

2013•2014
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Rol van smaakreceptoren in het waarnemen van zoetstoffen door de ghrelinecel

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
Prof. INGE DEPOORTERE
Mevr. SANDRA STEENSELS

Stephanie Jacobs

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2013•2014
Faculteit Industriële
ingenieurswetenschappen
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Rol van smaakreceptoren in het waarnemen van zoetstoffen
door de ghrelinecel

Promotor :
ing. Adele PEETERS

Promotor :
Prof. INGE DEPOORTERE
Mevr. SANDRA STEENSELS

Stephanie Jacobs

*Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële
wetenschappen: biochemie*

WOORD VOORAF

Na het behalen van mijn diploma als medisch laboratoriumtechnoloog aan de KHLim, heb ik de kans gekregen om verder te studeren aan de faculteit industriële ingenieurswetenschappen, studierichting Biochemie, in associatie met de KULeuven. Dit heb ik mij zeker en vast niet beklagd. Het was een zeer boeiende en ruime studierichting waarin ik ontzettend veel heb bijgeleerd op korte tijd.

Tijdens mijn masterjaar heb ik de gelegenheid gekregen om een masterproef te maken. Op het einde van het schakeljaar kreeg ik hieromtrent een lijst met alle mogelijke onderwerpen voor de masterproef. In deze lijst sprong alvast het onderwerp 'ghreline het hongerhormoon' mij in het oog. Ik heb het geluk gehad dat deze masterproef mij werd toegewezen.

Mijn masterproef vindt plaats in het 'Gut peptide Research Lab' van het translationeel onderzoekscentrum voor gastro-intestinale aandoeningen (TARGID) van het departement Klinische & Experimentele Geneeskunde (KU Leuven). Het is een bijzonder leerrijke en fijne ervaring geweest en daarom wil ik een aantal personen bedanken die hieraan hebben meegeholpen.

Deze masterproef was niet tot stand gekomen zonder de hulp van Professor Inge Depoortere, zij heeft mij de kans gegeven om mee te werken aan het onderzoek bij haar in het labo en daarom zou ik haar willen bedanken om mij deze gelegenheid te geven en om mee mijn thesis tot stand te brengen. Ook wil ik Apr. Sandra Steensels bedanken voor al haar goede raad, uitleg en energie die zij mee in dit werk heeft gestoken en voor de talloze keren dat zij mijn masterproef heeft nagelezen.

Dit is een geweldige ervaring geweest dankzij de hulp en goede informatie van alle doctoraatstudenten, ingenieurs en laboranten die mij tijdens deze 10 weken wegwijs hebben gemaakt in het onderzoek. Tenslotte wil ik ook mijn interne promotor ingenieur Adèle Peeters bedanken, voor het nalezen en verbeteren van mijn masterproef en verslagen.

Bedankt!

INHOUDSOPGAVE

Woord vooraf	
Inhoudsopgave	
Lijst van tabellen	
Lijst van figuren	
Verklarende woordenlijst	
Abstract	11
Abstract in English	13
1 Inleiding	15
2 Probleemstelling	17
3 Literatuurstudie	19
3.1 Ghreline	19
3.1.1 Ontdekking van ghreline	19
3.1.2 Synthese van ghreline	20
3.1.3 GOAT	21
3.1.4 Lokalisatie van ghreline	22
3.1.5 structuur en lokalisatie van de ghrelinereceptor	23
3.1.6 Functie van ghreline	23
3.1.7 Verloop ghrelinesecretie	27
3.2 Nutriëntsensing	28
3.2.1 Smaakreceptoren in de tong.....	28
3.2.2 Smaakreceptoren in het gastro-intestinaal stelsel.....	29
3.3 Zoetstoffen	33
3.3.1 oligofructose	33
3.3.2 sucralose	34
4 Doelstellingen	37
5 Materiaal en methoden	39
5.1 Experimentele opzet van de <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i> proeven	39
5.1.1 Stimulatie-experimenten in de muis ghrelinoma 3-1 cellijn, MGN3-1.....	39
5.1.2 <i>In vivo</i> experimenten.....	40
5.2 Bepaling van de concentratie octanoylghreline in cultuurmedia, plasma en weefselextracten	42
5.2.1 Opzuivering cultuurmedium en plasmastalen	42
5.2.2 Proteïne-extractie uit weefselstalen	42

5.2.3	Radioimmunoassay (RIA).....	42
5.2.4	Proteïnebepaling	44
5.3	Aantonen van zoetreceptoren, ghreline, GOAT, SGLT1 en GLUT2 in de MGN3-1 cellijn 44	
5.3.1	Isolatie van RNA	44
5.3.2	Real-time PCR.....	44
5.4	Statistisch analyse	45
6	Resultaten.....	47
6.1	In vitro experimenten.....	47
6.1.1	Tijdsafhankelijke effecten van de zoetstoffen op de vrijstelling van octanoyl ghreline	47
6.1.2	Rol van de zoetreceptor in de inhibitie van octanoyl ghreline vrijstelling door de zoetstoffen	48
6.1.3	Expressie van ghreline, TAS1R3, GOAT, SGLT1 en GLUT2	50
6.2	In vivo experimenten	53
6.2.1	Effect van intragastrische administratie van D-glucose en oligofructose op ghrelinesecretie.	53
6.2.2	Invloed van intraveneuze toediening van D-glucose op ghrelinesecretie.....	58
7	Discussie.....	61
7.1	In vitro experimenten.....	61
7.1.1	tijdsafhankelijke effecten van de zoetstoffen op de vrijstelling van octanoyl ghreline	61
7.1.2	De rol van de zoetreceptor in de inhibitie van octanoyl ghreline vrijstelling door de zoetstoffen.	62
7.1.3	Expressie van ghreline, GOAT, TAS1R3, SGLT1 en GLUT2 in MGN3-1 cellen.	63
7.2	In vivo experimenten	65
7.2.1	Effect van intragastrische administratie van D-glucose en oligofructose op ghrelinevrijstelling in muizen	65
7.2.2	Invloed van intraveneuze toediening op ghrelinesecretie	67
8	Literatuurlijst	69

LIJST VAN TABELLEN

Tabel 1: fysiologische Functies van ghreline	26
Tabel 2: Primersequenties van de gesequencede muisgenen	45

LIJST VAN FIGUREN

Figuur 1: Structuur van Ghreline	19
Figuur 2: Weesreceptorstrategie	20
Figuur 3: Van ghreline gen tot ghreline peptide	21
Figuur 4: Effect van rat ghreline op maagzuur secretie	25
Figuur 5: Invloed van ghreline op maaglediging	25
Figuur 6: Samenvatting verschillende receptoren voor umami, zoet, bitter en zuur	28
Figuur 7: glucose sensing in de endocrien L-cel.	30
Figuur 8: Transporters op de enterocyt	31
Figuur 9: Structuur oligofructose	34
Figuur 10: Structuurfomule sucralose.....	34
Figuur 11: Experimentele opzet in vivo proeven	41
Figuur 12: Radioimmunoassay	43
Figuur 13: Effect van 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM D-fructose na 6 (n=18), 16 (n=9) en 24 (n=24) uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM).....	47
Figuur 14: Octanoyl ghreline vrijstelling gedurende 3 uur stimulatie met HEPES buffer (10mM D-Glucose), na de preïncubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM D-fructose na 6 (n=18), 16 (n=9) en 24 (n=24) uur stimuleren van de MGN3-1 cellen in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM).....	48
Figuur 15: Effect van 20mM sucralose na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aan-en afwezigheid van 30µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM).....	49
Figuur 16: Effect van 25% FOS na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aanwezigheid van 30 µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM).....	49
Figuur 17: Effect van 20 mM d-fructose na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aanwezigheid van 30µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM).....	50
Figuur 18: Relatieve mRNA expressie van ghreline in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose.....	51
Figuur 19: Relatieve mRNA expressie van GOAT in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose.	51
Figuur 20: Relatieve mRNA expressie van TAS1R3 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose.....	52
Figuur 21: Relatieve mRNA expressie van SGLT1 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose.....	52

Figuur 22: Relatieve mRNA expressie van GLUT2 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose.....	53
Figuur 23: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op octanoyl (A) en totaal (B) plasma ghreline secretie. ghrelinewaarden werden 40 minuten na gavage in het plasma bepaald.....	54
Figuur 24: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofructose op octanoyl (A) en totaal (B) plasma ghreline secretie. ghrelinewaarden werden 40 minuten na gavage in het plasma bepaald.	54
Figuur 25: Effect van intragastrische toediening van saline en 4 g/kg D-glucose op octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van het duodenum. Het duodenum werd verwijderd 40 minuten na gavage.....	55
Figuur 26: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofructose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van het duodenum. Het duodenum werd verwijderd 40 minuten na gavage.....	55
Figuur 27: Effect van intragastrische toediening van saline en 4 g/kg D-glucose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van de maag. De maag werd verwijderd 40 minuten na gavage.	56
Figuur 28: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofructose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van de maag. De maag werd verwijderd 40 minuten na gavage.....	56
Figuur 29: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust ^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald.....	57
Figuur 30: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofructose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust ^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald.	58
Figuur 31: Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op plasma octanoyl (A) en totaal (B) ghrelineconcentratie. ghrelinewaarden werden bepaald in het plasma 40 minuten na gavage.....	59
Figuur 32: Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op de octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte van weefselextracten van het duodenum. het duodenum werd 40 minuten na gavage verwijderd..	59
Figuur 33 Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op de octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte van weefselextracten van de maag. De maag werd 40 minuten na gavage verwijderd.....	60
Figuur 34: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust ^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald.....	60

VERKLARENDE WOORDENLIJST

-/-	knockout
ADI	aanvaardbare dagelijkse inname
AgRP	<i>agouti-related</i> peptide
α -MSH	<i>α-melanocyte stimulating hormone</i>
AMP	adenosinemonofosfaat
ARC	<i>nucleus arcuatus</i>
ATP	adenosine trifosfaat
BMI	body mass index
BSA	albumine bovine fractie V
Ca ²⁺	tweewaardig calciumion
cAMP	cyclische adenosinemonofosfaat
CART	cocaïne- en amfetamine-gereguleerd transcript
cDNA	<i>copy</i> of complementair DNA
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>
EEC	enteroendocriene cel
FCS	foetaal kalfsserum
FOS	oligofruuctose
GABA	γ -aminoboterzuur
GADPH	glyceraldehyde-3-fosfaat dehydrogenase
GH	groei hormoon/ <i>growth hormone</i>
GHRH	<i>growth hormone releasing hormone</i>
GHSR/GHS-R	groei-hormoon-secreterende receptor
GHSs	<i>growth hormone stimulating</i> secretagogen
GI	Gastro-intestinaal
GOAT	ghreline-O-acyltransferase
GPCR	G-proteïne gekoppelde receptor
IP ₃	inositoltrifosfaat
IP3R3	inositol 1,4,5-trifosfaat receptor type 3

K ⁺	Kalium-ion
MBOAT	membraangebonden O-acyltransferase
mRNA	messenger ribonucleïnezuur
Na	Natrium-ion
NPY	neuropeptide Y
NRS	<i>normal rabbit serum</i>
PFA	paraformaldehyde
PLC β 2	fosfolipase C β 2
POMC	<i>pro-opiomelanocortin</i>
P/S	Penicilline/Streptomycine
PYY	peptide YY
rGhrelin	rat ghreline
RNA	ribonucleïnezuur
RPM	rotaties per minuut
SGLT1	Na ⁺ /glucose cotransporter 1
TRC	<i>taste receptor cells/ smaakreceptor cellen</i>

ABSTRACT

Deze masterproef onderzoekt het effect van de natuurlijke zoetstof oligofructose (FOS) en de artificiële zoetstof (sucralose) op de secretie van het hongerhormoon, ghreline. Functionele voedingsstoffen die de ghreline-secretie inhiberen en hierdoor het hongergevoel doen afnemen zouden kunnen gebruikt worden als een strategie voor het voorkomen van obesitas. Recente studies tonen aan dat de ghrelinecel zowel de zoete smaakreceptor bevat als het gustatorische G-proteïne, gustducine, nodig voor het waarnemen van zoetstoffen. In dit proefschrift werd het effect van zoetstoffen nagegaan op de ghreline-secretie zowel *in vitro* in de ghrelinomacellijn als *in vivo* in wildtype en α -gustducine knockout (α -gust^{-/-}) muizen.

Beide genotypes werden gegaveerd met 4g/kg D-glucose of 5,6g/kg FOS . Daarnaast werden WT muizen intraveneus (IV) geïnjecteerd met 1g/kg D-glucose. Ghrelinomacellen werden gedurende 6, 16 of 24h gestimuleerd met sucralose of FOS. Ghrelinegehalten werden in cultuurmedium, plasma en weefselextracten bepaald d.m.v. *radioimmunoassay*.

Gavage met D-glucose inhibeerde plasma ghrelinwaarden zowel in WT (54%) als in α -gust^{-/-} (67%) muizen. In beide genotypes ging dit gepaard met een stijging van het ghrelinegehalte in het duodenum maar niet in de maag. Intraveneuze toediening van D-glucose had geen effect op de plasma ghrelinwaarden. Dit betekent dat de ghrelinecel glucose luminaal waarneemt. Het smaak G-proteïne speelt geen rol in dit effect. Acute gavage van FOS had de tendens om ghrelinwaarden te doen dalen in WT, maar niet in α -gust^{-/-} muizen. In ghrelinomacellen induceerde sucralose en FOS een tijdsafhankelijke daling in octanoyl ghreline-secretie. Deze studie toont aan dat zoetstoffen luminaal en niet via het bloed worden waargenomen via de ghrelinecellen in het duodenum.

ABSTRACT IN ENGLISH

This master thesis examined the effect of the natural sweetener oligofructose (FOS) and the artificial sweetener (sucralose) on the secretion of the hunger hormone, ghrelin. The GI tract is the key interface between food and the human body. The ability of sweeteners to alter the release of ghrelin represents an exciting opportunity for their addition to foods as an agent to control glucose homeostasis and appetite regulation.

Ghrelinoma cells were stimulated with oligofructose and sucralose for three different time points. *In vivo*, wildtype (WT) and α -gustducin knockout mice (α -gust^{-/-}) were gavaged with 4g/kg D-glucose or 5.6g/kg FOS. In addition, WT mice were intravenously (IV) injected with 1g/kg D-glucose. Ghrelin levels were determined in culture medium, plasma and gut tissue extracts by radioimmunoassay.

In both WT and α -gust^{-/-} mice gavage of D-glucose decreased plasma octanoyl ghrelin levels (WT: 54%, α -gust^{-/-}: 67%). In both genotypes this was accompanied by an increase ($P < 0.05$) in duodenal but not stomach octanoyl ghrelin content. IV administration of D-glucose neither affected plasma octanoyl ghrelin levels nor tissue octanoyl ghrelin content. Acute gavage of FOS tended to decrease plasma octanoyl ghrelin levels in WT mice but not in α -gust^{-/-} mice. In ghrelinoma cells, FOS and sucralose induced a time-dependent decrease in octanoyl ghrelin release. It is still unclear if TAS1R2-TAS1R3 plays a role in these effects.

1 INLEIDING

Deze masterproef vond plaats in het 'Gut peptide Research Lab' van het translationeel onderzoekscentrum voor gastro-intestinale aandoeningen (TARGID) van het departement 'Klinische & Experimentele Geneeskunde' (KULeuven). Het Gut Peptide Research Lab onderzoekt hoe nutriënten waargenomen worden door smaakreceptoren in de darm en de regulatie van gastro-intestinale peptiden beïnvloeden.

Obesitas is een chronische ziekte waarbij het gewicht van de patiënt te hoog is, en de body mass index meer dan 30 bedraagt. [1] Vooral in onze westerse cultuur zijn er steeds meer patiënten die te kampen hebben met deze aandoening. Obesitas kan ernstige gevolgen hebben voor de gezondheid, deze patiënten ontwikkelen vaak insulineresistentie en β -cell dysfunctie, wat kan lijden tot diabetes type 2. [2]

In deze masterproef wordt er onderzocht hoe artificiële en natuurlijke zoetstoffen met prebiotische eigenschappen zoals respectievelijk sucralose en oligofruuctose gewichtsverlies kunnen induceren door de secretie van ghreline te beïnvloeden. Ghreline wordt ook wel het 'hongerhormoon' genoemd aangezien het stijgt voor de maaltijd en op die manier de frequentie van de maaltijden reguleert. Bij obesitas is dit maaltijdafhankelijk verloop van ghreline verstoord.

