Solcia et al. 1976; Smith, Jerome et al. 1981)
Ghrelin	orexigen	Magen	vagal	(Kojima, Hosoda et al. 1999; Tschop, Smiley et al. 2000; Date, Murakami et al. 2002)
Glucagon	anorexigen	α-Zellen des Pankreas	humoral	(Schulman, Carleton et al. 1957; Inokuchi, Oomura et al. 1984)
Glucagon-like-peptide-1 (GLP-1)	anorexigen	L-Zellen des Darms	humoral, vagal	(Herrmann, Goke et al. 1995; Turton, O'Shea et al. 1996; Imeryuz, Yegen et al. 1997)
Insulin	anorexigen	β-Zellen des Pankreas	humoral, vagal	(Houssay, Foglia et al. 1942; Baura, Foster et al. 1993; Poci, Lam et al. 2005)

Einleitung

Botenstoff	Wirkung	Syntheseort	Wirkungs- vermittlung	Referenzen
Leptin	anorexigen	Adipozyten	humoral	(Campfield, Smith et al. 1995; MacDougald, Hwang et al. 1995; Hileman, Pierroz et al. 2002)
Oxyntomodulin (OXM)	anorexigen	L-Zellen des Darms	humoral	(Schjoldager, Mortensen et al. 1989; Le Quellec, Kervran et al. 1992; Dakin, Gunn et al. 2001; Cohen, Ellis et al. 2003)
Pankreatisches Polypeptid (PP)	anorexigen	PP-Zellen des Pankreas	humoral, vagal	(Malaisse-Lagae, Carpentier et al. 1977; Asakawa, Inui et al. 2003)
Peptid YY 3-36 (PYY)	anorexigen	L-Zellen des Darms	humoral, vagal	(Tatemoto und Mutt 1980; Batterham, Cowley et al. 2002; Nonaka, Shioda et al. 2003; Koda, Date et al. 2005)

1.3.1.1 Das Peptidhormon Cholezystokinin

1.3.1.1.1 Die Entdeckung von Cholezystokinin

Im Jahre 1928 wurde Cholezystokinin (CCK) erstmalig von den Forschern Ivy und Oldberg entdeckt. Die beiden Wissenschaftler beobachteten, dass eine Infusion aus Extrakten der oberen intestinalen Mukosa bei Hunden zu einer Kontraktion der Gallenblase führte (Ivy und Oldberg 1928). In den Anfängen der siebziger Jahre fanden Gibbs et al. heraus, dass eine intraperitoneale Injektion von CCK bei Ratten die Nahrungsaufnahme vermindert (Gibbs, Young et al. 1973; Gibbs, Falasco et al. 1976). Darauf folgende Studien zeigten, dass CCK die Größe und Dauer jeder einzelnen Mahlzeit reduziert, aber auch die Frequenz der Nahrungsaufnahme steigert (Antin, Gibbs et al. 1975; West, Fey et al. 1984).

1.3.1.1.2 Die molekulare Struktur des Cholezystokinin

CCK ist ein Peptidhormon, das sich aus dem 115 Aminosäuren langen Präkursor-Molekül Präprocholezystokinin ableitet (Deschenes, Lorenz et al. 1984; Chaudhri, Salem et al. 2008). Im menschlichen Genom befindet sich das CCK-Gen auf Chromosom 3 (Lund, Geurts van Kessel et al. 1986). Das Präkursor-Molekül wird durch

gewebsspezifische posttranslationale und extrazelluläre Prozessierung in Fragmente unterschiedlicher Länge gespalten (Rehfeld 1985). Längerkettige Formen, wie CCK-22, CCK-33 und CCK-58 konnten vorwiegend im Darm und Plasma nachgewiesen werden (Eng, Du et al. 1984; Izzo, Brugge et al. 1984; Eysselein, Eberlein et al. 1987; Rehfeld, Sun et al. 2001). Das sulfatierte Cholezystokinin-Oktapeptid (CCK-8S) wurde vor allem in Neuronen nachgewiesen (Dockray 1980). CCK-8S wird von dem sulfatierten C-terminalen Ende des Präprocholezystokinins abgespalten und setzt sich aus der folgenden Aminosäuresequenz zusammen: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (Dockray 1980; Deschenes, Lorenz et al. 1984). Die Aminopeptidase-A und die Tripeptidylpeptidase-II spalten und inaktivieren CCK-8S (Migaud, Durieux et al. 1996; Rose, Vargas et al. 1996). In Forschungsarbeiten zur Regulation der Nahrungsaufnahme wird vorwiegend das kurzkettige CCK-8S verwendet (Day, McKnight et al. 1994; Barrachina, Martinez et al. 1997; Kobelt, Tebbe et al. 2005).

1.3.1.1.3 Die Wirkung von Cholezystokinin auf die Nahrungsaufnahme

Nach der Aufnahme von Nahrung, die reich an Proteinen oder an Fettsäuren mit einer Länge von mehr als 12 C-Atomen ist, wird CCK durch die I-Typ-Zellen des oberen Dünndarms endokrin in das Blut und parakrin in die Umgebung sezerniert (McLaughlin, Grazia Luca et al. 1999; Dockray 2009). Die Ausschüttung des Hormons stimuliert die Sekretion von Pankreasenzymen, die Kontraktion der Gallenblase und die intestinale Peristaltik (Gutierrez, Chey et al. 1974; Anagnostides, Chadwick et al. 1985). Eine inhibitorische Wirkung zeigt CCK auf die Magenentleerung, die Säuresekretion des Magens sowie die weitere Nahrungsaufnahme (Chen, Zhao et al. 2004). CCK wirkt hierbei zum einen direkt, indem das Peptidhormon die pankreatischen Azinuszellen und die glatten Muskelzellen des Magens aktiviert. Zum anderen bewirkt CCK indirekt über eine Stimulation afferenter vagaler Neuronen eine Ausschüttung von Pankreasenzymen, eine Kontraktion der glatten Muskulatur des Magens und die Inhibierung der weiteren Nahrungsaufnahme (Forster, Green et al. 1990; Li und Owyang 1994). Die Ausschüttung von CCK schafft somit ideale Bedingungen für die Verdauung von Fetten und Proteinen (Dockray 2009).

CCK hat im menschlichen Körper eine basale Konzentration von 1 pmol/Liter und eine Plasma-Halbwertszeit von wenigen Minuten (Liddle, Goldfine et al. 1985). Eine Gabe von CCK 30 Minuten vor Nahrungsbeginn zeigt keinen Einfluss auf die folgende Nahrungsaufnahme (Gibbs, Young et al. 1973). Unmittelbar nach der Nahrungszufuhr

steigt das CCK-Level an und erreicht nach etwa 15 Minuten seinen Maximalwert (Liddle, Goldfine et al. 1985). Die Wissenschaftler Crawley und Beinfeld fanden im Jahre 1983 heraus, dass die anorexigene Wirkung des Hormons bei einer kontinuierlichen intraperitonealen Applikation innerhalb weniger Stunden ausbleibt (Crawley und Beinfeld 1983). Eine täglich mehrmalige intraperitoneale Gabe von CCK-8S reduziert die unmittelbar folgende Nahrungsaufnahme, jedoch wird dieser Effekt durch eine gesteigerte Zufuhr an Nahrung jeweils zwischen den Injektionen kompensiert (West, Fey et al. 1984; West, Greenwood et al. 1987). Aus diesen Gründen ist CCK-8S zur therapeutischen Behandlung von Adipositas und anderen Essstörungen nicht einsetzbar.

1.3.1.1.4 Die Cholezystokinin-Rezeptoren

Das Peptidhormon CCK entfaltet seine Wirkung über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren CCK-1 (früher CCK-A für *alimentary*) und CCK-2 (früher CCK-B für *brain*). Während der CCK-1-Rezeptor vor allem im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden kann, ist der CCK-2-Rezeptor hauptsächlich im ZNS lokalisiert (Wank 1995).

DNA-Analysen des CCK-2-Rezeptors ergaben, dass der Rezeptor identisch mit dem Rezeptor für Gastrin ist (Pisegna, de Weerth et al. 1992). Der CCK-1-Rezeptor wurde neben seiner hauptsächlich Lokalisierung im Gastrointestinaltrakt auch in der AP, im NTS sowie im Hypothalamus nachgewiesen (van Dijk, Richards et al. 1984; Hill, Campbell et al. 1987).

Die Effekte auf die Gallenblasenkontraktilität, Sekretion und Motilität des Magendarmtraktes werden vornehmlich über den CCK-1-Rezeptor vermittelt (Chen, Zhao et al. 2004). Studien zeigen, dass die Gabe von CCK-1-Rezeptor-Antagonisten die inhibierende Wirkung von CCK auf die Nahrungsaufnahme reduzieren (Silver, Flood et al. 1989).

1.3.1.1.5 Die nervale Informationsvermittlung von Cholezystokinin

Der X. Hirnnerv stellt die größte neuroanatomische Verbindung zwischen dem Magendarmtrakt und dem Gehirn dar. Auf den afferenten Neuronen des N.vagus werden CCK-1- und CCK-2-Rezeptoren exprimiert (Corp, McQuade et al. 1993). Die terminalen Nervenendigungen sind in der *Tunica mucosa* nahe der enteroendokrinen Zellen und in der *Tunica muscularis* des Gastrointestinaltraktes lokalisiert (Raybould 2007; Dockray 2009). Die vagalen Nerven projizieren zur AP und zum NTS, die im DVC

im Hirnstamm lokalisiert sind (Rinaman und Schwartz 2004). Eine Vagotomie, die Gabe von CCK-1-Rezeptor-Antagonisten oder eine nervale Capsaicin-Behandlung schwächen den inhibitorischen Effekt von CCK auf die Nahrungsaufnahme ab (Smith, Jerome et al. 1981; Ritter und Ladenheim 1985; Day, McKnight et al. 1994).

Die Wirkung von CCK auf die Nahrungsaufnahme wird neben dem N.vagus auch durch die *Nervi splanchnici* vermittelt (Brown, Washington et al. 2011). In einer Studie führten die Wissenschaftler Brown et al eine Ganglionektomie der zwischen der *Arteria mesenterica superior* und *Arteria caecalis* gelegenen Ganglien durch. Hierdurch wurden die dort entlang führenden spinalen Afferenzen der *Nervi splanchnici* unterbunden. Die Untersuchungen ergaben, dass die intraperitoneale Gabe von CCK-8S in der Gruppe der Tiere mit zöliako-mesenterialer Ganglionektomie im Vergleich zu den lediglich zum Schein operierten Tieren zu einer Abschwächung der Wirkung des CCK-8S führt: Die Mahlzeitgröße nahm zu und die Intervalle zwischen den Mahlzeiten verkürzten sich (Brown, Washington et al. 2011).

1.3.1.1.6 Das zentrale Nervensystem als Wirkungsort des Cholezystokinin

CCK ist eines der am reichlichsten vorkommenden Neuropeptide im Gehirn. Die Hauptdetektionsorte von CCK sind der *Nucleus caudatus*, der Kortex, der Hippocampus, die *Eminentia mediana* und der Hypothalamus (Beinfeld, Meyer et al. 1981; Crawley 1985). Innerhalb des Hypothalamus konnte CCK unter anderem auch im PVN und ARC nachgewiesen werden (Beinfeld, Meyer et al. 1981; Crawley 1985). Studien belegen eine Kolokalisierung mit Neurotransmittern wie γ -Aminobuttersäure, Dopamin, Serotonin, dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP) oder dem Endocannabinoid-System (Hokfelt, Rehfeld et al. 1980; van der Kooy, Hunt et al. 1981; Hendry, Jones et al. 1983; Kosaka, Kosaka et al. 1985; Nunzi, Gorio et al. 1985; Katona, Sperlagh et al. 1999).

Eine intraperitoneale Injektion von CCK induziert eine Aktivierung von Neuronen in verschiedenen Hirnarealen. Studien wiesen nach der peripheren Injektion von CCK-8S als Korrelat der neuronalen Aktivierung eine gesteigerte Anzahl c-Fos-immunreaktiver (-ir) Neurone (siehe 1.4) unter anderem im PVN, NTS und der AP nach (Day, McKnight et al. 1994; Wang, Martinez et al. 1998). Weiterführende Studien stellten eine Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone auch in den Arealen des *Locus coeruleus* und des dorsomedialen Hypothalamus nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S fest (Mönnikes, Lauer et al. 1997 a; Kobelt, Paulitsch et al. 2006; Noetzel, Stengel et al.

2009). Mönnikes et al. konnten zudem zeigen, dass die endokrine Sekretion von CCK nach der Nahrungsaufnahme ebenfalls eine Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone in den Kerngebieten des PVN, des NTS, der AP und des *Locus coeruleus* induziert (Mönnikes, Lauer et al. 1997 b).

1.3.1.1.7 Die weiteren Funktionen des Cholezystokinin

Neben den oben genannten Wirkungen von CCK auf die Nahrungsregulation hat das Peptid auch Einfluss auf die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse): Eine intravenöse Injektion von CCK-8S bewirkt eine Steigerung der Konzentration von Kortikosteron und ACTH im Plasma (Kamilaris, Johnson et al. 1992). Das Peptidhormon ist zudem in die Steuerung vieler Verhaltensweisen involviert und nimmt unter anderem Einfluss auf das kognitive Gedächtnis, die Nozizeption, die Regulation des Schlafs, das Sexualverhalten und die Thermoregulation (Szelenyi 2010). Außerdem spielt CCK eine Rolle bei ZNS-Störungen wie Angst- und Panikattacken, Schizophrenie und Epilepsie (Crawley und Corwin 1994; Lee und Soltesz 2010). Eine Studie des Wissenschaftlers de Montigny zeigte, dass die intravenöse Injektion von CCK-4 in einer Dosis von 20-100 µg bei freiwilligen Probanden eine Panikattacke auslöst (de Montigny 1989).

1.3.2 Die zentralen nahrungsregulierende Botenstoffe

Mehrere zentrale Botenstoffe sind an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Die Botenstoffe wirken ebenfalls orexigen oder anorexigen auf die Nahrungsaufnahme. Die Tabelle 1.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten zentralen Peptide, die Einfluss auf die Nahrungsaufnahme nehmen.

Tabelle 1.2: Übersicht über die wichtigsten zentralen an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligten Peptide.

Botenstoff	Wirkung	Sekretionsort	Referenzen
<i>Agouti-related protein</i> (AgrP)	orexigen	ARC	(Broberger, Johansen et al. 1998)
<i>Cocaine- and amphetamine- regulated transcript</i> (CART)	orexigen, anorexigen	Hypothalamus	(Douglass, McKinzie et al. 1995; Abbott, Rossi et al. 2001)

Einleitung

Botenstoff	Wirkung	Sekretionsort	Referenzen
<i>Corticotropin-releasing factor (CRF)</i>	anorexigen	Hypothalamus	(Hashimoto, Ohno et al. 1982; Gosnell, Morley et al. 1983)
Galanin	orexigen	PVN	(Kyrkouli, Stanley et al. 1986; Kyrkouli, Stanley et al. 1990)
<i>Galanin-like Peptide</i>	anorexigen	ARC	(Larm und Gundlach 2000; Matsumoto, Watanabe et al. 2002)
<i>Melanin-Concentrating Hormone (MCH)</i>	orexigen	Perifornikales Gebiet, lateraler Hypothalamus	(Skofitsch, Jacobowitz et al. 1985; Qu, Ludwig et al. 1996)
<i>α-Melanocyte stimulating hormone (α-MSH)</i>	anorexigen	ARC, Hypophyse	(Panskepp, Reilly et al. 1976; Dube, Lissitzky et al. 1978)
Neuropeptid Y (NPY)	orexigen	ARC	(Clark, Kalra et al. 1984; Pelletier, Desy et al. 1984)
Nesfatin-1	anorexigen	Hypothalamus, Thalamus, Hirnstamm, limbisches System, Cortex	(Oh, Shimizu et al. 2006; Goebel-Stengel, Wang et al. 2011)
Proopiomelanocortin (POMC)	anorexigen	ARC, NTS, Adenohypophyse	(Civelli, Birnberg et al. 1982)
Orexin A/B	orexigen	Lateraler Hypothalamus, Thalamus, Hirnstamm, limbisches System, Cortex	(Sakurai, Amemiya et al. 1998; Nambu, Sakurai et al. 1999)
Oxytocin	anorexigen	PVN	(Swaab, Pool et al. 1975; Olson, Drutarosky et al. 1991 a)
Urocortin	anorexigen	<i>Nucleus Edinger-Westphal</i>	(Vaughan, Donaldson et al. 1995; Spina, Merlo-Pich et al. 1996; Kozicz, Yanaihara et al. 1998)

1.3.2.1 Der Neuromodulator *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*

Im Jahre 1995 fanden Douglass et al. eine spezielle mRNA, deren Expression durch die intrazerebroventrikuläre Injektion von Kokain oder Amphetamin gesteigert wurde. Sie nannten diese mRNA *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART) (Douglass, McKinzie et al. 1995).

Darauffolgende Studien ergaben, dass das menschliche CART-Gen zirka zwei Kilo-Basenpaare lang ist und sich auf Chromosom 5 befindet (Douglass und Daoud 1996). Die CART-mRNA kodiert für ein 116 Aminosäuren langes Peptid, das sowohl beim Mensch als auch bei Ratten vorkommt (Douglass, McKinzie et al. 1995; Douglass und Daoud 1996). Zusätzlich existiert bei Ratten eine aus 129 Aminosäuren bestehende Spleißvariante (Douglass, McKinzie et al. 1995). Nach der Abspaltung der Signalsequenz (27 Aminosäuren) entsteht die aus 89 Aminosäuren bestehende kurze Form des Propeptids (Mensch, Ratte) oder die 102 Aminosäuren lange Form (Ratte) (Douglass, McKinzie et al. 1995; Douglass und Daoud 1996). Die beiden Propeptide (proCART) werden gewebsspezifisch posttranslational wiederum zu zwei aktiven Formen prozessiert: Die lange Form wird in die beiden CART-Peptide CART 55-102 oder CART 62-102 und die kurze Form in CART 42-89 oder CART 49-89 modifiziert (Abbildung 1.5), (Thim, Kristensen et al. 1999; Rogge, Jones et al. 2008). Die Aminosäuresequenzen der beiden aktiven Formen des Menschen sind zu 95 % identisch mit den bei Ratten vorkommenden CART-Sequenzen (Douglass und Daoud 1996).

1.3.2.1.1 Die Lokalisation des CART-Peptids

Das CART-Peptid ist ein weitverbreiteter Neuromodulator, der im zentralen und peripheren Nervensystem, in endokrinen Zellen der Hypophyse, in der Nebenniere, in den Pankreasinseln, im Gastrointestinaltrakt und in der peripheren Blutzirkulation nachgewiesen wurde (Douglass, McKinzie et al. 1995; Couceyro, Koylu et al. 1997; Jensen, Kristensen et al. 1999). Im Gehirn synthetisieren folgende Gebiete CART-mRNA und CART-Peptid: der PVN, der *Nucleus supraopticus*, der laterale und ventromediale Hypothalamus, der *Nucleus dorsomedialis hypothalamus* und der ARC (Koylu, Couceyro et al. 1998; Vrang, Tang-Christensen et al. 1999). Auf zellulärer Ebene wird das CART-Peptid in Vesikeln von Nervenendigungen gespeichert (Smith, Koylu et al. 1997). Der Neuromodulator weist Verbindungen und Kolokalisationen mit sowohl anorexigenen als auch orexigenen Neuromodulatoren auf: Im Bereich des PVN

Einleitung

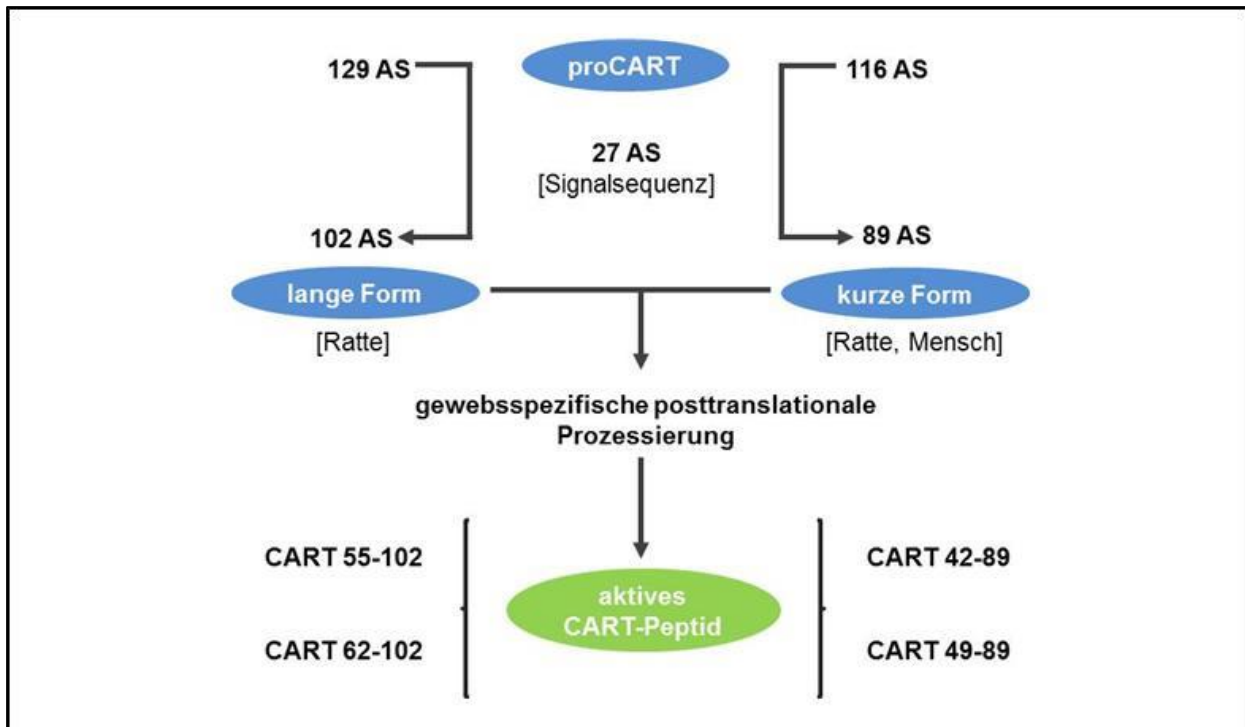


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der CART-Proteinsynthese.

Das 129 oder 116 Aminosäuren lange Propeptid (proCART) wird aus der CART-mRNA translatiert (Douglass, McKinzie et al. 1995; Douglass und Daoud 1996). Die Signalsequenz (27 Aminosäuren) wird abgespalten und es entsteht die kurze (89 Aminosäuren) beziehungsweise lange (102 Aminosäuren) Form des CART-Propeptids (Douglass, McKinzie et al. 1995; Douglass und Daoud 1996). Die beiden Formen des Propeptids werden gewebsspezifisch zu den aktiven CART-Peptiden prozessiert (Thim, Kristensen et al. 1999). Während die kurze Form zu CART 42-89 oder CART 49-89 modifiziert wird, wird aus der langen Form entweder CART 55-102 oder CART 62-102 gebildet (Thim, Kristensen et al. 1999; Rogge, Jones et al. 2008). AS = Aminosäuren, CART = *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*, proCART = *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*-Propeptid.

werden CART-Neurone von Nervenendigungen, die orexigenes NPY enthalten, umgeben (Lambert, Couceyro et al. 1998). Eine ultrastrukturelle Analyse zeigte axodendritische und axosomatische Verbindungen zwischen CART-ir und anorexigenen CRF-Neurone im PVN (Sarkar, Wittmann et al. 2004). Intraneuronal bestehen Kolokalisationen zwischen dem CART-Peptid und anorexigenen oder orexigenen Botenstoffen: Eine Kolokalisation mit anorexigenem α -MSH und POMC wurde im ARC nachgewiesen, im lateralen Hypothalamus jedoch mit orexigenem MCH (Elias, Lee et al. 1998; Broberger 1999). Im PVN konnten Kolokalisationen von CART-Peptid und anorexigenem Oxytocin gezeigt werden (Vrang, Larsen et al. 1999; Larsen, Seier et al.

2003). Einige wenige paraventriculäre CART-Neurone mit CRF-Kolokalisation stellten Larsen et al. in ihrer Studie fest (Larsen, Seier et al. 2003).

Bislang konnte noch kein CART-Rezeptor identifiziert werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass CART an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor bindet (Yermolaieva, Chen et al. 2001; Lakatos, Prinster et al. 2005).

1.3.2.1.2 Die Wirkung des CART-Peptids auf die Nahrungsaufnahme

Der Nachweis des CART-Peptides in den sättigungsregulierenden Hirngebieten legt eine Beteiligung an der Regulation der Nahrungsaufnahme nahe (Rogge, Jones et al. 2008).

Im Jahr 2001 wurde in einer Studie gezeigt, dass die intrazerebrale Injektion des CART-Peptides bei Nagern die Nahrungsaufnahme dosisabhängig hemmt (Asakawa, Inui et al. 2001). Nach einer Injektion von CART-Peptid in die *Cisterna magna* konnten Okumura et al. neben der gehemmten Nahrungsaufnahme eine Inhibition der Sekretion von Magensäure und der Magenentleerung beobachten (Okumura, Yamada et al. 2000). Die intrazerebrale Injektion von Antikörpern gegen das CART-Peptid bewirkt einen Anstieg der Nahrungsaufnahme bei Ratten (Kristensen, Judge et al. 1998; Lambert, Couceyro et al. 1998). Tiere, die vorübergehend keinen Zugang zu Nahrung haben, zeigen eine verminderte Expression der CART-mRNA im ARC (Kristensen, Judge et al. 1998). Hingegen bewirkte die intraperitoneale Injektion des Sättigungshormones Leptin eine vermehrte Expression der CART-mRNA in ebendiesem Hirngebiet (Kristensen, Judge et al. 1998). Eine kontinuierliche, über zehn Tage dauernde, intrazerebrale Injektion des CART-Peptids führte bei übergewichtigen und mageren Zucker-Ratten zu einer Gewichtsabnahme (Larsen, Vrang et al. 2000). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass CART ein endogener Inhibitor der Nahrungsaufnahme ist.

In einer Studie von Abbott et al. wurde jedoch gezeigt, dass die gezielte Injektion des CART-Peptids in bestimmte hypothalamische Kerngebiete, wie unter anderen auch in den ARC und PVN, zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führten und somit auch für eine orexigene Wirkung des CART-Peptids spricht (Abbott, Rossi et al. 2001).

1.3.2.1.3 Die weiteren Funktionen des CART-Peptids und der CART-mRNA

Das *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* erhielt seinen Namen auf Grund der Beobachtung, dass die Injektion von Kokain oder Amphetaminen zu einer

Einleitung

Hochregulierung des Gentranskriptes im *Corpus striatum* führte (Douglass, McKinzie et al. 1995). In folgenden Studien konnte auch eine Aktivierung von CART-Peptid enthaltenden Neuronen im *Nucleus accumbens* durch Psychostimulanzien wie dem Amphetamin 3,4-Methylendioxy-N-methylamphetamin (MDMA) oder Alkohol gezeigt werden (Salinas, Wilde et al. 2006; Jean, Conductier et al. 2007).

Des Weiteren ist CART an endokrinen Funktionen beteiligt. Die CART-mRNA wurde in allen drei Orten der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse detektiert und eine Beteiligung an der Ausschüttung der Hormone ACTH, Kortikosteron und Oxytocin wurde nachgewiesen (Koylu, Couceyro et al. 1997; Vrang, Larsen et al. 2000; Smith, Vaughan et al. 2004).

Die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse wird auch durch CART beeinflusst: In einer *in vitro*-Studie konnte gezeigt werden, dass das CART-Peptid im Hypothalamus bei präpubertären Ratten zu einer Steigerung der pulsatischen Ausschüttung des *Gonadotropin-releasing hormone* führt (Lebrethon, Vandersmissen et al. 2000).

In der thyreotropen Achse spielt CART ebenfalls eine Rolle: Im Jahre 2002 konnten Studien nachweisen, dass eine induzierte Hyperthyreose bei Ratten zu einer verminderten Exprimierung der CART-mRNA im PVN führt (Lopez, Seoane et al. 2002). Die Annahme, dass eine intrazerebroventrikuläre Applikation von CART zu einer Steigerung der Ausschüttung von Thyreoidea-stimulierendem Hormon führen könnte, bestätigte sich jedoch nicht (Baranowska, Wolinska-Witort et al. 2004).

Das CART-Peptid hat auch eine Bedeutung im Umgang mit Stress. Studien zeigten beispielsweise, dass das Aussetzen in eine Stresssituation, wie das Erzwingen von Schwimmen, bei Ratten zu einer vermehrten Synthese von CART-Peptid im PVN führt (Gozen, Balkan et al. 2007).

Das CART-Peptid könnte auch in den Bereich von Angst und Depression involviert sein. Nach der intrazerebroventrikulären Injektion von CART-Peptid kann ein angstähnliches Verhalten bei Ratten beobachtet werden (Kask, Schioth et al. 2000). Ratten, die einem *chronic mild stress paradigm*, einem Tiermodell für menschliche Depression, ausgesetzt wurden, weisen eine signifikante Verminderung von CART-mRNA im frontalen Cortex auf (Orsetti, Di Brisco et al. 2008).

1.3.2.2 Das Peptidhormon *Corticotropin-releasing factor*

Corticotropin-releasing factor (CRF) ist ein 41 Aminosäuren-langes Hormon, das die Freisetzung des Stresshormons ACTH aus der Hypophyse stimuliert (Vale, Spiess et al.

1981). Die mRNA des Peptidhormons und CRF-Immunreaktivität können vor allem im PVN, aber auch im Cortex, in der Amygdala und im Hippocampus detektiert werden (Hashimoto, Ohno et al. 1982; Valentino, Page et al. 1994).

CRF wirkt inhibierend auf die Nahrungsaufnahme, steigert die Fettoxidation sowie den Energieumsatz und bewirkt bei einer chronischen Gabe einen Gewichtsverlust (Gosnell, Morley et al. 1983; Arase, York et al. 1988; Smith, de Jonge et al. 2001). Die intrazerebroventrikuläre Injektion des anorexigenen Hormons Leptin induziert eine vermehrte Expression von CRF im PVN (Schwartz, Baskin et al. 1996). Die Arbeitsgruppe von Verbalis et al. konnte nachweisen, dass eine intraperitoneale Injektion von CCK-8S zu einer Aktivierung der CRF-Neurone im PVN führt (Wrenn, Picklo et al. 1996). Eine Aktivierung der paraventriculären CRF-Neurone wird auch durch eine intrazerebroventrikuläre Injektion von CART-Peptid ausgelöst (Vrang, Larsen et al. 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass paraventriculäre CRF-Neurone an der Wirkungsvermittlung der anorexigenen Botenstoffe Leptin, CCK und CART beteiligt sind.

1.3.2.3 Das Peptidhormon Oxytocin

Im Jahre 1906 entdeckte erstmalig Henry Dale Oxytocin in der Hypophyse (Dale 1906). Dale beschrieb einen stimulierenden Effekt auf das Myometrium sowie dadurch ausgelöste Uteruskontraktionen während der Geburt (Dale 1906). Kurze Zeit später konnten auch eine Stimulation der myoepithelialen Zellen der Brustdrüse und die damit verbundene Milchejektion in Zusammenhang mit Oxytocin gebracht werden (Ott und Scott 1910). Oxytocin spielt auch eine Rolle in der Mutter-Kind-Bindung und beeinflusst das soziale Verhalten sowie den sozialen Umgang (Kosfeld, Heinrichs et al. 2005; Feldman, Weller et al. 2007; Ross und Young 2009).

Im ZNS wird Oxytocin im Hypothalamus, vor allem im PVN synthetisiert (Swaab, Pool et al. 1975). Magnozellige Oxytocin-Neurone des PVN projizieren in die Neurohypophyse und sezernieren das Hormon dort in die Blutzirkulation (Poulain und Wakerley 1982).

In Bezug auf die Nahrungsregulation zählt Oxytocin zu den anorexigenen Botenstoffen und bewirkt eine Reduzierung der Nahrungsaufnahme (Olson, Drutarosky et al. 1991 a). Sowohl eine intrazerebroventrikuläre Injektion von anorexigenem Leptin als auch eine intraperitoneale CCK-Injektion führen zu einer gesteigerten Anzahl aktivierter Oxytocin-Neurone im PVN (Verbalis, Stricker et al. 1991; Blevins, Schwartz et al. 2004).

Eine intrazerebroventrikuläre Injektion von CART aktiviert ebenfalls einige Oxytocin-Neuronen im PVN (Vrang, Larsen et al. 2000). Die Aktivierung der Oxytocin-Neuronen weist auf eine mögliche Rolle von Oxytocin in der Wirkungsvermittlung der anorexigenen Peptidhormone Leptin, CCK und CART hin.

1.4 Das Protoonkogen c-Fos als Marker neuronaler Aktivität

C-Fos ist ein Protoonkogen, das der Familie der *immediate early genes transcription factors* zugeordnet wird (Greenberg und Ziff 1984). Die Gruppe der *immediate early genes transcription factors* zeichnet sich dadurch aus, dass die Transkription des Gens zur mRNA innerhalb weniger Minuten nach einem extrazellulären Stimulus beginnt (Greenberg und Ziff 1984). Als Transkriptionsfaktor reguliert c-Fos die Expression weiterer Gene (Chiu, Boyle et al. 1988).

Im Jahre 1988 zeigten Sagar et al. in ihrer Studie, dass Neurone nach vorangegangener Stimulation vorübergehend das *immediate early gene* c-Fos exprimieren (Sagar, Sharp et al. 1988). Die Autoren der Studie zogen aus diesen Ergebnissen die Schlussfolgerung, dass c-Fos als Marker für neuronale Aktivierung und zum Erstellen funktional-anatomischer Karten neurologischer Signalwege genutzt werden kann (Sagar, Sharp et al. 1988). In immunhistologischen Doppelfärbungen kann c-Fos eingesetzt werden, um aktivierte Neurone durch ebenfalls intrazellulär exprimierte Transmitter oder Neuropeptide zu charakterisieren (Ceccatelli, Villar et al. 1989).

Die Transkription von c-Fos wird durch extrazelluläre Stimuli ausgelöst, die durch gesteigerte intrazelluläre Calcium- oder cAMP-Spiegel den c-Fos Promoter aktivieren (Sassone-Corsi, Visvader et al. 1988; Sheng, McFadden et al. 1990). Die meisten Neurone weisen eine geringe oder gar keine Basalexpression der c-Fos-mRNA und des c-Fos-Proteins auf (Hughes, Lawlor et al. 1992). Nach der Stimulation wird die Expression des c-Fos-Genes in den Neuronen rasch induziert: Bereits nach 5 Minuten beginnt die Synthese der mRNA. Der Höhepunkt der mRNA-Synthese wird nach 30 bis 45 Minuten erreicht (Müller, Bravo et al. 1984; Greenberg, Greene et al. 1985). Das intranukleär-gelegene c-Fos-Protein zeigt 60 bis 90 Minuten post-Stimulation Maximalwerte und persistiert für 2 bis 5 Stunden (Morgan und Curran 1991; Kovacs und Sawchenko 1996).

Die Wissenschaftler Chen et al. wiesen bei Ratten nach einer Injektion von CCK-8S eine verstärkte c-Fos-Immunreaktivität im NTS und PVN nach. (Chen, Deutsch et al.

1993). Die CCK-induzierte Aktivierung der Neurone in diesen Kerngebieten kann durch die Gabe eines CCK-Antagonisten (L364,718) unterdrückt werden (Chen, Deutsch et al. 1993). Eine intrazerebroventrikuläre Injektion von CART-Peptid bewirkt auch eine Steigerung der Anzahl c-Fos-ir Neurone im ARC, NTS und PVN (Vrang, Tang-Christensen et al. 1999).

1.5. Die Zielsetzung

Das Robert Koch-Institut stellte 2012 in der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS) fest, dass 67% der Männer und 53% der Frauen mit einem *Body-Mass-Index* (BMI) von ≥ 25 kg/m² übergewichtet sind (Jordan, Watzke et al. 2012). Knapp ein Viertel der Deutschen leidet an Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m²) (Jordan, Watzke et al. 2012). Adipositas stellt ein Risiko für zahlreiche Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus, kardiovaskuläre Krankheiten oder Krebs dar (Kannel, Cupples et al. 1991; Chan, Rimm et al. 1994; Folsom, Kushi et al. 2000). Laut *World health organization* (WHO) stellen Übergewicht und Adipositas weltweit den fünfthäufigsten Risikofaktor für Todesfälle dar (WHO 2013). Die hohe Prävalenz von Übergewicht und Adipositas sowie das Risiko, das von der Fettleibigkeit ausgeht, verdeutlichen die Bedeutung der Erforschung der Regulation der Nahrungsaufnahme.

Die Peptide Cholezystokinin (CCK) und *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART)-Peptid sind an der Regulation der Nahrung beteiligt und zeigen inhibitorische Effekte auf die Nahrungsaufnahme (Antin, Gibbs et al. 1975; Kristensen, Judge et al. 1998). Die intrazerebroventrikuläre Injektion von CART-Peptid sowie eine intraperitoneale Injektion von CCK erhöhen die Anzahl aktivierter Neurone in den nahrungsaufnahmeregulatorischen Hirnzentren PVN und NTS (Chen, Deutsch et al. 1993; Vrang, Tang-Christensen et al. 1999). Hierbei ist bemerkenswert, dass sowohl CART als auch CCK paraventriculäre Neuronen aktivieren, die die anorexigenen Peptide CRF und Oxytocin enthalten (Verbalis, Stricker et al. 1991; Vrang, Larsen et al. 2000). Die Arbeitsgruppe Maletinska et al. zeigte zudem, dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion von CART-Peptid synergistisch mit peripher injiziertem CCK auf die Inhibition der Nahrungsaufnahme wirkt (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Weiterhin beobachtete sie, dass die inhibitorische Wirkung von CART auf die Nahrungsaufnahme durch die gleichzeitige Verabreichung des CCK-1-Rezeptor-Antagonisten Devazepid vermindert wurde (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Diese

Einleitung

Ergebnisse weisen darauf hin, dass CCK eine mögliche Rolle in der Modulation der nahrungsregulatorischen Wirkung von CART spielt (Maletinska, Maixnerova et al. 2008).

Das Ziel der Studie ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen peripher injiziertem CCK-8S und der Aktivierung von CART-Neuronen im PVN zu untersuchen. In dieser Arbeit soll zum ersten Mal überprüft werden, ob intraperitoneal injiziertes CCK-8S einen Effekt auf die neuronale Aktivität von CART-immunreaktiven (-ir) Neuronen im PVN hat. Im nächsten Schritt soll erforscht werden, inwiefern diese Aktivierung durch zwei unterschiedliche CCK-8S Dosen moduliert wird. Ein zusätzliches Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung der Anzahl aktivierter CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S. Hierbei soll auch eine mögliche dosisabhängige Modulation erfasst werden. Zuletzt sollen anatomische Zusammenhänge zwischen der Lokalisation von Oxytocin- oder CRF-Neuronen und CART-Nervenfasern im PVN erforscht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Die Versuchsmaterialien

2.1.1.1 Die Antikörper und Seren für die Immunhistochemie

<i>Avidin-biotin peroxidase complex</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Biotin-SP-goat-anti-rabbit-IgG</i> , polyklonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, St. Louis, USA
<i>Fluorescein-isothiocyanate-(FITC)- labeled donkey anti-rabbit IgG</i> , polyklonal	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
<i>Fluorescein-isothiocyanate-(FITC)- labeled goat anti-rabbit-IgG</i> , polyklonal	Sigma, St. Louis, USA
<i>Guinea pig anti-Corticotropin-releasing factor (CRF)</i> , polyklonal	Bachem Holding AG, Heidelberg, Deutschland
<i>Mouse anti-oxytocin (Isotyp IgG₁)</i> , monoklonal	Chemicon International, Billerica, USA
<i>Normal donkey serum (NDS)</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
<i>Normal goat serum (NGS)</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
<i>Normal rabbit serum (RbNS)</i>	Sigma, St. Louis, USA
<i>Rabbit anti- Cocaine- and amphetamine- regulated transcrip (CART)</i> , polyklonal	Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, USA
<i>Rabbit anti-c-Fos</i> , polyklonal	Oncogene Research Products, Boston, USA
<i>Tetramethylrhodamine-isothiocyanate- (TRITC)-labeled goat anti-mouse-IgG</i> , polyklonal	Sigma, St. Louis, USA

<i>Tetramethylrhodamine-isothiocyanate-</i> (TRITC)- <i>labeled rabbit anti-guinea-pig-</i> <i>IgG</i> , polyklonal	Sigma, St. Louis, USA
---	-----------------------

2.1.1.2 Die Chemikalien der Immunhistochemie

Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumborhydrid (NaBH ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phenylhydrazin	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Triton-X 100	Serva, Heidelberg, Deutschland
TSA™ <i>Tetramethylrhodamine Tyramide</i> <i>Reagent Pack</i>	PerkinElmer, Waltham, USA
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Tetramethylrhodamine labeled tyramide</i> • <i>amplification diluent</i> 	

2.1.1.3 Sonstige Chemikalien

4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, St. Louis, USA
1,4-Diazabicyklo-2,2,2-oktan (DABCO)	Sigma, St. Louis, USA
n-Hexan (C ₆ H ₁₄)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd (CH ₂ O)	Sigma, St. Louis, USA
Pikrinsäure (Trinitrophenol)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma, St. Louis, USA

2.1.1.4 Die Medikamente

Dextran 75 (Longasteril®)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Heparin (Liquemin® 5000 I.E./ml)	Hoffmann-La Roche, Gernzach-Whylen, Deutschland
Ketamin (Ketanest® 0,1 %)	Curamed, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchloridlösung (NaCl 0,9 %)	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Xylazin (Rompun® 2 %)	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.1.1.5 Das Peptid

Cholezystokinin-Oktapeptid, sulfatiert (CCK-8S)	Bachem AG, Heidelberg, Deutschland
---	------------------------------------

2.1.1.6 Die Geräte

Binokulares Mikroskop	Zeiss Opton, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank (Liebherr Premium -20 °C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (Ultra low freezer -80 °C)	New Brunswick Scientific, New Brunswick, Kanada
Heizplatte (Rec-G)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Horizontalschüttler (VXR)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM 510 Meta)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kryotom (Typ HM 500 OM)	Mikrom GmbH, Walldorf, Deutschland
Perfusionsmaschine	Technische Forschungslabore Charité, Berlin, Deutschland
pH-Meter (Mikroprozessor pH 537)	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten (Mikroliter)	Biohit Proline, Helsinki, Finnland
Shaker (Typ MS1)	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Material und Methoden

Thermometer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Waage	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
2.1.1.7 Verschiedene Materialien	
Deckgläser (24 x 46 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Faltenfilter	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Frozen section medium	Bio Optica, Milana, Italien
Glasflaschen	Fischerbrand, Schwerte, Deutschland
Injektionsspritzen (BD Platstipak®)	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Kanülen (BD Microlance® 0,4x19 mm)	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
KäfigEinstreu (Lignocel®)	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland
Knochenzange	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Korkscheiben	Sagrega, Spanien
Makrolon-Käfig IV	Ebeco, Castrop-Rauxel, Deutschland
Messer für Kryotom (16 cm)	Leica Instruments, Nussloch, Deutschland
Messzylinder	Simax, Tschechische Republik
Objektträger (76 x 26 mm)	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten	WU Mainz, Deutschland
Pinsel	Pelikan, Deutschland
Pipetten (Milliliter)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Plastikgefäße (Blue Max®)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Plexiglas-Gehirnmatrix	Technische Forschungslabore Charité, Berlin, Deutschland
Präparationsbesteck	Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Skalpelle (Feather® Nummer 21)	pmf Medizin AG, Köln, Deutschland
Standard-Rattenfutter	Altromin®, Lage, Deutschland
Trichter	Schott Duran, Mainz, Deutschland
Zellkulturplatten (Multiwell® 24 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

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

2.1.2 Die Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche *Sprague-Dawley*-Ratten von der Firma Harlan-Winkelmann verwendet.

In einer Gruppe von drei bis vier Tieren pro Makrolon-Käfig Typ IV hatten die Ratten Zugang zu Altromin®-Standardfutter und Trinkwasser *ad libitum*. Die Raumtemperatur betrug $22 \pm 2^\circ\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit lag konstant bei 60 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch ein zwölfstündiges Intervall mit einer Lichtphase zwischen 6:30 Uhr und 18:30 Uhr und einer Dunkelphase zwischen 18:30 Uhr und 6:30 Uhr vorgegeben.

Die Ratten wurden mindestens 21 Tage vor Versuchsbeginn bezogen. Nach einer siebentägigen Akklimationsphase wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen mittels eines Trainings an die Versuchsbedingungen und an die versuchsdurchführenden Personen gewöhnt. Zwischen 9:00 Uhr und 11:00 Uhr der Lichtphase wurden die Ratten in den ersten Tagen zunächst berührt, dann einzeln aus dem Käfig separiert. Hierbei konnten sich die Tiere möglichst frei an der oberen Extremität der versuchsdurchführenden Personen bewegen. Im nächsten Schritt wurden die Tiere zusätzlich an die für die intraperitoneale Injektion benötigte Rückenlage gewöhnt. Das Training wurde durchgeführt, um den für die Tiere während des Versuchs auftretenden Stress möglichst zu minimieren.

Zum Zeitpunkt der Versuche wogen die Ratten zwischen 250 g und 300 g.

Die Versuche wurden mit Genehmigung durch die Tierversuchskommission des Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin durchgeführt (Tierversuchsnummer: G0089/03).

2.1.3 Die Herstellung der Versuchslösungen

2.1.3.1 Die Herstellung der Fixierlösung

Zur Erhaltung der Zellstrukturen wurde eine Fixierlösung aus Paraformaldehyd, Glutaraldehyd und Pikrinsäure hergestellt. Paraformaldehyd und Glutaraldehyd bewirken eine Vernetzung der Proteine. Die Pikrinsäure fällt Proteine als Pikrate aus.

Zur Herstellung eines Liters der Fixierlösung wurden zunächst 40 g Paraformaldehyd in 750 ml *aqua bidest.* gelöst und auf 60°C erwärmt. Die Zugabe von 150 μl 10 M Natriumhydroxid klärte die Suspension. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 13,8 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat, 2 ml Glutaraldehyd und 166,5 ml

gesättigte Pikrinsäure hinzugegeben. Der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit *aqua bidest.* auf insgesamt einen Liter aufgefüllt und mit Hilfe eines Faltenfilters filtriert, um nicht gelöste Anteile zu entfernen. Die Fixierlösung wurde unter einer Dampfzugseinrichtung hergestellt, um eine mögliche Gesundheitsschädigung durch das Auftreten von toxischen Dämpfen zu minimieren. Bis zum Versuchsbeginn wurde die Lösung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.1.3.2 Die Herstellung des Narkosemittels

Als Narkosemittel wurde eine Kombination aus Ketamin (Ketanest® 0,1 %) und Xylazin (Rompun® 2 %) eingesetzt. Ketamin wirkt antagonistisch am NMDA-Rezeptor und zeigt analgetische und sedierende Wirkung. Als α_2 -Adrenorezeptor-Agonist bewirkt Xylazin eine Sedation, Muskelrelaxation und Analgesie.

Für die Dosierung des Narkosemittels wurden die Ratten vor Versuchsbeginn einzeln gewogen und mit 100 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 10mg/kg KG Xylazin anästhesiert. Das Narkosemittel wurde kurz vor Beginn der Perfusion intraperitoneal injiziert.

2.1.3.3 Die Herstellung der Peptid-Lösung

Zur Herstellung der verwendeten Peptidlösung wurde 1 mg des sulfatierten Cholezytokinin-Oktapeptids (CCK-8S) in 1 ml 0,1-prozentigem Ammoniumhydroxid gelöst, zu je 50 μ l aliquotiert und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Beginn der Versuche wurde die CCK-8S-Lösung mit sterilem 0,15 M Natriumchlorid auf die gewünschte Konzentration von 6 und 10 μ g/kg KG verdünnt. Dies entspricht einer Stoffmenge von 5,2 bzw. 8,7 nmol/kg. Bis zur Injektion wurden die Peptid-Lösungen auf Eis gelagert.

2.1.3.4 Die Herstellung des Phosphatpuffers

Zunächst wurde 1 l ein molarer Phosphatpuffer (PBS) hergestellt, indem 80 g Natriumchlorid, 2 g Kaliumchlorid, 14 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat, 2 g Natriumhydroxid und 2 g Natriumazid in 800 ml *aqua bidest.* gelöst wurden. Danach wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,4 titriert und die Lösung auf ein Gesamtvolumen von einem Liter mit *aqua bidest.* aufgefüllt. Um den gebrauchsfertigen 0,1 M Phosphatpuffer zu erhalten, wurde diese Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit *aqua bidest.* verdünnt.

2.1.3.5 Die Herstellung der Saccharose-Lösungen

Eine 5-prozentige Saccharose-Lösung wurde hergestellt, um mit Hilfe dieser das ungebundene Fixiermittel aus dem Gewebe auszuwaschen. Zwei weitere Saccharose-Lösungen in aufsteigender Konzentration (15 % und 27,3 %) wurden für die anschließende Dehydratation des Gehirngewebes verwendet.

Für je 1 l der Saccharose-Lösung wurden je 13,7 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat in 500 ml *aqua bidest.* gelöst. Für die Herstellung der 5-prozentigen Lösung wurde 50 g Saccharose, für die der 15-prozentigen 150 g Saccharose und für die der 27,3-prozentigen 273,84 g Saccharose hinzugegeben. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung anschließend auf ein Gesamtvolumen von einem Liter aufgefüllt. Nach der Filtrierung folgte die Lagerung bei 4°C.

2.2 Methoden

2.2.1 Die Applikation des Peptides

Unmittelbar vor Beginn der Versuche wurden die Ratten gewogen, um die genaue körperrgewichtabhängige Dosis für die Peptid-Lösung und das Anästhetikum zu berechnen.

Die Tierversuche wurden zwischen 9:00 Uhr und 11:00 Uhr, wie das bereits 2 Wochen durchgeführte Gewöhnungs-Training, begonnen. Den Tieren wurde die Peptid- (6 µg/kg KG CCK-8S + 0,15 M NaCl oder 10 µg/kg KG CCK-8S + 0,15 M NaCl) beziehungsweise Natriumchlorid-Lösung (0,15 M NaCl) mit einem jeweiligen Volumen von 0,5 ml intraperitoneal appliziert. Nach der in der Injektion enthaltenen Konzentration des Peptides CCK-8S wurden die Tiere in drei Versuchsgruppen (CART-Immunhistologie: je Gruppe n=4, CRF- und Oxytocin-Immunhistologie: je Gruppe n=3) eingeteilt. Im Anschluss an die erfolgte Peptid- oder Kochsalz-Injektion wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt und dort bis zu dem Beginn der transkardialen Perfusion für 90 Minuten belassen. Zwischen der Applikation des CCK-8S respektive der Natriumchlorid-Lösung und der transkardialen Perfusion wurde ein Zeitraum von 90 Minuten eingehalten, da nach dieser Zeit die Expression und Synthese des Markers für neuronale Aktivität c-Fos, der im Anschluss quantifiziert wurde, das Maximum erreicht (1.4), (Morgan und Curran 1991).

2.2.2 Die Durchführung der transkardialen Perfusion

Nach Ablauf von 90 Minuten nach der CCK-8S-Injektion wurden die Tiere mit 100 mg/kg KG Ketamin (Ketanest® 0,1 %) und 10 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2 %) anästhetisiert. Unmittelbar im Anschluss wurden 2500 I.E. Heparin (Liquemin® 5000 I.E./ml) injiziert, um eine Bildung von Thromben während der Perfusion zu vermeiden.

Zunächst wurde das Herz der Ratten freipräpariert. Hierzu wurden die Ratten nach vollkommenem Wirkungseintritt der Anästhesie mittels Klebestreifen an den Extremitäten in Rückenlage auf der Arbeitsplatte fixiert. Nachdem die Haut an der Symphyse beginnend entlang der *Linea alba* bis zum *Jugulum* inzidiert worden war, wurden die abdominale und oberflächlich thorakale Muskulatur sowie das Diaphragma und der knöcherne Thorax linkslateral durchtrennt. An dem eröffneten Brustkorb wurde im nächsten Schritt eine Inzision an dem *Apex cordis* des linken Ventrikels gesetzt und eine Perfusionskanüle in die *Aorta ascendens* eingebracht. Eine Gefäßklemme fixierte die Perfusionskanüle in dem Gefäß. Der Abfluss der Perfusionslösung wurde durch eine Eröffnung des *Sinus venosus* des rechten Atriums vor Beginn der Perfusion gewährleistet.

Zu Beginn wurde den Tieren mithilfe eines transkardialen Perfusionsgerätes je 100 ml Plasmaersatzmittel Dextran 75 (Longasteril®) während einer Dauer von 10 sec mit einem Druck von 210 mmHg verabreicht. Dieser erste Schritt diente zum einen der Entfernung des Blutes aus dem Kreislaufsystem, zum anderen wurde durch das Plasmaersatzmittel der kolloidosmotische Druck in den Blutgefäßen erhöht und somit eine Vergrößerung der extravaskulären Räume vermindert. Danach wurden die Tiere mit je 1000 ml Fixierlösung über einen Zeitraum von 30 Minuten perfundiert. In den ersten 5 Minuten wurde die Perfusion mit einem Druck von 210 mmHg, gefolgt von einem Druck von 20 mmHg, durchgeführt. Die Fixierlösung wurde eingesetzt, um die Zellstrukturen im Gehirngewebe zu erhalten. Zum Schluss wurde jedem Tier 500 ml der 5-prozentigen Saccharose-Lösung mit einem Druck von 100 mmHg injiziert. Hierbei wurde die verbliebene Fixierlösung aus dem Gewebe ausgewaschen.

2.2.3 Die Entnahme der Gehirne

Nach Abschluss der kardialen Perfusion wurden die Tiere mithilfe eines Skalpells dekapitiert, die Kopfhaut und Muskulatur entfernt und das Gehirn vorsichtig mit Hilfe einer Knochenzange aus dem knöchernen Schädel befreit. Die Gehirne wurden in eine Plexiglas-Gehirn-Matrix gelegt und mit Rasierklingen in vier 1,0 bis 4,5 mm große

Koronarsegmente geschnitten: Frontalhirn, Diencephalon mit Hypothalamus, Mesencephalon und Rhombencephalon mit zervikalem Rückenmark.

Die Koronarsegmente wurden bei 4°C in eine aufsteigende Reihe von Saccharosekonzentrationen gegeben (Barthel und Raymond 1990). Zunächst wurden die Hirnsegmente für zwölf Stunden in einer 5-prozentigen Saccharoselösung gelagert, um noch ungebundene Fixierlösung zu entfernen. Dann folgten zur Dehydration des Gewebes je weitere zwölfstündige Aufbewahrungen in einer 15-prozentigen und 27,3-prozentigen Saccharoselösung.

Anschließend wurden die Gehirnteile einzeln mit *frozen section medium* auf beschriftete Korkplättchen geklebt und für 20 Minuten in einem Hexanbad, welches durch flüssigen Stickstoff auf -70°C gekühlt war, schockgefroren. Danach wurden die Hirnsegmente einzeln aus dem Hexan entnommen und auf einer mit Zellstoff ausgelegten Unterlage zum Abdampfen des Hexans für 30 Minuten in einen Kühlschrank bei -20°C gegeben. Zur weiteren Lagerung wurden Plastikgefäße (Blue Max®) vorbereitet, welche mit 2-3 ml *aqua bidest.* befüllt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die vier beschrifteten Koronarsegmente eines Gehirnes wurden je in einem mit gefrorenem *aqua bidest* versehenen Plastikgefäß verpackt und bei -80°C gelagert. Die Zugabe des *aqua bidest.* in die Gefäße verminderte die Austrocknung des Gewebes während der Lagerung.

2.2.4 Die Anfertigung der Gehirnschnitte

Im nächsten Schritt wurden die Koronarsegmente der Gehirne, welche die zu untersuchenden Kerngebiete enthielten, aus der Lagerung bei -80°C einzeln entnommen. Die zu untersuchenden Kerngebiete fanden sich in den Koronarsegmenten, welche den Hypothalamus, und somit den ARC und PVN, und die *Medulla oblongata*, und somit den NTS, beinhalteten. Die einzelnen Hirnsegmente wurden für die immunhistologische Färbung wie folgt an einem Kryotom (Typ HM 500 OM) bei -26°C zugeschnitten: Zuerst wurde das Koronarsegment mithilfe von *frozen section medium* auf der zuvor mit Aceton enteisten Objekthalterung des Kryotoms befestigt. Die 25 µm dicken Gewebsschnitte wurden nun angefertigt und mit einem Pinsel einzeln in serieller Abfolge in mit PBS gefüllte Zellkulturplatten (Multiwell® 24 well) gesetzt. Bis zum nächsten Arbeitsschritt wurden die Hirnschnitte einzeln und frei flottierend in den beschrifteten Zellkulturplatten bei -4°C und Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.5 Die immunhistologischen Färbungen

2.2.5.1 Allgemeines zu den immunhistologischen Protokollen

Die verwendeten immunhistologischen Protokolle beinhalteten als Methode die indirekte Immunfluoreszenz. Hierbei wird zuerst der Primär-Antikörper inkubiert, der gegen das darzustellende Antigen gerichtet ist. Im zweiten Schritt wird ein Antikörper, der gegen den Primär-Antikörper gerichtet ist, hinzugegeben. An diesen Sekundär-Antikörper ist ein Marker, wie zum Beispiel ein Farbstoff, gebunden und somit kann das Antigen indirekt durch die Markierung des Primärantikörpers gezeigt werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll wurde das Verfahren der *Tyramide signal amplification* und die Verwendung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes als weiterer Schritt in das Protokoll eingebaut. Sowohl der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex als auch die *Tyramide signal amplification* bewirken eine Verstärkung des Signals der als farbliche Marker eingesetzten Fluorochrome (Hsu, Raine et al. 1981; Adams 1992).

Für die Darstellung von c-Fos und CART wurde ein Protokoll gewählt, in dem wie folgt vorgegangen wird: (A) Die Gewebsschnitte werden zuerst für die immunhistologische Färbung vorbereitet, indem mögliche vorhandene endogene Enzyme inaktiviert und Proteine blockiert werden. (B) Im folgenden Schritt wird der Primär-Antikörper gegen c-Fos aufgetragen (Abbildung 2.1, (1)). Nachdem die Gewebsschnitte mit PBS gespült worden sind, (C) wird ein Sekundär-Antikörper, an den Biotin gebunden ist, gegen den Primär-Antikörper hinzugegeben (Abbildung 2.1, (2)). Nach der Inkubationszeit des biotinylierten Sekundär-Antikörpers wird wiederum mit PBS gespült. (D) Im nächsten Schritt folgt das Auftragen des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes, der an das am Sekundär-Antikörper gebundene Biotin bindet (Abbildung 2.1, (3)). (E) Schließlich wird ein an Tyramide gebundener Fluorchrom-Farbstoff hinzugegeben (Abbildung 2.1, (4)). Die zuvor aufgetragene Peroxidase aktiviert die Tyramide (Adams 1992). Die aktivierte Tyramide bindet an Proteine, die sich in der unmittelbaren Nähe der Peroxidase befinden und verstärkt so das Signal (Adams 1992).

Für die Darstellung des zweiten Antigens CART wird ein zweiter Primär-Antikörper gegen das CART-Peptid verwendet. Die Schritte (C) bis (E) werden analog durchgeführt (Abbildung 2.1, (5)-(8)). Eine mit einem anderen Fluorchrom-Farbstoff verbundene Tyramide wird in diesem Arbeitsschritt verwendet, so dass in der Auswertung eindeutig zwischen dem ersten und zweiten Antigen unterschieden werden

Material und Methoden

kann. Zum Schluss wird eine Gegenfärbung mit DAPI durchgeführt, um die zu untersuchenden Kerngebiete lokalisieren zu können.

Alle Färbeschritte werden mit der *free-floating*-Technik, also in Zellkulturplatten frei flottierende Gewebsschnitte, auf einem horizontalen Schüttler bei einer Raumtemperatur von 21°C durchgeführt. Die Technik ermöglicht eine gleichmäßige Wirkung und Auswaschung der verwendeten Lösungen an einer großen Gewebsoberfläche. Falls im Folgenden nicht gesondert vermerkt, wurde eine 0,1 molare PBS-Lösung verwendet. Der Spülvorgang mit PBS, der sich im Verlauf des Protokolls mehrmals wiederholt, erfolgt stets in einem zeitlichen Abstand von 2 Minuten, 20 Minuten und 30 Minuten.

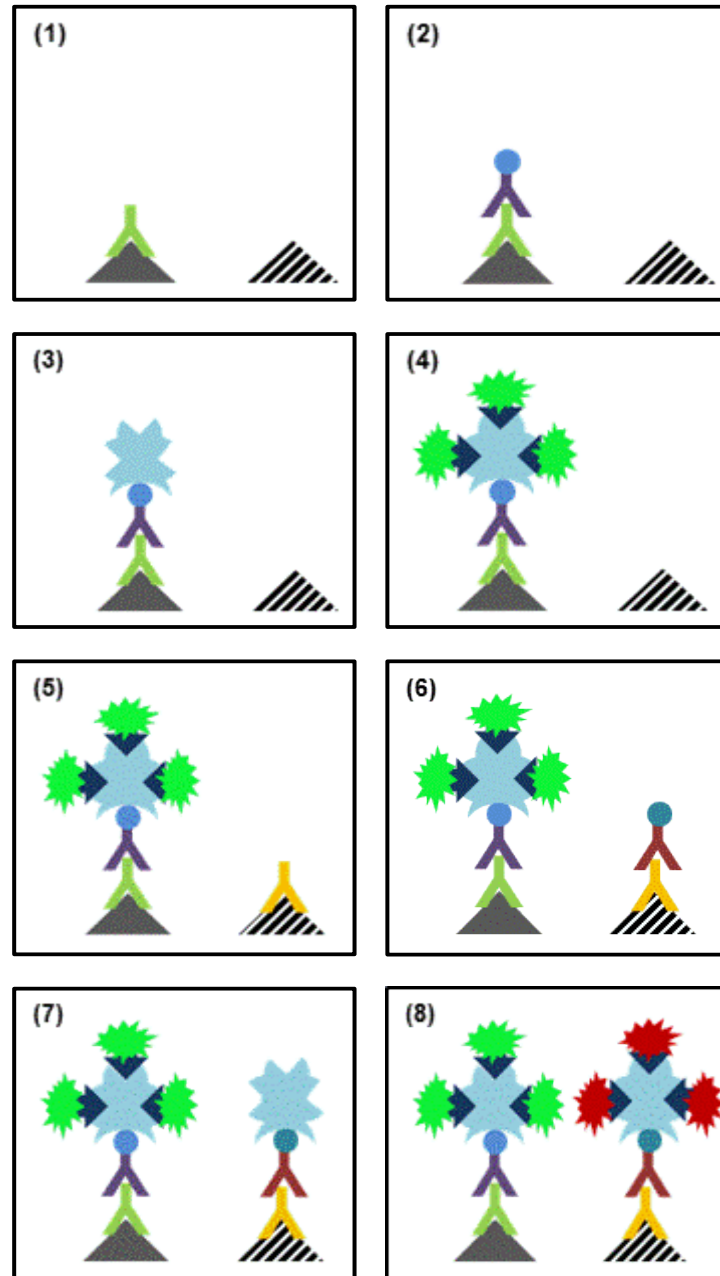


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz in der Doppelfärbung gegen c-Fos und CART.