De hoofddoelstelling van dit onderzoek is te achterhalen hoe sucralose en oligofruuctose worden waargenomen door smaakreceptoren op de ghrelinecel en de secretie van ghreline inhiberen om vervolgens de energie-en glucosehomeostase te beïnvloeden.

2 PROBLEEMSTELLING

Obesitas neemt steeds meer epidemische vormen aan, er wordt getracht hiervoor een oplossing te vinden. Een mogelijke piste in deze therapeutische doelstelling is het onderzoek naar voedingsmiddelen die ghreline sterk kunnen doen dalen en hierdoor het hongergevoel doen afnemen. Het lichaam beschikt over nutriëntsensoren die voedingsstoffen detecteren en via effectoren de energieopname van het lichaam coördineren. Eén van deze effectoren is het hongerhormoon ghreline.

Plasmaghrelineconcentraties stijgen voor de maaltijd en induceren het hongergevoel. Na de maaltijd daalt de ghrelineconcentratie in het plasma. [3] De grootte van deze postprandiale daling in ghrelineconcentratie is afhankelijk van de calorische waarde en samenstelling van de maaltijd. Deze bevindingen suggereren dat de ghrelinecel over nutriëntsensoren beschikt die de secretie van ghreline kunnen reguleren. De mens kan vijf smaakstoffen waarnemen: zoet, umami, bitter, zout en zuur. De laatste twee worden waargenomen door ionenkanalen, de eerste drie door G-proteïne gekoppelde receptoren aan gustatorische G-proteïnen zoals gustducine en transducine [4] [5]. Subtypes van de TAS1R-familie vormen een heterodimeer om zoet (TAS1R2-TAS1R3) of umami (TAS1R1-TAS1R3) waar te nemen terwijl bitter herkend wordt door 25 verschillende receptoren van de TAS2R-familie. Er werd reeds aangetoond dat ghreline gecolocaliseerd is met de gustatorische G-proteïnen, α -gustducine en α -transducine [6] en met TAS1R3, de subeenheid voor zoet en umami [7]. Dit doet vermoeden dat deze receptoren betrokken zijn bij het waarnemen van onder meer zoetstoffen zoals sucralose en oligofructose. Zo kunnen ze de cel beïnvloeden om ghreline te produceren.

De vraag die zich nu stelt in dit onderzoek is of oligofructose en sucralose op de zoetreceptor van de ghrelinecel kunnen binden en zo de concentratie aan ghreline in het lichaam kunnen doen dalen, wat kan resulteren in een verlaagd hongergevoel bij de patiënt.

Eerst en vooral zal het effect van de zoetstoffen op de ghrelineproductie nagegaan worden *in vitro* in een ghrelinomacellijn. Nadat de optimale concentratie en duur van stimulatie bepaald is, zal het mechanisme verder bestudeerd worden door gebruik te maken van farmacologische blokkers. Het effect op de expressie van ghreline en TAS1R2-TAS1R3 wordt op mRNA niveau verder bestudeerd.

Naast het *in vitro* deel van het eindwerk zal het effect van zoetstoffen op de ghrelineproductie ook verder uitgeklaard worden *in vivo*. Hiertoe zal gebruik gemaakt worden van wildtype en α -gustducine knockout muizen (α -gust^{-/-}).

3 LITERATUURSTUDIE

3.1 GHRELINE

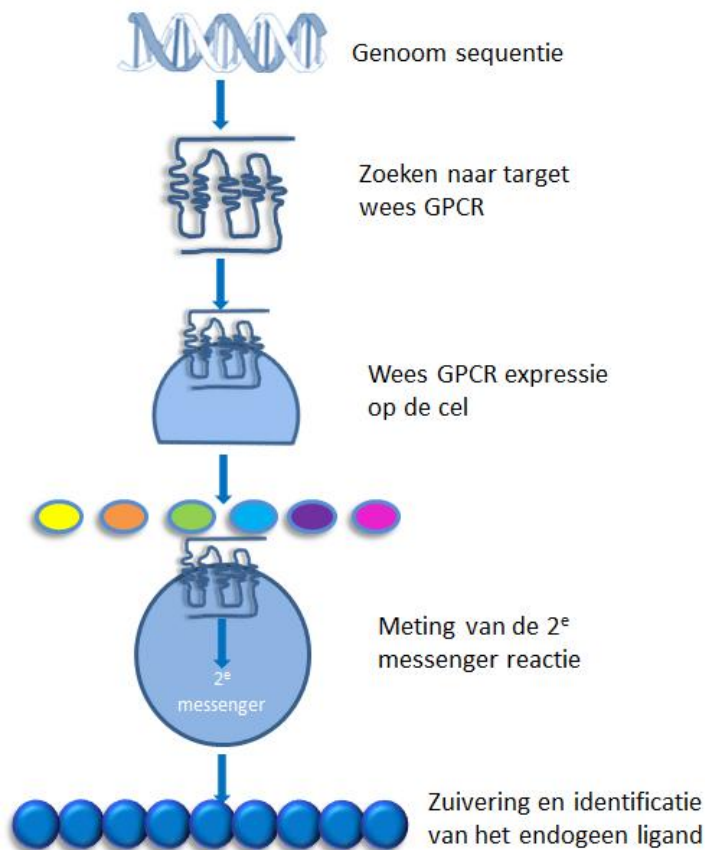
Ghreline is een peptide hormoon bestaande uit 28 aminozuren met op het derde aminozuur vanuit de N-terminus, serine, een octanoyl-groep. De aminozuursequentie wordt weergegeven in Figuur 1. Dit peptide wordt geproduceerd door X/A cellen in de oxyntische mucosa van de maag. [8] Ghreline speelt een belangrijke rol in de regulatie van de voedselinname en gastro-intestinale (GI) motiliteit. Dit is het eerste en tot nu toe enige endogeen geproduceerde hormoon dat centraal de voedselinname stimuleert, daarom wordt ghreline ook wel het hongers hormoon genoemd. De naam ghreline is afkomstig van 'ghre' wat groei betekent in de Indo-Europese taalfamilie. [9]



Figuur 1: Structuur van Ghreline

3.1.1 ONTDEKKING VAN GHRELINE

Het endogeen ligand van de groeihormoon secretagoog receptor (GHS-R) werd ontdekt door Kojima *et al.* in 1999 met behulp van de weesreceptorstrategie. [10] In Figuur 2 wordt beschreven hoe de weesreceptorstrategie is opgesteld om endogene liganden te identificeren. Kojima *et al.* toonde aan dat extracten van de maag een Ca²⁺ respons konden veroorzaken in een cellijn die de GHS-R tot expressie bracht. Vervolgens werd het ghreline geïsoleerd uit het extract met behulp van chromatografie.

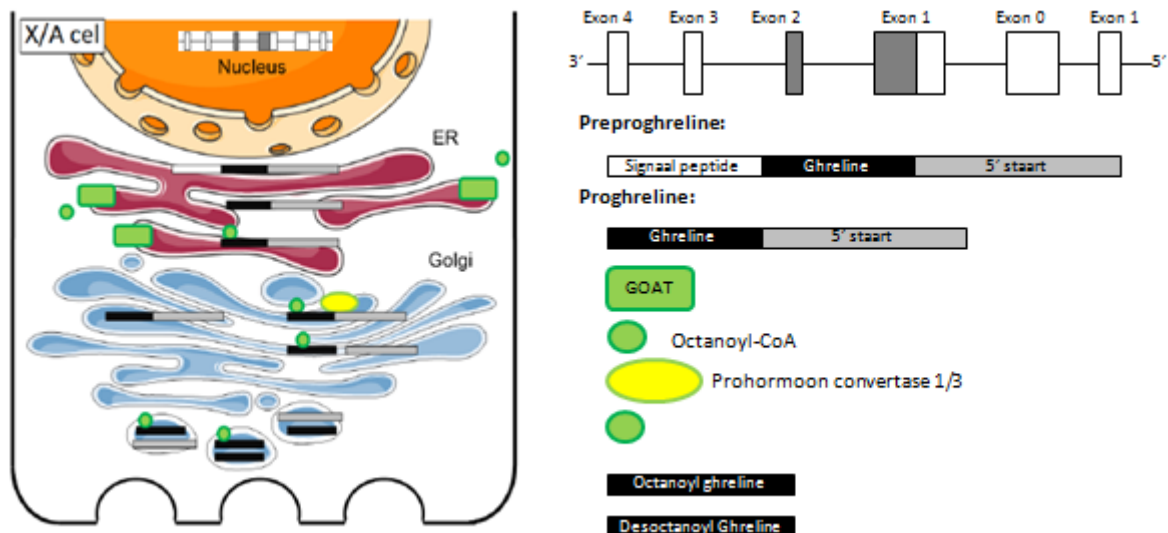


Figuur 2: Weesreceptorstrategie [11]

3.1.2 SYNTHESE VAN GHRELINEN

Het humaan ghrelinen gen wordt gecodeerd op de korte arm van chromosoom 3p25-26, (Figuur 3), het bevat 6 exonen, waarvan 2 niet-coderende, 4 intronen en codeert voor mRNA met een lengte van 511 basenparen. In de nucleus gebeurt de transcriptie van het gen. Na translatie in het ruw endoplasmatisch reticulum (RER) ontstaat proghreline (117 aminozuren), dit bestaat uit een 23 aminozuren signaalpeptide en 94 aminozuren die corresponderen met proghreline. Proghreline bestaat op zijn beurt na protease activiteit en acylmodificatie, uit 28 aminozuren die coderen voor het actief acyl-gemodificeerd ghreline peptide en 66 aminozuren die coderen voor het carboxyterminaal uiteinde van het peptide (C-ghreline). C-ghreline wordt verder verwerkt tot het peptide obestatin, dat 23 aminozuren groot is. *Alternative splicing* van het humaan ghrelinen gen zorgt voor transcripten die coderen voor andere peptiden zoals des-Gln14-ghrelinen. [11] [12]

De acylatie van het proghrelinen wordt in het endoplasmatisch reticulum (ER) uitgevoerd door het ghrelinen-O-acetyltransferase (GOAT), voordat het getransporteerd wordt naar het golgi-apparaat.



Figuur 3: Van ghreline gen tot ghreline peptide [12]

De enzymen verantwoordelijk voor de omzetting van preproghreline naar ghreline bevatten: signaal peptidase, prohormoon convertase 1/3 en carboxypeptidase-B. De enzymen die verantwoordelijk zijn voor de omzetting van proghreline tot obestatin moeten nog geïdentificeerd worden. [12]

3.1.3 GOAT

De actieve vorm van ghreline bevat een postrtranslationele modificatie, deze modificatie bestaat uit de octanoylgroep op serine³. De modificatie wordt uitgevoerd door ghreline-O-acyltransferase (GOAT). [13] Dit enzyme behoort tot de membraangebonden O-acyltransferase familie (MBOAT) en is een integraal membraanproteïne.

GOAT komt bij de mens voornamelijk tot expressie in het GI-stelsel en in de pancreas. In de maag bevindt GOAT zich bij de ghrelinecellen, waar GOAT in het membraan van het endoplasmatisch reticulum de octanoylering uitvoert.

Er zijn nog andere acylmodificaties mogelijk, zoals een n-decanoyl en een n-decenoyl-groep. [14] Deze grote verscheidenheid aan vetzuren kan door GOAT worden verwerkt. De acylgroepen, op ghreline, zijn afkomstig uit het dieet. Het smaak G-proteïne, α -gustducine, speelt een belangrijke rol in de waarneming van vetzuren aangereikt door de voeding en dus in het octanoylatieproces. [15] De meest waarschijnlijke acyl-donoren zijn van het type Acyl-Coenzyme A. Doordat Acyl-Coenzyme A gelegen is in het cytosol is het membraan van het endoplasmatisch reticulum een barrière dat dit molecule moet doorkruisen. Hierdoor kan gesteld worden dat GOAT een acyl-Coenzym A *transporter* is. [16]

De maag is de grootste bron van ghreline biosynthese (65-90%). Zowel in de maag als in de bloedstroom bestaat de meerderheid (80%) van het aanwezige ghreline uit de biologische inactieve gedeacyleerde vorm. [17] Hiervoor zijn twee mogelijke verklaringen. De eerste is dat des-acyl ghreline een resultaat is van de onvolledige acylatie van ghreline. Een tweede theorie zegt dat er enzymen betrokken zijn in het deacylatie proces. Mogelijke enzymen die hieraan meewerken zijn: butyrylcholineesterase, acetylhydrolase, carboxylesterase en *high-density lipoprotein-associated paraoxonase* enzym. [18] [19]

Het humaan GOAT gen is gelegen op chromosoom 8p12, deze sequentie wordt sterk behouden tussen verschillende vertebren. De aminozuur sequentie van humaan, rat en muis GOAT vertoont 90 % gelijkheid. [20]

In de substraatherkenning van GOAT speelt de vier aminozuur lange N-terminale sequentie van ghreline; glycine¹, serine³, en fenylalanine⁴ een belangrijke rol. Waarbij voornamelijk glycine¹ cruciaal is voor de binding met de actieve site van GOAT. [21]

3.1.4 LOKALISATIE VAN GHRELIN

Ghreline wordt geproduceerd door de X/A-cellen, bij de mens P/D₁-cellen genoemd, waarvan de grootste populatie aanwezig is in de oxyntische mucosa van de maagfundus. [22] X/A-cellen bevatten ronde, compacte, elektrodense granullen die gevuld zijn met ghreline. X/A-cellen nemen 20% van het totaal aantal endocriene cellen voor hun rekening. [23] Ghrelinecellen kunnen onderverdeeld worden in 2 verschillende celtypen. De cellen die voorkomen in de oxyntische mucosa zijn gesloten cellen, deze staan niet in rechtstreeks contact met het lumen van het GI-stelsel. Deze cellen reageren op fysische stimuli uit het lumen of chemische stimuli van de basolaterale zijde van de cel. [22] Het tweede type ghrelinecel is de open cel, zij staan aan de basis van de lumenale detectie van macronutriënten in de voeding, deze cellen vinden we verder distaalwaarts in het GI stelsel terug. [24] In de X/A-cellen in de maag werden twee ghrelinecelpopulaties aangetroffen. De eerste cel populatie bestaat voor 60% uit ghrelinecellen die zowel octanoyl- als desoctanoylghreline bevatten. De tweede populatie bevat enkel desoctanoylghreline.