(1) Zuerst wird der Primär-Antikörper (hier: grün) gegen c-Fos (hier: grau) aufgetragen. (2) Im zweiten Schritt wird ein biotinylierter Sekundär-Antikörper (hier: violett) gegen den Primär-Antikörper hinzugegeben. (3) Der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (hier: hellblau) wird aufgetragen und bindet an das Biotin des Sekundär-Antiköpers. (4) Als nächstes folgt die Zugabe des an Tyramide (hier: dunkelblau) gebundenen Fluorchrom-Farbstoffs (hier: grün). (5) Nun folgt der zweite Primär-Antikörper (hier: orange) gegen CART (hier: schwarz-weiß gestreift). (6) Ein zweiter biotinylierter Sekundär-Antikörper (hier: rot) wird hinzugegeben. (7) Zum Schluss wird nochmals der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (hier: hellblau) sowie (8) ein weiterer an Tyramide (hier: dunkelblau) gebundener Fluorchrom-Farbstoff (hier: rot) aufgetragen. Die gezeigte Darstellung orientiert sich an einer Abbildung von *Vector Laboratories* (Vector-Laboratories 2005).

2.2.5.2 Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos-Immunreaktivität

Zuerst wurden die Kryostatschnitte mit 1-prozentigem Natriumborhydrid in 0,1 M PBS für 15 Minuten inkubiert, um die Aldehyd-induzierte Autofluoreszenz des Gewebes zu minimieren (Clancy und Cauller 1998). Zum Entfernen des Natriumborhydrids wurden die Gehirnschnitte dreimal mit PBS gespült. Es folgte eine 60-minütige Inkubation mit 1-prozentigen Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*, BSA) und 0,3-prozentigem Triton-X 100 in PBS, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu blockieren. Anschließend wurde dreimal mit PBS gespült.

Der Primär-Antikörper zum Nachweis des Proteins c-Fos *Rabbit anti-rat-c-Fos* wurde 1:3000 in 1-prozentigem BSA in PBS verdünnt, und um die Haltbarkeit zu verlängern mit 0,1% Natriumazid versetzt. Jeder Gehirnschnitt wurde mit 250 µl der Antikörperlösung bedeckt und für 24 Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden die Gehirnschnitte mit 1-prozentigem BSA in PBS für 120 Minuten inkubiert. Es folgte eine Inkubation mit dem Fluoreszein-Isothiocyanat-(FITC)-konjugierten Sekundärantikörper *FITC-labeled goat anti-rabbit-IgG* 1:400 in 1-prozentigem BSA in PBS für 12 Stunden, um den Primärantikörper zu detektieren. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Gewebsschnitte dreimal in PBS gespült. Im Anschluss wurde eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid, ein Zellchromatin anfärbendes Fluorochrom, durchgeführt, um in den Gehirnschnitten die Kerngebiete darstellen zu können. Für 15 Minuten wurden die Kryostatschnitte mit 0,2-prozentigem Propidiumjodid inkubiert und dann dreimal mit PBS gespült.

Die Gehirnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, in *anti-fading*-Lösung, die aus 100 mg/ml DABCO in 90 % Glycerin und 10 % PBS bestand, eingebettet, mit einem Deckglas versehen und bei -20°C gelagert. Die *anti-fading*-Lösung wurde angewendet, um ein frühzeitiges Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern.

2.2.5.3 Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und CART-Immunreaktivität

Die zuvor in PBS-Lösung aufbewahrten Kryostatschnitte wurden mit 1-prozentigem Natriumborhydrid in 0,1 M PBS für 15 Minuten inkubiert. Nach dem Spülen mit PBS wurde eine Lösung aus 1-prozentigem BSA, 0,05-prozentigem Phenylhydrazin und 0,3-prozentigem Triton-X 100 in PBS für eine Stunde hinzugegeben. Hierbei wurden durch die Zugabe von BSA und Triton-X 100 in dem Gewebe enthaltene Proteine

blockiert und so ein unspezifisches Binden der Antikörper vermindert. Phenylhydrazin zerstörte gewebeeigene Peroxidasen. Nach dreimaligen Spülen mit PBS folgte zum Nachweis des Proteins c-Fos eine 24-stündige Inkubation mit dem Primär-Antikörper *Rabbit anti-c-Fos*, der 1:3000 in 1-prozentigem BSA in PBS gelöst wurde. Anschließend wurde wiederum dreimal mit PBS gespült. Nun wurde die Sekundär-Antikörperlösung aus 1:1000 *Biotin-SP-goat-anti-rabbit-IgG* in 1-prozentigem BSA in PBS für zwölf Stunden hinzugegeben und nach Ablauf der Inkubationszeit wiederum dreimal mit PBS gespült. Hierauf folgte die Inkubation mit dem *Avidin-biotin peroxidase complex* 1:1000 in PBS für 5 Stunden. Darauf wurde ein dreimaliges Spülen mit PBS durchgeführt und die Kryostatschnitte mit *Tetramethylrhodamine-isothiocyanate-(TRITC)-labeled tyramide* 1:150 in Amplifikationspuffer und 0,0001 % Wasserstoffperoxid gelöst für 15 Minuten inkubiert.

Die Gehirnschnitte wurden dreimal mit PBS gespült, eine Stunde mit 0,2-prozentigen BSA in PBS versetzt und dann für 24 Stunden mit dem zweiten Primär-Antikörper *Rabbit anti-rat-CART* 1:1500 in 1-prozentigem BSA in PBS inkubiert, um das CART-Peptid nachweisen zu können. Nach dreimaliger PBS-Spülung und einer einstündigen Inkubation in 0,2-prozentiger BSA-Lösung in PBS wurde der zweite Sekundär-Antikörper *Fluorescein-(FITC)-labeled donkey anti-rabbit-IgG* 1:200 in PBS Lösung für zwölf Stunden auf den Kryostatschnitten belassen. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte das dreimalige Spülen mit PBS.

Zuletzt wurden die Gehirnschnitte zur Gegenfärbung mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) für 15 Minuten inkubiert und im Anschluss dreimal mit PBS gespült. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich bevorzugt in Adenin-Thymin-reichen Bereichen der DNS anlagert (Lin, Comings et al. 1977).

Mit einem Pinsel wurden die Gewebsschnitte auf Objektträger aufgezogen, in *anti-fading*-Lösung (100 mg/ml DABCO in 90 % Glycerin und 10 % PBS) eingebettet, mit einem Deckglas bedeckt und bei -20°C gelagert.

2.2.5.4 Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und CRF-Immunreaktivität

Im ersten Schritt wurden die in PBS aufbewahrten Schnitte für 15 Minuten mit 1-prozentiger Natriumborhydridlösung in PBS vorbehandelt. Nach einer Spülung mit PBS folgte eine 1-stündige Inkubation mit 5-prozentigem *Normal Goat Serum (NGS)* und 0,3-prozentigem TritonX-100 in PBS. Im Anschluss wurden die beiden Primär-

Antikörper *Rabbit anti-c-Fos* 1:3000 und *Guinea-pig anti-CRF* 1:200 in 5-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS für 42 Stunden aufgetragen. Die Hirnschnitte wurden dreimal mit PBS gespült und 2 Stunden in 5-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS inkubiert. Nach Ablauf der 2 Stunden wurde der erste Sekundärantikörper *FITC-labeled goat anti-rabbit-IgG* 1:600 in 5-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS für 12 Stunden hinzugegeben. Wiederholt wurde dreimal mit PBS gespült und die Hirnschnitte wurden für 5 Stunden in einer Lösung aus 5-prozentigem BSA, 3-prozentigem *Normal Rabbit Serum (RbNS)* und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS inkubiert. Anschließend wurde der zweite Sekundär-Antikörper *TRITC-labeled rabbit anti-guinea-pig-IgG* 1:200 in 5-prozentigem BSA, 3-prozentigem RbNS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS für 12 Stunden hinzugegeben. Wiederum folgte ein Spülen der Hirnschnitte mit PBS, die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI für 15 Minuten und ein erneutes Spülen mit PBS. Zuletzt wurden die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte mit *anti-fading*-Lösung (100 mg/ml DABCO in 90 % Glycerin und 10 % PBS) sowie einem Deckglas bedeckt und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.2.5.5 Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von c-Fos- und Oxytocin-Immunreaktivität

Zuerst wurde wiederum eine Vorbehandlung zur Hemmung der endogenen Peroxidasen mit 1-prozentigem Natriumborhydrid in PBS für 15 Minuten durchgeführt. Nach dem dreimaligen Spülen mit PBS wurde für 1 Stunde eine Lösung aus 3-prozentigem *Normal donkey serum (NDS)* und 0,3-prozentigem Triton X-100 in PBS aufgetragen. Dann wurde jeder Schnitt für 42 Stunden mit 200µl der Primär-Antikörper Lösungen aus *Rabbit anti-c-Fos* 1:3000 und monoklonaler *Mouse anti-oxytocin* (Isotyp IgG1) 1:7000 in 3-prozentigem NDS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS inkubiert. Eine weitere 2-stündige Inkubation mit 3-prozentigem NDS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS folgte nach dem Spülen mit PBS. Anschließend wurden die Sekundär-Antikörper-Lösung *TRITC-labeled donkey anti-rabbit-IgG* 1:200 und *FITC-labeled goat-anti-mouse* 1:400 verdünnt in 3-prozentigem NDS, 3-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS hinzugegeben und für 12 Stunden lichtgeschützt einwirken gelassen. Schließlich wurde dreimal mit PBS gespült und das im Zellkern enthaltene Chromatin mit DAPI angefärbt. DAPI wurde für 15 Minuten auf den Schnitten belassen und die Hirnschnitte im Anschluss mit PBS gespült.

Im letzten Schritt wurden die Schnitte auf die Objektträger gezogen und mit *anti-fading*-Lösung (100 mg/ml DABCO in 90 %) sowie einem Deckglas bedeckt bei -20°C im Gefrierschrank bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

2.2.5.6 Das immunhistologische Protokoll zum Nachweis von Immunreaktivität für CART und Oxytocin sowie für CART und CRF

Zu Beginn der immunhistologischen Färbung wurden die Hirnschnitte mit 1-prozentigem Natriumborhydrid in PBS für 15 Minuten vorbehandelt. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu blockieren, folgte eine 1-stündige Inkubation in einer Lösung aus 3-prozentigem NDS und 0,3-prozentigem Triton X-100 in PBS. Anschließend wurden die Primär-Antikörper *Rabbit anti-rat-CART* 1:1500 und monoklonaler *Mouse anti-oxytocin* (Isotyp IgG1) 1:7000 (oder *Guinea-pig anti-CRF* 1:200 in 5-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS) in 3-prozentigem NDS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS für 42 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dem immunhistologischen Protokoll für den Nachweis von CART und CRF wurde anstelle des monoklonalen *Mouse anti-oxytocin* als zweiter Primär-Antikörper *Guinea-pig anti-CRF* 1:200 in 5-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS hinzugegeben. Nachdem die Hirnschnitte mit PBS gespült wurden, für 2 Stunden in 3-prozentigem NDS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS inkubiert wurden, folgten für 12 Stunden die Sekundär-Antikörper *FITC-labeled donkey anti-rabbit-IgG* 1:200 und *TRITC-labeled goat anti-mouse* 1:400 in 3-prozentigem NDS, 3-prozentigem NGS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS. In der Färbung gegen CART und CRF wurde anstatt *TRITC-labeled goat anti-mouse* der Sekundär-Antikörper *TRITC-labeled rabbit anti-guinea-pig-IgG* 1:200 in 5-prozentigem BSA, 3-prozentigem NDS und 0,1-prozentigem Natriumazid in PBS verwendet. Zum Schluss wurden die Hirnschnitte in PBS gespült und das Zellchromatin mit DAPI für 15 Minuten gegengefärbt. Die Hirnschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, mit *anti-fading*-Lösung (100 mg/ml DABCO in 90 %) bedeckt und mit einem Deckglas versehen bei -20°C bis zur konfokal-mikroskopischen Analyse gelagert.

2.2.6 Die mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Gehirnschnitte wurde mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop (cLSM 510 Meta) durchgeführt. In Tabelle 2.2 sind die jeweiligen Einstellungen für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe aufgeführt.

Tabelle 2.2: Einstellungen des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

	DAPI	FITC	Propidiumjodid	TRITC
Bündelspalt	BP	HFT	HFT	HFT
[nm]	365/12	UV/488/543/633	UV/488/543/633	488/543
Filter [nm]	FT 395	BP 505-550	BP 560-615	560-615
Emissionswellenlänge [nm]	455nm	519nm	617nm	572nm
Exzitationswellenlänge [nm]	345nm	488nm	543nm	547nm

Die zur Gegenfärbung verwendeten Farbstoffe DAPI und Propidiumjodid dienen zur Abgrenzung der untersuchten Gehirnerne (ARC, NTS, PVN) von benachbarten Gehirnstrukturen. Hierbei erzeugte DAPI ein blaues und Propidiumjodid ein rotes Fluoreszenzsignal in den Zellkernen.

Die quantitative Auszählung der c-Fos-Immunreaktivität erfolgte jeweils bilateral im ARC (Bregma -2.12 bis -3.60 mm), NTS (Bregma -13.24 bis -14.30 mm) und im PVN (Bregma -1.30 bis -2.12 mm) gemäß der Koordinaten aus dem Atlas von Paxinos und Watson (Paxinos und Watson 1997). Zur Beurteilung der c-Fos-ir Neuronen wurden die jeweils durch FITC mit einem grünen Fluoreszenzsignal markierten Zellkerne in den drei untersuchten Kerngebieten ausgezählt. Hierzu wurde jeder dritte Hirnschnitt der koronal in 25 µm aufeinander folgenden Schnittserie verwendet. Die drei Versuchsgruppen (6 µg/kg CCK, 10 µg/kg CCK, Vehikel) bestanden jeweils aus 4 Ratten.

Ein weiterer Teil der Hirnschnitte wurde für die immunhistologischen Doppelfärbungen im Bereich des PVN gegen c-Fos und CART, c-Fos und CRF sowie gegen c-Fos und Oxytocin verwendet. Die Färbungen wurden quantitativ beurteilt, indem zunächst die Anzahl der CART-, CRF- oder Oxytocin-ir Neurone im PVN bilateral für jeden Hirnschnitt erfasst wurde. Anschließend wurde die Anzahl der simultan (1) c-Fos- und CART-, (2) c-Fos und CRF- sowie (3) c-Fos und Oxytocin-ir Neuronen/Hirnschnitt im PVN bilateral ausgezählt. Hierbei wurde dem mit FITC markierten CART-Peptid ein grünes Fluoreszenzsignal zugeordnet. Die mit TRITC markierten CRF- oder Oxytocin-ir Zellen wurden durch ein rotes Fluoreszenzsignal identifiziert. Für die Doppelfärbung gegen c-Fos und CART wurden in jeder Versuchsgruppe (6 µg/kg CCK, 10 µg/kg CCK, Vehikel) die Hirnschnitte von je 4 Tieren verwendet. Die immunhistologischen

Färbungen gegen c-Fos und CRF sowie gegen c-Fos und Oxytocin wurden an den Hirnschnitten von je 3 Tieren pro Versuchsgruppe durchgeführt.

Ein Teil der Hirnschnitte der Versuchsgruppe, der 10 µg/kg CCK-8S injiziert worden war, wurde zudem gegen CART und CRF sowie gegen CART und Oxytocin angefärbt. Die immunhistologische Färbung wurde qualitativ mit dem konfokalen Mikroskop bewertet, um mögliche lokale Beziehungen der Neuropeptide aufzudecken.

Die gesamte mikroskopische Auswertung fand ohne Kenntnis über die vorangegangene Art der Behandlung der Tiere statt.

2.2.7 Die statistische Auswertung

Alle Daten wurden als durchschnittliche Anzahl c-Fos-, CART-, CRF- oder Oxytocin-ir Neurone sowie simultan (1) c-Fos- und CART-, (2) c-Fos und CRF- oder (3) c-Fos und Oxytocin-ir Neurone pro Hirnschnitt \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) erfasst. Aus den mikroskopisch erhobenen Daten wurde der prozentuale Anteil der CART-ir Neuronen/Hirnschnitt mit c-Fos-Kolokalisation an der Anzahl aller CART-ir Neuronen/Hirnschnitt im PVN berechnet. Die prozentualen Anteile der aktivierten CRF- und der aktivierten Oxytocin-ir Neurone/Hirnschnitt im PVN wurden ebenso ermittelt. Die Daten wurden statistisch mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA: *analysis of variance*) und dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurden mit den post-hoc Tests Fisher- *least significant difference* (LSD)-Test und Student-Newman-Keuls-Test ermittelt, wobei $p < 0,05$ als signifikant galt. Die statistischen Berechnungen wurden mit SigmaStat 3.1 vorgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Effekte von CCK-8S auf die neuronale Aktivierung im Nucleus arcuatus, Nucleus paraventricularis und Nucleus tractus solitarius

Nach der intraperitonealen Injektion von Cholezystokinin-Oktapeptid (CCK-8S) sollte gemessen werden, inwieweit Neuronen in den Kerngebieten des *Nucleus arcuatus* (ARC), des *Nucleus paraventricularis* (PVN) und des *Nucleus tractus solitarius* (NTS) aktiviert werden. Zudem sollte überprüft werden, ob die Dosierung von CCK-8S einen Einfluss auf die Anzahl der aktivierten Neurone hat. Hierzu wurden drei Versuchsgruppen gebildet: Der ersten Versuchsgruppe wurde 6 µg/kg CCK-8S, der zweiten 10 µg/kg CCK-8S und der Kontrollgruppe die Vehikellösung (0,15 M NaCl) intraperitoneal injiziert. Nach der transkardialen Perfusion der Versuchstiere, der Entnahme der Gehirne und der Anfertigung der Kryostatschnitte erfolgte eine immunhistologische Färbung. In den relevanten Hirnschnitten wurde c-Fos als Marker neuronaler Aktivierung markiert. Die immunhistologisch angefärbten Schnitte wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop ausgewertet.

Im ARC konnten nach der intraperitonealen Injektion von 6 µg/kg CCK-8S 25 ± 2 c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt erfasst werden. In der 10 µg/kg CCK-8S Versuchsgruppe wurde eine Aktivierung in 26 ± 3 Neurone/Hirnschnitt beobachtet. 24 ± 3 c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt wurden in der Kontrollgruppe gezählt. Die Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen sind statistisch nicht signifikant ($p = 0,746$; Abbildung 3.1, 3.2).

Die konfokal-mikroskopische Auswertung ergab im PVN nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S 102 ± 6 c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt ($p < 0,001$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl). In der Auszählung der PVN-Schnitte der 10 µg/kg CCK-8S-Gruppe konnte in 150 ± 5 Neurone/Hirnschnitt Immunreaktivität für c-Fos festgestellt werden ($p < 0,001$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl). In der Vehikelgruppe wurden 18 ± 7 aktivierte Neurone/Hirnschnitt bestimmt. Im Verhältnis zur Kontrollgruppe steigerte die Injektion von 6 µg/kg die Anzahl der aktivierten Neurone/Hirnschnitt 5,8-fach und die von 10 µg/kg 8,5-fach. Der Einfluss von CCK-8S auf die Anzahl der c-Fos-ir Neurone im PVN erwies sich somit als dosisabhängig und statistisch signifikant (Abbildung 3.2, 3.3).

Ergebnisse

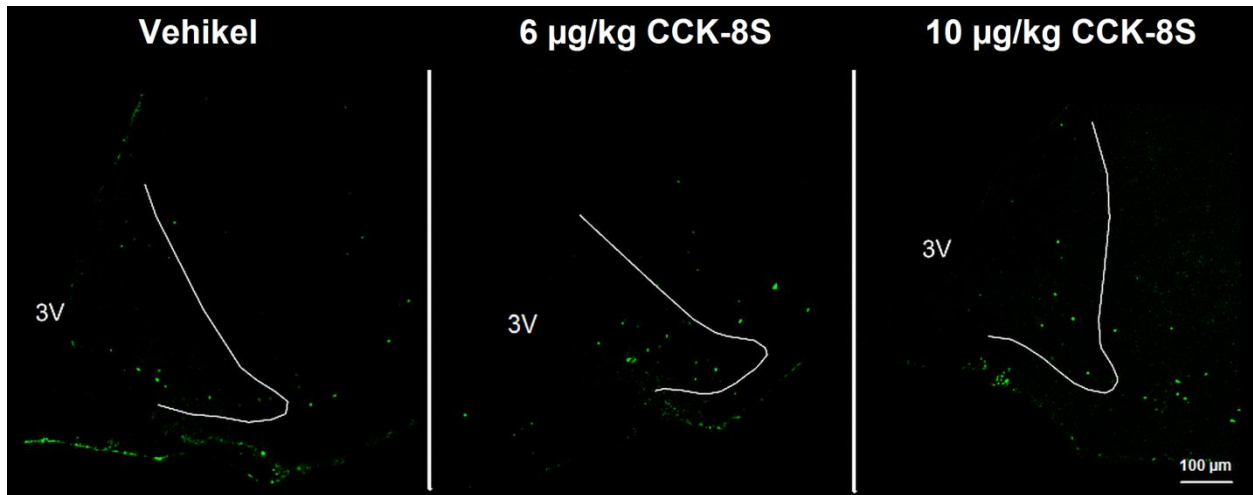


Abbildung 3.1: Repräsentative Gehirnschnitte des ARC nach intraperitonealer Injektion von 0,15 M NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

Im ARC bewirkte die Injektion von CCK-8S keine signifikante Steigerung der Anzahl der c-Fos-ir Neurone (grüne Fluoreszenzsignale). Die weiße Linie zeigt die Ausdehnung des ARC. 3V = Dritter Ventrikel.

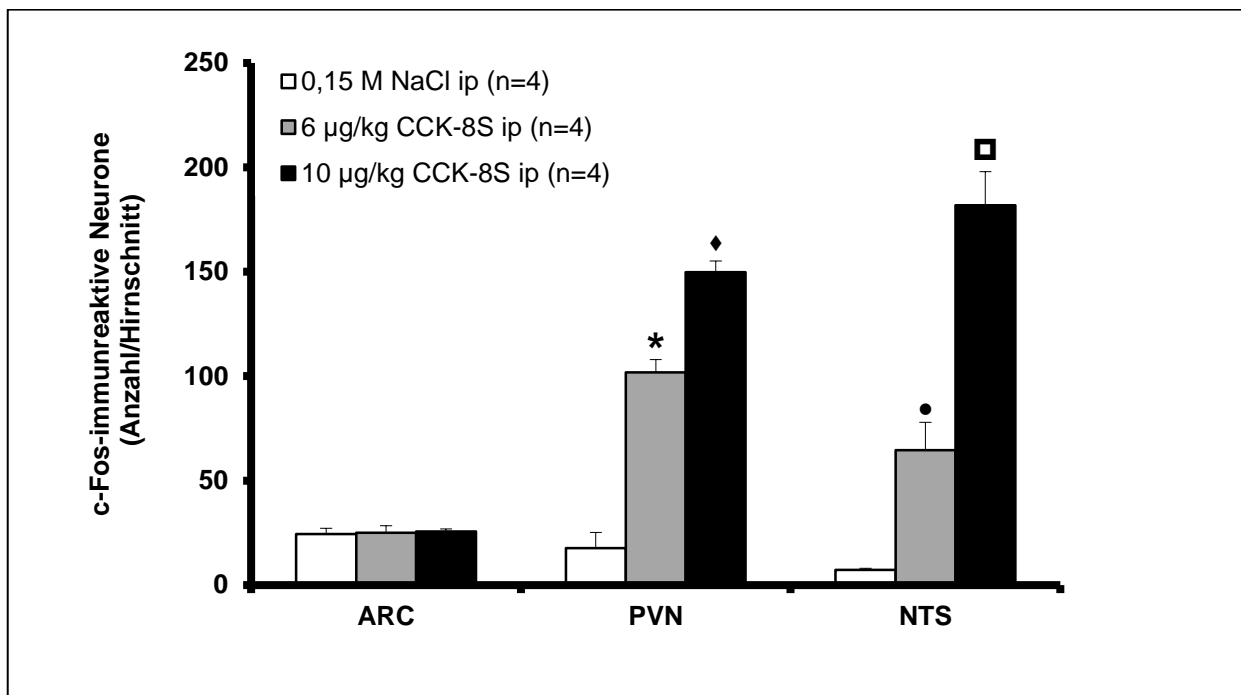


Abbildung 3.2: Darstellung der Anzahl der c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt im ARC, PVN und NTS nach der intraperitonealen Injektion von 0,15 M NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

Die CCK-8S-Injektion hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der aktivierten Neurone im ARC. Eine statistisch signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anzahl c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt konnte im PVN und NTS festgestellt werden. Die Daten (Anzahl/Hirnschnitt) sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt, ip= intraperitoneal, n= Anzahl der Ratten, * $p < 0,001$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ♦ $p < 0,001$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; • $p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ◻ $p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl.

Ergebnisse

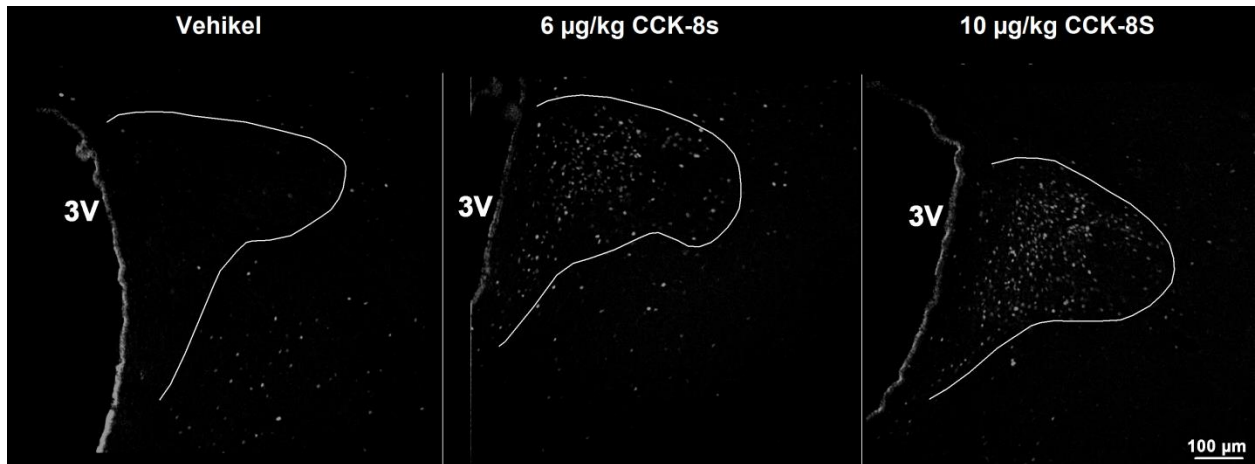


Abbildung 3.3: Darstellung der c-Fos-Immunreaktivität im PVN nach der Injektionen der Kochsalzlösung und von CCK-8S in den Dosierungen 6 µg/kg und 10 µg/kg.

Eine geringe Anzahl c-Fos-ir Neurone konnte nach der Injektion von Kochsalz detektiert werden. Die intraperitoneale Injektion von CCK-8S bewirkte dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone/Hirnschnitt im PVN. Die weiße Linie begrenzt das Kerngebiet des PVN. 3V = Dritter Ventrikel.

Im NTS induzierte CCK-8S in beiden Dosierungen eine statistisch signifikante Steigerung der aktivierten Neurone gegenüber der Kontrollgruppe. 65 ± 13 c-Fos-ir Neurone/Hirnschnitt wurden nach der intraperitonealen Injektion von 6 µg/kg CCK-8S ($p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und 182 ± 16 nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S ($p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) gezählt. In den Hirnschnitten der Versuchstiere, denen Kochsalz injiziert wurde, konnte in 7 ± 1 Neurone/Schnitt Immunreaktivität für c-Fos nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ergibt sich nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S eine 9-fache Steigerung und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 25,3-fache Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone/Hirnschnitt im NTS (Abbildung 3.2, 3.4).

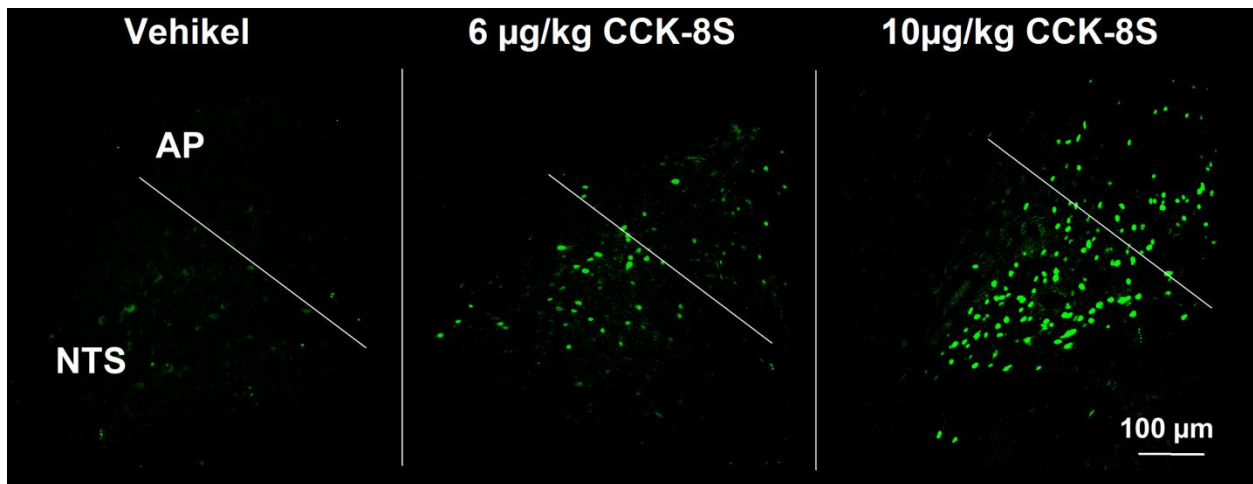


Abbildung 3.4: Auswahl repräsentativer Gehirnschnitte des NTS nach intraperitonealer Injektion von 0,15 M NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

Die Injektion von CCK-8S bewirkte dosisabhängige Zunahme c-Fos-ir-Neuronen im NTS. Die weiße Linie grenzt den NTS von der Area postrema ab. AP = Area postrema.