Ghreline wordt ook op andere plaatsen in het lichaam van de mens aangetroffen. Zo is ook de pancreas een ghreline producerend orgaan. Het celtype dat ghreline produceert in de pancreas zijn de α -cellen. [25] Er worden tevens lage concentraties aan ghreline in de hersenen, de boogvormige hypothalamus, hypofyse, glomeruli van de nieren en de placenta gevonden. [22] [26]

3.1.5 STRUCTUUR EN LOKALISATIE VAN DE GHRELINERECEPTOR

Ghreline is het enige bekende orexigeen hormoon en endogeen ligand voor de groei-hormoon-secreterende receptor (GHSR). De octanylatie van ghreline is noodzakelijk om aan deze receptor te binden en de bloedhersenbarrière te doorkruisen. Het gen voor deze receptor is gelegen op het chromosoom 3q26-27. Dit gen bestaat uit 2 exonen die gescheiden worden door een intron. Hiervan wordt tussen de transcriptie en translatie het mRNA gespliced, waardoor er 2 subtypes ontstaan. [27]

GHSR type 1a is functioneel actief en kreeg dan ook deze naam 'Ghrelinerceptor' (GRLN-R) door Davenport *et al.*, deze receptor bestaat uit 7 transmembranaire domeinen. Type-1b is een afgeknotte versie van GHSR-1a en is farmacologisch inactief, deze receptor bevat slechts vijf transmembranaire domeinen. [28] GHSR type-1a komt voornamelijk tot expressie in de hypothalamus en in kleinere hoeveelheden in de hypofyse, pancreas, schildklier, milt en myocardium. Type-1b komt voornamelijk voor in de perifere organen, inclusief in de immuuncellen. [28]

Wanneer ghreline wordt blootgesteld aan GHS-R1a resulteert dit in een snelle responsverzwakking van de receptor. Deze desensitisatie is het gevolg van een internalisatie van de receptor via "clarithine coated pits". De ghrelinerceptor is constitutief actief en vertoont een hoge activiteit in de afwezigheid van zijn ligand. [29]

3.1.6 FUNCTIE VAN GHRELINE

3.1.6.1 OREXIGEEEN EFFECT

Ghreline heeft als belangrijkste functie het stimuleren van de eetlust en zijn belang in de energiehomeostase. Toediening van ghreline stimuleert voedselinname bij de mens en verscheidene diersoorten. [30] [31]

Ghrelinewaarden stijgen voor een maaltijd en dalen postprandiaal waardoor ghreline beschouwd wordt als een fysiologisch maaltijdinitiator. [3]

Ghreline regelt voedselinname centraal vanuit de hypothalamus, en specifiek via de arcuate nucleus (ARC). [32] Het ghreline vrijgesteld door de X/A like cellen van de oxyntische mucosa van de maag, bereikt de hypothalamus via de bloedstroom, aangezien de bloedhersenbarrière ter hoogte van de hypothalamus onvolledig is. [33] Detectie van GRLN op vagaal afferente neuronen en vagotomie studies tonen aan dat ghreline zijn effect op de hypothalamus ook via vagale afferenten kan uitvoeren. In de ARC zijn er twee belangrijke neurale celpopulaties, de orexigene celpopulatie die de peptiden *neuropeptide Y* (NPY) en

agouti related peptide (AgRP) tot expressie brengt en de anorexigene celpopulatie bestaande uit pro-opiomelanocortin (POMC) en cocaïne en amfetamine regulerend transcript (CART) neuronen. De POMC-neuronen secreteren α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), een hormoon dat de voedselinname inhibeert via activatie van de melanocortinereceptor-4/5 (MCR4/5) in de paraventriculaire nucleus (PVN). Ghreline activeert de NPY /AgRP neuronen, en zorgt hierbij voor de vrijstelling van NPY dat via de neuropeptide receptor-Y1/Y5 (NPY1/5R) in de paraventriculaire nucleus (PVN) voedselinname stimuleert. Het vrijgestelde AgRP treedt als fysiologische antagonist van MCR4/5 op en blokkeert zo het signaal van α -MSH. [34] [35]

3.1.6.2 ADIPOGENESE

Ghreline wordt beschouwd als de initiator van voedselinname op korte termijn, maar speelt ook een belangrijke rol in de langetermijn regeling van het lichaamsgewicht.

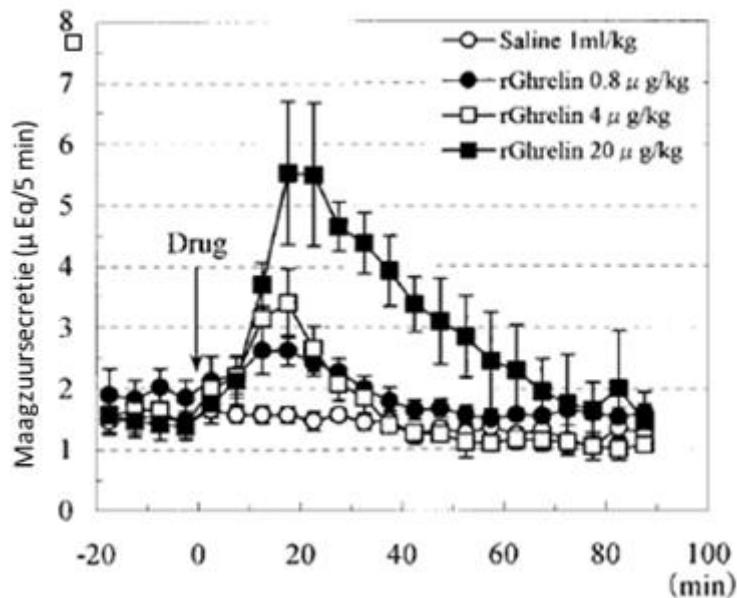
Chronische of herhaaldelijke infusies met ghreline doen het lichaamsgewicht toenemen in knaagdieren. [36] Dit gebeurt niet enkel door voedselinname te stimuleren. Ghreline kan ook het adipose metabolisme beïnvloeden. Studies tonen aan dat ghreline de adipogenese stimuleert en de adipocyten apoptose inhibeert. [37] Chronische toediening van ghreline inhibeert lipide oxidatie en doet de lipogenese en triglyceride opname in de witte adipocyten toenemen.

In tegenstelling tot de verwachting, blijken mensen met obesitas een lagere basale ghrelinesecretie te hebben. Dit duidt mogelijks op een compensatiemechanisme waarbij het lichaam de hongerprikkel probeert te laten afnemen. Een uitzondering hierop is een genetische aandoening genaamd het Prader-Willie-syndroom. Deze patiënten vertonen een ernstige vorm van obesitas en een buitensporige eetlust. Hun basale ghrelinewaardes zijn bijna drie maal hoger dan die van gezonde individuen. [38]

Obese mensen vertonen ook een minder uitgesproken postprandiale ghreline daling waardoor het maaltijdafhankelijke verloop afgevlakt wordt. [39] De voedselinname heeft een minder sterke remming van het hongersignaal met als gevolg dat dit blijvend hongergevoel zorgt voor een verhoogde voedselinname en verhoogde kans op zwaarlijvigheid. Bij patiënten met anorexia nervosa (AN) merken we hogere plasmaghrelinewaardes op, wat ook verklaard kan worden door een compensatiemechanisme. [40]

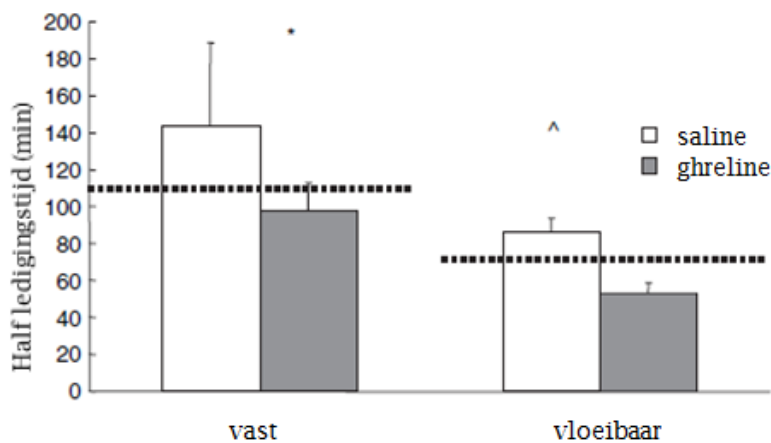
3.1.6.3 GASTRO-INTESTINALE EFFECTEN

De studie van Masuda et al. (2000) toont aan dat verschillende concentraties ghreline, dosis afhankelijke toename van maagzuursecretie tot gevolg hebben (zie Figuur 4). [41] Hieruit blijkt hoe hoger de concentratie aan ghreline, die toegediend wordt aan de rat, hoe meer maagzuur geproduceerd wordt. Na 20 minuten wordt een piek bereikt bij een concentratie van 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



Figuur 4: Effect van rat ghreline op maagzuur secretie [41]

Een studie van Tack et al. (2005) toont aan dat patiënten met een idiopatische gastroparese een verbeterde maaglediging vertonen door intraveneuze toediening van ghreline, dit is weergegeven in Figuur 5. De patiënten die deze behandeling toegediend kregen, vertoonden een significante daling in maaltijdgerelateerde symptomen. [42]



Figuur 5: Invloed van ghreline op maaglediging [42]

In de gevaste toestand induceert exogeen ghreline zowel bij de mens als knaagdieren fase-3-contracties van het migrerend motorisch complex (MMC), een patroon van sterke contracties die ontstaan in de maag/duodenum en distaalwaarts migreren om de darm te reinigen van onverteerd materiaal. [42] Ghreline interageert hiervoor met de vagus maar ook met perifere receptoren in de myenterische plexus. Uit deze studie van Fujino et al. (2003) blijkt dat ghreline afkomstig van de maag betrokken is in de regulatie van de motorische activiteit van het GI-stelsel. Dit ghreline werkt in op de ghrelinereceptor en beïnvloedt NPY neuronen in de hersenen. [43]

3.1.6.4 ANDERE FUNCTIES

Ghreline komt in vele organen tot expressie waardoor het ook andere functies heeft in het lichaam. Een aantal van deze functies worden in Tabel 1 weergegeven. [11]

Tabel 1: fysiologische Functies van ghreline [44]

Hypothalamus	Voedselinname ↑ Geheugen en educatie ↑ Angst ↑ Anorexia nervosa ↑ Obesitas ↓	Vetweefsel	Vetmassa ↑ Vetoxidatie ↓ Glycerol vrijgave ↑
Hypofyse	Groeihormoon secretie ↑	Tumor	Trofie ↑↓
Pancreas	Insuline secretie ↓	B en T cellen	Cytotoxische lymfocyten ↑ Circulatie lymfocyten ↑
Maag	Gastrine ↑ Maagzuur ↑ Beweging ↓ Maaglediging ↑	Hart	Bloeddruk ↓ Hartminuutvolume ↓ Apoptose ↓ Myocardiocyten ↑

Ghreline en zijn receptor komen ook tot expressie in de pancreas. Een eerste studie toonde aan dat de ghrelineproductie wordt beperkt door de insuline productie van de β -cellen. In een studie van Date et al. wordt aangetoond dat ghreline exclusief tot expressie komt in de glucagon producerende α -cellen. [45] $GOAT^{-/-}$ vertonen verlaagde insuline waarden in vergelijking met wildtypen muizen, $ghreline^{-/-}$ muizen vertonen een gelijkaardige trend, maar dit is niet significant bevonden. [46]

3.1.7 VERLOOP GHRELINSECRETIE

De ghrelinesecretie kent een maaltijdafhankelijk verloop. Bij gezonde personen ligt de basale concentratie van biologisch actief ghreline rond de 10-20 fmol/ml. [3] Men stelt vast dat ghrelinewaarden in humaan plasma, in tegenstelling tot de verzadigingshormonen Glucagon like peptide-1 (GLP-1) en Peptide-YY (PYY) tot bijna een tweevoud van de basale concentratie stijgen voor elke maaltijd en binnen het uur na de maaltijd een postprandiale daling tot het nader vertonen. Dit suggereert dat ghreline een rol speelt in de maaltijdinitiatie.

Recent heeft Zhao *et al.* aangetoond dat de preprandiale stijging van ghreline te wijten is aan adrenerge stimulatie. Deze adrenerge stimulatie bevordert de ghrelinesecretie in celcultuur. Daarnaast zag men dat depletie van adrenaline in de sympathische neuronnen in muizen, door reserpine, de preprandiale stijging in ghreline blokkeerde. Hierdoor concludeerde men dat de preprandiale stijging van ghreline veroorzaakt werd door adrenerge stimulatie van β 1-receptoren op de ghrelinesecreterende cellen van de maag. [47]

De grootte en het verloop van de postprandiale daling in ghrelinesecretie is afhankelijk van de samenstelling van macronutriënten. Zo zullen lipiden, ghreline minder effectief onderdrukken dan koolhydraten of proteïnen. Na inname van koolhydraten nemen de ghrelineconcentraties gedurende 3 uren af, dit wordt gevolgd door een overshoot gedurende de 3 volgende uren. Dit kan mogelijks verklaren waarom we na inname van een snoepje of zoet tussendoortje, snel weer honger hebben. Deze overschoot wordt niet waargenomen na inname van lipiden of proteïnen.

Onderzoek toont aan dat het mechanisch opspannen van de maag, door water te drinken, geen verzadigingsgevoel induceert in de vorm van een plasma acylghrelinedaling. [3] Dit, samen met het feit dat de ghrelinedaling afhankelijk is van de nutriëntsamenstelling van de maaltijd, doet het vermoeden ontstaan dat er een nutriëntwaarnemingsmechanisme aanwezig moet zijn in het spijsverteringsstelsel om aanwezige voedingsstoffen in de darm te detecteren. Verder zijn er nog tal van andere factoren die een rol spelen in de ghrelinesecretie. Hormonen, zoals insuline, onderdrukken vermoedelijk de ghrelinesecretie en ook postgastrische mechanismen zoals maaglediging blijken een rol te spelen. [48]

3.2 NUTRIËNTSENSING

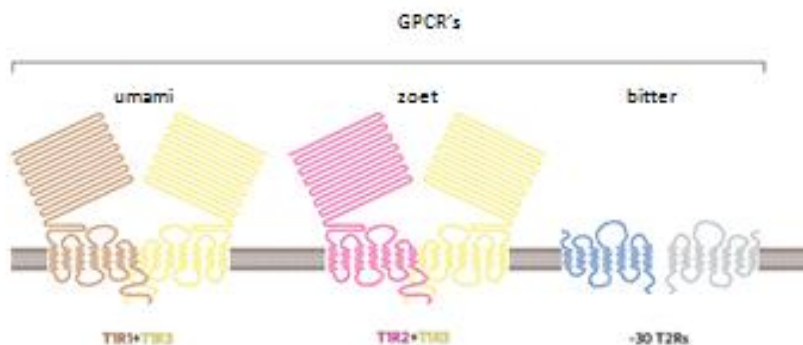
Hoe koolhydraten de ghreline secretie onderdrukken is niet gekend maar een mogelijk mechanisme is via zoete smaakreceptoren (TAS1R2-TAS1R3).

De mens kan vijf basissmaken waarnemen: zoet, bitter, umami, zout en zuur. De eerste 3 stoffen worden herkend door G-proteïne gekoppelde receptoren (GPCR), de laatste 2 door ionenkanalen. Vet wordt recent als de zesde smaak beschouwd herkend alhoewel hier nog heel wat controversen om is.

3.2.1 SMAAKRECEPTOREN IN DE TONG

In de mondholte zijn de smaakpapillen gelegen op de tong, deze smaakpapillen bestaan uit clusters die tot 100 gepolarizeerde neuro-epitheliale cellen bevatten, de zogenoemde smaakreceptorcellen (TRC). Eens de TRC's geprikkeld worden door smaak, wordt er een signaal getransporteerd naar de afferente zenuw die betrekking heeft op smaken, deze afferente zenuw brengt prikkels aan in gedeelten van de hersenen die specifiek instaan voor de smaakbeleving. [49]

Smaakpapillen bevatten 3 morfologisch verschillende celtypen (type-1, -2 en -3). Deze celtypen maken deel uit van de 5 klassen van smaakcellen. Bitter, zoet en umami worden waargenomen door de G-proteïne gekoppelde receptoren. De zoete smaak van suikers of artificiële zoetstoffen wordt waargenomen door de TAS1R2 en TAS1R3 receptoren. Bitter wordt waargenomen door de familie van TAS2 receptoren, umami wordt op zijn beurt waargenomen door TAS1R1 en TAS1R3 [50], maar tevens ook door GPRC6A [51] en CaSR [52]. De TAS1R-familie behorend tot de GPCR's binden liganden en vormen dan een structuur die lijkt op een 'venus vliegenvanger'. Dit domein is verbonden met het transmembranaire segment door een cysteïne rijk domein dat ligand bindingen koppelt aan de activatie van de receptor, dit is weergegeven in Figuur 6. [50]



Figuur 6: Samenvatting verschillende receptoren voor umami, zoet, bitter en zuur [53]

3.2.2 SMAAKRECEPTOREN IN HET GASTRO-INTESTINAAL STELSEL

Smaakreceptoren komen niet enkel op de tong voor. Het GI-systeem wordt ook wel eens een zintuig genoemd, er zijn gespecialiseerde cellen nodig om chemische componenten in het GI-systeem te detecteren. In het GI-stelsel zijn drie celtypes verantwoordelijk voor het waarnemen of opnemen van nutriënten in het lumen. [15] Enterocyten staan in contact met het lumen, deze cellen zorgen voor de absorptie van vrije vetzuren, suikers en aminozuren. Een speciaal type enterocyt is de borstelcel, deze cellen worden gekenmerkt door microvilli die boven de omringende cellen uitsteken en verantwoordelijk is voor het ontvangen van chemische prikkels en het nutriëntentransport. Ze komen vaak voor in de grens tussen de fundus en corpus van de maag. De borstelcellen brengen ook smaakreceptoren en α -gustducine tot expressie. [6] Deze borstelcellen kunnen waarschijnlijk ook informatie doorgeven aan gesloten type entero-endocriene cellen die de nutriënten niet rechtstreeks in het lumen kunnen detecteren, maar waarschijnlijk wel informatie krijgen vanuit de bloedbaan. De entero-endocriene cellen bevatten, in tegenstelling tot de borstelcellen, granules voor de secretie van peptides zoals cholecystokinine (I-cellen), ghreline (X/A-cellen), gastrine (G-cellen), glucose-dependent-insulinotrope peptide (GIP) (K-cellen), *glucagon-like peptides-1* en *-2* (GLPs) en peptide-YY (PYY) (L-cellen). [54] [55] Entero-endocriene cellen (EEC) vertegenwoordigen ongeveer 1% van de gehele darm populatie aan cellen. EEC's kunnen flesvormig en open zijn waardoor ze in direct contact staan met het lumen van de darm en de nutriënten aanwezig in de darm kunnen waarnemen. De open type entero-endocriene cellen brengen ook smaakreceptoren tot expressie maar staan niet in rechtstreeks contact met het lumen.