3.2. Die Effekte von CCK-8S auf die CART-, CRF- und Oxytocin-immunreaktiven Neurone und deren Aktivierung im Nucleus paraventricularis

In diesem Teil der Versuche sollte zunächst untersucht werden, ob peripher injiziertes CCK-8S einen Einfluss auf die Anzahl CART-ir-Neurone im PVN hat. Ein weiteres Ziel war es zu überprüfen, ob CART-Neurone im PVN durch die intraperitoneale Injektion von CCK-8S aktiviert werden. Im nächsten Schritt sollte der prozentuale Anteil aktivierter CART-ir-Neurone ermittelt werden. In allen Versuchen sollte beobachtet werden, ob der Einfluss von CCK-8S auf die CART-Neurone dosisabhängig ist.

Des Weiteren sollte die Anzahl aktivierter CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S in der Dosis von 6 µg/kg und 10 µg/kg quantifiziert werden. Zudem sollte erfasst werden, ob ein Zusammenhang zu der CCK-8S-Dosierung besteht.

In den Doppelfärbungen gegen c-Fos und CART wurden im Bereich des PVN (A) die Anzahl der CART-ir-Neurone, (B) die Anzahl der CART-Neurone mit c-Fos-Kolokalisation und (C) der prozentuale Anteil der aktivierten CART-Neurone an der Anzahl aller CART-ir-Neurone für jede Versuchsgruppe (NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S) ermittelt.

Ergebnisse

Der Effekt von Kochsalzlösung, von 6 µg/kg und auch von 10 µg/kg CCK-8S auf die CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN wurde in immunhistologischen Färbungen gegen CRF und c-Fos sowie gegen Oxytocin und c-Fos untersucht. Hierzu wurde (A) die Anzahl der CRF-ir sowie Oxytocin-ir Neurone und (B) die Anzahl der aktivierten CRF- sowie Oxytocin-Neurone im PVN in den drei Versuchsgruppen erfasst. Ferner wurde (C) der prozentuale Anteil der aktivierten CRF-ir und Oxytocin-ir Neurone an der gesamten Anzahl der CRF- beziehungsweise Oxytocin-Neurone berechnet.

Zuletzt wurde eine immunhistologische Doppelfärbung gegen CART und CRF sowie gegen CART und Oxytocin angefertigt, mit dem Ziel, mögliche Zusammenhänge in der Lokalisation der Neuropeptide untereinander im PVN aufzudecken.

3.2.1 Die Effekte von intraperitoneal injizierten CCK-8S auf die CART-, CRF- sowie Oxytocin-immunreaktiven Neurone und deren Aktivierung im PVN

Die mikroskopische Auswertung der immunhistologischen Färbung gegen CART ergab, dass in der Versuchsgruppe der Tiere, denen 6 µg/kg CCK-8S injiziert worden war, im Bereich des PVN 129 ± 16 Neurone/Hirnschnitt immunreaktiv für CART waren. In den Hirnschnitten der mit 10 µg/kg CCK-8S behandelten Tiere wurden 123 ± 23 und in der Vehikel-Gruppe 96 ± 18 CART-ir Neurone/Hirnschnitt beobachtet. Der Unterschied der Anzahl CART-ir Neurone in den drei Versuchsgruppen (CCK-8S 6 µg, CCK-8S 10 µg, Vehikel) war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Abbildung 3.5 (A)).

In der Immunhistologie gegen CRF wurden nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S $254,56 \pm 24,31$ CRF-ir Neurone/Hirnschnitt gezählt. In den Hirnschnitten der Versuchstiere, denen CCK 10 µg/kg oder 0,15 M NaCl injiziert wurde, konnte CRF-Immunreaktivität in $247 \pm 18,98$ beziehungsweise $212,22 \pm 25,36$ Neurone/Hirnschnitt detektiert werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl der CRF-Neurone konnte zwischen den Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Abbildung 3.5 (A)).

Die Anzahl der Oxytocin-ir Neurone/Hirnschnitt im PVN betrug $146,11 \pm 2,8$ nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S. Nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S wurden $123,22 \pm 7,8$ und nach der von Kochsalz $156,33 \pm 17,86$ Oxytocin-Neurone festgestellt. Das Verhältnis der Anzahl der Oxytocin-ir Neurone zwischen den drei Versuchsgruppen war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Abbildung 3.5 (A)).

Ergebnisse

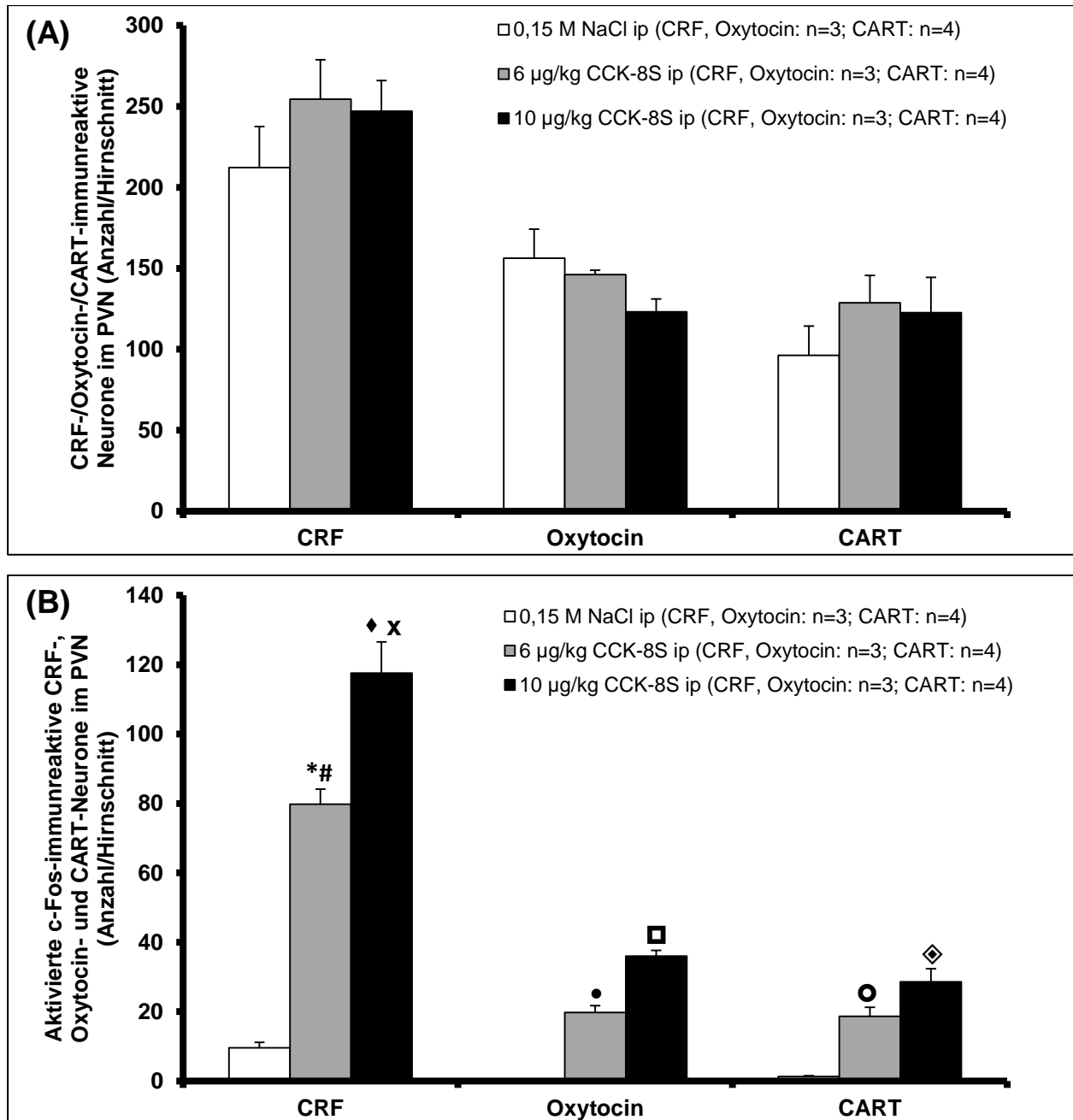


Abbildung 3.5: (A) Darstellung der Anzahl der CRF-, Oxytocin- und der CART-ir Neurone/Hirnschnitt und **(B)** der aktivierten c-Fos-ir CRF-, Oxytocin- und CART- Neurone/Hirnschnitt im PVN nach intraperitonealer Injektion von 0,15 M NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

(A) Ein signifikanter Einfluss von CCK-8S auf die Anzahl der CRF-, Oxytocin- und CART-ir Neurone im PVN konnte nicht festgestellt werden. (B) Die Doppelfärbung gegen CRF, Oxytocin, CART und c-Fos zeigte, dass CCK-8S in den Dosierungen 6 µg/kg und 10 µg/kg die Anzahl der c-Fos-ir-CRF-/Oxytocin-/CART-Neurone signifikant und dosisabhängig steigert. Daten (Anzahl/Hirnschnitt) dargestellt als Mittelwert ± SEM, ip= intraperitoneal, n= Anzahl der Ratten, * p = 0,004 vs. 10 µg/kg CCK-8S; # p < 0,001 vs. 0,15 M NaCl; ♦ p = 0,004 vs. 6 µg/kg CCK-8S; x p < 0,001 vs. 0,15 M NaCl; • p < 0,001 vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ■ p < 0,001 vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl, ● p < 0,05 vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ◆ p < 0,05 vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl.

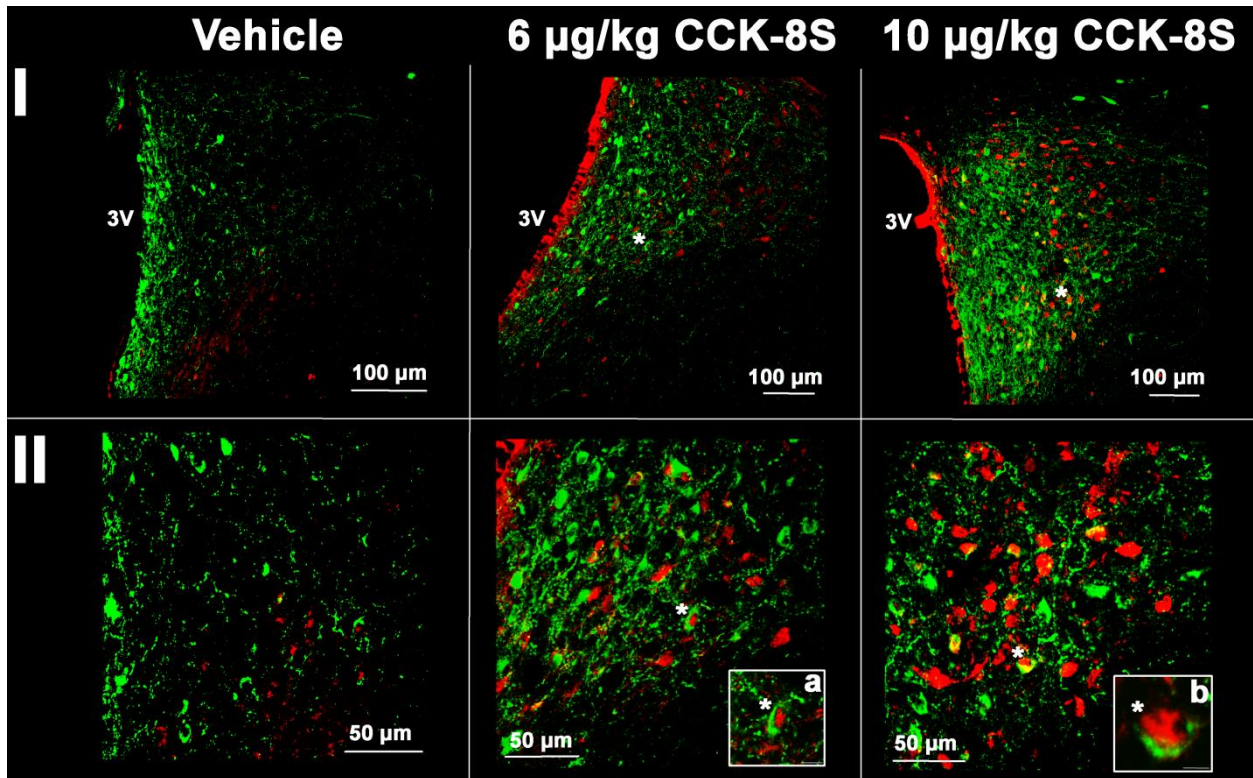


Abbildung 3.6: Repräsentative Gehirnschnitte des PVN nach der immunhistologischen Doppelfärbung gegen CART und c-Fos nach intraperitonealer Injektion von 0,15 M NaCl, 6 µg/kg, 10 µg/kg CCK-8S.

(I) In den Hirnschnitten wurde eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl der Neurone, die zugleich Immunreaktivität für c-Fos (rote Fluoreszenzsignale) und auch für CART (grüne Fluoreszenzsignale) aufweisen, festgestellt. CART-ir Neurone sind im magnozellulären und vor allem im parvozellulären Subnucleus des PVN sowie in der periventrikulären Zone lokalisiert. (II) In der Vergrößerung (a und b) kann beobachtet werden, dass die c-Fos-Immunreaktivität innerhalb des Zellkerns detektiert wurde (siehe auch Abbildung 3.7). Hingegen wurde die CART-Immunreaktivität im Zytoplasma der Zellen festgestellt. 3V = Dritter Hirnventrikel.

In der Auswertung der Immunmarkierung gegen CART und c-Fos wurden in der Versuchsgruppe, die mit 6 µg/kg CCK-8S behandelt wurde, 19 ± 3 ($p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und in der 10 µg/kg CCK-8S-Versuchsgruppe 29 ± 4 ($p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) aktivierte CART-ir Neurone/Hirnschnitt erfasst. In der Vehikel-Gruppe wurde 1 ± 0 zugleich CART- und c-Fos-ir Neuron/Hirnschnitt gezählt. Im Verhältnis zu der Kontrollgruppe steigerte die Injektion von 6 µg/kg CCK-8S die Anzahl der simultan c-Fos und CART-ir Neurone/Hirnschnitt um das 14-fache und die Injektion von 10 µg/kg CCK-8S um das

Ergebnisse

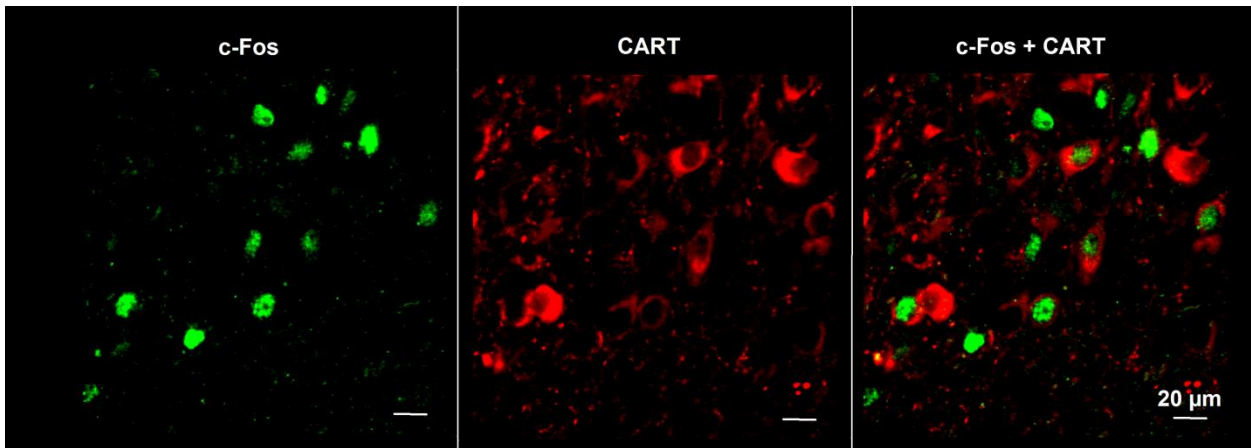


Abbildung 3.7: Vergrößerte Darstellung eines repräsentativen Gehirnschnitts des PVN nach intraperitonealer Injektion von 6 µg/kg CCK-8S.

In der Darstellung ist c-Fos-Immunreaktivität als grünes Fluoreszenzsignal und CART-Immunreaktivität als rotes Fluoreszenzsignal zu erkennen. Die letzte Aufnahme verdeutlicht die intraneuronale Kolokalisation von c-Fos- und CART-Immunreaktivität. Hierbei kann die Immunreaktivität gegen c-Fos innerhalb des Zellkerns und die Immunreaktivität gegen CART innerhalb des Zytoplasmas beobachtet werden.

21,5-fache. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl aktivierter CART-Neurone/Hirnschnitt wurde zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen (Abbildung 3.5 (B), 3.6, 3.7).

Die periphere Injektion von CCK-8S bewirkte in einer Dosis von 6 µg/kg eine 8,4-fache und in der Dosierung von 10 µg/kg eine 12,3-fache Steigerung der Anzahl aktivierter CRF-Neurone/Hirnschnitt. Im PVN konnten in der 6 µg/kg CCK-8S Versuchsgruppe $79,78 \pm 4,33$ ($p = 0,004$ vs. 10 µg/kg CCK-8S; $p < 0,001$ vs. 0,15 M NaCl) und in der 10 µg/kg CCK-8S Gruppe $117,56 \pm 8,99$ ($p = 0,004$ vs. 6 µg/kg CCK-8S; $p < 0,001$ vs. 0,15 M NaCl) aktivierte CRF-Neurone/Hirnschnitt beobachtet werden. In der Kontrollgruppe wurden $9,56 \pm 1,57$ CRF-ir Neurone/Hirnschnitt nachgewiesen (Abbildung 3.5 (B), 3.8).

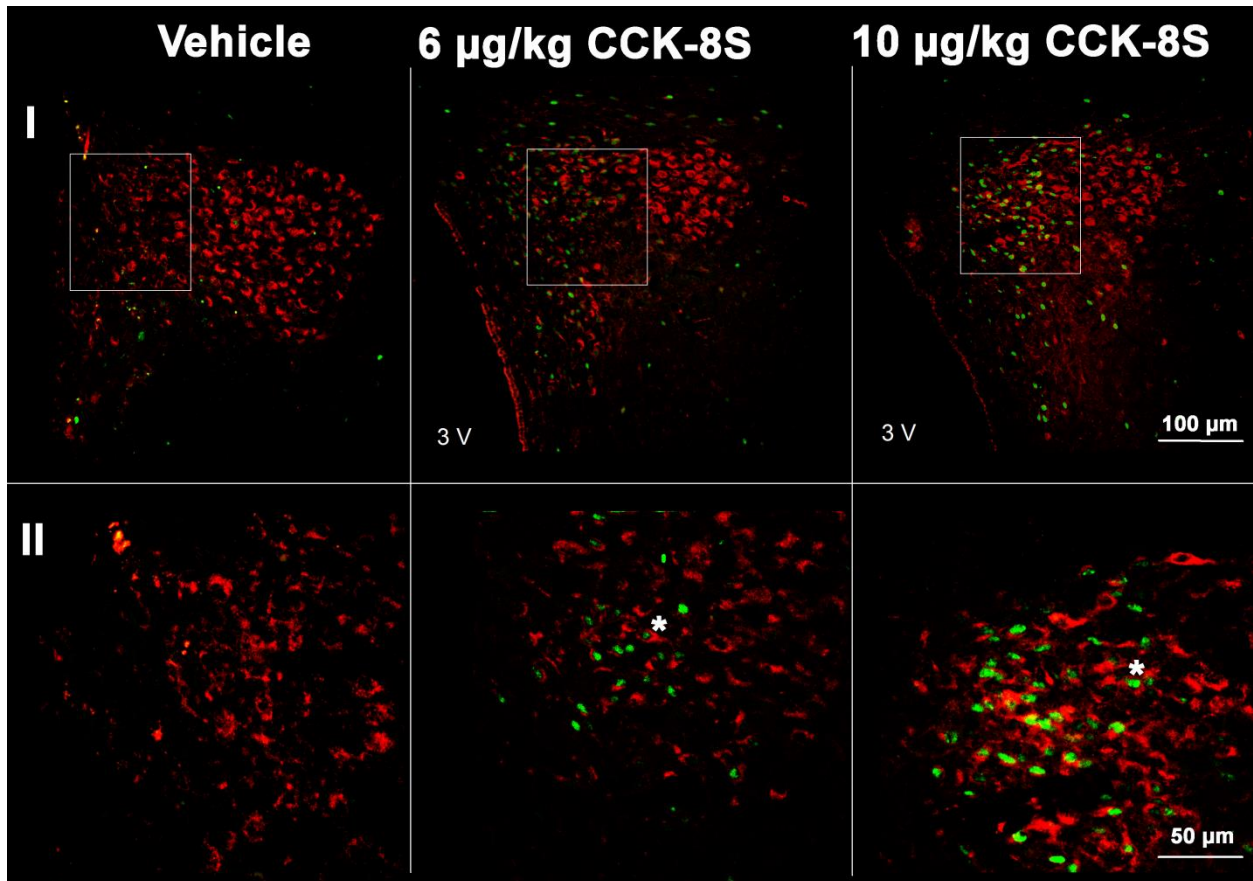


Abbildung 3.8: Immunhistologische Doppelfärbung gegen CRF und c-Fos im PVN nach intraperitonealer Injektion von Kochsalzlösung, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

(I) In der Übersicht des PVN sind c-Fos- (grün) und CRF-ir (rot) Neurone mit Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. (II) Die Vergrößerung von (I) (weißer Kasten) verdeutlicht, dass zahlreiche c-Fos-ir Neurone simultan eine Immunreaktivität für CRF aufweisen (Stern). 3V = Dritter Hirnventrikel.

In der Färbung des PVN gegen Oxytocin und c-Fos konnte nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S eine Koloration mit c-Fos in $19,78 \pm 1,93$ ($p < 0,001$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S in $36 \pm 1,68$ ($p < 0,001$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) Oxytocin-Neuronen/Hirnschnitt gefunden werden. Die Versuchstiere, denen die Vehikellösung injiziert wurde, zeigten keine Kolorationen von Oxytocin und c-Fos. Die 6 µg/kg CCK-8S Versuchsgruppe wies im Verhältnis zur Vehikel-Gruppe eine 19,8-fache und die 10 µg/kg CCK-8S Gruppe eine 36-fache Steigerung der Anzahl aktivierter Oxytocin-ir Neurone im PVN auf (Abbildung 3.5 (B), 3.9).

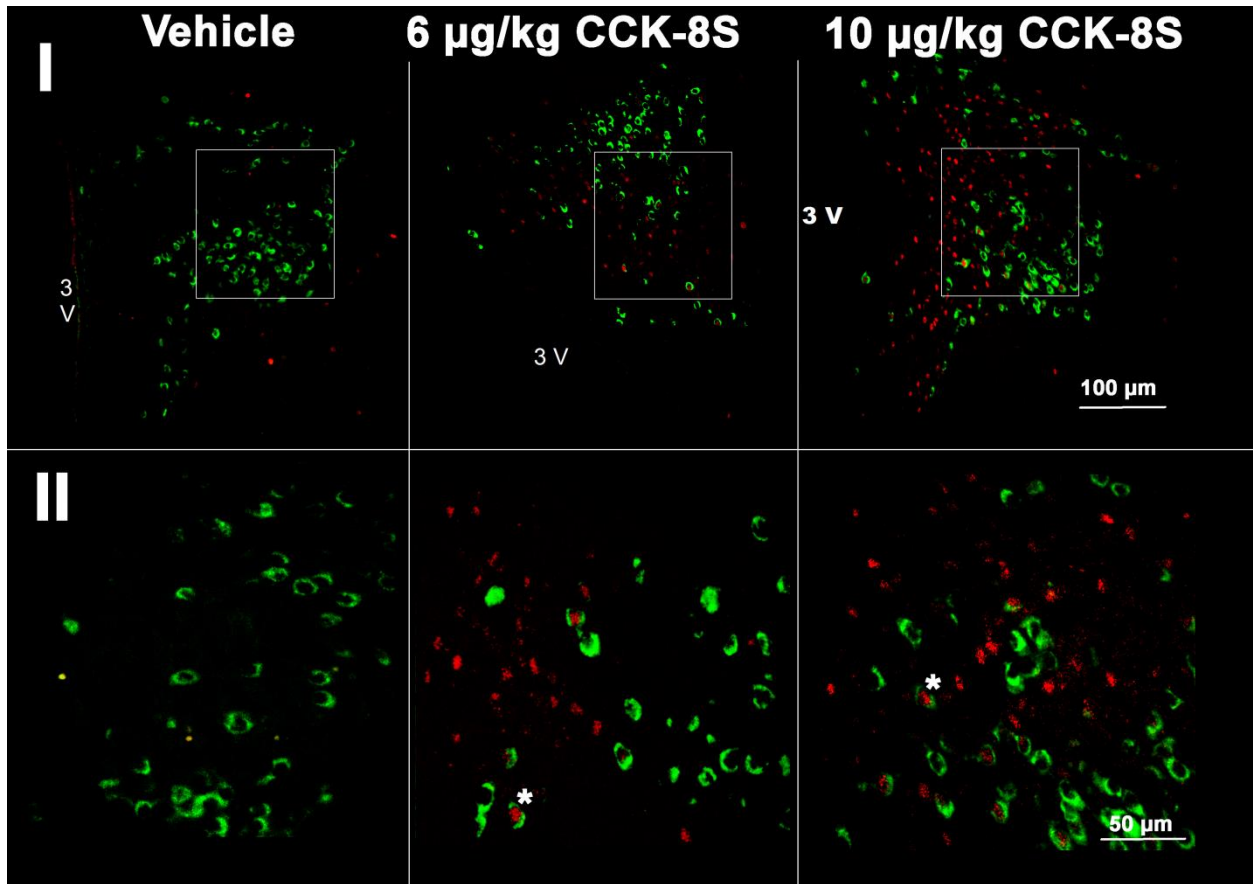


Abbildung 3.9: Darstellung repräsentativer Hirnschnitte des PVN nach der immunhistologischen Doppelfärbung gegen Oxytocin und c-Fos nach der peripheren Injektion von Kochsalzlösung, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S.

(I) Die Übersichtsaufnahmen zeigen c-Fos-ir Neurone (rote Fluoreszenzsignale) und Oxytocin-ir Neurone (grüne Fluoreszenzsignale). (II) In den Vergrößerungen der in (I) markierten Kästen lassen sich in den beiden CCK-8S Versuchsgruppen Oxytocin-ir Neurone mit c-Fos-Kolokalisationen (Stern) feststellen. Die Anzahl dieser Kolokalisationen nahm zu. 3V = Dritter Hirnventrikel.

Die prozentuale Berechnung des Anteils der aktivierten CART-Neurone im PVN zeigte, dass nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S $16,67 \pm 5,54 \%$ ($p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und nach der von 10 µg/kg CCK-8S $24,94 \pm 3,47 \%$ ($p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) der CART-ir Neurone/Hirnschnitt simultan für c-Fos immunreaktiv waren. Für die Vehikel-Gruppe wurde ein Anteil von $1,55 \pm 0,38 \%$ der beschriebenen Neuronengruppe ermittelt. Die Injektion von 6 µg/kg CCK-8S bewirkte im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine 10,4-fache und die Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 15,6-fache Steigerung des prozentualen Anteils der aktivierten CART-Neurone/Hirnschnitt (Abbildung 3.10).

Ergebnisse

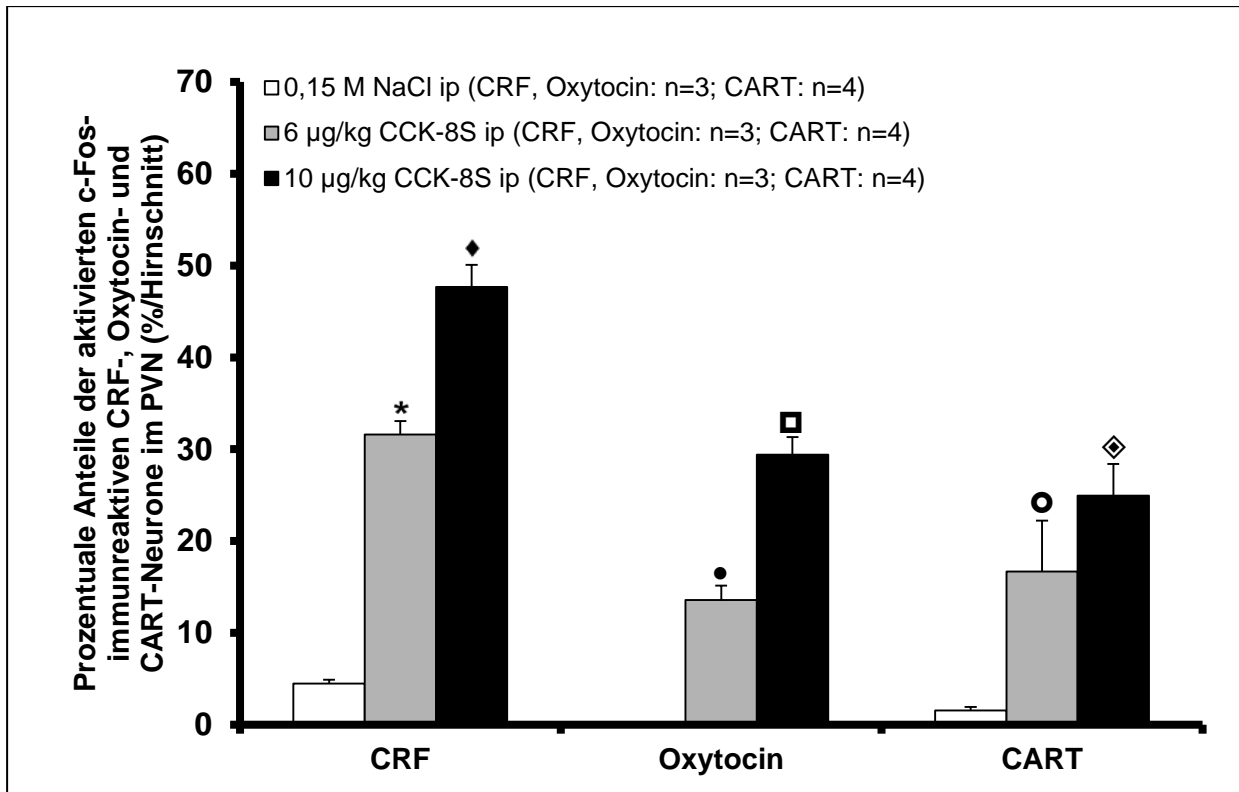


Abbildung 3.10: Darstellung der prozentualen Anteile der aktivierten c-Fos-ir CRF-, Oxytocin- und CART-Neurone/Hirnschnitt im PVN, nachdem intraperitoneal 0,15 M NaCl, 6 µg/kg und 10 µg/kg CCK-8S injiziert wurde.