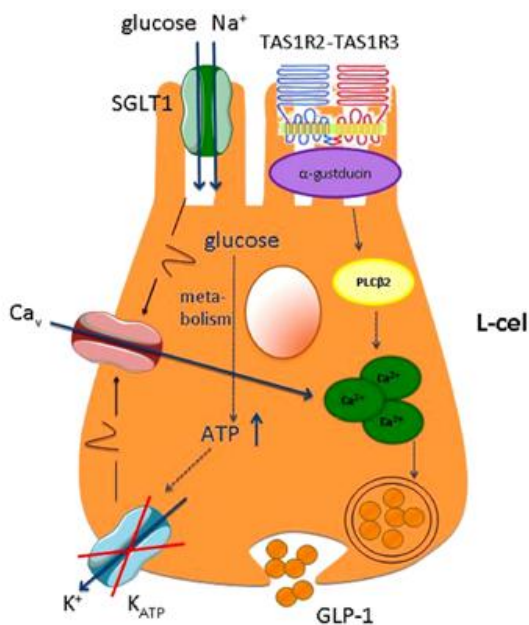
Het idee dat de GI-tractus in staat is om 'zoet' te detecteren, vond zijn oorsprong in het incretine effect. Oraal glucose veroorzaakt een hogere vrijstelling van incretinehormonen, zoals *glucagon-like peptide-1* (GLP1), dan intraveneuze toediening. [56]

3.2.2.1 ZOETRECEPTOREN

De zoetreceptoren TAS1R2-TAS1R3 en het daaraan gekoppelde G-proteïne, gustducine, komen o.a. tot expressie in de X/A cel die ghreline bevat [57] en in de L-cel die GLP-1 en PYY bevat. [58] Voor de L-cel is reeds aangetoond dat dit receptorcomplex een belangrijke rol speelt in de vrijzetting van incretinehormonen zoals GLP-1 en PYY in aanwezigheid van suikers. Dit werd aangetoond door middel van farmacologische blokkers voor de receptoren (gurmarine bij muizen en lactisole in humane studies) en siRNA-knockdown van

de α -subeenheid van het G-proteïne gustducine. [7] [59] In knockoutmodellen voor de zoetreceptor werd aangetoond dat niet metaboliseerbare zoetstoffen, zoals sucralose via de zoetreceptor ook een effect op hormoonvrijstelling kan veroorzaken. [59] Humane studies bevestigden het belang van de zoetreceptoren bij de vrijzetting van incretinehormonen door glucose. [60] Andere onderzoekers toonden echter aan dat de glucose gestimuleerde vrijstelling van GLP-1 niet via zoete smaakreceptoren verloopt maar via Na^+ /glucose cotransporter-1 (SGLT1). [58] [61] In cellijnen kon glucose gemedieerde GLP-1 vrijstelling gedeeltelijk geblokkeerd worden in aanwezigheid van de SGLT1 antagonist, phloridzine. [62] Knockoutmodellen voor deze transporter vertoonden een gedaalde incretinerespons na glucosetoediening. [61]

Verder distaal in het colon werd aangetoond dat K_{ATP} -kanalen in de endocriene cellen een rol spelen in de glucose geïnduceerde vrijstelling van GLP-1. [63] De GLUTag-cel (produceert GLP-1) bezit glucose-sensing mechanismen. K_{ATP} kanalen spelen hierin een belangrijke regulatorische rol. Deze cellen zijn hypergepolariseerd wanneer en lage glucose concentraties heersen. Wanneer de glucose concentratie verhoogt, resulteert dit in de sluiting van het K_{ATP} -kanaal. [64] In Figuur 7 is weergegeven hoe de endocriene L-cel zoet waarneemt.



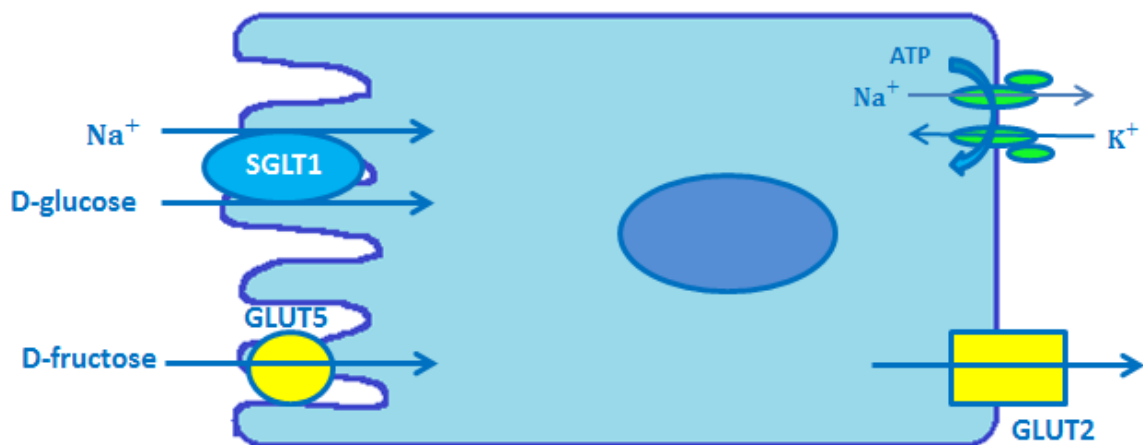
Figuur 7: glucose sensing in de endocrien L-cel. [65]

3.2.2.2 TRANSPORTERS

Glucose moleculen zijn grote polaire moleculen en kunnen daarom niet vanuit het lumen van de darm doorheen het apolaire celmembraan migreren. Om dit probleem te verhelpen zijn er proteïnen in het celmembraan aanwezig zijn om deze moleculen in de enterocyt te transporteren (zie Figuur 8). Dit

transportproteïne is Na⁺/glucose cotransporter-1 (SGLT1) welke aan de apicale zijde van de enterocyt gelegen is. De absorptie van glucose (en galactose) is gekoppeld met deze van Na⁺ en zijn bijhorende elektrochemische gradiënt. Deze elektrochemische gradiënt wordt voorzien door de basaal gelegen Na⁺/K⁺-ATPase pomp. [66] Fructose wordt onafhankelijk van Na⁺ door de GLUT5-transporter in de enterocyt en verder naar de bloedbaan getransporteerd. [67]

GLUT2 verzorgt de gefaciliteerde diffusie van glucose en fructose. Algemeen werd aangenomen dat deze transporter enkel basolateraal aanwezig is in het celmembraan van enterocyten om de efflux van glucose en fructose mogelijk te maken vanuit het cytoplasma naar de bloedbaan. Men ontdekte echter dat GLUT2, in aanwezigheid van hoge lumenale glucoseconcentraties, in het apicaal grensvlak geïnserteerd wordt [68]. De apicale insertie van GLUT2 in het membraan kan plaatsvinden door een conformatieverandering in het cytoskelet van de enterocyt. De [Ca²⁺]_i verhoging, die een rol speelt in deze insertie, kan veroorzaakt worden door de activatie van TAS1R2/TAS1R3 door de hoge lumenale suikerconcentratie. Studies in TAS1R2/TAS1R3^{-/-} en α -gustducine^{-/-} tonen aan dat activatie van de zoetereceptor een upregulatie van SGLT-1 kan veroorzaken. [67]



Figuur 8: Transporters op de enterocyt [67]

Mace et al. [69] toonden aan dat niet enkel SGLT-1, maar ook GLUT2 belangrijk is voor de glucosegemedieerde vrijstelling van ondermeer GIP, GLP-1 en PYY. Bij toevoeging van zowel een SGLT1 als GLUT 2 blokker (respectievelijk phloridzine en phloretine) kan het glucosegemedieerde effect op GLP-1 vrijstelling volledig geblokkeerd worden terwijl de aanwezigheid van slechts één van deze blokkers het effect slechts voor 40-50% kan inhiberen. [69] GLUT2 wordt snel upgereguleerd in aanwezigheid van lumenale suikers of zoetstoffen. Dit effect verdwijnt in TAS1R2/TAS1R3^{-/-} en α -gustducine^{-/-} modellen wat erop duidt dat het TAS1R2/TAS1R3 complex niet enkel een rol speelt in de expressie van SGLT1, maar ook in de expressie van GLUT2. [69] GLUT 2 is op het apicale membraan

aanwezig om hoge luminale glucose concentraties te absorberen. [70] Via GLUT 2 verlaat D-glucose de enterocyt aan het basolateraal membraan. [61]

De manier waarop GLUT2 zijn effect uitoefent is mogelijks door de membraandepolarisatie te beïnvloeden, aangezien GLUT2 de sluiting van de K_{ATP} gevoelige kanalen kan induceren. In afwezigheid van SGLT1 is de secretie van GIP, GLP1 en PYY gevoelig voor kaliumkanaal modulators, wat de voorgaande hypothese staft.

SGLT1 behandelt het merendeel van het D-glucose transport over het membraan aan het grensvlak met de borstelcellen en de enterocyt, onafhankelijk van de glucoseconcentratie. SGLT1 komt tot expressie op het luminale membraan van de endocriene cellen, deze cellen worden tevens positief bevonden voor incretine en GIP. *In vitro* studies hebben aangetoond dat SGLT1 gemedieerd monosacchariden transport incretine secretie uitlokt via electorgeen gekoppelde influx van Na^+ , wat resulteert in membraan depolarisatie, elektrische activiteit, spanning gerelateerde Ca^{2+} intrede en exocytose. [61]

In obese patiënten werd een verhoogde expressie van onder meer α -gustducine vastgesteld, terwijl de expressie van TAS1R2/TAS1R3 verlaagd is. Deze veranderingen kunnen deel uitmaken van een adaptief mechanisme dat de GI-tractus toelaat zich aan te passen aan een langdurige positieve energiebalans [71]. In diabetici, met verhoogde bloedglucose waarden, is de expressie van TAS1R2/TAS1R3 [72] α -gustducine [73] verlaagd. Dit duidt erop dat intestinale expressie van smaakreceptoren afhankelijk is van metabolische toestand.

3.3 ZOETSTOFFEN

In deze masterproef worden 2 zoetstoffen van naderbij onderzocht. Oligofructose, een natuurlijke zoetstof en sucralose, een artificiële zoetstof. Het effect van de zoetstoffen op ghreline-secretie wordt bekeken.

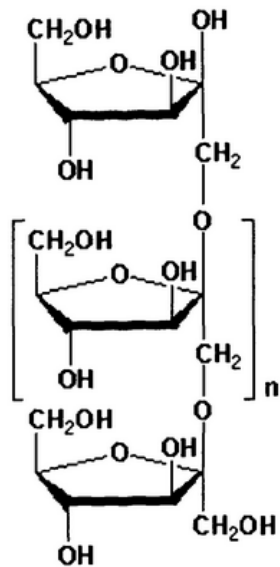
3.3.1 OLIGOFRUCTOSE

Oligofructose is een prebiotisch koolhydraat dat gebruikt wordt als natuurlijke zoetstof. Het heeft een zoetheid van 30-50% van commerciële suikers (sucrose). Oligofructose komt natuurlijk voor in verscheidene natuurproducten zoals bananen, ajuinen en look. Oligofructose wordt gewonnen uit de wortel van chicorei. Oligofructose behoort tot de fructanen groep van de koolhydraten. Het bestaat uit een fructoseketen met een gemiddelde lengte van 6 eenheden, de keten bevat een eindstandige D-glucose of D-fructose. De fructose eenheid van oligofructose is een mengsel van lineaire fructose polymeren en oligomeren verbonden met β -2-1-glycosidische bindingen. [74] [75]

Oligofructose heeft een lagere calorische waarde dan de meeste koolhydraten, dit is te danken aan de β -2-1-glycosidische bindingen, deze bindingen kunnen niet verteerd worden door menselijke amylasen, waardoor oligofructose onverteerd in het menselijk colon terechtkomt. Hier wordt oligofructose door de microbiota gefermenteerd met productie van korte keten vetzuren en gassen. [74] De structuur van oligofructose is te zien in Figuur 9.

Een studie van Parnell et al. [76] toont aan dat bij 48 volwassenen, die dagelijks 21g oligofructose consumeren, een gewichtsverlies merkbaar was en dat de glucoseregulatie verbeterde. Oligofructose veroorzaakte dit effect door verlaagde energie-inname. Obese testpersonen nemen minder calorieën op als ze op een oligofructose dieet staan. Uit dit onderzoek blijkt dat er een rol weggelegd is voor oligofructose in de glucosehomeostase. Er werd een afname van ghreline in het plasma geconstateerd door een behandeling met oligofructose gedurende 3 maanden. Oligofructose zou de posprandiale glycemie beïnvloeden door incretine hormonen te stimuleren. [76]

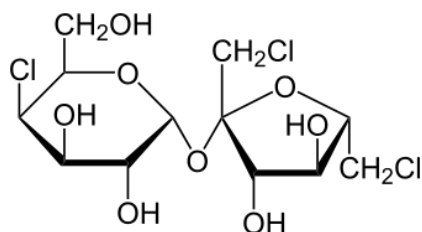
Door zijn zoetheid kan oligofructose mogelijks de zoetreceptoren activeren. Anderzijds kan het fermentatieproduct van oligofructose, de korte keten vetzuren, interageren met vetzurreceptoren FFAR2 en FFAR3, gelokaliseerd op entero-endocrienecellen in het colon. Studies hebben reeds aangetoond dat korte keten vetzuren, FFAR2 en FFAR3 op de L-cellen (PYY, GLP-1) en X/A-cellen (ghreline) kunnen activeren. [77]



Figuur 9: Structuur oligofructose

3.3.2 SUCRALOSE

Sucralose werd in 1976 ontdekt. Deze artificiële zoetstof is 600 maal zoeter dan sucrose en het wordt niet in het lichaam gemetaboliseerd om energie te produceren, met andere woorden het bevat geen calorieën. De aanvaardbare dagelijkse inname (ADI) van sucralose is gezet op 5 mg/kg lichaamsgewicht. [78] In Figuur 9 is te zien hoe de structuurformule van sucralose is opgebouwd. Deze bevat 3 chlooratomen (zie Figuur 10) waardoor dit product een grotere zoetheid heeft. Aangezien chloor in ons drinkwater voorkomt, is het veilig om sucralose te consumeren. [79]



Figuur 10: Structuurformule sucralose

Een onderzoek van Saada et al. [80] bij gezonde en diabete ratten toont aan dat toediening van sucralose gedurende 6 weken (11mg/kg) geen effect had op insuline, terwijl de bloedglucosewaarden dalen. De resultaten werden bevonden na 12 uur vasten en bevestigen de bevindingen dat sucralose geen cephalische (voorbereidende fase) insuline respons induceren. Derhalve blijkt dat de afname aan glucose kan worden toegeschreven aan een vermindering in absorptie. [80]

Dit kan mogelijks verklaard worden door een interactie met de zoetreceptoren. Activatie van de zoetreceptoren kan de expressie van de glucose transporters

beïnvloeden. Als deze receptor gedurende 6 weken geactiveerd wordt kan er mogelijk een compensatiemechanisme optreden waardoor er minder SGLT1 en GLUT2 tot expressie komen, dan aanvankelijk verwacht.

In het onderzoek van Saada et al. werd geen effect op insuline waargenomen. Orale inname van sucralose heeft geen toename van plasma GLP-1 [81] of PYY concentraties tot gevolg. Sucralose in combinatie met glucose heeft een stimulerend effect op GLP-1-secretie van de primaire L-cellen, in vergelijking met enkel sucralose of glucose. Deze studie van Saada et al. suggereert dat de combinatie van niet-calorische zoetstoffen met suikers synergetisch functioneren door de stimulatie van GLP-1-secretie. Ook werd in de studie van Ford et al. aangetoond dat sucralose, bij mensen, geen effect heeft op plasmagluucose- en insulineconcentraties. [82]

4 DOELSTELLINGEN

De hoofddoelstelling van dit onderzoek is te achterhalen hoe oligofructose en sucralose worden waargenomen door de ghrelinecel en de secretie van ghreline beïnvloeden. Dit ghreline beïnvloedt op zijn beurt weer de voedselinname omdat het betrokken is bij de energie-en glucosehomeostase.

Deze hoofddoelstelling wordt in kleinere objectieven opgesplitst. Eerst en vooral wordt het effect van de zoetstoffen op de ghrelineproductie nagegaan *in vitro* in een ghrelinomacellijn. Nadat de optimale concentratie en duur van stimulatie bepaald is, wordt het mechanisme verder bestudeerd door gebruik te maken van farmacologische blokkers. Het effect op de expressie van ghreline en de zoete smaakreceptor wordt op mRNA-niveau verder bestudeerd.

Naast het *in vitro* deel van het eindwerk wordt het effect van zoetstoffen op de ghrelineproductie ook verder uitgeklaard in *in vivo* proeven, waarbij we gebruik maken van wildtype en α -gustducine knockout muizen (α -gust^{-/-}). Gustducine is een signaaltransduciemolecule dat een belangrijke rol speelt in de signaaltransductie van smaakreceptoren. Aangezien D-glucose één van de belangrijkste monosacharides is die in de GI-tract voorkomen, wordt eerst en vooral het effect van dit monosacharide bekeken. D-glucose kan in tegenstelling tot artificiële zoetstoffen niet alleen waargenomen worden door TAS1R2-TAS1R3 maar kan ook opgenomen worden door glucosetransporters zoals SGLT1 en GLUT2.

Allereerst wordt het effect van intragastrische en intraveneuze toediening van D-glucose bestudeerd. Hiermee wordt bekeken of D-glucose lumaal of basolateraal door de ghrelinecel waargenomen wordt. Vervolgens wordt het knockout model gebruikt om uit te zoeken of smaakreceptoren een rol spelen in het effect van D-glucose op de ghrelinesecretie. Aangezien oligofructose niet opgenomen wordt door de endocriene cellen en dus niet in het bloed terechtkomt, wordt enkel het intragastrische effect van oligofructose bekeken. Ook hier wordt het knockout model gebruikt om het mechanisme verder op te helderen.

5 MATERIAAL EN METHODEN

5.1 EXPERIMENTELE OPZET VAN DE *IN VITRO* EN *IN VIVO* PROEVEN

5.1.1 STIMULATIE-EXPERIMENTEN IN DE MUIS GHRELINOMA 3-1 CELLIJN, MGN3-1

Met behulp van entero-endocriene cellen, afgeleid van een ghrelineproducerende maagtumor van een muis, wordt de invloed van zoetstoffen op de ghrelinesecretie nagegaan. Nadat de optimale stimulatieduur (tijdskinetiek) en concentratie bepaald zijn, wordt het mechanisme verder uitgeklaard met behulp van farmacologische blokkers.

5.1.1.1 CELLIJN

De muis ghrelinomacellijn (MGN3-1) is een ghreline producerende cellijn. Deze cellijn is afkomstig van een maagtumor die ontstaan is uit een ghrelinepromotor Simian virus 40 T-antigeen transgene (GP-Tag Tg) muis. [83] Deze cellijn werd ons vriendelijk ter beschikking gesteld door Professor Hiroshi Iwakura.

5.1.1.2 IN CULTUUR PLAATSEN VAN MGN3-1 CELLEN

De MGN3-1 cellen worden in cultuur gebracht bij 37°C met 5% CO₂ in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, LONZA, Verviers, België, BE12-604F) aangereikt met 10% *fetal bovine serum* (FBS) (LONZA, Verviers, België) en 1% Penicilline/Streptomycine (LONZA, Verviers, België).

5.1.1.3 STIMULATIE VAN DE MGN3-1 CELLEN

De MGN3-1 cellen worden uitgezaaid, aan 600 000 cellen per well (diameter 21,40 mm) en overnacht in cultuur geplaatst.

De cellen worden gewassen met warm DPBS (LONZA, Verviers, België, BE17-512F). Waarna de testoplossingen: DMEM (GIBCO, GENT, België, 21063-029, D-glucose 25 mM, zonder fenolrood), 20 mM sucralose in DMEM, 25% FOS in DMEM en 20 mM fructose in DMEM, aan de cellen worden toegevoegd. Per testoplossing worden 3 wells gebruikt. Om de kinetiek te bepalen worden de cellen gedurende 6, 16 en 24 uur met de testoplossingen gepreïncubeerd. Bij gebruik van gurmarine (TAS1R2-TAS1R3 antagonist) worden de MGN3-1 cellen eerst een uur gepreïncubeerd met deze antagonist, om daarna gedurende 6 uur behandeld te worden met de respectievelijke zoetstoffen in aanwezigheid van de antagonist. Gedurende de

stimulatie wordt 30µg/ml gurmarine om de twee uur toegevoegd om een constante concentratie antagonist te garanderen. Het supernatans wordt gecollecteerd en de cellen worden gewassen met warm DPBS.

Nadien wordt er gedurende 3 uren gestimuleerd met HEPES buffer (deze bestaat uit 140 mM NaCl; 4,5 mM KCl; 1,2 mM MgCl₂ · 6H₂O; 10 mM D-glucose; 20 mM HEPES; 0,1% BSA (w/V); 1,8 mM CaCl₂ · 2H₂O en had een pH tussen 7,2 en 7,4). Deze incubaties vinden plaats bij 37°C en 5% CO₂. Het supernatans wordt gecollecteerd, aangezuurd met 1M HCl (10%) en gedurende 7 minuten gecentrifugeerd bij 2200 rpm en 4°C, het supernatans wordt bewaard op -80°C.

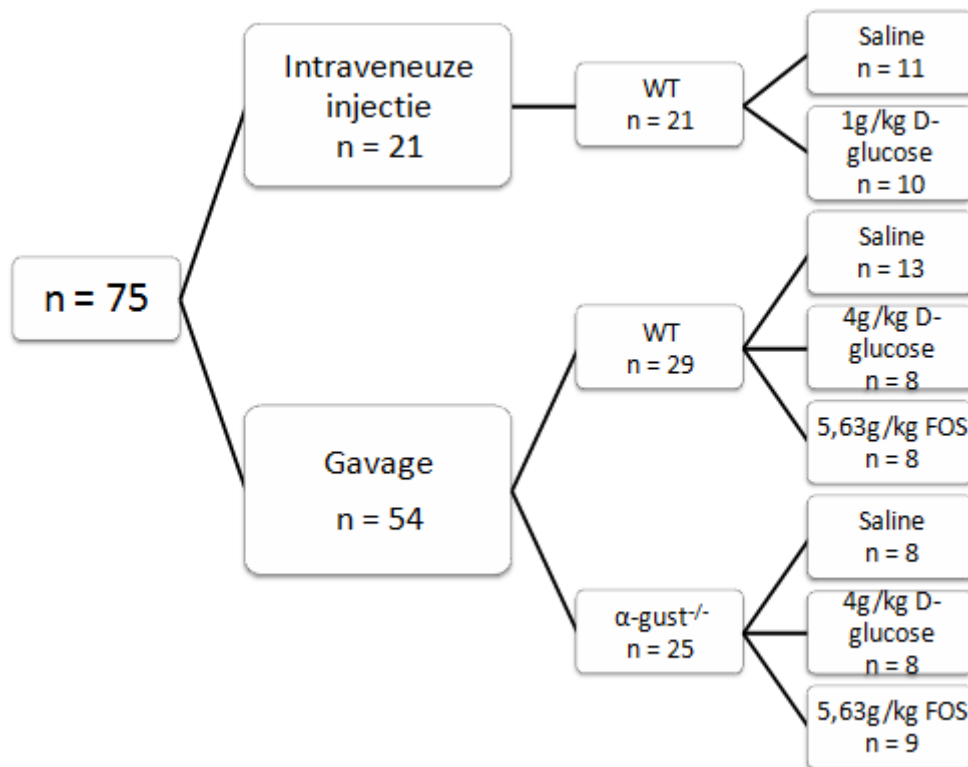
5.1.2 *IN VIVO* EXPERIMENTEN

5.1.2.1 PROEFDIEREN

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke C57 Black 6 (C57BL/6) muizen (wild type, WT) en mannelijke α -gustducine^{-/-} knockouts (α -gust^{-/-}). Hiervoor werd toestemming verleend door het Ethisch Comité voor Proefdierexperimenten van de Katholieke Universiteit Leuven.

5.1.2.2 OPZET VAN DE EXPERIMENTEN

Twaalf weken oude mannelijke C57 Black 6 muizen (n = 50) en twaalf weken oude mannelijke α -gustducine knockouts (α -gust^{-/-}) (n=25) worden voor het experiment per 3 of 4 gehuisvest in een temperatuurgecontroleerde omgeving (20-22°C) en overnacht gevast, waarbij ze vrije toegang hebben tot water. Deze muizen worden over 2 experimenten verdeeld. Voor het gavage experiment worden zowel de WT muizen als de α -gust^{-/-} muizen gebruikt, terwijl het effect van de intraveneuze injectie enkel in WT muizen nagegaan wordt. De eerste groep (n= 54) wordt gegaveerd met ofwel 4g/kg D-glucose (WT; n=8, α -gust^{-/-}; n=8), 5.63g/kg oligofruuctose (FOS) (WT; n=8, α -gust^{-/-}; n=9) ofwel saline (0,9% NaCl; Braun Medical, Bethlehem, PA, Verenigde Staten) als controle (WT; n=13, α -gust^{-/-}; n=8) en na 40 min geëuthanaseerd. De tweede groep (n=21) wordt intraveneus geïnjecteerd met ofwel 1g/kg D-glucose (n=10) ofwel saline (0.9% NaCl) als controle (n=11) (Figuur 11).



Figuur 11: Experimentele opzet in vivo proeven

5.1.2.3 DISSECTIE VAN DE MUIZEN

Door middel van intraperitoneale toediening van ketamine (10 mg/ml; Pfizer, New York, NY, Verenigde Staten) en xylazine (1%; Bayer, Leverkusen, Duitsland) worden de muizen verdoofd. Via intracardiale punctie wordt het bloed afgenomen, aprotinine (1 mg/ml bloed) en EDTA (2 mg/ml bloed; Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland) worden hieraan toegevoegd om vervolgens de bloedstalen gedurende 10 minuten bij 4 °C te centrifugeren (2000 *g). Na centrifugatie wordt het plasma afgepipetteerd, aangezuurd met 1 M HCl (10%) en bewaard bij -80 °C. Onmiddellijk na de intracardiale punctie, worden de maag en het duodenum gedisseceerd, gespoeld en onderverdeeld in een deel voor fixatie (ingebed in 4% PFA), proteïnebepaling (onmiddellijk ingevroren bij -80°C) en expressiebepaling (overnacht incubatie in RNA-later en daarna bewaard bij -80°C). Tevens wordt de hypothalamus verwijderd, dit wordt ook ingevroren bij -80°C.

5.2 BEPALING VAN DE CONCENTRATIE OCTANOYLGHRELIN IN CULTUURMEDIA, PLASMA EN WEEFSELEXTRACTEN

5.2.1 OPZUIVERING CULTUURMEDIUM EN PLASMASTALEN

De stalen van de cultuurmedia en plasma worden opgezuiverd door gebruik te maken van C₁₈ Sep Pak kolommen (360 mg C18, 55-105 µm, Waters corporation, Milford, MA, Verenigde Staten). Deze kolommen werken op basis van *reversed-phase* kolomchromatografie. Bij dit soort chromatografie wordt gebruik gemaakt van de polariteit van de solventen of buffer. [84]

C₁₈ Sep Pak kolommen worden gepreëquilibreerd met 80% CH₃CN (Acros Organics, Geel, België, 26827-0025)-0,1% TFA (Acros Organics, Geel, België, 139721000) en 3% CH₃CN - 0,1% TFA. Vervolgens wordt aan het staal een gelijke hoeveelheid 10% CH₃CN toegevoegd en op de C₁₈ kolommen geladen. Vervolgens worden de C₁₈ kolommen gewassen met 15% CH₃CN - 0,1% TFA en tenslotte wordt er geëluëerd met 50% CH₃CN - 0,1% TFA.

Wanneer het eluaat volledig bevroren is wordt het gelyofiliseerd door gebruik te maken van de Speed-Vac (Univapo 150 ECH, Montreal Biotech, Dorval, PQ, Canada). Het staal wordt op -80°C bewaard.

5.2.2 PROTEÏNE-EXTRACTIE UIT WEEFSELSTALEN

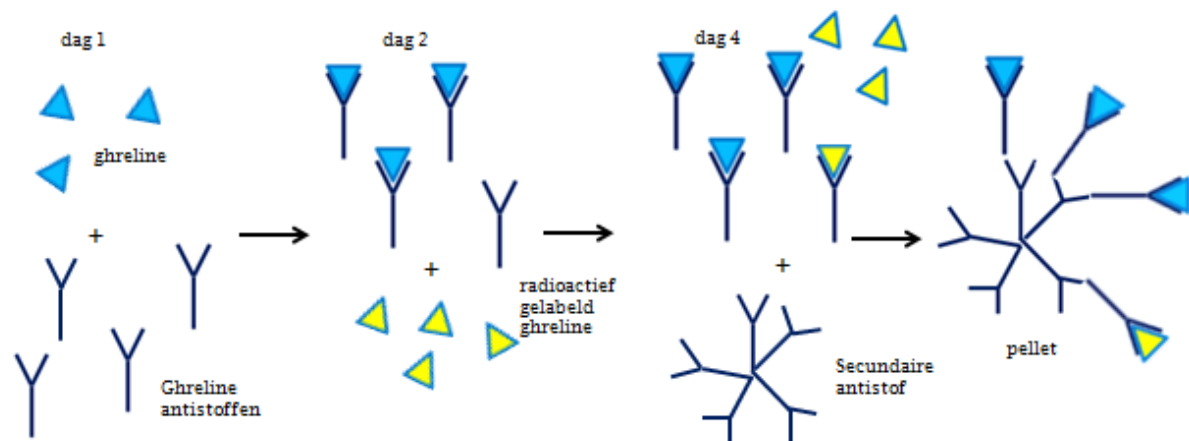
Nadat het weefsel is ontdooid, wordt het gedurende 10 minuten gekookt. Er wordt aan het weefsel protease inhibitor cocktail (Protease Inhibitor Cocktail kit, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, Verenigde Staten) (3 ml/g weefsel) en azijnzuur (6%) (9 ml/g weefsel) toegevoegd, vervolgens worden de stalen gehomogeniseerd in de Precellys 24 homogenisator (Bertin Technologies, Aix en Provence, Frankrijk). Het gehomogeniseerde weefsel wordt opnieuw 10 minuten gekookt en 45 minuten lang gecentrifugeerd bij 20.817 *g en 4 °C. Het supernatans wordt afgepipetteerd en bewaard bij -80 °C.

5.2.3 RADIOIMMUNOASSAY (RIA)

5.2.3.1 PRINCIPE RIA

Met *radio immuno assay* wordt de concentratie octanoyl-en totaal ghrelina bepaald. Het principe is gebaseerd op competitieve binding. Er treedt competitie op tussen het antigeen uit het staal en een vaste hoeveelheid radioactief gelabeld antigeen in aanwezigheid van een vaste hoeveelheid antistof. Hieraan wordt een

tweede antistof, gebonden aan cellulose, toegevoegd die bindt op het eerste antistof, hierdoor wordt een groot gebonden systeem gevormd, wat neerslaat. Het ongebonden antigen wordt gescheiden van de gebonden antigen-antistof fractie door het geheel te centrifugeren en het supernatans te verwijderen. Door gebruik te maken van een standaard verdunningsreeks kunnen de concentraties aan octanoyl-en totaal ghreline berekend worden. In Figuur 12 is het principe van RIA weergegeven.



Figuur 12: Radioimmunoassay

5.2.3.2 UITVOERING

De gesublimeerde stalen worden heropgelost in RIA buffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4(2\text{H}_2\text{O})$ (Merck, 06580), 25 mM Na_2EDTA (Calbiochem, CALB324503-100), 80 mM NaCl, 0.05% NaN_3 , 0.5% Triton X-100 (Sigma, T-6878), 0.5% BSA (Serva, 11930.04)). De plasmastalen en celextracten worden hierbij in het origineel volume opgelost terwijl de stalen van de maag en duodenum verdund worden, respectievelijk 1500 en 30 maal.