Die prozentualen Berechnungen ergaben eine statistisch signifikante und dosisabhängige Steigerung der Anteile der CRF-, Oxytocin- und CART-ir Neuronen/Hirnschnitt, die eine c-Fos Kolokalisation aufweisen. Daten (%/Hirnschnitt) dargestellt als Mittelwert \pm SEM, ip= intraperitoneal, n= Anzahl der Ratten, * $p < 0,001$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ♦ $p < 0,001$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; • $p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ◻ $p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ◉ $p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; ◊ $p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl.

Der prozentuale Anteil der aktivierten CRF-ir Neurone/Hirnschnitt betrug in der 6 µg/kg CCK-8S Versuchsgruppe $31,6 \pm 1,45$ % ($p < 0,001$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und in der Versuchsgruppe mit einer Injektion von 10 µg/kg CCK-8S $47,69 \pm 2,38$ % ($p < 0,001$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl). In der Versuchsgruppe, der das Vehikel injiziert wurde, wurde ein prozentualer Anteil aktivierter CRF-ir Neurone/Hirnschnitt von $4,49 \pm 0,39$ % ermittelt. Die Injektion von 6 µg/kg CCK-8S induzierte im Verhältnis zu der Kochsalzlösung eine 7-fache und die Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 10,6-fache Zunahme des prozentualen Anteils der aktivierten CRF-Neurone im PVN (Abbildung 3.10).

Eine statistische Signifikanz und Abhängigkeit von der Dosis ergab sich auch für den prozentualen Anteil der aktivierten Oxytocin-Neurone im PVN. In der Kontrollgruppe zeigte sich keine Aktivierung Oxytocin-ir Neurone des PVN. Der prozentuale Anteil aktivierter Oxytocin-Neurone/Hirnschnitt nahm in der 6 µg/kg CCK8-S Versuchsgruppe 13,6-fach auf einen Wert von $13,59 \pm 1,54 \%$ ($p < 0,05$ vs. 10 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl) und in der 10 µg/kg CCK-8S Gruppe 29,4-fach auf $29,39 \pm 1,92 \%$ zu ($p < 0,05$ vs. 6 µg/kg CCK-8S und vs. 0,15 M NaCl; Abbildung 3.10).

3.2.2 Die Lokalisation der CART-, CRF-, Oxytocin- und c-Fos-Immunreaktivität in den Neuronen und im Gebiet des PVN

In der Immunhistochemie gegen c-Fos und CART-, Oxytocin- oder CRF wurde erwartungsgemäß Immunreaktivität für c-Fos innerhalb des Zellkerns der aktivierten Neurone des PVN beobachtet (Abbildung 3.6, 3.7, 3.11, 3.12). Immunreaktivität für die Neuropeptide CART, CRF und Oxytocin konnte im Zytoplasma und in den Axonen festgestellt werden.

CART-ir Neurone wurden im magnozellulären und vornehmlich im parvozellulären Subnucleus des PVN sowie in der periventrikulären Zone erfasst (Abbildung 3.6). Immunreaktivität für CRF wurde vor allem im parvozellulären Subnucleus, ein geringerer Teil aber auch im magnozellulären Subnucleus des PVN nachgewiesen. Im Gegensatz zu den CART- und CRF- Neuronen wurden die Mehrheit der Oxytocin-ir Neurone im Bereich des magnozellulären und ein geringer Anteil im parvozellulären Subnucleus detektiert.

Des Weiteren ergab sich in den Immunfärbungen gegen CART und CRF sowie gegen CART und Oxytocin die Beobachtung, dass die CRF- und Oxytocin-ir Neurone im PVN jeweils in ein dichtes Netzwerk aus CART-Fasern gebettet sind (Abbildung 3.11, 3.12).

Ergebnisse

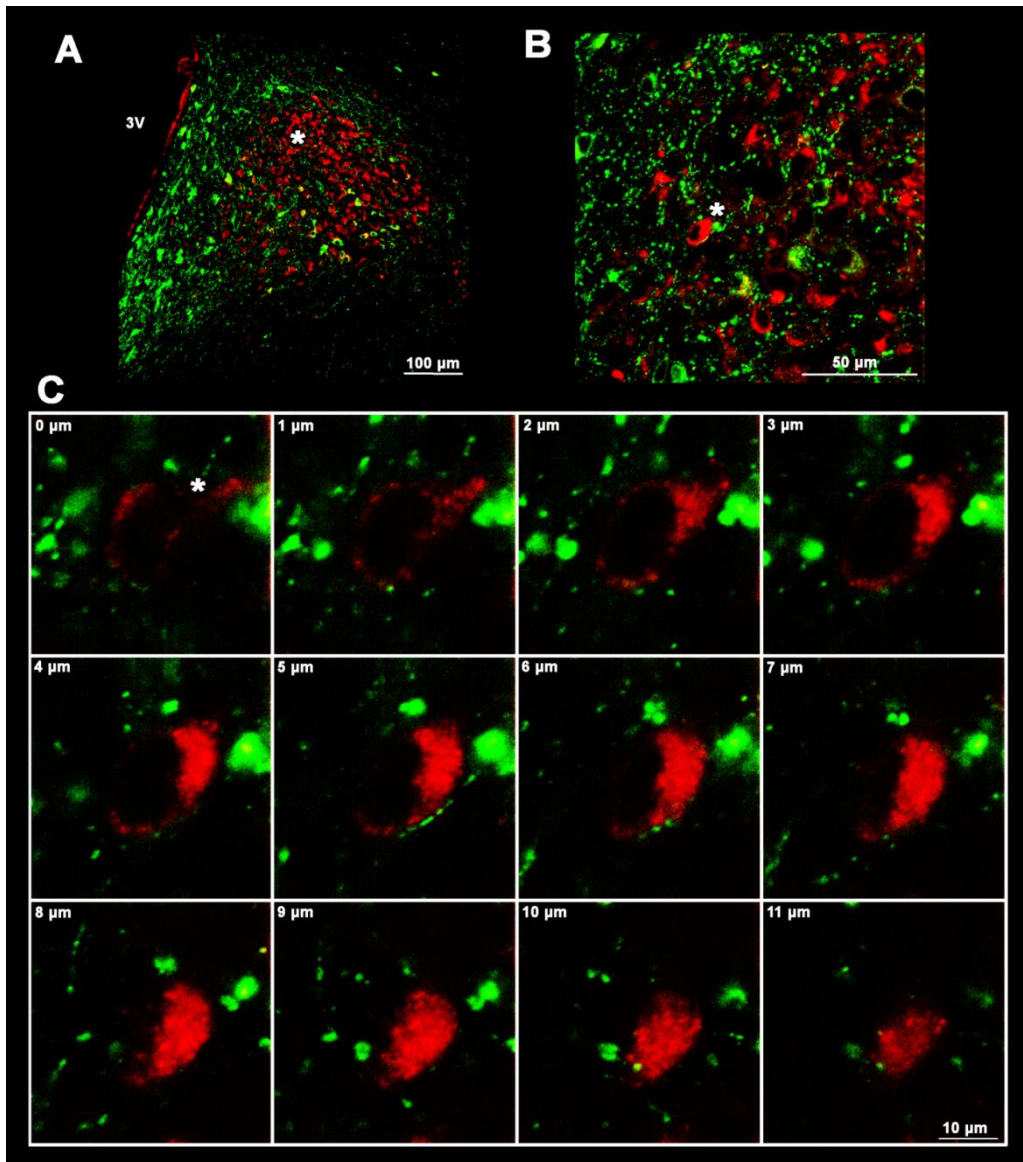


Abbildung 3.11: Immunhistologische Doppelfärbung eines repräsentativen Hirnschnittes des PVN gegen CRF und CART nach der Injektion von 10 µg/kg CCK8S.

(A) Übersichtsdarstellung des PVN mit CRF-Immunreaktivität (rote Fluoreszenzsignale) und CART-Immunreaktivität (grüne Fluoreszenzsignale). (B) In der vergrößerten Aufnahme markiert der Stern das in (C) dargestellte Neuron. (C) Die *z-stack*-Analyse des konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskops verdeutlicht die enge räumliche Beziehung zwischen den CRF-ir Neuronen und den CART-Fasern. 3 V = Dritter Ventrikel.

Ergebnisse

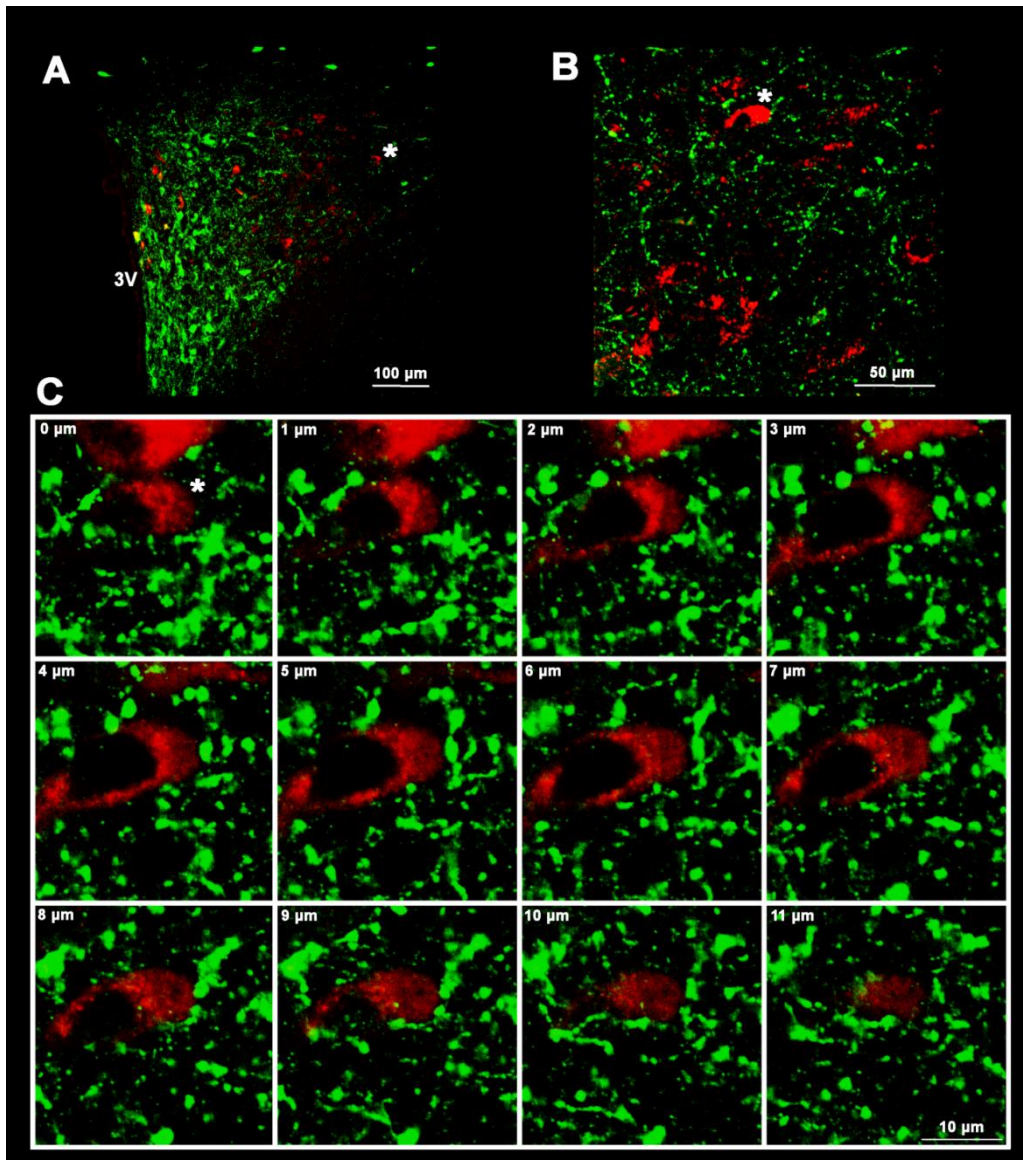


Abbildung 3.12: Immunfärbung gegen CART und Oxytocin im PVN, nachdem 10 µg/kg CCK-8S intraperitoneal injiziert wurde.

(A) Übersicht über die Immunreaktivität für CART (grüne Fluoreszenzsignale) und Oxytocin (rote Fluoreszenzsignale) im PVN. (B) In der Vergrößerung kennzeichnet der Stern das in (C) analysierte Oxytocin-Neuron. (C) In der *z-stack*-Analyse ist erkennbar, dass das Oxytocin-ir Neuron von einem dichten Netzwerk aus CART-Fasern umgeben ist. 3 V = Dritter Ventrikel.

4. Diskussion

Das gastrointestinale Peptidhormon Cholezystokinin (CCK) und das Neuropeptid *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript* (CART) sind an den regulatorischen Prozessen der Nahrungsaufnahme beteiligt. Eine besondere Bedeutung haben hierbei die Hirnregionen *Nucleus arcuatus* (ARC) und *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus und der *Nucleus tractus solitarius* (NTS) des Hirnstamms.

Das Ziel dieser Studie war es, den Zusammenhang zwischen dem gastrointestinalen Peptiden CCK und dem nahrungsregulatorischen Neuropeptid CART zu untersuchen. Es sollte ermittelt werden, ob und in welchem Maße peripher injiziertes CCK-8S die neuronale Aktivität von CART-exprimierenden Neuronen im Bereich des PVN beeinflusst. Zusätzlich sollte überprüft werden, inwiefern CCK-8S in den Dosierungen 6 µg/kg und 10 µg/kg CRF- und Oxytocin-Neuronen des PVN aktiviert.

Hierzu wurde den Versuchstieren CCK-8S in zwei unterschiedlichen Dosierungen (6 µg/kg oder 10 µg/kg) oder als Kontrolle Vehikellösung (0,15 M NaCl) intraperitoneal injiziert. Mithilfe einer c-Fos-Immunhistochemie wurde zunächst die Anzahl der aktivierten Neurone in den Hirnzentren ARC, PVN und NTS ermittelt. Die mikroskopische Auswertung der Doppelfärbung gegen das CART-Peptid und c-Fos quantifizierte im zweiten Schritt die Anzahl aktivierter CART-ir Neurone im Bereich des PVN. Die Anzahl aktivierter CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN wurde in einer Immunfärbung gegen CRF und c-Fos beziehungsweise Oxytocin und c-Fos erfasst. Eine Doppelfärbung gegen CART und CRF sowie gegen CART und Oxytocin diente dazu, mögliche lokale Zusammenhänge der Neuropeptide untereinander im PVN aufzudecken.

In den Versuchen zeigte sich, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S eine dosisabhängige statistisch signifikante Steigerung der c-Fos-Aktivität im PVN und NTS, jedoch nicht im ARC, bewirkte. Zum ersten Mal konnte nachgewiesen werden, dass eine periphere Injektion von sulfatierten CCK-Oktapeptid eine statistisch signifikante und dosisabhängige Steigerung der aktivierten CART-ir Neurone im PVN induziert. Nach der Injektion von CCK-8S in einer Dosierung von 6 µg/kg konnte eine 14-fache und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 22-fache Steigerung der Anzahl aktivierter CART-Neurone im Verhältnis zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine periphere CCK-8S-Injektion in der

Dosierung von 6 µg/kg und 10 µg/kg zu einer dosisabhängigen gesteigerten Anzahl c-Fos-ir CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN führt. Die Injektion von 6 µg/kg CCK 8S bewirkte eine 8-fache Zunahme der Anzahl aktivierter CRF-Neurone und eine 20-fache Steigerung aktivierter Oxytocin-Neurone. CCK-8S in einer Dosis von 10 µg/kg steigerte die Anzahl der CRF-Neurone mit c-Fos Kolokalisation 12-fach und die der Oxytocin-Neurone mit c-Fos-Kolokalisation 36-fach. In der konfokalen Mikroskopie konnte zudem beobachtet werden, dass CRF- und Oxytocin-ir Neurone im PVN in ein dichtes Netzwerk aus CART-Fasern eingebettet sind.

4.1 Die Rolle des Nucleus arcuatus in den Versuchen

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Studie ergaben, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S zwar zu einer Aktivierung von Neuronen des PVN und NTS, jedoch nicht des ARC führt (3.1.). Die Beobachtung, dass eine periphere Injektion von CCK-8S keine Steigerung der Expression von c-Fos in Neuronen des ARC bewirkt, zeigt sich in mehreren Studien konsistent (Wang, Martinez et al. 1998; Kobelt, Tebbe et al. 2005; Noetzel, Stengel et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe von Cullinan et al. fand heraus, dass eine Situation mit akutem Stress bei Ratten zu einer gesteigerten c-Fos-Expression in mehreren Hirngebieten führt (Cullinan, Herman et al. 1995). Die Forscher lösten bei den Versuchstieren Stress aus, indem sie diese zum Schwimmen zwangen oder die Bewegungsfreiheit einschränkten (Cullinan, Herman et al. 1995). In der darauffolgenden Immunhistologie konnte als Reaktion auf den Stress eine gesteigerte c-Fos-Immunreaktivität in den Hirngebieten des ARC, PVN und NTS festgestellt werden (Cullinan, Herman et al. 1995). In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurden die Versuchstiere in einem zweiwöchigen Training an den Ablauf der Versuche gewöhnt, um ein mögliches Auftreten von Stress zu minimieren. Die Durchführung der Versuche könnte bei den Versuchstieren dennoch eine Stressreaktion, beispielsweise durch die während des Trainings nicht durchgeführte Injektion, ausgelöst haben. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Ergebnisse der c-Fos-Färbung nicht (ausschließlich) auf die Effekte von CCK-8S zurückzuführen sind, sondern auch durch Stress induziert sein könnten. Im ARC konnte in keiner der drei Versuchsgruppen eine Steigerung der c-Fos-Immunreaktivität beobachtet werden. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die Versuchstiere während der Experimente keinen Stress empfanden. Die Ergebnisse der c-Fos-, CART-, CRF-

und Oxytocin-Immunhistologie im ARC, PVN Und NTS lassen sich somit auf den Einfluss von CCK-8S zurückführen.

4.2 Die Rolle des Nucleus paraventricularis in der nahrungsregulatorischen Wirkung von Cholezystokinin-Oktapeptid

In Bezug auf die Nahrungszufuhr nimmt der PVN eine inhibitorische Rolle ein. Der PVN ist an der Vermittlung der hemmenden Wirkung von CCK auf die Nahrungsaufnahme beteiligt. In einer Untersuchung zeigten Crawley et al., dass durch die Zerstörung des PVN die supprimierende Wirkung von peripherem CCK auf die Nahrungsaufnahme verhindert wird (Crawley und Kiss 1985). Umgekehrt wird durch eine periphere Injektion von CCK-8S eine Aktivierung von paraventriculären Neuronen ausgelöst (Olson, Hoffman et al. 1992; Mönnikes, Lauer et al. 1997 a; Wang, Martinez et al. 1998; Kobelt, Tebbe et al. 2005; Noetzel, Stengel et al. 2009).

Eine signifikante dosisabhängige Steigerung der c-Fos-ir Neurone des PVN konnte auch in dieser Arbeit nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S in zwei unterschiedlichen Dosen festgestellt werden: Nach der intraperitonealen Injektion von 6 µg/kg CCK-8S wurde im Verhältnis zur Kontrollgruppe ein 5,8-facher und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S ein 8,5-facher Anstieg der c-Fos-ir Neurone im PVN gemessen. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass CCK-8S in einer Dosis von ≥ 8 µg/kg Übelkeit und Geschmacksaversionen bei Ratten auslösen kann (Morley 1987). Diese dosisabhängige Wirkung von CCK-8S könnte die Ergebnisse der 10 µg/kg CCK-8S-Versuchsgruppe beeinflusst haben. Für eine Dosierung von CCK-8S unter 8 µg/kg sind solche Effekte nicht beschrieben (Morley 1987).

4.2.1. Die mögliche Beteiligung anorexigener Neuropeptide im PVN an der Wirkungsvermittlung von CCK

Frühere Studien zur Phänotypisierung der Neuronen des PVN zeigten, dass diese die Neuropeptide CRF, Oxytocin und Nesfatin-1 enthalten (Krahn, Gosnell et al. 1988; Olson, Drutarosky et al. 1991 a; Noetzel, Stengel et al. 2009). Gemeinsam ist diesen drei Botenstoffen ein inhibitorischer Effekt auf die Nahrungsaufnahme (Krahn, Gosnell et al. 1988; Olson, Drutarosky et al. 1991 a; Oh, Shimizu et al. 2006).

In einer Studie injizierten die Wissenschaftler Krahn et al. CRF direkt in das Kerngebiet des PVN und stellten daraufhin eine reduzierte Nahrungszufuhr der Versuchstiere fest (Krahn, Gosnell et al. 1988). Eine Steigerung der c-Fos-Immunreaktivität in CRF-ir

Diskussion

Neurone des PVN nach einer intraperitonealen CCK-8S-Injektion konnte in früheren Untersuchungen nachgewiesen werden (Verbalis, Stricker et al. 1991). Verbalis et al. verwendeten in ihren Versuchen eine einzige Dosierung von 100 µg/kg CCK-8S, um die durch CCK aktivierten CRF-Neurone zu quantifizieren (Verbalis, Stricker et al. 1991). Zum ersten Mal konnte nun gezeigt werden, dass die periphere Injektion von CCK-8S auch eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter CRF-Neurone im PVN bewirkt. Die intraperitoneale Injektion von 6 µg/kg CCK-8S beziehungsweise 10 µg/kg CCK-8S induzierte eine 8-fache respektive 12-fache statistisch signifikante Steigerung der Anzahl aktivierter CRF-ir Neurone im PVN. Während Verbalis et al. eine Dosis in Höhe von 100 µg/kg CCK-8S für ihre Versuche wählten, wurden den Versuchstieren in den hier vorgestellten Versuchen 6 µg/kg oder 10 µg/kg CCK-8S injiziert. Mönnikes et al. stellten fest, dass eine periphere Injektion von 100 µg/kg CCK-8S supraphysiologische CCK-Plasmalevel induziert (Mönnikes, Lauer et al. 1997 a). Hingegen konnte nach der Injektion von 25 µg/kg CCK-8S ein physiologischer Anstieg des Plasmalevels gemessen werden (Mönnikes, Lauer et al. 1997 a). Die Ergebnisse von Verbalis et al. könnten durch ein supraphysiologisches CCK-Plasmalevel beeinflusst worden sein. In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass periphere CCK-8S Injektionen in Dosierungen, die nicht zu supraphysiologischen CCK-Plasmawerten führen, auch eine Steigerung der Anzahl aktivierter CRF-Neurone im PVN bewirken. Zudem konnte eine durch die CCK-Dosis modulierte Beeinflussung der Aktivität der CRF-Neurone im PVN nachgewiesen werden.

Die Arbeitsgruppe von Ceccatelli et al. berichtete, dass Stress bei Ratten c-Fos-Immunreaktivität in CRF-Neuronen des PVN induziert (Ceccatelli, Villar et al. 1989). Die hier präsentierten Ergebnisse der neuronalen Aktivierung der CRF-Neurone im PVN könnten teilweise auch durch Stress, der während der Versuche auf die Ratten einwirkte, beeinflusst worden sein. Der Versuchsablauf, und somit wahrscheinlich auch das Stressniveau der Ratten, unterschied sich zwischen den Tieren der Kontrollgruppe und den beiden CCK-Gruppen nicht. Da sich der Unterschied in der Anzahl aktivierter CRF-Neurone zwischen der Vehikelgruppe und der Peptid-Gruppe als statistisch signifikant erwies, ist die Aktivierung der CRF-Neurone vermutlich auf die Wirkung von CCK-8S zurückzuführen.

Frühere Studien demonstrierten, dass die intravenöse Injektion von CCK-8S bei Ratten und bei Menschen zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von ACTH führt, dessen

Diskussion

Sekretion aus der vorderen Hypophyse durch CRF induziert wird (Rivier und Plotsky 1986; Kamilaris, Johnson et al. 1992; Calogero, Nicolosi et al. 1993). Ein signifikant verminderter Anstieg der ACTH Plasmakonzentration infolge einer peripheren CCK-8S-Injektion zeigt sich bei einer gleichzeitigen intravenösen Gabe eines CRF-Antiserums (Kamilaris, Johnson et al. 1992). Die simultane intravenöse Injektion des CCK-1-Rezeptor-Antagonisten L 364, 718 sowie die Zerstörung der vagalen Afferenzen durch Capsaicin bewirken einen geringeren Anstieg der Konzentration von ACTH im Plasma nach intravenöser CCK-Injektion (Kamilaris, Johnson et al. 1992). Die Unterbrechung oder Blockierung vagaler Afferenzen führt auch zu einer Abschwächung der anorexigenen CCK-Wirkung (Smith, Jerome et al. 1981; Ritter und Ladenheim 1985; Day, McKnight et al. 1994). Die Ergebnisse der Untersuchung von Kamilaris et al. lassen vermuten, dass peripher ausgeschüttetes CCK über CCK-1-Rezeptor und den *Nervus vagus* vermittelt zu einer Aktivierung CRF-ir Neurone des PVN führt (Kamilaris, Johnson et al. 1992). Die durch CCK aktivierten CRF-ir PVN-Neurone könnten die hypophysäre Ausschüttung von ACTH und somit einen Anstieg der Plasmakonzentration bewirken (Rivier und Plotsky 1986; Verbalis, Stricker et al. 1991; Kamilaris, Johnson et al. 1992; Calogero, Nicolosi et al. 1993).

Die intrazerebroventrikuläre Injektion von Oxytocin führt ebenfalls zu einer verminderten Aufnahme von Nahrung (Olson, Drutarosky et al. 1991 a). Untersuchungen von Verbalis et al. belegen, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S eine dosisabhängige Steigerung der Oxytocin-Konzentration im Plasma bewirkt (Verbalis, McCann et al. 1986). Nach der intraperitonealen Injektion des Peptidhormons CCK-8S (1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg) zeigt sich ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl von Oxytocin-Neuronen mit c-Fos-Kolokalisation im PVN (Verbalis, Stricker et al. 1991). In weiterführenden Versuchen zeigten andere Arbeitsgruppen, dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion des Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten Vasotocin die anorexigene Wirkung von systemisch verabreichtem CCK-8S abschwächt (Olson, Drutarosky et al. 1991 b; Blevins, Eakin et al. 2003). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Verbalis et al. zeigte sich in den hier vorgestellten Versuchen ebenfalls, dass CCK-8S eine dosisabhängige statistisch signifikante Steigerung der Anzahl aktivierter Oxytocin-Neuronen im PVN bewirkt (Verbalis, Stricker et al. 1991). Im Gegensatz zu der qualitativen Auswertung der immunhistologischen Färbung von

Diskussion

Verbalis et al., wurde in dieser Arbeit eine genaue Quantifizierung der aktivierten Oxytocin-Neurone vorgenommen. Nach der Injektion von CCK-8S in einer Dosis von 6 µg/kg konnte eine 20-fache und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 36-fache Steigerung der Anzahl aktivierter Oxytocin-ir Neurone im PVN berechnet werden. Diese Ergebnisse könnten zusammen mit den Untersuchungen von Verbalis et al. darauf hinweisen, dass an der Wirkungsübermittlung von CCK eine Aktivierung von Oxytocin-Neuronen im PVN und eine folgende Ausschüttung des anorexigenen Peptidhormon Oxytocin beteiligt sind (Verbalis, McCann et al. 1986; Verbalis, Stricker et al. 1991).

Die Wissenschaftler Oh et al. injizierten Ratten intrazerebroventrikulär Nesfatin-1 und beobachteten einen inhibierenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme (Oh, Shimizu et al. 2006). Eine weitere Studie zeigte, dass auch eine intraperitoneale Injektion von Nesfatin-1 zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme führt (Shimizu, Oh et al. 2009). Eine Injektion von Nesfatin-1 in den *Ventriculus tertius cerebri* bewirkt eine signifikante Steigerung der Anzahl c-Fos-ir Nervenzellen des PVN (Maejima, Sedbazar et al. 2009). Injiziert man Ratten kurz vor Beginn der Dunkelphase Nesfatin-1 direkt in das Kerngebiet des PVN, kann man eine verminderte Nahrungsaufnahme in den folgenden ein bis vier Stunden beobachten (Chen, Dong et al. 2012). Interessanterweise bewirkt eine intraperitoneale Injektion von CCK eine dosisabhängige Aktivierung Nesfatin-1-ir paraventriculärer Neurone (Noetzel, Stengel et al. 2009). Die Ergebnisse der genannten Studien zu Nesfatin-1 weisen darauf hin, dass auch dieses Peptidhormon einen Anteil an der inhibitorischen Wirkung von CCK auf die Nahrungsaufnahme hat.

Studien zur Phänotypisierung der Neuronen des PVN nach einer intraperitonealen Injektion von CCK berichteten bislang von einer Aktivierung von CRF-, Oxytocin- und Nesfatin-1-ir Neurone (Verbalis, Stricker et al. 1991; Noetzel, Stengel et al. 2009). Das CART-Peptid hat wie Oxytocin, CRF und Nesfatin-1 eine anorexigene Wirkung. Nach einer intrazerebroventrikulären Injektion des CART-Peptids reduzieren Ratten die Nahrungsaufnahme (Kristensen, Judge et al. 1998; Thim, Nielsen et al. 1998; Vrang, Tang-Christensen et al. 1999; Aja, Sahandy et al. 2001; Bannon, Seda et al. 2001). In einer weiterführenden Untersuchung der Arbeitsgruppe Maletinska et al. wurde gezeigt, dass die kombinierte Injektion von CCK-8S (intraperitoneal) und CART-Peptid (intrazerebroventrikulär) eine Verstärkung und Verlängerung der anorexigenen Wirkung

Diskussion

von CART bewirkt (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Die Nahrungsaufnahme wird dabei signifikant stärker reduziert als nach der singulären Injektion eines der beiden Peptide (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Für diese Beobachtung konnte ein entsprechendes Korrelat im PVN gefunden werden: Die kombinierte Injektion von CCK-8S und CART-Peptid führt zu einer signifikanten Steigerung der Anzahl c-Fos-ir paraventriculärer Neurone im Vergleich zur Injektion der einzelnen Peptide (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die simultane Injektion des CCK-1-Rezeptor-Antagonisten Devazepid die anorexigene CART-Wirkung blockiert (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Die Autoren leiteten aus diesen Ergebnissen ihrer Studie eine synergistische Interaktion zwischen CCK-8S und dem CART-Peptid ab (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Auf Grund dieser Beobachtungen lässt sich eine wichtige Rolle für CCK in der CART-vermittelten Reduktion der Nahrungsaufnahme vermuten. Zugleich weisen die Studien auch auf eine potentielle Rolle des CART-Peptids in der CCK-vermittelten Hemmung der Nahrungsaufnahme hin.

Im Hinblick auf die genannten Studien ist es interessant, dass in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Aktivierung von CART-ir Neurone im PVN nach der Injektion von CCK-8S nachgewiesen werden konnte. Die intraperitoneale Injektion von 6 µg/kg CCK-8S steigerte im Verhältnis zur Kontrollgruppe die Anzahl aktivierter CART-Neurone 14-fach und die Injektion von 10 µg/kg CCK-8S 22-fach. Somit konnte nicht nur eine Aktivierung von CART-Neuronen, sondern auch eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter CART-Neurone im PVN festgestellt werden. Die Steigerung der Anzahl c-Fos-ir CART-Neurone im PVN nach der peripheren Injektion von CCK-8S unterstützt zusammen mit den Ergebnissen von Maletinska et al. die Annahme, dass das CART-Peptid an der Vermittlung der anorexigenen Wirkung von CCK beteiligt ist (Maletinska, Maixnerova et al. 2008). Zudem könnte die dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter CART-Neurone daraufhin hinweisen, dass CCK den Aktivitätszustand der CART-Neurone im PVN moduliert.

Die vier Neuropeptiden CRF, Oxytocin, Nesfatin-1 und CART haben nicht nur alle die Eigenschaft inhibierend auf die Nahrungsaufnahme zu wirken, sondern sie könnten auch jeweils eine Rolle in der Wirkungsvermittlung von CCK spielen (Krahn, Gosnell et al. 1988; Olson, Drutarosky et al. 1991 a; Kristensen, Judge et al. 1998; Oh, Shimizu et

al. 2006). Die intraperitoneale Injektion von CCK-8S bewirkt eine Steigerung der Anzahl aktivierter CRF-, Oxytocin-, Nesfatin-1- und CART-Neurone im PVN (Verbalis, Stricker et al. 1991; Noetzel, Stengel et al. 2009).

Eine Kolokalisation von Nesfatin-1 mit Oxytocin, CRF und CART im PVN konnte in wissenschaftlichen Untersuchungen nachgewiesen werden (Brailoiu, Dun et al. 2007; Foo, Brismar et al. 2008; Kohno, Nakata et al. 2008). Der Forschungsarbeit von Maejima et al. kann man entnehmen, dass eine Injektion von Nesfatin-1 in den dritten Hirnventrikel eine gesteigerte Anzahl aktivierter Oxytocin-ir Neuronen im PVN induziert (Maejima, Sedbazar et al. 2009). Eine weiterführende *in vitro* Studie zeigte, dass Nesfatin-1 zudem eine Freisetzung von Oxytocin aus paraventriculären Neuronen bewirkt (Maejima, Sedbazar et al. 2009). Gotoh et al. wiesen nach der Injektion von Nesfatin-1 in den *Ventriculus tertius cerebri* im PVN ein vermehrtes Vorkommen von CRF nach (Gotoh, Masaki et al. 2013). Inwiefern eine periphere oder zentrale Injektion von Nesfatin-1 CART-Neurone im PVN beeinflusst, wurde bislang noch nicht untersucht. Eine intraperitoneale Injektion von Nesfatin-1 bewirkt jedoch eine signifikant gesteigerte Expression von CART in Neuronen des NTS (Shimizu, Oh et al. 2009). In einer Studie stellten Noetzel et al. nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S im PVN eine Steigerung der aktivierten Nesfatin-1 Neurone mit CRF- oder Oxytocin-Kolokalisation fest (Noetzel, Stengel et al. 2009). Die Kolokalisationen von Nesfatin-1, Oxytocin, CRF oder CART und die gegenseitigen Beeinflussungen lassen vermuten, dass zwischen den anorexigenen Neuropeptiden mögliche Interaktionen und Wirksynergismen bestehen (Brailoiu, Dun et al. 2007; Foo, Brismar et al. 2008; Kohno, Nakata et al. 2008; Maejima, Sedbazar et al. 2009; Shimizu, Oh et al. 2009; Gotoh, Masaki et al. 2013). Sowohl die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse als auch die Resultate von Noetzel et. al. unterstützen die Hypothese, dass der inhibitorische Effekt von CCK auf die Nahrungsaufnahme durch die Beteiligung und Interaktion mehrerer Neuropeptide vermittelt wird (Noetzel, Stengel et al. 2009).

4.3. Die Rolle der Afferenzen und Efferenzen des Nucleus tractus solitarius in der nahrungsregulatorischen Wirkungsübermittlung von CCK

Die Bedeutung des NTS in der Regulierung der Nahrungsaufnahme wurde durch die Forschungsarbeit von Menani et al. verdeutlicht (Menani, Colombari et al. 1996): Die

Diskussion

Wissenschaftler zerstörten das Kerngebiet des NTS durch gezielte elektrische Läsionen (Menani, Colombari et al. 1996). Danach fielen die Versuchstiere durch eine verminderte Nahrungsaufnahme und reduzierte Gewichtszunahme auf (Menani, Colombari et al. 1996). Der NTS gilt als zentrale „Schaltstelle“ und es bestehen zahlreiche Afferenzen und Efferenzen des NTS: Katecholaminerge (A2-Zellgruppe) und nicht-katecholaminerge Nervenzellen des NTS projizieren zu hypothalamischen Hirngebieten wie dem PVN, ARC, *Nucleus dorsomedialis hypothalami* (DMH) und *Nucleus supraopticus* (Ricardo und Koh 1978; Sawchenko und Swanson 1981; Sawchenko und Swanson 1982; Cunningham und Sawchenko 1988; Sawchenko, Benoit et al. 1988; Rinaman 2010). Die Forscher Rinaman et al. wiesen eine direkte synaptische Verbindung aus der Magenwand über den NTS zu Kerngebieten des Diencephalons, wie dem PVN und ARC, nach (Rinaman und Schwartz 2004). Hierzu verwendeten Rinaman et al. den Erregerstamm H129 des Herpes simplex Virus-1, der als Tracer anterograd transneuronal transportiert wird (Rinaman und Schwartz 2004). Der Tracer H129 wurde in die Magenwand von Ratten injiziert und im Anschluss wurden immunhistologische Färbungen der Hirnschnitte angefertigt (Rinaman und Schwartz 2004). Sowohl im NTS als auch im ARC und PVN konnte der Tracer H129 nachgewiesen werden (Rinaman und Schwartz 2004).

Der NTS und dessen Afferenzen und Efferenzen sind auch in die Übermittlung der anorexigenen Wirkung von CCK involviert: Die Arbeitsgruppe von Crawley et al. konnte nachweisen, dass Läsionen im parvozellulären Anteil des NTS, in welchen die Afferenzen aus dem Gastrointestinaltrakt enden, zu einem Ausbleiben der Sättigungseffekte von CCK führen (Crawley und Schwaber 1984). Interessanterweise erhalten PVN-Neurone, die durch peripheres CCK-8S aktiviert werden, noradrenerge Efferenzen von A2-Zellgruppen des NTS, die auch durch die periphere Injektion von CCK-8S aktiviert wurden (Rinaman, Hoffman et al. 1995). Eine Aktivierung katecholaminerger Neurone im Gebiet des NTS nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden (Rinaman, Verbalis et al. 1993). Die Bedeutung der noradrenergen Efferenzen aus dem NTS zum PVN für die Wirkungsübertragung von CCK zeigten Rinaman et al. in folgendem Versuch: Die Wissenschaftler zerstörten mithilfe des Toxins Saporin gezielt die noradrenergen Neurone des NTS (Rinaman 2003). Saporin wurde an einen Antikörper gegen Dopamin- β -Hydroxylase, ein Enzym das in noradrenergen Neurone synthetisiert wird,

gekoppelt und direkt in den kaudalen Anteil des NTS injiziert (Wrenn, Picklo et al. 1996; Ritter, Bugarith et al. 2001; Rinaman 2003). Nach einem Monat folgte eine intraperitoneale Gabe von CCK-8S (Rinaman 2003). Die anschließende Messung der Nahrungsaufnahme der Tiere ergab eine signifikant geringere CCK-induzierte Inhibition der Nahrungsaufnahme (Rinaman 2003). In der Immunhistologie wurde zudem eine verminderte c-Fos-Immunreaktivität in Neuronen des PVN festgestellt (Rinaman 2003). In Übereinstimmung mit anderen Studien konnte in dieser Arbeit nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S eine Steigerung der Anzahl c-Fos-ir Neurone im NTS festgestellt werden (Chen, Deutsch et al. 1993; Rinaman, Verbalis et al. 1993). Die Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone im NTS erwies sich als dosisabhängig: Im Verhältnis zur Kontrollgruppe wurde die Anzahl der c-Fos-ir Neurone nach der Injektion von 6 µg/kg CCK-8S 9-fach und nach der Injektion von 10 µg/kg CCK-8S 25,3-fach gesteigert. Interessanterweise konnte ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl aktivierter Neurone im PVN festgestellt werden. Im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Rinaman et al. könnte man mutmaßen, dass die Aktivierung der PVN-Neurone zumindest teilweise durch noradrenerge Afferenzen aus dem NTS vermittelt wurde.

In der Doppelfärbung des PVN gegen das CART-Peptid und c-Fos konnte zudem verzeichnet werden, dass die intraperitoneale Injektion von CCK-8S die Anzahl der aktivierten CART-Neurone statistisch signifikant steigert. Die Injektion von 6 µg/kg CCK-8S bewirkte im Verhältnis zur Vehikelgruppe eine 14-fache und die Injektion von 10 µg/kg CCK-8S eine 21,5-fache Steigerung. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass Noetzel et al. nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S in immunhistologischen Färbungen eine Kolokalisation von c-Fos und Nesfatin-1 im PVN nachweisen konnten (Noetzel, Stengel et al. 2009). Zudem beobachteten sie, dass Nesfatin-1-Neurone im PVN in ein dichtes Netzwerk aus Tyrosin-Hydroxylase-Fasern eingebettet waren (Noetzel, Stengel et al. 2009). Tyrosin-Hydroxylase ist ein wichtiges Enzym in der Synthese von Katecholaminen. Die Ergebnisse von Noetzel et al. unterstreichen die Annahme, dass Nesfatin-1-ir Neurone des PVN unter anderem durch katecholaminerge Projektion der A2-Zellgruppe des NTS aktiviert werden (Noetzel, Stengel et al. 2009). Noradrenerge Projektionen könnten auch bei der durch CCK-8S induzierten Aktivierung von Oxytocin-Neuronen im PVN eine Rolle spielen (Ueta, Kannan et al. 1993). Die Wissenschaftler Ueta et al. blockierten mit Phentolamin, einem

Antagonist an α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren, noradrenerge Signalwege. Eine Steigerung der Anzahl aktivierter Oxytocin-ir Neuronen im PVN durch die periphere Injektion von CCK-8S blieb daraufhin aus (Ueta, Kannan et al. 1993). In den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen konnte eine signifikant gesteigerte Anzahl aktivierter Oxytocin-Neurone im PVN nach der peripheren Injektion von CCK-8S verzeichnet werden. Katecholaminerge Afferenzen des PVN könnten diese Oxytocin-Neuronen aktiviert haben. Ähnlich wie es für Nesfatin-1- und Oxytocin-Neurone im PVN vermutet wird, könnte die Aktivierung der CART-Neurone im PVN nach der CCK-Injektion zumindest teilweise über katecholaminerge Projektionen aus dem NTS vermittelt werden. Zur Verifizierung dieser Hypothese sind weitere Studien nötig. Eine Doppelimmunhistologie des PVN gegen CART und Tyrosin-Hydroxylase nach der peripheren Injektion von CCK-8S könnte beispielsweise eine lokale Beziehung zwischen aktivierten CART-Neuronen und katecholaminergen Projektionen aufdecken. Eine selektive Blockade noradrenerger Signalwege könnte zudem weitere Hinweise geben, inwiefern katecholaminerge Afferenzen an der Aktivierung von CART-Neuronen im PVN nach der peripheren Injektion von CCK-8S beteiligt sind.

4.4 Die Wirkung von CART und Cholezystokinin auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Das CART-Peptid ist ein Botenstoff, der sowohl im Hypothalamus, in der Hypophyse als auch in der Nebenniere nachgewiesen wurde (Thim, Kristensen et al. 1999). Der Nachweis des CART-Peptids in allen drei Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse) legt eine Beteiligung von CART an den Regulierungsmechanismen der HHN-Achse nahe (Koylu, Balkan et al. 2006).

In einer Studie zeigten Vrang et al., dass eine intrazerebroventrikuläre Injektion des CART-Peptids eine Aktivierung von CRF-Neuronen im PVN bewirkt: In 89 % der CRF-ir Neurone konnte in einer immunhistologischen Doppelfärbung c-Fos-Immunreaktivität detektiert werden (Vrang, Larsen et al. 2000). Die Messung der Konzentration von Kortikosteron im Blut der Versuchstiere ergab, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion des CART-Peptids eine signifikante Steigerung des Kortikosteron-Plasmaspiegels bewirkt (Vrang, Larsen et al. 2000). Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe von Vrang in den immunhistologischen Färbungen des PVN des Weiteren beobachten, dass aktivierte CRF- und Oxytocin-Neurone jeweils von

Diskussion

einem Netzwerk aus CART-Fasern umgeben waren (Vrang, Larsen et al. 2000). Die Autoren interpretierten, dass CRF-Neurone im PVN direkt durch CART-enthaltende Axone aktiviert werden könnten (Vrang, Larsen et al. 2000). Die Aktivierung der CRF-Neurone könnte zu einer Sekretion von Kortikosteron und einer Erhöhung des Plasmaspiegels führen (Vrang, Larsen et al. 2000). In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse, der von Okumura durchgeführten Versuche erwähnenswert (Okumura, Yamada et al. 2000). Die Wissenschaftler injizierten intrazerebroventrikulär gleichzeitig zu dem CART-Peptid einen CRF-Rezeptor-Antagonisten (α -helikales CRF9-41) (Okumura, Yamada et al. 2000). Daraufhin wurde die CART-induzierte Inhibition der Sekretion von Magensäure vollständig blockiert (Okumura, Yamada et al. 2000). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass CRF zumindest teilweise an der Vermittlung der anorexigenen Wirkung von CART beteiligt ist (Okumura, Yamada et al. 2000). Die Arbeitsgruppe von Vrang stellte zudem fest, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion des CART-Peptids nicht nur zu einer Erhöhung des Plasmalevels von Kortikosteron, sondern auch zu einer Erhöhung der Konzentration von Oxytocin im Plasma führt (Vrang, Larsen et al. 2000). Ein Anteil der Oxytocin-ir Neurone des PVN wurde ebenfalls durch das CART-Peptid aktiviert (Vrang, Larsen et al. 2000).

Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch in Untersuchungen zu CCK: Eine signifikant gesteigerte Anzahl aktivierter CART-, CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN konnte in den in dieser Arbeit präsentierten Versuchen nach der peripheren Injektion von CCK-8S nachgewiesen werden. Weitere Studien demonstrierten, dass nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S die Konzentration von Kortikosteron und Oxytocin im Plasma der Versuchstiere ansteigt (Porter und Sander 1981; Verbalis, McCann et al. 1986). Eine intravenöse Gabe von CCK-8S bewirkt beim Menschen eine Steigerung der Plasmakonzentration von Kortisol (Calogero, Nicolosi et al. 1993).

In Bezug auf diese Ergebnisse sind die in dieser Arbeit durchgeführten Doppelfärbungen gegen CART und CRF sowie gegen CART und Oxytocin nach der Injektion von 10 μ g/kg CCK-8S interessant. In der Mikroskopie wurde beobachtet, dass die Oxytocin- und CRF-ir Neurone im PVN jeweils in ein dichtes Netzwerk aus CART-Fasern eingebettet sind. Die Beobachtung, dass CRF-Neuronen von CART-Fasern dicht umgeben sind, ist konsistent mit den immunhistologischen Ergebnissen von Vrang et al. (Vrang, Larsen et al. 2000). Die Methodik der Doppelfärbung und die Auswertung an einem konfokalen Mikroskop geben Aufschluss über eine enge lokale Beziehung

zwischen den angefärbten Neuropeptiden. Um jedoch eine direkte Beeinflussung der Oxytocin- und CRF-Neuronen durch CART-Fasern feststellen zu können, wären ultrastrukturelle Analysen notwendig. Die Arbeitsgruppe von Sarkar konnte axosomatische und axodendritische Kontakte zwischen CART-Axonen und CRF-Neuronen in solch einer ultrastrukturellen Analyse nachweisen (Sarkar, Wittmann et al. 2004). Ein Nachweis von direkten synaptischen Verbindungen zwischen Oxytocin-Neuronen und CART-Fasern im PVN könnte weiteren Aufschluss über die Rolle von CART in der HHN-Achse geben.

Die Ergebnisse der Doppelfärbung gegen CART, Oxytocin und CRF weisen zusammen mit den erwähnten Studien darauf hin, dass CART an der Vermittlung der CCK-Wirkung auf die CRF- und Oxytocin-Neurone im PVN beteiligt sein könnte (Porter und Sander 1981; Verbalis, McCann et al. 1986; Calogero, Nicolosi et al. 1993; Vrang, Larsen et al. 2000). Des Weiteren könnte die durch CCK induzierte Sekretion der Hormone Oxytocin und Kortikosteron zumindest teilweise durch CART vermittelt werden (Porter und Sander 1981; Verbalis, McCann et al. 1986; Calogero, Nicolosi et al. 1993; Vrang, Larsen et al. 2000). Die Neuropeptide CART, CRF und Oxytocin sowie die Aktivierung der HHN-Achse könnten umgekehrt auch in der CCK-abhängigen Regulation eine Rolle spielen.

4.4.1 Das CART-Peptid – Ein Botenstoff mit orexigener und anorexigener Wirkung?

In der Einleitung wurde bereits beschrieben, dass CART-mRNA und das CART-Peptid mit sowohl anorexigenen als auch orexigenen Neuropeptiden kolokalisiert ist (Elias, Lee et al. 1998; Lambert, Couceyro et al. 1998; Broberger 1999; Sarkar, Wittmann et al. 2004).

Die Lokalisation von CART-, CRF- und Oxytocin-ir Neuronen innerhalb des PVN wurde in dieser Arbeit nach der intraperitonealen Injektion von CCK-8S untersucht. CART konnte vornehmlich im parvozellulären, aber auch im magnozellulären Subnucleus sowie in der periventriculären Zone detektiert werden. Oxytocin war hauptsächlich im magnozellulären und CRF vor allem im parvozellulären Subnucleus lokalisiert. Die Beobachtungen zu den Lokalisationen der Neuropeptide CART, Oxytocin und CRF innerhalb des PVN bestätigen die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von Verbalis et al. und Vrang et al. (Verbalis, Stricker et al. 1991). Die Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass es intrazelluläre Kolokalisationen zwischen CART und CRF im Bereich

Diskussion

des parvozellulären Subnucleus und zwischen CART und Oxytocin im magnozellularen Subnucleus geben könnte. In Studien zur Phänotypisierung von CART-Neuronen konnte bislang nur eine sehr geringe oder keine Kollokalisierung zwischen CART und CRF im parvozellulären Subnucleus des PVN festgestellt werden (Vrang, Larsen et al. 1999; Larsen, Seier et al. 2003). Eine simultane Immunreaktivität für Oxytocin und CART hingegen konnte in früheren Forschungsarbeiten vor allem in den Neuronen des magnozellularen Subnucleus des PVN detektiert werden (Vrang, Larsen et al. 1999; Larsen, Seier et al. 2003). In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass vorherige Untersuchungen im PVN Kollokalisierungen von CRF und Oxytocin mit dem anorexigenen Neuropeptid Nesfatin-1 nachwies (Brailoiu, Dun et al. 2007; Foo, Brismar et al. 2008; Kohno, Nakata et al. 2008; Noetzel, Stengel et al. 2009). Hierbei wurden zugleich Nesfatin-1- und CRF-exprimierende Neurone vor allem im parvozellulären Subnucleus beobachtet (Brailoiu, Dun et al. 2007; Foo, Brismar et al. 2008; Kohno, Nakata et al. 2008; Noetzel, Stengel et al. 2009). Kollokalisierungen von Nesfatin-1 und Oxytocin wurden besonders im magnozellularen Subnucleus detektiert (Brailoiu, Dun et al. 2007; Foo, Brismar et al. 2008; Kohno, Nakata et al. 2008; Noetzel, Stengel et al. 2009). Die Arbeitsgruppe von Foo et al. stellte zudem intrazelluläre Kollokalisierungen von Nesfatin-1 und CART im PVN fest (Foo, Brismar et al. 2008). Das Detektieren mehrerer neurogener Botenstoffe innerhalb einer Nervenzelle könnte zum einen dafür sprechen, dass sich diese Peptide gegenseitig regulieren und beeinflussen. Zum anderen könnte die Kollokalisierung von CART mit dem anorexigenen CRF, Oxytocin und Nesfatin-1 auf eine synergistisch inhibierende Wirkung auf die Nahrungsaufnahme hinweisen (Abbildung 4.1).

In mehreren wissenschaftlichen Arbeiten wurde eine Abhängigkeit zwischen dem Ort der Injektion des CART Peptids und der daraufhin entwickelten orexigenen oder anorexigenen Wirkung beobachtet: Die intrazerebroventrikuläre Applikation von rekombinantem CART-Peptid bewirkt bei Ratten eine Hemmung der Nahrungsaufnahme (Kristensen, Judge et al. 1998). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung stimuliert die intrazerebroventrikuläre Injektion von Antikörpern gegen das CART-Peptid die Nahrungsaufnahme (Lambert, Couceyro et al. 1998). Diskrepante Ergebnisse erhielten Abbott et al. in ihren Untersuchungen: Die Wissenschaftler injizierten Fragmente des CART-Peptides (55-102) direkt in die hypothalamischen Kern-

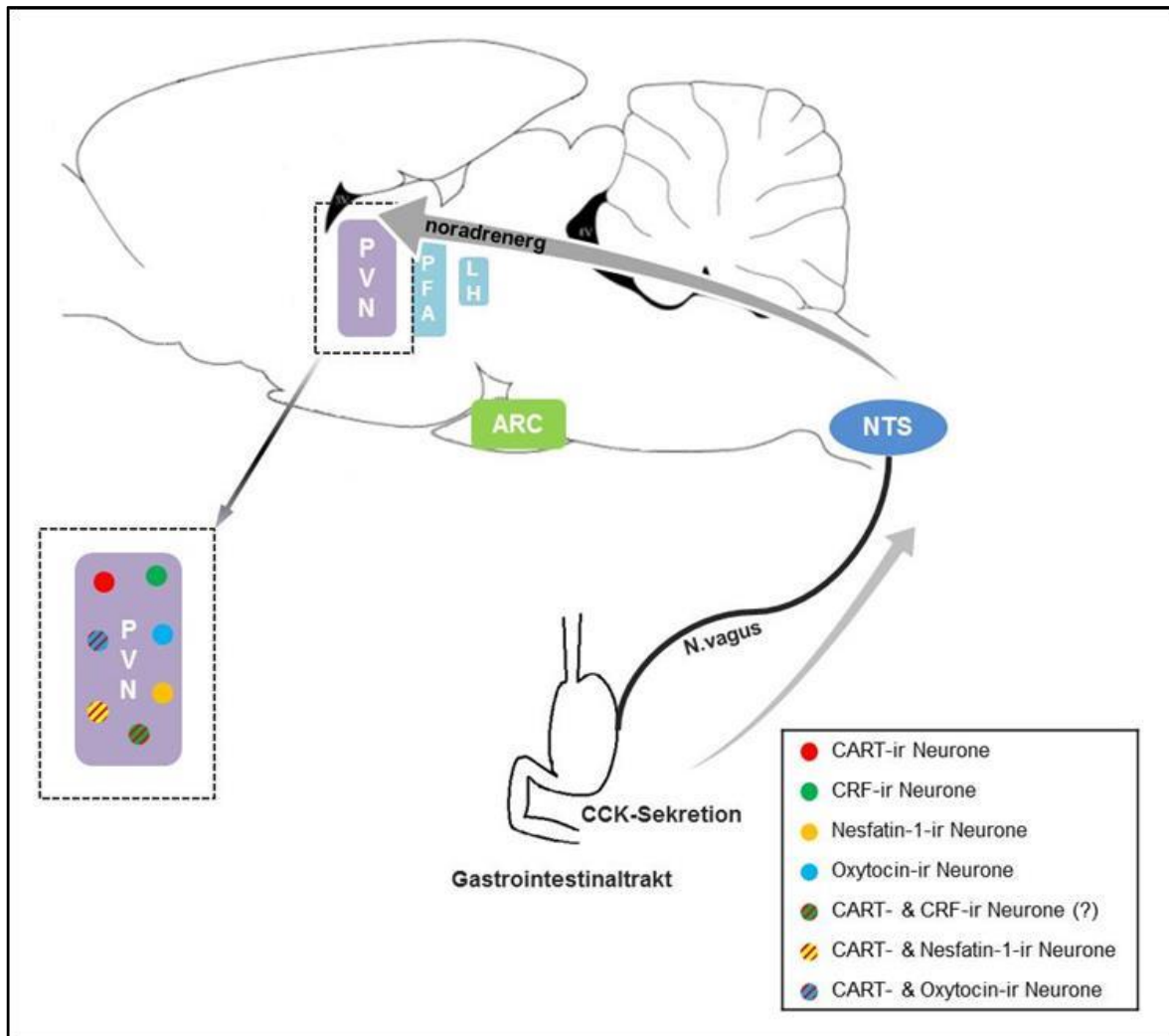


Abbildung 4.1: (I) Darstellung intraneuronaler Kolokalisationen anorexigener Neuropeptide im PVN und (II) vereinfachte Abbildung möglicher Signalwege von peripher sezerniertem CCK.

(I) Im PVN konnte eine intraneuronale Kolokalisation von CART-Peptid (hier: rot) und Oxytocin (hier blau) sowie CART-Peptid und Nesfatin-1 (hier: gelb) nachgewiesen werden (Vrang, Larsen et al. 1999; Larsen, Seier et al. 2003; Foo, Brismar et al. 2008). Eine geringe oder keine Kolokalisation von CART-Peptid und CRF konnte bislang gezeigt werden (Vrang, Larsen et al. 1999; Larsen, Seier et al. 2003). Die Kolokalisationen könnten auf eine synergistisch inhibierende Wirkung der Neuropeptide CART, CRF, Nesfatin-1 und Oxytocin hinweisen.

(II) Die periphere Injektion von CCK-8S bewirkt eine Aktivierung katecholaminerger Neurone im NTS (Rinaman, Verbalis et al. 1993). Noradrenerge Afferenzen aus dem NTS könnten daraufhin die Aktivierung der Neuronen im PVN vermitteln und somit eine wichtige Rolle in der Wirkungsübertragung von peripherem CCK einnehmen (Ueta, Kannan et al. 1993; Noetzel, Stengel et al. 2009). ARC = *Nucleus arcuatus*, AgRP = *Agouti-related protein*, CART = *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*, CCK = Cholezystokinin, CRF = *Corticotropin-releasing factor*, -ir = immunreaktiv, LH = lateraler Hypothalamus, NTS = *Nucleus tractus solitarius*, N.vagus = *Nervus vagus*, PFA = perifornikales Gebiet, PVN = *Nucleus paraventricularis*. Abbildung des Sagittalschnitts des Rattenhirns aus (Paxinos und Watson 1997).

gebiete *Nucleus ventromediales*, ARC, PVN, *Nucleus dorsomediales*, *Nucleus supraopticus* und in den lateralen oder anterioren Anteil des Hypothalamus (Abbott, Rossi et al. 2001). Nach der Injektion wurde bei den Versuchstieren eine vermehrte Nahrungsaufnahme festgestellt (Abbott, Rossi et al. 2001). Ähnliche Resultate kann man auch Forschungsarbeiten entnehmen, die ein CART-Transgen in ihren Versuchen verwendeten (Kong, Stanley et al. 2003; Smith, Gardiner et al. 2008). Dieses Transgen bewirkt in den Nervenzellen eine gesteigerte Synthese von CART-Peptid. Das CART-Transgen wurde gezielt stereotaktisch in den ARC oder PVN eingebracht (Kong, Stanley et al. 2003; Smith, Gardiner et al. 2008). Daraufhin konnte ein Anstieg der Nahrungsaufnahme und eine Gewichtszunahme der Ratten gemessen werden (Kong, Stanley et al. 2003; Smith, Gardiner et al. 2008). Qing et al. injizierten präparierte adeno-assoziierte Viren, die eine gesteigerte Synthese des CART-Peptids bewirken, in den dritten Hirnventrikel übergewichtiger Ratten (Qing und Chen 2007). Die Wissenschaftler beobachteten im Gegensatz zu Kong et al. und Smith et al. eine signifikante Abnahme der Nahrungsaufnahme und eine verminderte Gewichtszunahme der Versuchstiere (Qing und Chen 2007).

Die Autoren Aja et al. vermuten den Einfluss eines „Lokalitätsfaktors“ für die anorexigene und orexigene CART-Wirkung (Aja, Sahandy et al. 2001): In ihrer Studie blockierten sie das Aquädukt bei Ratten und verhinderten somit die physiologische Kommunikation des Liquorflusses zwischen dem dritten und vierten Hirnventrikel (Aja, Sahandy et al. 2001). Zunächst wurde das Fressverhalten der Ratten ohne vorherige Blockade des Aquäduktes untersucht (Aja, Sahandy et al. 2001). Die Injektion von CART-Peptid (55-102) sowohl in den dritten als auch in den vierten Ventrikel führte zu einer in der Frequenz und Menge verminderten Nahrungsaufnahme (Aja, Sahandy et al. 2001). Nach der Blockade des Aquädukts konnte in der Versuchsgruppe, der CART in den dritten Ventrikel injiziert wurde, eine signifikante Abschwächung dieses Effektes festgestellt werden. (Aja, Sahandy et al. 2001). Die Versuchsgruppe mit der Injektion in den vierten Ventrikel zeigte nach der Blockierung des Aquädukts keinen Unterschied in der Nahrungsaufnahme (Aja, Sahandy et al. 2001). Die Autoren der Studie nehmen an, dass die anorexigenen Effekte von CART durch die *Medulla oblongata* vermittelt werden könnten (Aja, Sahandy et al. 2001). Eine Vermittlung der orexigenen CART-Wirkung durch Kerngebiete des Hypothalamus wäre vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Aja et al. denkbar. Diese Hypothese wird durch die oben genannte

Diskussion

Studie von Abbott et al. unterstützt, die eine orexigene CART-Wirkung nach der direkten Injektion von CART in den Hypothalamus nachwies (Abbott, Rossi et al. 2001). In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass CART-Knock-out Mäuse im Vergleich mit anderen gleichaltrigen Mäusen ein gesteigertes Körpergewicht aufweisen (Wierup, Richards et al. 2005). Ein gezieltes Abschalten des CART-Genes im Hypothalamus oder im Hirnstamm könnte mehr Aufschluss über den Einfluss der Lokalisation auf die anorexigene oder orexigene CART-Wirkung geben (Parker und Bloom 2012).