Het konijn anti-humaan-ghreline antistof (AB5004, Peninsula, Laboratories Inc., Bachem) wordt opgelost met een verdunning van 1/83 000 in RIA-buffer met 0,5% NRS (normal rabbit serum, Jackson Immunoresearch, 011-000-120). Hiervan wordt 200 μl aan 100 μl staal toegevoegd. Dit wordt op 4°C overnacht geïncubeerd, hierna wordt 100 μl ^{125}I gelabeld ghreline toegevoegd (80000-10000 cpm). Dit wordt gedurende 48 uur geïncubeerd op 4°C. Vervolgens wordt gedurende 45 minuten, 100 μl SAC-CEL anti konijn (AA-SAC1 Lucron Bioproducts, DS Boldon.NE35 9PD, Engeland) geïncubeerd bij 4°C. Nadien wordt gedurende 20 minuten op 3000 rpm bij 4°C gecentrifugeerd om de niet gebonden antigenen te verwijderen in het supernatans. Als laatste stap wordt de radioactiviteit van ^{125}I gemeten in de pellet door de gamma-teller (Cobra II auto-gamma, Packard, Downers grove, IL, Verenigde Staten).

5.2.4 PROTEÏNEBEPALING

De proteïnebepaling in de maagextracten wordt uitgevoerd door gebruik te maken van de Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Verenigde Staten).

5.3 AANTONEN VAN ZOETRECEPTOREN, GHRELIN, GOAT, SGLT1 EN GLUT2 IN DE MGN3-1 CELLIJN

5.3.1 ISOLATIE VAN RNA

De cellen worden na stimulatie met de testoplossingen gewassen met DPBS, dissociatiebuffer (GIBCO, Gent, België, 13151-014) wordt aan de cellen toegevoegd. De losgekomen cellen worden gecollecteerd en gedurende 5 minuten op 4°C aan 300g gecentrifugeerd. Het supernatans wordt verwijderd en de pellet wordt geresuspendeerd in 1 ml DPBS, opnieuw gecentrifugeerd en geresuspendeerd in 350 µl RLT-buffer (1/100; mercaptoethanol (GIBCO, Gent, België, 21985-023)/RLT ((Qiagen, Venlo, Nederland, 79216)). Met behulp van een 22G-naald wordt het staal gehomogeniseerd en vervolgens op -80°C bewaard.

Totaal RNA wordt geëxtraheerd uit de MGN3-1 cellen door gebruik te maken van de RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Nederland).

5.3.2 REAL-TIME PCR

Het RNA geëxtraheerd uit de MGN3-1 cellen wordt vervolgens omgezet via *reverse* transcriptie naar complementair DNA (cDNA) door middel van Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA, Verenigde Staten). De Polymerase ketting reactie (PCR) wordt uitgevoerd met behulp van de LightCycler® 480 system (Roche Diagnostics, Bazel, Zwitserland). 1µl cDNA van elk staal wordt toegevoegd aan 9 µl premix (3 µl nucleotide vrij water, 0,5 µl 5µM *forward* primer, 0,5 µl *reverse* primer, 5 µl Sybr green. Er wordt tevens een 'inter-run calibrator in rekening gebracht als correctiefactor. De primersequenties die gebruikt worden zijn weergegeven in Tabel 2. De expressie van elk van de stalen wordt bepaald door gebruik te maken van LightCycler® 480 software versie 1.5 (Roche Applied Science) en de resultaten worden relatief uitgedrukt ten opzichte van Glycerinaldehyde-3-fosfaat dehydrogenase (GAPDH).

Tabel 2: Primersequenties van de gesequencede muisgenen

Gen		Primersequentie
Ghreline	<i>forward</i>	CCAgAggACAgAggACAAGC
	<i>reverse</i>	ACATCgAAgggAgCATTgAA
GOAT	<i>forward</i>	ACCCgggCCAggTACCT
	<i>reverse</i>	ACCCATggCAGCAAAAgC
TAS1R3	<i>forward</i>	CCCAACAgCATCCCgTgCAA
	<i>reverse</i>	CTCCACAgCCATCTTCATAgC
SGLT1	<i>Forward</i>	AAGATCCggAAGAAggCATC
	<i>reverse</i>	CAATCAGCACgAggATgAAC
GLUT2	<i>Forward</i>	TCTTCACggCTgTCTCTgTg
	<i>reverse</i>	AATCAGCACgAggATgAACA

5.4 STATISTISCH ANALYSE

Alle resultaten worden weergegeven als gemiddelde \pm standaardfout van het gemiddelde ("Standard Error of Mean" of SEM). De statistische analyse gebeurt door gebruik te maken van STATISTICA versie 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, VS). Bij de *in vitro* experimenten, wordt gebruik gemaakt van herhaalde-metingen ANOVA bij de tijdskinetiek en een factoriële ANOVA bij de experimenten in aanwezigheid van een antagonist, al dan niet gevolgd door geplande vergelijkingen tussen de verschillende behandelingen/dosissen. Er wordt gebruik gemaakt van de gepaarde T-test bij de analyse van de mRNA-expressie. Bij de proefdierexperimenten wordt bij de gavage experimenten gebruik gemaakt van een factoriële ANOVA, eveneens gevolgd door geplande vergelijkingen; terwijl bij het effect van intraveneuze toediening van 1g/kg D-glucose op de octanoyl ghrelinesecretie wordt geopteerd voor de ongepaarde T-test. Verschillen worden als statistisch significant beschouwd bij een *P*-waarde kleiner dan 0,05.

6 RESULTATEN

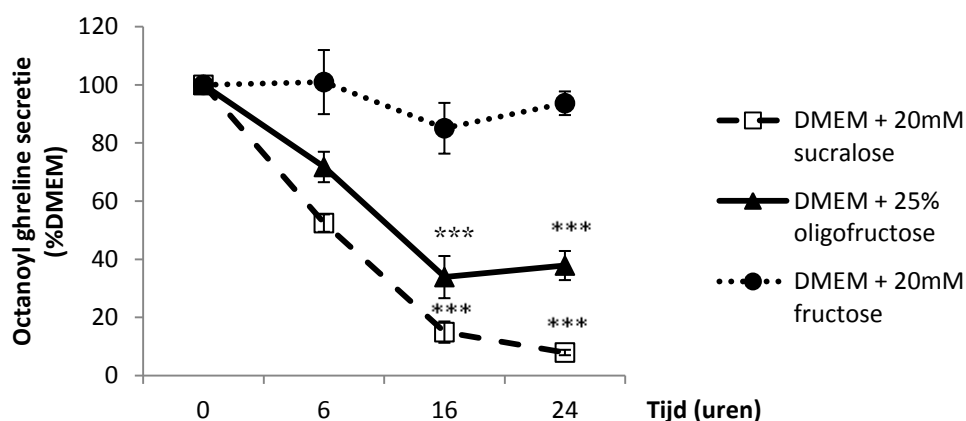
6.1 IN VITRO EXPERIMENTEN

Met behulp van de *in vitro* experimenten wordt het effect van de zoetstoffen op de ghrelineproductie in de ghrelinomacellijn nagegaan. Allereerst wordt de optimale concentratie en duur van de stimulatie bepaald door een tijdskinetiek uit te voeren. Hierna wordt het mechanisme verder onderzocht door gebruik te maken van de zoetreceptorblokker, gurmarine. Tenslotte wordt het effect van de zoetstoffen op de expressie van ghreline, GOAT, TAS1R2-TAS1R3, SGLT1 en GLUT2 bestudeerd.

6.1.1 TIJDSAFHANKELIJKE EFFECTEN VAN DE ZOETSTOFFEN OP DE VRIJSTELLING VAN OCTANOYL GHRELINE

6.1.1.1 EFFECT VAN STIMULATIE VAN MGN3-1 CELLEN MET ZOETSTOFFEN OP OCTANOYL GHRELINESECRETIE

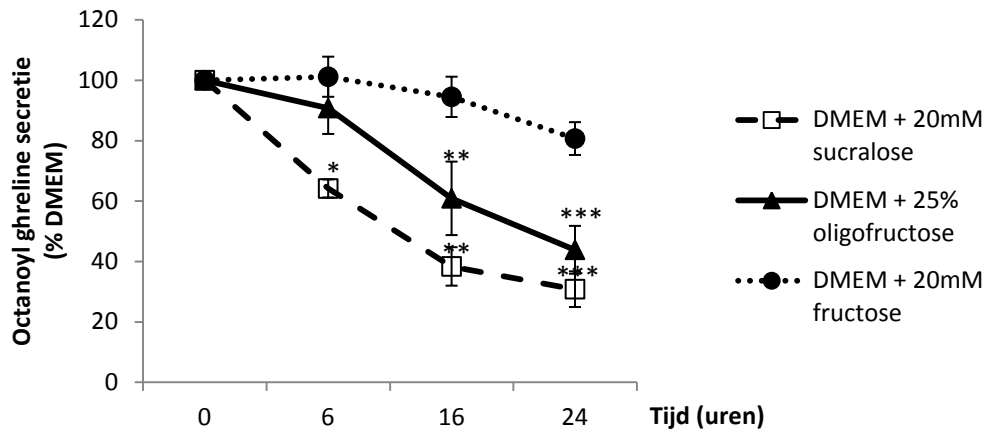
Om de optimale stimulatieperiode te bepalen worden de ghrelinomacellen gedurende 6, 16 en 24 uur gestimuleerd met de testoplossingen: 20 mM sucralose, 25% FOS en 20 mM fructose. Sucralose en oligofructose veroorzaken een significante daling in octanoyl ghrelinesecretie na 16 en 24 uur. D-fructose veroorzaakt geen effect op de octanoyl ghrelinesecretie. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 13.



Figuur 13: Effect van 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM D-fructose na 6 (n=18), 16 (n=9) en 24 (n=24) uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM). Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). *** $P < 0,001$ versus controle.

6.1.1.2 STIMULATIE

De hoeveelheid resterend octanoyl ghreline in MGN3-1 cellen is gedaald in aanwezigheid van 20 mM sucralose en 25% oligofructose. Dit werd nagegaan door de basale octanoyl ghreline vrijstelling gedurende 3 uur, na 6, 16 en 24 uur stimulatie met sucralose, oligofructose of D-fructose te bekijken in aanwezigheid van HEPES buffer. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 14.



Figuur 14: Octanoyl ghreline vrijstelling gedurende 3 uur stimulatie met HEPES buffer (10mM D-Glucose), na de preïncubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM D-fructose na 6 (n=18), 16 (n=9) en 24 (n=24) uur stimuleren van de MGN3-1 cellen in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM). Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ versus controle.

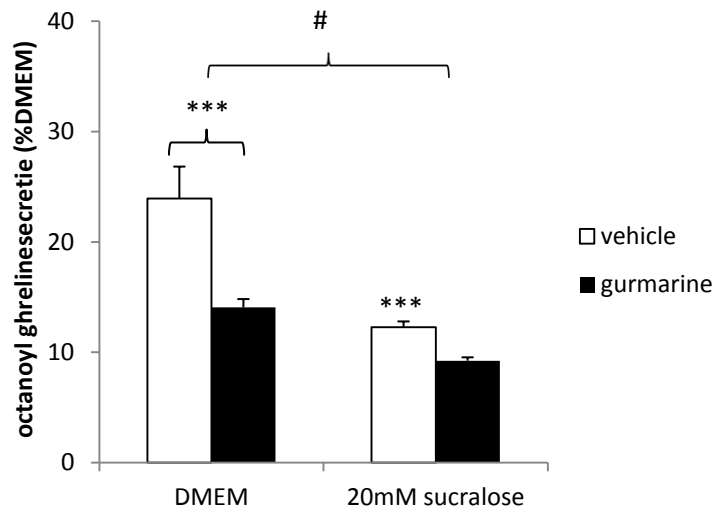
6.1.2 ROL VAN DE ZOETRECEPTOR IN DE INHIBITIE VAN OCTANOYL GHRELINE VRIJSTELLING DOOR DE ZOETSTOFFEN

De rol van de zoetreceptor in het effect van de zoetstoffen op de ghrelinesecretie wordt bestudeerd door gebruik te maken van een TAS1R2-TAS1R3 antagonist; gurmarine.

6.1.2.1 EFFECT VAN STIMULATIE VAN MGN3-1 CELLEN MET ZOETSTOFFEN IN AANWEZIGHEID VAN GURMARINE OP OCTANOYL GHRELINESECRETIE

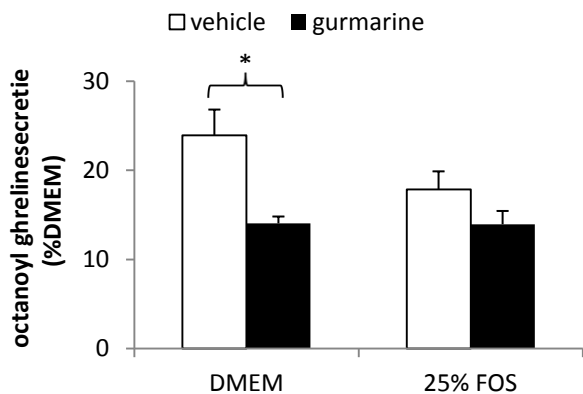
Het effect van de preïncubatie van de MGN3-1 cellen met 30 $\mu\text{g/ml}$ van de zoetreceptorantagonist, gurmarine, op de door zoetstof geïnduceerde ghrelinevrijstelling werd getest. Er is een significant verschil (interactie-effect: $P < 0,001$) in het effect van sucralose op de octanoyl ghrelinesecretie in aan- en afwezigheid van gurmarine. Tevens is 20 mM sucralose in afwezigheid van gurmarine nog steeds in staat de ghrelinesecretie te inhiberen. Gurmarine (30 $\mu\text{g/ml}$) had op zich ook een effect op de basale ghrelinesecretie. Door het effect van de antagonist op de controlestimulatie kan hier niet geconcludeerd worden

dat de zoetreceptor een rol speelt in het sucralose gemedieerde effect op de octanoyl ghrelinesecretie (Figuur 15).



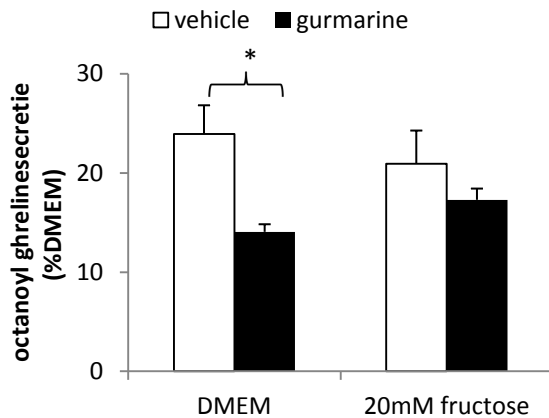
Figuur 15: Effect van 20mM sucralose na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aan-en afwezigheid van 30µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM). Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± Standard Error of Mean (SEM). *** $P < 0,001$ versus controle.

Stimulatie van de MGN3-1 cellijn gedurende 6 uur met 25% oligofruuctose induceerde enkel een tendens tot daling in octanoyl ghrelinesecretie. Gurmarine (30µg/ml) veroorzaakte een significante daling in octanoyl ghrelinesecretie waardoor het effect van gurmarine op de octanoyl ghrelinesecretie door FOS moeilijk te evalueren valt (Figuur 16).



Figuur 16: Effect van 25% FOS na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aanwezigheid van 30 µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM). Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± Standard Error of Mean (SEM).

Stimulatie van de MGN3-1 cellijn gedurende 6 uur met 20mM fructose induceerde geen significant effect in octanoyl ghrelinesecretie. 30µg/ml gurmarine veroorzaakte een significante daling in octanoyl ghrelinesecretie (Figuur 17).