Die im Ergebnissteil dieser Arbeit dargelegten Resultate zeigen, dass eine intraperitoneale Injektion des anorexigenen CCK zu einer statistisch signifikant gesteigerten Anzahl aktivierter CART-ir Neuronen im PVN führt. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass CART eine Rolle in der Nahrungsregulation spielt. Verschiedene Studien zeigen, dass das CART-Peptid sowohl an orexigenen als auch anorexigenen Regulationsmechanismen beteiligt ist (Kristensen, Judge et al. 1998; Lambert, Couceyro et al. 1998; Abbott, Rossi et al. 2001; Aja, Sahandy et al. 2001; Kong, Stanley et al. 2003; Qing und Chen 2007; Smith, Gardiner et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation der CART-Neuronen und der jeweiligen Wirkungsweise auf die Nahrungsregulation könnte bestehen (Aja, Sahandy et al. 2001). Weitere wissenschaftliche Untersuchungen sind notwendig, um genauere Einblicke in die Wirkungsweise von CART in der Nahrungsregulation zu erlangen. Diesbezüglich könnten die Forschungsergebnisse von Lin et al. von Bedeutung sein (Lin, Hall et al. 2011). Die Arbeitsgruppe fand in einer *in vitro*-Studie heraus, dass PACAP 6-38 als CART-Rezeptor-Antagonist eingesetzt werden könnte (Lin, Hall et al. 2011). Die Wissenschaftler Burgos et al. injizierten Ratten daraufhin CART-Peptid (55-102) und PACAP 6-38 in den vierten Hirnventrikel (Burgos, Iresjo et al. 2013). Die folgende Untersuchung ergab, dass PACAP 6-38 die von CART induzierte Hypophagie sowie den Gewichtsverlust blockiert (Burgos, Iresjo et al. 2013). Eine Injektion von PACAP 6-38 ohne CART-Peptid in den vierten Ventrikel bewirkte bei den Versuchstieren keine Veränderung im Nahrungsverhalten (Burgos, Iresjo et al. 2013). Nach der simultanen Injektion von PACAP 6-38 und CART wurden zwar die Hypophagie und der Gewichtsverlust blockiert, ein Effekt von CART auf das motorische Verhalten, der in vorherigen Studien beobachtet wurde, blieb jedoch unbeeinflusst (Kimmel, Gong et al.

2000; Aja, Sahandy et al. 2001; Burgos, Iresjo et al. 2013). Die Forscher vermuteten, dass die unterschiedlichen Effekte des CART-Peptids über multiple CART-Rezeptor-Subtypen vermittelt werden könnten (Burgos, Iresjo et al. 2013). Die Rolle des CART-Peptids in der Nahrungsaufnahme könnte mithilfe des CART-Rezeptor-Antagonisten PACAP 6-38 weiter erforscht werden. Ein Versuchsaufbau mit einer Blockade des Aquädukts, wie von Aja et al. in ihrer Studie durchgeführt, ist vorstellbar. (Aja, Sahandy et al. 2001). Nach der Aquädukt-Blockade könnte PACAP 6-38 zusammen mit CART-Peptid in den dritten oder vierten Hirnventrikel injiziert werden. Die CART-Wirkung könnte somit gezielt im Hirnstamm oder Hypothalamus blockiert werden. Hierdurch könnte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation von CART und dem anorexigenen oder orexigenen CART-Effekt besteht. Fraglich ist jedoch, ob die orexigenen Effekte von CART auch durch PACAP 6-38 blockiert werden. Burgos et al. stellten die Hypothese auf, dass mehrere CART-Rezeptor-Subtypen existieren könnten (Burgos, Iresjo et al. 2013). Die orexigene CART-Wirkung könnte über einen anderen Rezeptor-Subtyp als die anorexigenen Effekte vermittelt werden. Somit ist es vorstellbar, dass PACAP 6-38 die nahrungsaufnahme-fördernde CART-Wirkung nicht antagonisiert.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die anorexigene Wirkung von CART einen Anteil des inhibitorischen Effektes von CCK auf die Nahrungsaufnahme darstellt. Diesbezüglich wäre es interessant herauszufinden, ob und in welchem Maße der nahrungsaufnahmehemmende Effekt von CCK auf der anorexigenen Wirkung von CART beruht. In einer Folgestudie könnte versucht werden, die anorexigene CART Wirkung durch eine intrazerebroventrikuläre Injektion von PACAP 6-38 bei Ratten zu blockieren. Nach einer intraperitonealen Injektion von CCK-8S könnte die anschließende Nahrungsaufnahme erfasst und in Verhältnis mit der Nahrungszufuhr einer nicht mit PACAP 6-38 behandelten Kontrollgruppe gesetzt werden. Zusammenfassend könnte durch die Untersuchung die Beteiligung von CART an der anorexigenen CCK-Wirkung quantifiziert werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Studie zeigte, dass peripheres CCK-8S eine Steigerung der Anzahl aktivierter CART-Neurone im PVN induziert. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Hypothese, dass CART an der anorexigenen Wirkung von CCK beteiligt ist. Eine weiterführende Erforschung des Zusammenspiels von CCK und CART könnte die

Diskussion

Regulation der Nahrungsaufnahme genauer beleuchten. Der Wissenszuwachs im Bereich der Nahrungsregulation stellt einen wichtigen Baustein im Verständnis der Adipositas dar. Hieraus könnten neue Therapiemöglichkeiten entstehen, die zu einer Senkung der Prävalenz der Fettleibigkeit und der damit verbundenen Folgeerkrankungen beitragen.

5. Literaturverzeichnis

- Abbott, C. R., M. Rossi, A. M. Wren, K. G. Murphy, A. R. Kennedy, S. A. Stanley, A. N. Zollner, D. G. Morgan, I. Morgan, M. A. Ghatei, C. J. Small und S. R. Bloom. Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* 142, 2001; 8: 3457-3463.
- Adams, J. C. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 40, 1992; 10: 1457-1463.
- Aja, S., S. Sahandy, E. E. Ladenheim, G. J. Schwartz und T. H. Moran. Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, 2001; 6: R1862-1867.
- Amir, S. Stimulation of the paraventricular nucleus with glutamate activates interscapular brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Brain Res* 508, 1990; 1: 152-155.
- Anagnostides, A. A., V. S. Chadwick, A. C. Selden, J. Barr und P. N. Maton. Human pancreatic and biliary responses to physiological concentrations of cholecystokinin octapeptide. *Clin Sci (Lond)* 69, 1985; 3: 259-263.
- Anand, B. K. und R. V. Pillai. Activity of single neurones in the hypothalamic feeding centres: effect of gastric distension. *J Physiol* 192, 1967; 1: 63-77.
- Antin, J., J. Gibbs, J. Holt, R. C. Young und G. P. Smith. Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. *J Comp Physiol Psychol* 89, 1975; 7: 784-790.
- Antunes, J. L., P. W. Carmel und E. A. Zimmerman. Projections from the paraventricular nucleus to the zona externa of the median eminence of the rhesus monkey: an immunohistochemical study. *Brain Res* 137, 1977; 1: 1-10.
- Arase, K., D. A. York, H. Shimizu, N. Shargill und G. A. Bray. Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255, 1988; 3 Pt 1: E255-259.
- Armstrong, W. E. und G. I. Hatton. The localization of projection neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus following vascular and neurohypophysial injections of HRP. *Brain Res Bull* 5, 1980; 4: 473-477.
- Arvaniti, K., Q. Huang und D. Richard. Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. *Neuroendocrinology* 73, 2001; 4: 227-236.
- Asai, J., M. Nakazato, K. Kangawa, S. Matsukura und H. Matsuo. Isolation and sequence determination of rat islet amyloid polypeptide. *Biochem Biophys Res Commun* 164, 1989; 1: 400-405.
- Asakawa, A., A. Inui, H. Yuzuriha, T. Nagata, T. Kaga, N. Ueno, M. A. Fujino und M. Kasuga. Cocaine-amphetamine-regulated transcript influences energy metabolism, anxiety and gastric emptying in mice. *Horm Metab Res* 33, 2001; 9: 554-558.
- Asakawa, A., A. Inui, H. Yuzuriha, N. Ueno, G. Katsuura, M. Fujimiya, M. A. Fujino, A. Nijima, M. M. Meguid und M. Kasuga. Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* 124, 2003; 5: 1325-1336.

Literaturverzeichnis

- Bai, F. L., M. Yamano, Y. Shiotani, P. C. Emson, A. D. Smith, J. F. Powell und M. Tohyama. An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331, 1985; 1: 172-175.
- Baker, R. A. und M. Herkenham. Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *J Comp Neurol* 358, 1995; 4: 518-530.
- Bannon, A. W., J. Seda, M. Carmouche, J. M. Francis, M. A. Jarosinski und J. Douglass. Multiple behavioral effects of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptides in mice: CART 42-89 and CART 49-89 differ in potency and activity. *J Pharmacol Exp Ther* 299, 2001; 3: 1021-1026.
- Baranowska, B., E. Wolinska-Witort, L. Martynska, M. Chmielowska und A. Baranowska-Bik. Effects of cocaine-amphetamine regulated transcript (CART) on hormone release. *Regul Pept* 122, 2004; 2: 55-59.
- Barrachina, M. D., V. Martinez, L. Wang, J. Y. Wei und Y. Tache. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1997; 19: 10455-10460.
- Barthel, L. K. und P. A. Raymond. Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 38, 1990; 9: 1383-1388.
- 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 und S. R. Bloom. Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 2002; 6898: 650-654.
- Baura, G. D., D. M. Foster, D. Porte, Jr., S. E. Kahn, R. N. Bergman, C. Cobelli und M. W. Schwartz. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest* 92, 1993; 4: 1824-1830.
- Beckstead, R. M. und R. Norgren. An autoradiographic examination of the central distribution of the trigeminal, facial, glossopharyngeal, and vagal nerves in the monkey. *J Comp Neurol* 184, 1979; 3: 455-472.
- Beinfeld, M. C., D. K. Meyer, R. L. Eskay, R. T. Jensen und M. J. Brownstein. The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Res* 212, 1981; 1: 51-57.
- Berthoud, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 2002; 4: 393-428.
- Berthoud, H. R., G. M. Sutton, R. L. Townsend, L. M. Patterson und H. Zheng. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol Behav* 89, 2006; 4: 517-524.
- Blevins, J. E., T. J. Eakin, J. A. Murphy, M. W. Schwartz und D. G. Baskin. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res* 993, 2003; 1-2: 30-41.
- Blevins, J. E., M. W. Schwartz und D. G. Baskin. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, 2004; 1: R87-96.
- Brailoiu, G. C., S. L. Dun, E. Brailoiu, S. Inan, J. Yang, J. K. Chang und N. J. Dun. Nesfatin-1: distribution and interaction with a G protein-coupled receptor in the rat brain. *Endocrinology* 148, 2007; 10: 5088-5094.

Literaturverzeichnis

- Broberger, C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Res* 848, 1999; 1-2: 101-113.
- Broberger, C., J. Johansen, C. Johansson, M. Schalling und T. Hokfelt. 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, 1998; 25: 15043-15048.
- Brown, T. A., M. C. Washington, S. A. Metcalf und A. I. Sayegh. The feeding responses evoked by cholecystokinin are mediated by vagus and splanchnic nerves. *Peptides* 32, 2011; 8: 1581-1586.
- Bruhn, T. O., E. L. Anthony, P. Wu und I. M. Jackson. GRF immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat: an immunohistochemical study with monoclonal and polyclonal antibodies. *Brain Res* 424, 1987; 2: 290-298.
- Buffa, R., E. Solcia und V. L. Go. Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 70, 1976; 4: 528-532.
- Burgos, J. R., B. M. Iresjo und U. Smedh. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 6-38 blocks cocaine- and amphetamine-regulated transcript Peptide-induced hypophagia in rats. *PLoS One* 8, 2013; 8: e72347.
- Calogero, A. E., A. M. Nicolosi, M. L. Moncada, F. Coniglione, E. Vicari, P. Polosa und R. D'Agata. Effects of cholecystokinin octapeptide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and on vasopressin, prolactin and growth hormone release in humans. *Neuroendocrinology* 58, 1993; 1: 71-76.
- Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos und P. Burn. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 1995; 5223: 546-549.
- Ceccatelli, S., M. J. Villar, M. Goldstein und T. Hokfelt. Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1989; 23: 9569-9573.
- Chan, J. M., E. B. Rimm, G. A. Colditz, M. J. Stampfer und W. C. Willett. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 17, 1994; 9: 961-969.
- Chance, W. T., A. Balasubramaniam, A. Stallion und J. E. Fischer. Anorexia following the systemic injection of amylin. *Brain Res* 607, 1993; 1-2: 185-188.
- Chaudhri, O. B., V. Salem, K. G. Murphy und S. R. Bloom. Gastrointestinal satiety signals. *Annu Rev Physiol* 70, 2008: 239-255.
- Chen, D., C. M. Zhao, R. Hakanson, L. C. Samuelson, J. F. Rehfeld und L. Friis-Hansen. Altered control of gastric acid secretion in gastrin-cholecystokinin double mutant mice. *Gastroenterology* 126, 2004; 2: 476-487.
- Chen, D. Y., J. A. Deutsch, M. F. Gonzalez und Y. Gu. The induction and suppression of c-fos expression in the rat brain by cholecystokinin and its antagonist L364,718. *Neurosci Lett* 149, 1993; 1: 91-94.
- Chen, X., J. Dong und Z. Y. Jiang. Nesfatin-1 influences the excitability of glucosensing neurons in the hypothalamic nuclei and inhibits the food intake. *Regul Pept* 177, 2012; 1-3: 21-26.

Literaturverzeichnis

- Chiu, R., W. J. Boyle, J. Meek, T. Smeal, T. Hunter und M. Karin. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 1988; 4: 541-552.
- Chronwall, B. M., D. A. DiMaggio, V. J. Massari, V. M. Pickel, D. A. Ruggiero und T. L. O'Donohue. The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15, 1985; 4: 1159-1181.
- Civelli, O., N. Birnberg und E. Herbert. Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J Biol Chem* 257, 1982; 12: 6783-6787.
- Clancy, B. und L. J. Cauller. Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J Neurosci Methods* 83, 1998; 2: 97-102.
- Clark, J. T., P. S. Kalra, W. R. Crowley und S. P. Kalra. Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115, 1984; 1: 427-429.
- Cohen, M. A., S. M. Ellis, C. W. Le Roux, R. L. Batterham, A. Park, M. Patterson, G. S. Frost, M. A. Ghatei und S. R. Bloom. Oxyntomodulin suppresses appetite and reduces food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2003; 10: 4696-4701.
- Corp, E. S., J. McQuade, T. H. Moran und G. P. Smith. Characterization of type A and type B CCK receptor binding sites in rat vagus nerve. *Brain Res* 623, 1993; 1: 161-166.
- Couceyro, P. R., E. O. Koylu und M. J. Kuhar. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *J Chem Neuroanat* 12, 1997; 4: 229-241.
- Crawley, J. N. Comparative distribution of cholecystokinin and other neuropeptides. Why is this peptide different from all other peptides? *Ann N Y Acad Sci* 448, 1985: 1-8.
- Crawley, J. N. und M. C. Beinfeld. Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. *Nature* 302, 1983; 5910: 703-706.
- Crawley, J. N. und R. L. Corwin. Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15, 1994; 4: 731-755.
- Crawley, J. N. und J. Z. Kiss. Paraventricular nucleus lesions abolish the inhibition of feeding induced by systemic cholecystokinin. *Peptides* 6, 1985; 5: 927-935.
- Crawley, J. N. und J. S. Schwaber. Abolition of the behavioral effects of cholecystokinin following bilateral radiofrequency lesions of the parvocellular subdivision of the nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 295, 1984; 2: 289-299.
- Cullinan, W. E., J. P. Herman, D. F. Battaglia, H. Akil und S. J. Watson. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 1995; 2: 477-505.
- Cunningham, E. T., Jr., R. R. Miselis und P. E. Sawchenko. The relationship of efferent projections from the area postrema to vagal motor and brain stem catecholamine-containing cell groups: an axonal transport and immunohistochemical study in the rat. *Neuroscience* 58, 1994; 3: 635-648.
- Cunningham, E. T., Jr. und P. E. Sawchenko. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274, 1988; 1: 60-76.
- Dakin, C. L., I. Gunn, C. J. Small, C. M. Edwards, D. L. Hay, D. M. Smith, M. A. Ghatei und S. R. Bloom. Oxyntomodulin inhibits food intake in the rat. *Endocrinology* 142, 2001; 10: 4244-4250.

Literaturverzeichnis

- Dale, H. H. On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34, 1906; 3: 163-206.
- Date, Y., N. Murakami, K. Toshinai, S. Matsukura, A. Niiijima, H. Matsuo, K. Kangawa und M. Nakazato. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123, 2002; 4: 1120-1128.
- Day, H. E., A. T. McKnight, J. A. Poat und J. Hughes. Evidence that cholecystokinin induces immediate early gene expression in the brainstem, hypothalamus and amygdala of the rat by a CCKA receptor mechanism. *Neuropharmacology* 33, 1994; 6: 719-727.
- de Montigny, C. Cholecystokinin tetrapeptide induces panic-like attacks in healthy volunteers. Preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 46, 1989; 6: 511-517.
- Deschenes, R. J., L. J. Lorenz, R. S. Haun, B. A. Roos, K. J. Collier und J. E. Dixon. Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rat preprocholecystokinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1984; 3: 726-730.
- Dierickx, K. und F. Vandesande. Immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res* 201, 1979; 3: 349-359.
- Dobbins, E. G. und J. L. Feldman. Brainstem network controlling descending drive to phrenic motoneurons in rat. *J Comp Neurol* 347, 1994; 1: 64-86.
- Dockray, G. J. Cholecystokinins in rat cerebral cortex: identification, purification and characterization by immunochemical methods. *Brain Res* 188, 1980; 1: 155-165.
- Dockray, G. J. Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept* 155, 2009; 1-3: 6-10.
- Douglass, J. und S. Daoud. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding CART: a cocaine- and amphetamine-regulated transcript. *Gene* 169, 1996; 2: 241-245.
- Douglass, J., A. A. McKinzie und P. Couceyro. PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15, 1995; 3 Pt 2: 2471-2481.
- Dube, D., J. C. Lissitzky, R. Leclerc und G. Pelletier. Localization of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rat brain and pituitary. *Endocrinology* 102, 1978; 4: 1283-1291.
- Elias, C. F., C. Lee, J. Kelly, C. Aschkenasi, R. S. Ahima, P. R. Couceyro, M. J. Kuhar, C. B. Saper und J. K. Elmquist. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1998; 6: 1375-1385.
- Eng, J., B. H. Du, Y. C. Pan, M. Chang, J. D. Hulmes und R. S. Yalow. Purification and sequencing of a rat intestinal 22 amino acid C-terminal CCK fragment. *Peptides* 5, 1984; 6: 1203-1206.
- Eysselein, V. E., G. A. Eberlein, W. H. Hesse, M. V. Singer, H. Goebell und J. R. Reeve, Jr. Cholecystokinin-58 is the major circulating form of cholecystokinin in canine blood. *J Biol Chem* 262, 1987; 1: 214-217.
- Feldman, R., A. Weller, O. Zagoory-Sharon und A. Levine. Evidence for a neuroendocrinological foundation of human affiliation: plasma oxytocin levels across pregnancy and the postpartum period predict mother-infant bonding. *Psychol Sci* 18, 2007; 11: 965-970.
- Folsom, A. R., L. H. Kushi, K. E. Anderson, P. J. Mink, J. E. Olson, C. P. Hong, T. A. Sellers, D. Lazovich und R. J. Prineas. Associations of general and abdominal obesity with multiple health outcomes in older women: the Iowa Women's Health Study. *Arch Intern Med* 160, 2000; 14: 2117-2128.

Literaturverzeichnis

- Foo, K. S., H. Brismar und C. Broberger. Distribution and neuropeptide coexistence of nucleobindin-2 mRNA/nesfatin-like immunoreactivity in the rat CNS. *Neuroscience* 156, 2008; 3: 563-579.
- Forster, E. R., T. Green, M. Elliot, A. Bremner und G. J. Dockray. Gastric emptying in rats: role of afferent neurons and cholecystokinin. *Am J Physiol* 258, 1990; 4 Pt 1: G552-556.
- Fryscak, T., W. Zenker und D. Kantner. Afferent and efferent innervation of the rat esophagus. A tracing study with horseradish peroxidase and nuclear yellow. *Anat Embryol (Berl)* 170, 1984; 1: 63-70.
- Gabriel, M. und H. Seller. Interaction of baroreceptor afferents from carotid sinus and aorta at the nucleus tractus solitarii. *Pflugers Arch* 318, 1970; 1: 7-20.
- Gibbs, J., J. D. Falasco und P. R. McHugh. Cholecystokinin-decreased food intake in rhesus monkeys. *Am J Physiol* 230, 1976; 1: 15-18.
- Gibbs, J., R. C. Young und G. P. Smith. Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84, 1973; 3: 488-495.
- Goebel-Stengel, M., L. Wang, A. Stengel und Y. Tache. Localization of nesfatin-1 neurons in the mouse brain and functional implication. *Brain Res* 1396, 2011: 20-34.
- Gosnell, B. A., J. E. Morley und A. S. Levine. Adrenal modulation of the inhibitory effect of corticotropin releasing factor on feeding. *Peptides* 4, 1983; 6: 807-812.
- Gotoh, K., T. Masaki, S. Chiba, H. Ando, T. Shimasaki, K. Mitsutomi, K. Fujiwara, I. Katsuragi, T. Kakuma, T. Sakata und H. Yoshimatsu. Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem* 124, 2013; 1: 90-99.
- Gozen, O., B. Balkan, G. Yararbas, E. O. Koylu, M. J. Kuhar und S. Pogun. Sex differences in the regulation of cocaine and amphetamine-regulated transcript expression in hypothalamic nuclei of rats by forced swim stress. *Synapse* 61, 2007; 7: 561-568.
- Greenberg, M. E., L. A. Greene und E. B. Ziff. Nerve growth factor and epidermal growth factor induce rapid transient changes in proto-oncogene transcription in PC12 cells. *J Biol Chem* 260, 1985; 26: 14101-14110.
- Greenberg, M. E. und E. B. Ziff. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 1984; 5985: 433-438.
- Grill, H. J. und G. P. Smith. Cholecystokinin decreases sucrose intake in chronic decerebrate rats. *Am J Physiol* 254, 1988; 6 Pt 2: R853-856.
- Gross, P. M., K. M. Wall, J. J. Pang, S. W. Shaver und D. S. Wainman. Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 259, 1990; 6 Pt 2: R1131-1138.
- Gutierrez, J. G., W. Y. Chey und V. P. Dinoso. Actions of cholecystokinin and secretin on the motor activity of the small intestine in man. *Gastroenterology* 67, 1974; 1: 35-41.
- Hashimoto, K., N. Ohno, Y. Aoki, J. Kageyama, J. Takahara und T. Ofuji. Distribution and characterization of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin in rat hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* 34, 1982; 1: 32-37.
- Hendry, S. H., E. G. Jones und M. C. Beinfeld. Cholecystokinin-immunoreactive neurons in rat and monkey cerebral cortex make symmetric synapses and have intimate associations with blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1983; 8: 2400-2404.

Literaturverzeichnis

- Herrmann, C., R. Goke, G. Richter, H. C. Fehmann, R. Arnold und B. Goke. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56, 1995; 2: 117-126.
- Hileman, S. M., D. D. Pierroz, H. Masuzaki, C. Bjorbaek, K. El-Haschimi, W. A. Banks und J. S. Flier. Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* 143, 2002; 3: 775-783.
- Hill, D. R., N. J. Campbell, T. M. Shaw und G. N. Woodruff. Autoradiographic localization and biochemical characterization of peripheral type CCK receptors in rat CNS using highly selective nonpeptide CCK antagonists. *J Neurosci* 7, 1987; 9: 2967-2976.
- Hokfelt, T., J. F. Rehfeld, L. Skirboll, B. Ivemark, M. Goldstein und K. Markey. Evidence for coexistence of dopamine and CCK in meso-limbic neurones. *Nature* 285, 1980; 5765: 476-478.
- Hosoya, Y., Y. Sugiura, N. Okado, A. D. Loewy und K. Kohno. Descending input from the hypothalamic paraventricular nucleus to sympathetic preganglionic neurons in the rat. *Exp Brain Res* 85, 1991; 1: 10-20.
- Houssay, B. A., V. G. Foglia, F. S. Smyth, C. T. Rietti und A. B. Houssay. The Hypophysis and Secretion of Insulin. *J Exp Med* 75, 1942; 5: 547-566.
- Hsu, S. M., L. Raine und H. Fanger. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29, 1981; 4: 577-580.
- Hughes, P., P. Lawlor und M. Dragunow. Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13, 1992; 4: 355-357.
- Imeryuz, N., B. C. Yegen, A. Bozkurt, T. Coskun, M. L. Villanueva-Penacarrillo und N. B. Ulusoy. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol* 273, 1997; 4 Pt 1: G920-927.
- Inokuchi, A., Y. Oomura und H. Nishimura. Effect of intracerebroventricularly infused glucagon on feeding behavior. *Physiol Behav* 33, 1984; 3: 397-400.
- Ivy, A. und E. Oldberg. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *American Journal of Physiology* 86, 1928: 599-613.
- Izzo, R. S., W. R. Brugge und M. Praissman. Immunoreactive cholecystikinin in human and rat plasma: correlation of pancreatic secretion in response to CCK. *Regul Pept* 9, 1984; 1-2: 21-34.
- Jean, A., G. Conductier, C. Manrique, C. Bouras, P. Berta, R. Hen, Y. Charnay, J. Bockaert und V. Compan. Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2007; 41: 16335-16340.
- Jensen, P. B., P. Kristensen, J. T. Clausen, M. E. Judge, S. Hastrup, L. Thim, B. S. Wulff, C. Foged, J. Jensen, J. J. Holst und O. D. Madsen. The hypothalamic satiety peptide CART is expressed in anorectic and non-anorectic pancreatic islet tumors and in the normal islet of Langerhans. *FEBS Lett* 447, 1999; 2-3: 139-143.
- Jordan, S., N. Watzke, U. Hapke, B.-M. Kurth, C. Lange, M. Lange und A.-C. Saß. Die Gesundheit von Erwachsenen in Deutschland 2012. 2012; Robert Koch-Institut: 10-11.

Literaturverzeichnis

- Kalia, M. und M. M. Mesulam. Brain stem projections of sensory and motor components of the vagus complex in the cat: II. Laryngeal, tracheobronchial, pulmonary, cardiac, and gastrointestinal branches. *J Comp Neurol* 193, 1980; 2: 467-508.
- Kamilaris, T. C., E. O. Johnson, A. E. Calogero, K. T. Kalogeras, R. Bernardini, G. P. Chrousos und P. W. Gold. Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130, 1992; 4: 1764-1774.
- Kannan, H., Y. Hayashida und H. Yamashita. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol* 256, 1989; 6 Pt 2: R1325-1330.
- Kannel, W. B., L. A. Cupples, R. Ramaswami, J. Stokes, 3rd, B. E. Kreger und M. Higgins. Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. *J Clin Epidemiol* 44, 1991; 2: 183-190.
- Kask, A., H. B. Schioth, F. Mutulis, J. E. Wikberg und L. Rago. Anorexigenic cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide intensifies fear reactions in rats. *Brain Res* 857, 2000; 1-2: 283-285.
- Katona, I., B. Sperlagh, A. Sik, A. Kafalvi, E. S. Vizi, K. Mackie und T. F. Freund. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19, 1999; 11: 4544-4558.
- Kilcoyne, M. M., D. L. Hoffman und E. A. Zimmerman. Immunocytochemical localization of angiotensin II and vasopressin in rat hypothalamus: evidence for production in the same neuron. *Clin Sci (Lond)* 59 Suppl 6, 1980: 57s-60s.
- Kimmel, H. L., W. Gong, S. D. Vechia, R. G. Hunter und M. J. Kuhar. Intra-ventral tegmental area injection of rat cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 induces locomotor activity and promotes conditioned place preference. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 2000; 2: 784-792.
- Kobelt, P., S. Paulitsch, M. Goebel, A. Stengel, M. Schmidtman, I. R. van der Voort, J. J. Tebbe, R. W. Veh, B. F. Klapp, B. Wiedenmann, Y. Tache und H. Mönnikes. Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res* 1117, 2006; 1: 109-117.
- Kobelt, P., J. J. Tebbe, I. Tjandra, A. Stengel, H. G. Bae, V. Andresen, I. R. van der Voort, R. W. Veh, C. R. Werner, B. F. Klapp, B. Wiedenmann, L. Wang, Y. Tache und H. Mönnikes. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, 2005; 3: R751-758.
- Koda, S., Y. Date, N. Murakami, T. Shimbara, T. Hanada, K. Toshinai, A. Nijima, M. Furuya, N. Inomata, K. Osuye und M. Nakazato. The role of the vagal nerve in peripheral PYY3-36-induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 146, 2005; 5: 2369-2375.
- Kohno, D., M. Nakata, Y. Maejima, H. Shimizu, U. Sedbazar, N. Yoshida, K. Dezaki, T. Onaka, M. Mori und T. Yada. Nesfatin-1 neurons in paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus coexpress oxytocin and vasopressin and are activated by refeeding. *Endocrinology* 149, 2008; 3: 1295-1301.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo und K. Kangawa. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 1999; 6762: 656-660.
- Kong, W. M., S. Stanley, J. Gardiner, C. Abbott, K. Murphy, A. Seth, I. Connoley, M. Ghatei, D. Stephens und S. Bloom. A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. *FASEB J* 17, 2003; 12: 1688-1690.

Literaturverzeichnis

- Kosaka, T., K. Kosaka, K. Tateishi, Y. Hamaoka, N. Yanaihara, J. Y. Wu und K. Hama. GABAergic neurons containing CCK-8-like and/or VIP-like immunoreactivities in the rat hippocampus and dentate gyrus. *J Comp Neurol* 239, 1985; 4: 420-430.
- Kosfeld, M., M. Heinrichs, P. J. Zak, U. Fischbacher und E. Fehr. Oxytocin increases trust in humans. *Nature* 435, 2005; 7042: 673-676.
- Kovacs, K. J. und P. E. Sawchenko. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16, 1996; 1: 262-273.
- Koylu, E. O., B. Balkan, M. J. Kuhar und S. Pogun. Cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) and the stress response. *Peptides* 27, 2006; 8: 1956-1969.
- Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert und M. J. Kuhar. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391, 1998; 1: 115-132.
- Koylu, E. O., P. R. Couceyro, P. D. Lambert, N. C. Ling, E. B. DeSouza und M. J. Kuhar. Immunohistochemical localization of novel CART peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. *J Neuroendocrinol* 9, 1997; 11: 823-833.
- Kozicz, T., H. Yanaihara und A. Arimura. Distribution of urocortin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 391, 1998; 1: 1-10.
- Krahn, D. D., B. A. Gosnell, A. S. Levine und J. E. Morley. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 443, 1988; 1-2: 63-69.
- Krashes, M. J., S. Koda, C. Ye, S. C. Rogan, A. C. Adams, D. S. Cusher, E. Maratos-Flier, B. L. Roth und B. B. Lowell. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* 121, 2011; 4: 1424-1428.
- Kristensen, P., M. E. Judge, L. Thim, U. Ribel, K. N. Christjansen, B. S. Wulff, J. T. Clausen, P. B. Jensen, O. D. Madsen, N. Vrang, P. J. Larsen und S. Hastrup. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 1998; 6680: 72-76.
- Kyrkouli, S. E., B. G. Stanley und S. F. Leibowitz. Galanin: stimulation of feeding induced by medial hypothalamic injection of this novel peptide. *Eur J Pharmacol* 122, 1986; 1: 159-160.
- Kyrkouli, S. E., B. G. Stanley, R. D. Seirafi und S. F. Leibowitz. Stimulation of feeding by galanin: anatomical localization and behavioral specificity of this peptide's effects in the brain. *Peptides* 11, 1990; 5: 995-1001.
- Lakatos, A., S. Prinster, A. Vicentic, R. A. Hall und M. J. Kuhar. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) peptide activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in AtT20 cells via putative G-protein coupled receptors. *Neurosci Lett* 384, 2005; 1-2: 198-202.
- Lambert, P. D., P. R. Couceyro, K. M. McGirr, S. E. Dall Vechia, Y. Smith und M. J. Kuhar. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29, 1998; 4: 293-298.
- Laqueur, G. L. Neurosecretory pathways between the hypothalamic paraventricular nucleus and the neurohypophysis. *J Comp Neurol* 101, 1954; 3: 543-563.