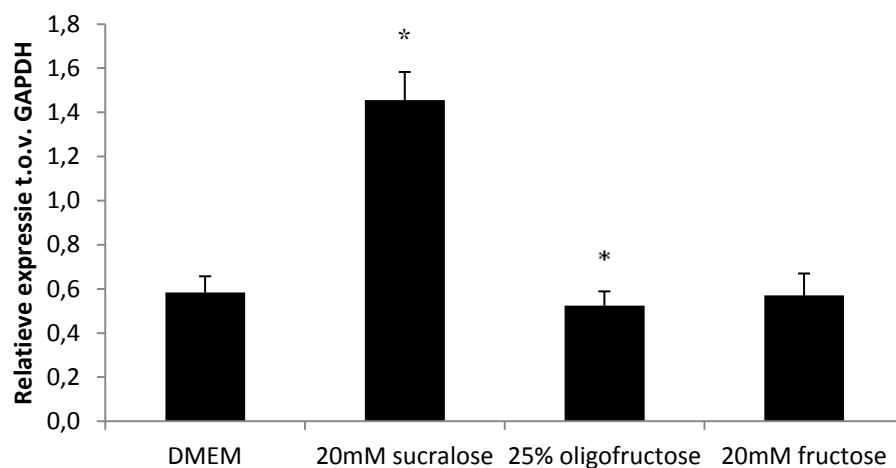


Figuur 17: Effect van 20 mM d-fructose na 6 uur stimuleren van de MGN 3-1 cellen (N=9), in aanwezigheid van 30µg/ml gurmarine, in vergelijking met de controlestimulatie (DMEM). Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± Standard Error of Mean (SEM).

6.1.3 EXPRESSIE VAN GHRELIN, TAS1R3, GOAT, SGLT1 EN GLUT2

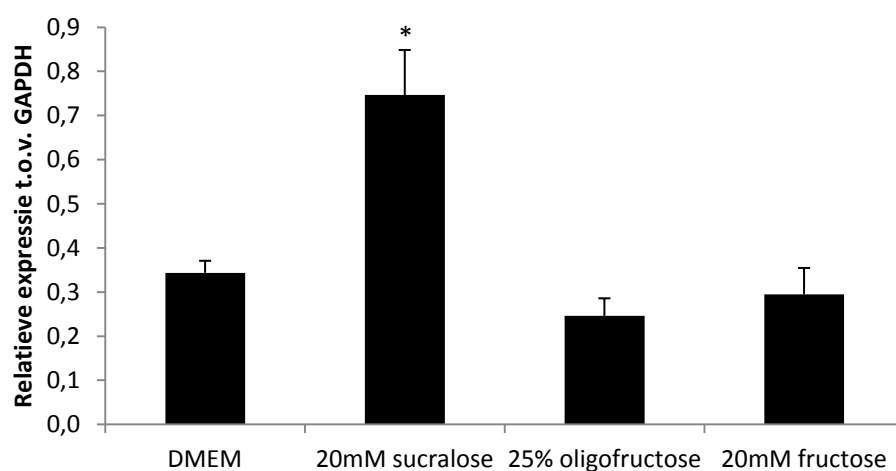
Aangezien er een significant effect van 20 mM sucralose en 25% oligofructose op de ghrelinesecretie werd waargenomen, worden veranderingen in expressie van ghreline, GOAT, de zoetreceptor en glucosetransporters na 24 uur incubatie met de teststoplossingen bekeken. 24 uur incubatie van de MGN3-1 cellen met 20 mM sucralose veroorzaakt een significante toename in ghreline, GOAT en TAS1R3 expressie terwijl 20 mM sucralose de glucosetransporter GLUT2 significant in expressie doet afnemen en we deze tendens ook waarnemen voor SGLT1. 24 uur incubatie met 25% oligofructose veroorzaakt een significante daling in ghreline expressie en in expressie van de glucosetransporters SGLT1 en GLUT2. Op TAS1R3 en GOAT expressie werd geen significant verschil waargenomen. 24 uur incubatie met 20 mM fructose veroorzaakte geen significant effect op het expressieniveau van de onderzochte genen (Figuur 18-Figuur 22).

Ghreline

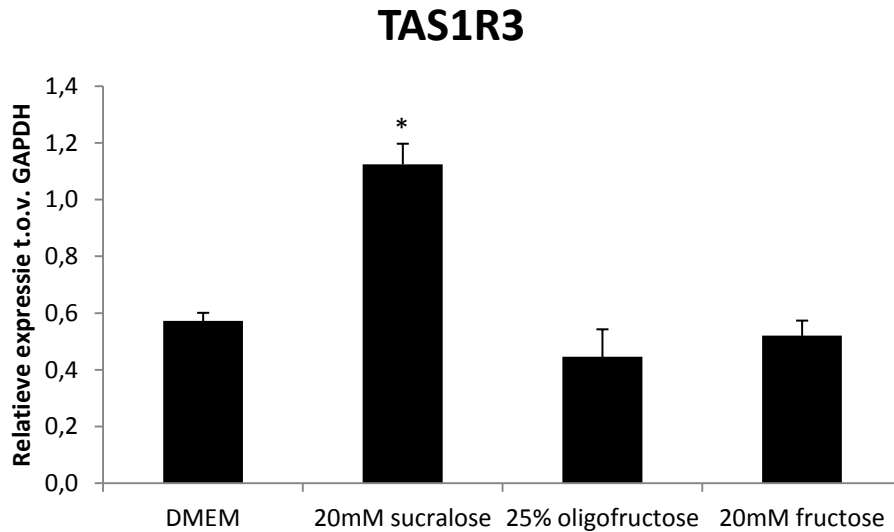


Figuur 18: Relatieve mRNA expressie van ghreline in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose. Resultaten zijn relatief weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus DMEM.

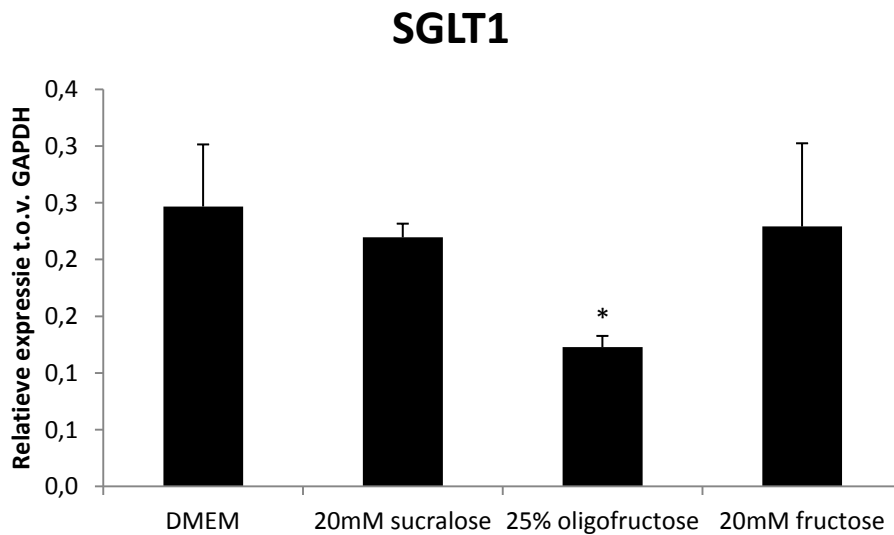
GOAT



Figuur 19: Relatieve mRNA expressie van GOAT in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose. Resultaten zijn relatief weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus DMEM.

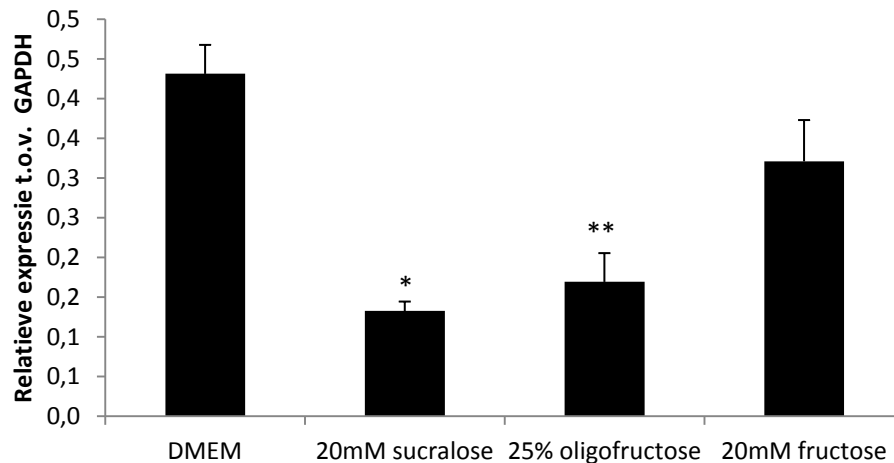


Figuur 20: Relatieve mRNA expressie van TAS1R3 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofruuctose en 20mM fructose. Resultaten zijn relatief weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus DMEM.



Figuur 21: Relatieve mRNA expressie van SGLT1 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofruuctose en 20mM fructose. Resultaten zijn relatief weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus DMEM.

GLUT2



Figuur 22: Relatieve mRNA expressie van GLUT2 in de MGN3-1 cellijn (n=3/conditie) na 24 uur incubatie met 20mM sucralose, 25% oligofructose en 20mM fructose. Resultaten zijn relatief weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus DMEM.

6.2 IN VIVO EXPERIMENTEN

Om het effect van D-glucose en oligofructose na te gaan op de octanoyl en totale ghreline-secretie, wordt er gebruik gemaakt wildtypen en α -gustducine^{-/-} muizen, waarbij 4g/kg D-glucose of 5,63 g/kg oligofructose gegeven wordt.

Om na te gaan of D-glucose lumaal (aan de kant van de darm) of basolateraal (aan de kant van de bloedbaan) wordt waargenomen door de entero-endocriene cel, wordt het effect van D-glucose op ghrelinevrijstelling, zowel na gavage als na intraveneuze injectie bekeken.

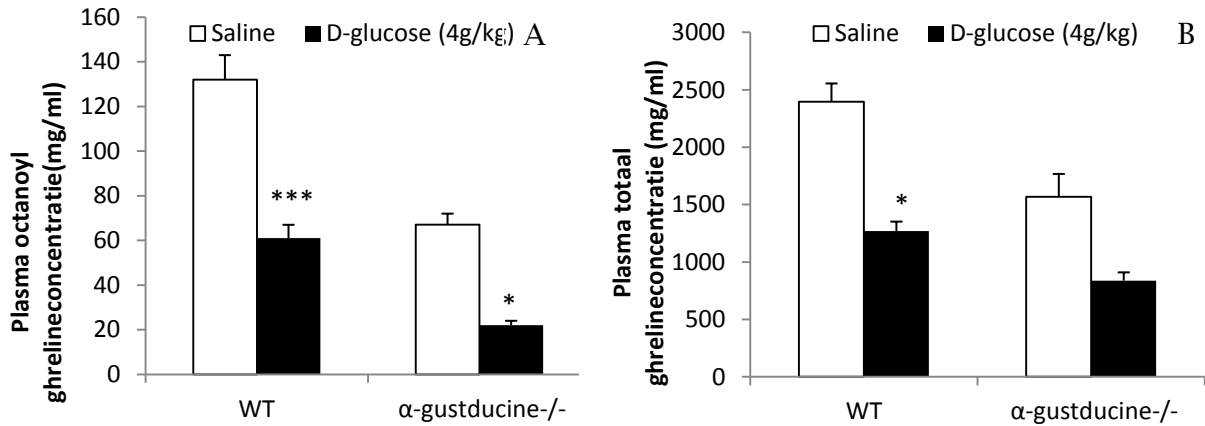
6.2.1 EFFECT VAN INTRAGASTRICHE ADMINISTRATIE VAN D-GLUCOSE EN OLIGOFRUCTOSE OP GHRELINESCRETIE.

Om een beeld te krijgen van het effect van D-glucose en oligofructose op het octanoyl en totale ghrelinegehalte, werd een 4g/kg D-glucose en 5.6g/kg oligofructose-oplossing intragastrisch toegediend aan WT en α -gust^{-/-} muizen.

6.2.1.1 INVLOED VAN D-GLUCOSE EN OLIGOFRUCTOSE OP PLASMA GHRELINCONCENTRATIES

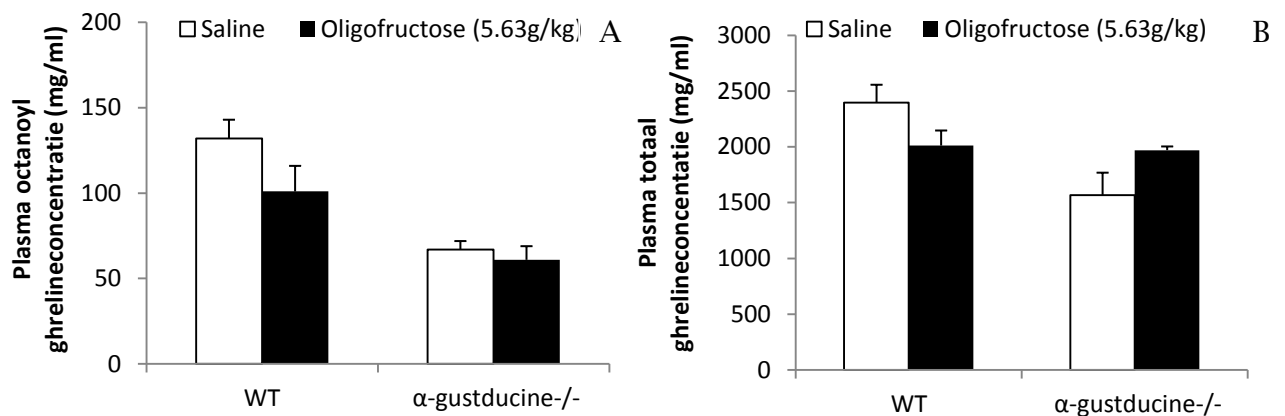
Intragastrische toediening van 4g/kg D-glucose veroorzaakt een significante daling in het plasma octanoyl ghrelinegehalte van WT en α -gust^{-/-} muizen ($P < 0,001$ en $P < 0,05$) (WT; Saline: $132,8 \pm 11,7$ pg/ml versus 4g/kg D-glucose: $61,2 \pm$

6,6 pg/ml, α -gust^{-/-}; Saline: 67,2 ± 5,8 pg/ml versus 4g/kg D-glucose: 22,2 ± 2,2 pg/ml). Tevens veroorzaakt intragastrische toediening van D-glucose een significante daling in plasma totale ghrelineconcentratie bij WT muizen ($P < 0,05$) (WT; Saline: 2396,4 ± 160,8 pg/ml versus 4g/kg D-glucose: 1271,7 ± 82,8 pg/ml). Resultaten zijn weergegeven in Figuur 23.



Figuur 23: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op octanoyl (A) en totaal (B) plasma ghreline secretie. Ghrelinwaarden werden 40 minuten na gavage in het plasma bepaald. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ *** $P < 0,001$ versus controle.

Intragastrische toediening van 5,63 g/kg oligofruuctose veroorzaakt geen significante verschillen in plasma ghrelinwaarden bij beide genotypen, enkel een tendens tot daling in WT muizen (Figuur 24).

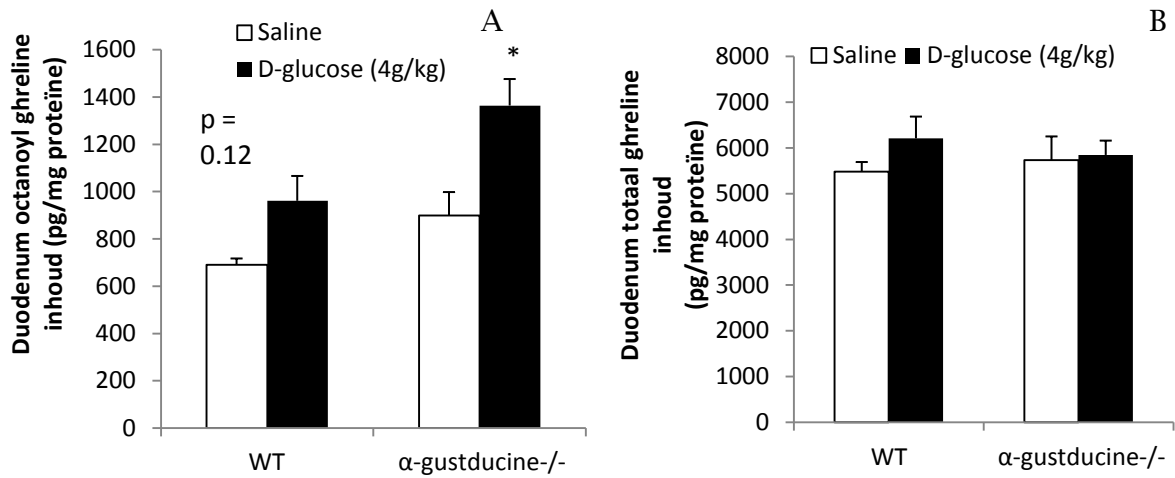


Figuur 24: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofruuctose op octanoyl (A) en totaal (B) plasma ghreline secretie. Ghrelinwaarden werden 40 minuten na gavage in het plasma bepaald. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde ± Standard Error of Mean (SEM).