Literaturverzeichnis

- Larm, J. A. und A. L. Gundlach. Galanin-like peptide (GALP) mRNA expression is restricted to arcuate nucleus of hypothalamus in adult male rat brain. *Neuroendocrinology* 72, 2000; 2: 67-71.
- Larsen, P. J., V. Seier, A. Fink-Jensen, J. J. Holst, J. Warberg und N. Vrang. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript is present in hypothalamic neuroendocrine neurones and is released to the hypothalamic-pituitary portal circuit. *J Neuroendocrinol* 15, 2003; 3: 219-226.
- Larsen, P. J., N. Vrang, P. C. Petersen und P. Kristensen. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. *Obes Res* 8, 2000; 8: 590-596.
- Le Quellec, A., A. Kervran, P. Blache, A. J. Ciurana und D. Bataille. Oxyntomodulin-like immunoreactivity: diurnal profile of a new potential enterogastrone. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 1992; 6: 1405-1409.
- Lebrethon, M. C., E. Vandersmissen, A. Gerard, A. S. Parent und J. P. Bourguignon. Cocaine and amphetamine-regulated-transcript peptide mediation of leptin stimulatory effect on the rat gonadotropin-releasing hormone pulse generator in vitro. *J Neuroendocrinol* 12, 2000; 5: 383-385.
- Lechan, R. M. und I. M. Jackson. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111, 1982; 1: 55-65.
- Lee, S. Y. und I. Soltesz. Cholecystokinin: A multi-functional molecular switch of neuronal circuits. *Dev Neurobiol* 2010.
- Leibowitz, S. F., S. Diaz und D. Tempel. Norepinephrine in the paraventricular nucleus stimulates corticosterone release. *Brain Res* 496, 1989; 1-2: 219-227.
- Leibowitz, S. F., N. J. Hammer und K. Chang. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav* 27, 1981; 6: 1031-1040.
- Li, Y. und C. Owyang. Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathway in rats. *Gastroenterology* 107, 1994; 2: 525-531.
- Liddle, R. A., I. D. Goldfine, M. S. Rosen, R. A. Taplitz und J. A. Williams. Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin Invest* 75, 1985; 4: 1144-1152.
- Lin, M. S., D. E. Comings und O. S. Alfi. Optical Studies of the interaction of 4'-6'-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 60, 1977; 1: 15-25.
- Lin, Y., R. A. Hall und M. J. Kuhar. CART peptide stimulation of G protein-mediated signaling in differentiated PC12 cells: identification of PACAP 6-38 as a CART receptor antagonist. *Neuropeptides* 45, 2011; 5: 351-358.
- Loewy, A. D. und H. Burton. Nuclei of the solitary tract: efferent projections to the lower brain stem and spinal cord of the cat. *J Comp Neurol* 181, 1978; 2: 421-449.
- Lopez, M., L. Seoane, S. Tovar, R. M. Senaris und C. Dieguez. Thyroid status regulates CART but not AgRP mRNA levels in the rat hypothalamus. *Neuroreport* 13, 2002; 14: 1775-1779.
- Lund, T., A. H. Geurts van Kessel, S. Haun und J. E. Dixon. The genes for human gastrin and cholecystokinin are located on different chromosomes. *Hum Genet* 73, 1986; 1: 77-80.

Literaturverzeichnis

- MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan und M. D. Lane. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1995; 20: 9034-9037.
- Machleidt, F. und H. Lehnert. [Central nervous system control of energy homeostasis]. *Dtsch Med Wochenschr* 136, 2011; 11: 541-545.
- Maejima, Y., U. Sedbazar, S. Suyama, D. Kohno, T. Onaka, E. Takano, N. Yoshida, M. Koike, Y. Uchiyama, K. Fujiwara, T. Yashiro, T. L. Horvath, M. O. Dietrich, S. Tanaka, K. Dezaki, I. S. Oh, K. Hashimoto, H. Shimizu, M. Nakata, M. Mori und T. Yada. Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab* 10, 2009; 5: 355-365.
- Malaisse-Lagae, F., J. L. Carpentier, Y. C. Patel, W. J. Malaisse und L. Orci. Pancreatic polypeptide: a possible role in the regulation of food intake in the mouse. *Hypothesis. Experientia* 33, 1977; 7: 915-917.
- Maletinska, L., J. Maixnerova, R. Matyskova, R. Haugvicova, Z. Pirnik, A. Kiss und B. Zelezna. Synergistic effect of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptide and cholecystokinin on food intake regulation in lean mice. *BMC Neurosci* 9, 2008: 101.
- Matsumoto, Y., T. Watanabe, Y. Adachi, T. Itoh, T. Ohtaki, H. Onda, T. Kurokawa, O. Nishimura und M. Fujino. Galanin-like peptide stimulates food intake in the rat. *Neurosci Lett* 322, 2002; 1: 67-69.
- McLaughlin, J., M. Grazia Luca, M. N. Jones, M. D'Amato, G. J. Dockray und D. G. Thompson. Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* 116, 1999; 1: 46-53.
- Meister, B., T. Hokfelt, M. Geffard und W. Oertel. Glutamic acid decarboxylase- and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 48, 1988; 5: 516-526.
- Menani, J. V., E. Colombari, W. T. Talman und A. K. Johnson. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. *Brain Res* 740, 1996; 1-2: 102-108.
- Menetrey, D. und A. I. Basbaum. Spinal and trigeminal projections to the nucleus of the solitary tract: a possible substrate for somatovisceral and viscerovisceral reflex activation. *J Comp Neurol* 255, 1987; 3: 439-450.
- Migaud, M., C. Durieux, J. Viereck, E. Soroca-Lucas, M. C. Fournie-Zaluski und B. P. Roques. The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. *Peptides* 17, 1996; 4: 601-607.
- Mönnikes, H., G. Lauer und R. Arnold. Peripheral administration of cholecystokinin activates c-fos expression in the locus coeruleus/subcoeruleus nucleus, dorsal vagal complex and paraventricular nucleus via capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK-A receptors in the rat. *Brain Res* 770, 1997 a; 1-2: 277-288.
- Mönnikes, H., G. Lauer, C. Bauer, J. Tebbe, T. T. Zittel und R. Arnold. Pathways of Fos expression in locus coeruleus, dorsal vagal complex, and PVN in response to intestinal lipid. *Am J Physiol* 273, 1997 b; 6 Pt 2: R2059-2071.
- Morgan, J. I. und T. Curran. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14, 1991: 421-451.
- Morley, J. E. Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev* 8, 1987; 3: 256-287.

Literaturverzeichnis

- Müller, R., R. Bravo, J. Burckhardt und T. Curran. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312, 1984; 5996: 716-720.
- Murphy, K. G. und S. R. Bloom. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444, 2006; 7121: 854-859.
- Nambu, T., T. Sakurai, K. Mizukami, Y. Hosoya, M. Yanagisawa und K. Goto. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 1999; 1-2: 243-260.
- Noetzel, S., A. Stengel, T. Inhoff, M. Goebel, A. S. Wisser, N. Bannert, B. Wiedenmann, B. F. Klapp, Y. Tache, H. Mönnikes und P. Kobelt. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul Pept* 157, 2009; 1-3: 84-91.
- Nonaka, N., S. Shioda, M. L. Niehoff und W. A. Banks. Characterization of blood-brain barrier permeability to PYY3-36 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 306, 2003; 3: 948-953.
- Nunzi, M. G., A. Gorio, F. Milan, T. F. Freund, P. Somogyi und A. D. Smith. Cholecystokinin-immunoreactive cells form symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol* 237, 1985; 4: 485-505.
- Oh, I. S., H. Shimizu, T. Satoh, S. Okada, S. Adachi, K. Inoue, H. Eguchi, M. Yamamoto, T. Imaki, K. Hashimoto, T. Tsuchiya, T. Monden, K. Horiguchi, M. Yamada und M. Mori. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature* 443, 2006; 7112: 709-712.
- Okumura, T., H. Yamada, W. Motomura und Y. Kohgo. Cocaine-amphetamine-regulated transcript (CART) acts in the central nervous system to inhibit gastric acid secretion via brain corticotropin-releasing factor system. *Endocrinology* 141, 2000; 8: 2854-2860.
- Olson, B. R., M. D. Drutarosky, M. S. Chow, V. J. Hruby, E. M. Stricker und J. G. Verbalis. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12, 1991 a; 1: 113-118.
- Olson, B. R., M. D. Drutarosky, E. M. Stricker und J. G. Verbalis. Brain oxytocin receptor antagonism blunts the effects of anorexigenic treatments in rats: evidence for central oxytocin inhibition of food intake. *Endocrinology* 129, 1991 b; 2: 785-791.
- Olson, B. R., G. E. Hoffman, A. F. Sved, E. M. Stricker und J. G. Verbalis. Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex. *Brain Res* 569, 1992; 2: 238-248.
- Onai, T., K. Takayama und M. Miura. Projections to areas of the nucleus tractus solitarii related to circulatory and respiratory responses in cats. *J Auton Nerv Syst* 18, 1987; 2: 163-175.
- Orsetti, M., F. Di Brisco, P. L. Canonico, A. A. Genazzani und P. Ghi. Gene regulation in the frontal cortex of rats exposed to the chronic mild stress paradigm, an animal model of human depression. *Eur J Neurosci* 27, 2008; 8: 2156-2164.
- Ott, J. und J. C. Scott. The galactogogue action of the thymus and corpus luteum. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 8, 1910: 49.
- Palkovits, M., J. Z. Kiss, M. C. Beinfeld und M. J. Brownstein. Cholecystokinin in the hypothalamo-hypophyseal system. *Brain Res* 299, 1984; 1: 186-189.
- Panskepp, J., P. Reilly, P. Bishop, R. B. Meeker, T. R. Vilberg und A. J. Kastin. Effects of alpha-MSH on motivation, vigilance and brain respiration. *Pharmacol Biochem Behav* 5, 1976; Suppl 1: 59-64.

Literaturverzeichnis

- Panula, P., H. Y. Yang und E. Costa. Neuronal location of the bombesin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regul Pept* 4, 1982; 5: 275-283.
- Parker, J. A. und S. R. Bloom. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. *Neuropharmacology* 63, 2012; 1: 18-30.
- Paxinos, G. und C. Watson. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- Pelletier, G., L. Desy, L. Kerkerian und J. Cote. Immunocytochemical localization of neuropeptide Y (NPY) in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res* 238, 1984; 1: 203-205.
- Pisegna, J. R., A. de Weerth, K. Huppi und S. A. Wank. Molecular cloning of the human brain and gastric cholecystokinin receptor: structure, functional expression and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1992; 1: 296-303.
- Pittman, Q. J., H. W. Blume und L. P. Renaud. Connections of the hypothalamic paraventricular nucleus with the neurohypophysis, median eminence, amygdala, lateral septum and midbrain periaqueductal gray: an electrophysiological study in the rat. *Brain Res* 215, 1981; 1-2: 15-28.
- Pocai, A., T. K. Lam, R. Gutierrez-Juarez, S. Obici, G. J. Schwartz, J. Bryan, L. Aguilar-Bryan und L. Rossetti. Hypothalamic K(ATP) channels control hepatic glucose production. *Nature* 434, 2005; 7036: 1026-1031.
- Porter, J. R. und L. D. Sander. The effect of cholecystokinin octapeptide on pituitary-adrenal hormone secretion. *Regul Pept* 2, 1981; 4: 245-252.
- Poulain, D. A. und J. B. Wakerley. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7, 1982; 4: 773-808.
- Qing, K. und Y. Chen. Central CART gene delivery by recombinant AAV vector attenuates body weight gain in diet-induced-obese rats. *Regul Pept* 140, 2007; 1-2: 21-26.
- Qu, D., D. S. Ludwig, S. Gammeltoft, M. Piper, M. A. Pelleymounter, M. J. Cullen, W. F. Mathes, R. Przypek, R. Kanarek und E. Maratos-Flier. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 1996; 6571: 243-247.
- Raybould, H. E. Mechanisms of CCK signaling from gut to brain. *Curr Opin Pharmacol* 7, 2007; 6: 570-574.
- Rehfeld, J. F. Neuronal cholecystokinin: one or multiple transmitters? *J Neurochem* 44, 1985; 1: 1-10.
- Rehfeld, J. F., G. Sun, T. Christensen und J. G. Hillingso. The predominant cholecystokinin in human plasma and intestine is cholecystokinin-33. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2001; 1: 251-258.
- Ricardo, J. A. und E. T. Koh. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153, 1978; 1: 1-26.
- Rinaman, L. Hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central cFos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J Neurosci* 23, 2003; 31: 10084-10092.
- Rinaman, L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res* 1350, 2010: 18-34.

Literaturverzeichnis

- Rinaman, L., G. E. Hoffman, J. Dohanics, W. W. Le, E. M. Stricker und J. G. Verbalis. Cholecystinin activates catecholaminergic neurons in the caudal medulla that innervate the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol* 360, 1995; 2: 246-256.
- Rinaman, L. und G. Schwartz. Anterograde transneuronal viral tracing of central viscerosensory pathways in rats. *J Neurosci* 24, 2004; 11: 2782-2786.
- Rinaman, L., J. G. Verbalis, E. M. Stricker und G. E. Hoffman. Distribution and neurochemical phenotypes of caudal medullary neurons activated to express cFos following peripheral administration of cholecystinin. *J Comp Neurol* 338, 1993; 4: 475-490.
- Ritter, R. C. und E. E. Ladenheim. Capsaicin pretreatment attenuates suppression of food intake by cholecystinin. *Am J Physiol* 248, 1985; 4 Pt 2: R501-504.
- Ritter, S., K. Bugarith und T. T. Dinh. Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. *J Comp Neurol* 432, 2001; 2: 197-216.
- Rivier, C. L. und P. M. Plotsky. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 48, 1986: 475-494.
- Rogge, G., D. Jones, G. W. Hubert, Y. Lin und M. J. Kuhar. CART peptides: regulators of body weight, reward and other functions. *Nat Rev Neurosci* 9, 2008; 10: 747-758.
- Rosas-Arellano, M. P., L. P. Solano-Flores und J. Ciriello. Arcuate nucleus inputs onto subfornical organ neurons that respond to plasma hypernatremia and angiotensin II. *Brain Res* 707, 1996; 2: 308-313.
- Rose, C., F. Vargas, P. Facchinetti, P. Bourgeat, R. B. Bambal, P. B. Bishop, S. M. Chan, A. N. Moore, C. R. Ganellin und J. C. Schwartz. Characterization and inhibition of a cholecystinin-inactivating serine peptidase. *Nature* 380, 1996; 6573: 403-409.
- Ross, H. E. und L. J. Young. Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Front Neuroendocrinol* 30, 2009; 4: 534-547.
- Sagar, S. M., F. R. Sharp und T. Curran. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1988; 4857: 1328-1331.
- Sakurai, T., A. Amemiya, M. Ishii, I. Matsuzaki, R. M. Chemelli, H. Tanaka, S. C. Williams, J. A. Richardson, G. P. Kozlowski, S. Wilson, J. R. Arch, R. E. Buckingham, A. C. Haynes, S. A. Carr, R. S. Annan, D. E. McNulty, W. S. Liu, J. A. Terrett, N. A. Elshourbagy, D. J. Bergsma und M. Yanagisawa. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 1998; 5: 1 page following 696.
- Salinas, A., J. D. Wilde und R. E. Maldve. Ethanol enhancement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript mRNA and peptide expression in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 97, 2006; 2: 408-415.
- Saper, C. Central Autonomic System. In: Paxinos G, W. C. The rat nervous system. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press, 2004: 763-784.
- Sarkar, S., G. Wittmann, C. Fekete und R. M. Lechan. Central administration of cocaine- and amphetamine-regulated transcript increases phosphorylation of cAMP response element binding protein in corticotropin-releasing hormone-producing neurons but not in prothyrotropin-releasing hormone-producing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 999, 2004; 2: 181-192.

Literaturverzeichnis

- Sassone-Corsi, P., J. Visvader, L. Ferland, P. L. Mellon und I. M. Verma. Induction of proto-oncogene fos transcription through the adenylate cyclase pathway: characterization of a cAMP-responsive element. *Genes Dev* 2, 1988; 12A: 1529-1538.
- Sawchenko, P. E., R. Benoit und M. R. Brown. Somatostatin 28-immunoreactive inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei: principal origin from non-aminergic neurons in the nucleus of the solitary tract. *J Chem Neuroanat* 1, 1988; 2: 81-94.
- Sawchenko, P. E. und L. W. Swanson. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science* 214, 1981; 4521: 685-687.
- Sawchenko, P. E. und L. W. Swanson. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res* 257, 1982; 3: 275-325.
- Sawchenko, P. E., L. W. Swanson und W. W. Vale. Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J Neurosci* 4, 1984; 4: 1118-1129.
- Schjoldager, B., P. E. Mortensen, J. Myhre, J. Christiansen und J. J. Holst. Oxyntomodulin from distal gut. Role in regulation of gastric and pancreatic functions. *Dig Dis Sci* 34, 1989; 9: 1411-1419.
- Schulman, J. L., J. L. Carleton, G. Whitney und J. C. Whitehorn. Effect of glucagon on food intake and body weight in man. *J Appl Physiol* 11, 1957; 3: 419-421.
- Schwartz, M. W., D. G. Baskin, T. R. Bukowski, J. L. Kuijper, D. Foster, G. Lasser, D. E. Prunkard, D. Porte, Jr., S. C. Woods, R. J. Seeley und D. S. Weigle. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45, 1996; 4: 531-535.
- Schwartz, M. W., R. J. Seeley, S. C. Woods, D. S. Weigle, L. A. Campfield, P. Burn und D. G. Baskin. Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46, 1997; 12: 2119-2123.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley und D. G. Baskin. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 2000; 6778: 661-671.
- Shapiro, R. E. und R. R. Miselis. The central neural connections of the area postrema of the rat. *J Comp Neurol* 234, 1985; 3: 344-364.
- Sheng, M., G. McFadden und M. E. Greenberg. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4, 1990; 4: 571-582.
- Shimizu, H., I. S. Oh, K. Hashimoto, M. Nakata, S. Yamamoto, N. Yoshida, H. Eguchi, I. Kato, K. Inoue, T. Satoh, S. Okada, M. Yamada, T. Yada und M. Mori. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. *Endocrinology* 150, 2009; 2: 662-671.
- Shutter, J. R., M. Graham, A. C. Kinsey, S. Scully, R. Luthy und K. L. Stark. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 11, 1997; 5: 593-602.
- Silver, A. J., J. F. Flood, A. M. Song und J. E. Morley. Evidence for a physiological role for CCK in the regulation of food intake in mice. *Am J Physiol* 256, 1989; 3 Pt 2: R646-652.

Literaturverzeichnis

- Silverman, A. J., D. L. Hoffman und E. A. Zimmerman. The descending afferent connections of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). *Brain Res Bull* 6, 1981; 1: 47-61.
- Sipols, A. J., D. G. Baskin und M. W. Schwartz. Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44, 1995; 2: 147-151.
- Skofitsch, G., D. M. Jacobowitz und N. Zamir. Immunohistochemical localization of a melanin concentrating hormone-like peptide in the rat brain. *Brain Res Bull* 15, 1985; 6: 635-649.
- Smith, G. P., C. Jerome und J. Gibbs. Abdominal vagotomy does not block the satiety effect of bombesin in the rat. *Peptides* 2, 1981; 4: 409-411.
- Smith, K. L., J. V. Gardiner, H. L. Ward, W. M. Kong, K. G. Murphy, N. M. Martin, M. A. Ghatei und S. R. Bloom. Overexpression of CART in the PVN increases food intake and weight gain in rats. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2008; 10: 2239-2244.
- Smith, S. M., J. M. Vaughan, C. J. Donaldson, J. Rivier, C. Li, A. Chen und W. W. Vale. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through a corticotropin-releasing factor receptor-dependent mechanism. *Endocrinology* 145, 2004; 11: 5202-5209.
- Smith, S. R., L. de Jonge, M. Pellymouner, T. Nguyen, R. Harris, D. York, S. Redmann, J. Rood und G. A. Bray. Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2001; 5: 1991-1998.
- Smith, Y., E. O. Koylu, P. Couceyro und M. J. Kuhar. Ultrastructural localization of CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. *Synapse* 27, 1997; 1: 90-94.
- Spina, M., E. Merlo-Pich, R. K. Chan, A. M. Basso, J. Rivier, W. Vale und G. F. Koob. Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science* 273, 1996; 5281: 1561-1564.
- Stanley, B. G., A. S. Chin und S. F. Leibowitz. Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull* 14, 1985; 6: 521-524.
- Stanley, B. G., S. E. Kyrkouli, S. Lampert und S. F. Leibowitz. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7, 1986; 6: 1189-1192.
- Stanley, B. G., V. L. Willett, 3rd, H. W. Donias, L. H. Ha und L. C. Spears. The lateral hypothalamus: a primary site mediating excitatory amino acid-elicited eating. *Brain Res* 630, 1993; 1-2: 41-49.
- Suzuki, K., K. A. Simpson, J. S. Minnion, J. C. Shillito und S. R. Bloom. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 57, 2010; 5: 359-372.
- Swaab, D. F., C. W. Pool und F. Nijveldt. Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Neural Transm* 36, 1975; 3-4: 195-215.
- Szelenyi, Z. Cholecystokinin: role in thermoregulation and other aspects of energetics. *Clin Chim Acta* 411, 2010; 5-6: 329-335.
- Tatemoto, K. und V. Mutt. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical method for finding naturally occurring polypeptides. *Nature* 285, 1980; 5764: 417-418.

Literaturverzeichnis

- Ter Horst, G. J., P. de Boer, P. G. Luiten und J. D. van Willigen. Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A Phaseolus vulgaris lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31, 1989; 3: 785-797.
- Ter Horst, G. J. und P. G. Luiten. Phaseolus vulgaris leuco-agglutinin tracing of intrahypothalamic connections of the lateral, ventromedial, dorsomedial and paraventricular hypothalamic nuclei in the rat. *Brain Res Bull* 18, 1987; 2: 191-203.
- Thim, L., P. Kristensen, P. F. Nielsen, B. S. Wulff und J. T. Clausen. Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1999; 6: 2722-2727.
- Thim, L., P. F. Nielsen, M. E. Judge, A. S. Andersen, I. Diers, M. Egel-Mitani und S. Hastrup. Purification and characterisation of a new hypothalamic satiety peptide, cocaine and amphetamine regulated transcript (CART), produced in yeast. *FEBS Lett* 428, 1998; 3: 263-268.
- Tschop, M., D. L. Smiley und M. L. Heiman. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 2000; 6806: 908-913.
- Turton, M. D., D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, G. M. Taylor, M. M. Heath, P. D. Lambert, J. P. Wilding, D. M. Smith, M. A. Ghatei, J. Herbert und S. R. Bloom. A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 1996; 6560: 69-72.
- Ueta, Y., H. Kannan, T. Higuchi, H. Negoro und H. Yamashita. CCK-8 excites oxytocin-secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats--possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Res Bull* 32, 1993; 5: 453-459.
- Vale, W., J. Spiess, C. Rivier und J. Rivier. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213, 1981; 4514: 1394-1397.
- Valentino, R. J., M. E. Page, P. H. Luppi, Y. Zhu, E. Van Bockstaele und G. Aston-Jones. Evidence for widespread afferents to Barrington's nucleus, a brainstem region rich in corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroscience* 62, 1994; 1: 125-143.
- van der Kooy, D., S. P. Hunt, H. W. Steinbusch und A. A. Verhofstad. Separate populations of cholecystokinin and 5-hydroxytryptamine-containing neuronal cells in the rat dorsal raphe, and their contribution to the ascending raphe projections. *Neurosci Lett* 26, 1981; 1: 25-30.
- van Dijk, A., J. G. Richards, A. Trzeciak, D. Gillissen und H. Mohler. Cholecystokinin receptors: biochemical demonstration and autoradiographical localization in rat brain and pancreas using [³H] cholecystokinin₈ as radioligand. *J Neurosci* 4, 1984; 4: 1021-1033.
- Vaughan, J., C. Donaldson, J. Bittencourt, M. H. Perrin, K. Lewis, S. Sutton, R. Chan, A. V. Turnbull, D. Lovejoy, C. Rivier und et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378, 1995; 6554: 287-292.
- Vector-Laboratories. Discovery through color - A guide to multiple antigen labeling. 2005: 6-7.
- Verbalis, J. G., M. J. McCann, C. M. McHale und E. M. Stricker. Oxytocin secretion in response to cholecystokinin and food: differentiation of nausea from satiety. *Science* 232, 1986; 4756: 1417-1419.
- Verbalis, J. G., E. M. Stricker, A. G. Robinson und G. E. Hoffman. Cholecystokinin activates C-fos expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J Neuroendocrinol* 3, 1991; 2: 205-213.

Literaturverzeichnis

- von Euler, C., J. N. Hayward, I. Marttila und R. J. Wyman. Respiratory neurones of the ventrolateral nucleus of the solitary tract of cat: vagal input, spinal connections and morphological identification. *Brain Res* 61, 1973: 1-22.
- Vrang, N., P. J. Larsen, J. T. Clausen und P. Kristensen. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci* 19, 1999; 10: RC5.
- Vrang, N., P. J. Larsen, P. Kristensen und M. Tang-Christensen. Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 141, 2000; 2: 794-801.
- Vrang, N., M. Tang-Christensen, P. J. Larsen und P. Kristensen. Recombinant CART peptide induces c-Fos expression in central areas involved in control of feeding behaviour. *Brain Res* 818, 1999; 2: 499-509.
- Wang, L., V. Martinez, M. D. Barrachina und Y. Tache. Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res* 791, 1998; 1-2: 157-166.
- Wank, S. A. Cholecystokinin receptors. *Am J Physiol* 269, 1995; 5 Pt 1: G628-646.
- West, D. B., D. Fey und S. C. Woods. Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol* 246, 1984; 5 Pt 2: R776-787.
- West, D. B., M. R. Greenwood, A. C. Sullivan, L. Prescod, L. R. Marzullo und J. Triscari. Infusion of cholecystokinin between meals into free-feeding rats fails to prolong the intermeal interval. *Physiol Behav* 39, 1987; 1: 111-115.
- WHO. Obesity and overweight. Fact sheet N°311, 2013. (Accessed March 4, 2014, at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.)
- Wierup, N., W. G. Richards, A. W. Bannon, M. J. Kuhar, B. Ahren und F. Sundler. CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul Pept* 129, 2005; 1-3: 203-211.
- Wrenn, C. C., M. J. Picklo, D. A. Lappi, D. Robertson und R. G. Wiley. Central noradrenergic lesioning using anti-DBH-saporin: anatomical findings. *Brain Res* 740, 1996; 1-2: 175-184.
- Yermolaieva, O., J. Chen, P. R. Couceyro und T. Hoshi. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide modulation of voltage-gated Ca²⁺ signaling in hippocampal neurons. *J Neurosci* 21, 2001; 19: 7474-7480.
- Zamir, N., G. Skofitsch, R. L. Eskay und D. M. Jacobowitz. Distribution of immunoreactive atrial natriuretic peptides in the central nervous system of the rat. *Brain Res* 365, 1986; 1: 105-111.

6. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Lisa Peter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Peripher injiziertes sulfatiertes Cholezystokinin-Oktapeptid aktiviert *Cocaine- and amphetamine-regulated transcript*-immunreaktive Neurone des *Nucleus paraventricularis* in Ratten“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Lisa Peter hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1

Autoren: Lisa Peter*, Andreas Stengel*, Steffen Noetzel, Tobias Inhoff, Miriam Goebel, Yvette Taché, Rüdiger W. Veh, Norbert Bannert, Carsten Grötzinger, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt.
* = geteilte Autorenschaft.

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

Zeitschrift: Peptides

Jahr: 2010

Anteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit in Planung und Durchführung der Tierexperimente, Gewinnung und Auswahl von geeigneten Geweben, Anfertigen der immunhistologischen Färbungen, Mitarbeit an der Analyse der mikroskopischen Bilder, Mitwirken an der Erstellung und Korrektur des Manuskripts

Publikation 2

Autoren: Tobias Inhoff*, Andreas Stengel*, Lisa Peter, Miriam Goebel, Yvette Taché, Norbert Bannert, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt.
* = geteilte Autorenschaft.

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

Zeitschrift: Peptides

Jahr: 2010

Anteil: 20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit an der Durchführung der Tierexperimente, Mithilfe bei der Gewebegewinnung, Beteiligung an der Durchführung der immunhistologischen Färbungen

Lisa Peter

Priv.-Doz. Dr. Peter Kobelt

7. Lebenslauf

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

8. Publikationen

Geteilte Autorenschaften sind mit * markiert.

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

Lisa Peter*, Andreas Stengel*, Steffen Noetzel, Tobias Inhoff, Miriam Goebel, Yvette Taché, Rüdiger W. Veh, Norbert Bannert, Carsten Grötzing, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt. *Peptides* 31, 2010;6: 1118-1123.

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

Tobias Inhoff*, Andreas Stengel*, Lisa Peter, Miriam Goebel, Yvette Taché, Norbert Bannert, Bertram Wiedenmann, Burghard F. Klapp, Hubert Mönnikes, Peter Kobelt. *Peptides* 31, 2010;2: 257-262.

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Peter Kobelt für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während der Durchführung der Experimente und die konstruktive Kritik im Rahmen der Erstellung der Dissertationsschrift bedanken.

Für die ausgezeichnete Einarbeitung im Labor bedanke ich mich bei meinen Mit-Doktoranden Herrn Dr. Tobias Inhoff und Herrn Steffen Noetzel. Vielen Dank auch an die gute Zusammenarbeit mit meinen Mit-Doktorandinnen Frau Kim-Marie Engster, Frau Lisa Frommelt und Frau Vanessa Lembke.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, die mich in meinem Werdegang stets begleitet und unterstützt. Ich bedanke mich herzlich bei meinen Eltern, dass sie mir das Medizinstudium, die damit verbundenen Auslandsaufenthalte und das Anfertigen dieser Promotion ermöglicht haben. Auch danke ich meinen Schwestern, Anna und Katharina, die wesentlich zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die diese Arbeit von Beginn an unermüdlich Korrektur las. Danke!

Zuletzt möchte ich noch bei meinen Freunden Carolin, Dennis, Eduard, Franz, Johanna, Johannes, Julien, Katharina, Marcus, Meghna, Micha, Rebecca, Stephan, Tanja und Tamara für die gemeinsame Zeit während des Studiums und die motivierende und tatkräftige Unterstützung für das Beginnen, Verfassen und Fertigstellen dieser Promotion bedanken.