6.2.1.2 INVLOED VAN D-GLUCOSE EN OLIGOFRUCTOSE OP DUODENUM OCTANOYL EN TOTALE GHRELINE INHOUD

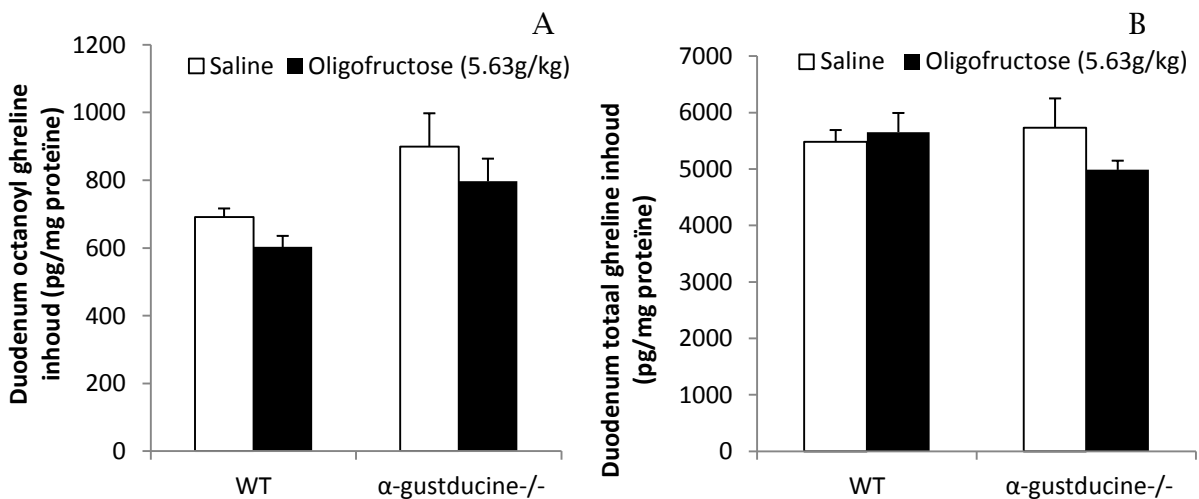
Intragastrische toediening van 4 g/kg D-glucose veroorzaakt een significante toename in octanoyl ghreline inhoud van het duodenum bij α -gust^{-/-} muizen

($p < 0,05$) (α -gust^{-/-}; Saline: $899,2 \pm 99,1$ pg/ml versus 4g/kg D-glucose: $1364,2 \pm 112,0$ pg/ml). In WT muizen werd een tendens tot toename waargenomen ($p = 0,12$). Resultaten zijn weergegeven in Figuur 25.



Figuur 25: Effect van intragastrische toediening van saline en 4 g/kg D-glucose op octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van het duodenum. Het duodenum werd verwijderd 40 minuten na gavage. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus controle.

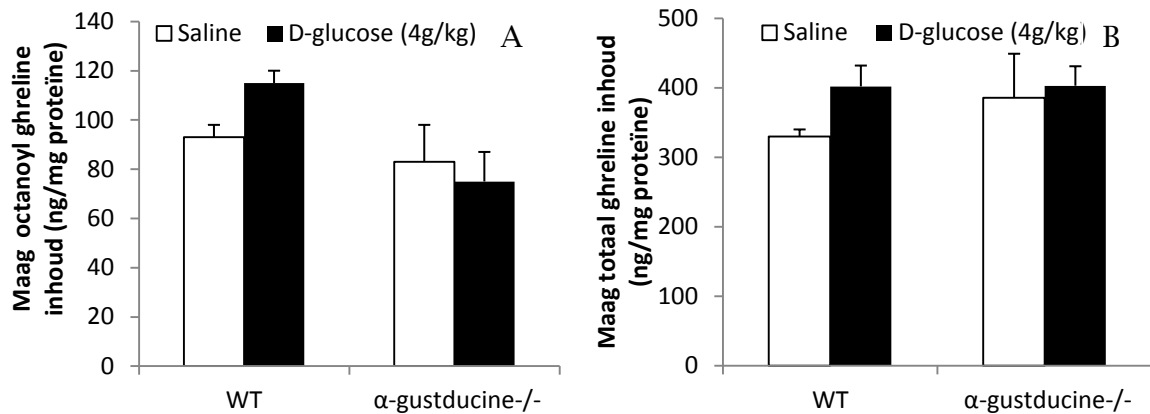
Intragastrische toediening van 5,63 g/kg oligofruuctose veroorzaakt geen significante verschillen in octanoyl en totale ghreline inhoud van het duodenum bij beide genotypen (Figuur 26).



Figuur 26: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofruuctose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van het duodenum. Het duodenum werd verwijderd 40 minuten na gavage. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

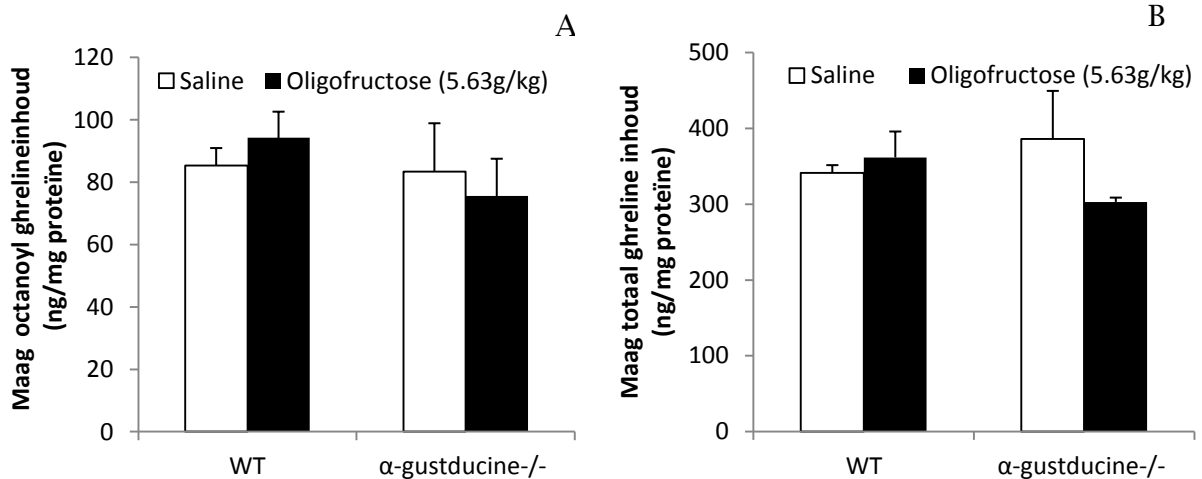
6.2.1.3 INVLOED VAN D-GLUCOSE EN OLIGOFRUCTOSE OP MAAG OCTANOYL EN TOTALE GHRELINE INHOUD

Intragastrische toediening van 4 g/kg D-glucose veroorzaakt geen significante verschillen in de octanoyl en totaal ghreline inhoud van de maag bij beide genotypen (Figuur 27).



Figuur 27: Effect van intragastrische toediening van saline en 4 g/kg D-glucose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van de maag. De maag werd verwijderd 40 minuten na gavage. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

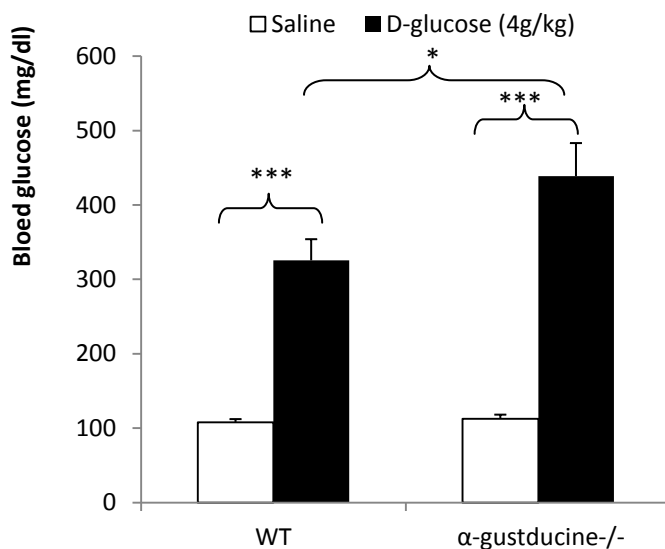
Intragastrische toediening van 5,63 g/kg oligofruuctose veroorzaakt geen significant verschil in de maag octanoyl en totale ghreline inhoud van WT en α -gust^{-/-} muizen. (Figuur 28).



Figuur 28: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofruuctose op de secretie van octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte in weefselextracten van de maag. De maag werd verwijderd 40 minuten na gavage. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$ versus controle.

6.2.1.4 INVLOED VAN INTRAGASTRISCHE TOEDIENING VAN D-GLUCOSE OP BLOEDGLUCOSEWAARDEN

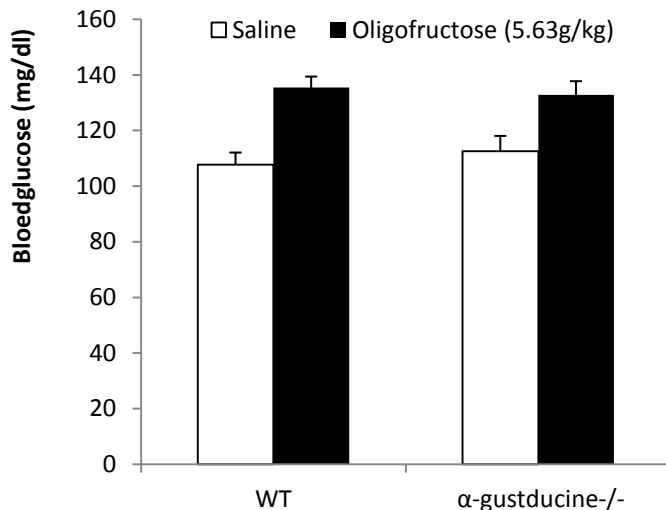
Intragastrische toediening van 4 g/kg D-glucose veroorzaakt een significante stijging van bloedglucosewaarden in WT en α -gust^{-/-} muizen ($P < 0,001$ en $P < 0,001$) (WT; Saline: $107,7 \pm 4,5$ pg/ml versus 4g/kg D-glucose: $325,4 \pm 28,5$ pg/ml, α -gust^{-/-}; Saline: $112,6 \pm 5,5$ pg/ml versus 4g/kg D-glucose: $438,6 \pm 44,5$ pg/ml). Tevens is er een significant verschil in het effect van intragastrische toediening van 4g/kg D-glucose tussen de verschillende genotypen ($P < 0,05$) (WT; 4g/kg D-glucose: $325,4 \pm 28,5$ pg/ml versus α -gust^{-/-}; 4g/kg D-glucose: $438,6 \pm 44,5$ pg/ml) (Figuur 29).



Figuur 29: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ versus controle.

6.2.1.5 INVLOED VAN INTRAGASTRISCHE TOEDIENING VAN OLIGOFRICTOSE OP BLOEDGLUCOSE

Intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofruuctose veroorzaakt geen significante verschillen op de bloedglucosewaarden in beide genotypen (Figuur 30).



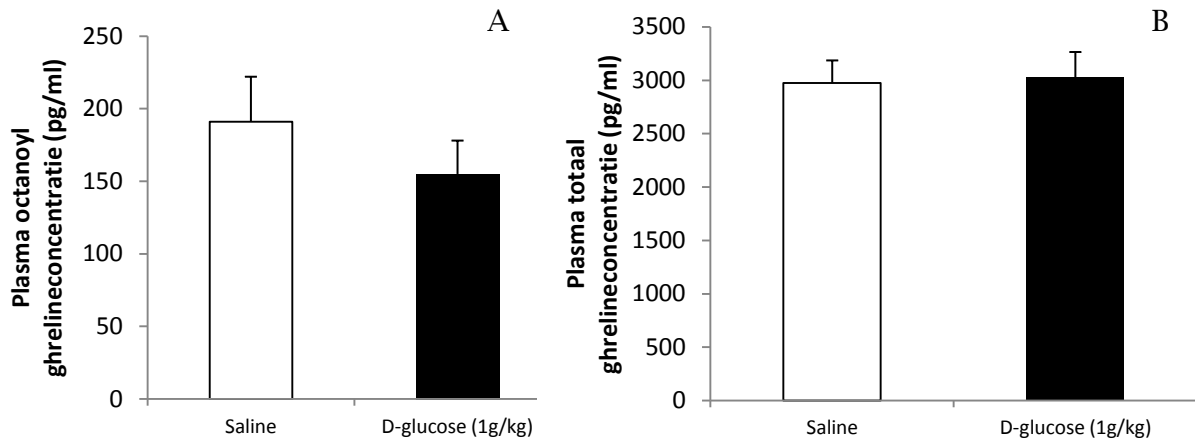
Figuur 30: Effect van intragastrische toediening van saline en 5,63 g/kg oligofructose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

6.2.2 INVLOED VAN INTRAVENEUZE TOEDIENING VAN D-GLUCOSE OP GHRELINESECRETIE

Door middel van een intraveneuze injectie met saline of 1g/kg D-glucose wordt nagegaan of D-glucose via de bloedbaan waargenomen kan worden door de ghrelinecel. De hoeveelheid octanoyl en totaal ghreline wordt nagegaan in het plasma, duodenum en maag, maar ook de bloedglucosewaarden worden bepaald. De concentratie D-glucose ligt hier lager dan in de experimenten met intragastrische toediening van D-glucose, dit is te wijten aan de snelheid van opname van D-glucose. Na intraveneuze injectie wordt een snelle piekglucose waargenomen, die na 15 minuten reeds sterk afgenomen is. Om dit effect te beperken, wordt er een lagere concentratie aan D-glucose in de experimenten met intraveneuze injectie gebruikt.

6.2.2.1 INVLOED VAN D-GLUCOSE OP PLASMA GHRELINECONCENTRATIES

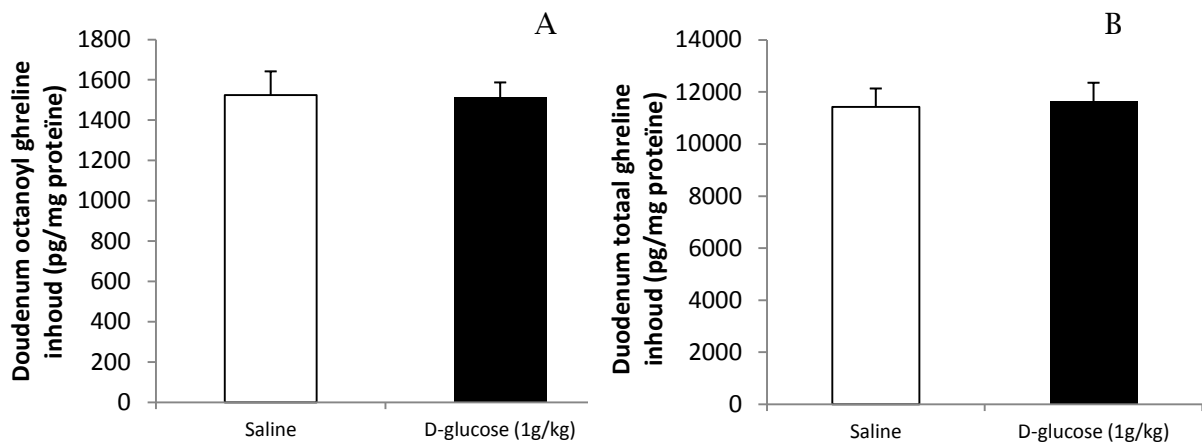
Intraveneuze injectie met 1g/kg D-glucose veroorzaakt geen significant verschil in plasma octanoyl en totale ghrelineconcentraties bij WT muizen. In Figuur 31 zijn de resultaten weergegeven van dit experiment.



Figuur 31: Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op plasma octanoyl (A) en totaal (B) ghrelineconcentratie. ghrelinwaarden werden bepaald in het plasma 40 minuten na gavage. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

6.2.2.2 INVLOED VAN D-GLUCOSE OP GHRELINE INHOUD VAN HET DUODENUM

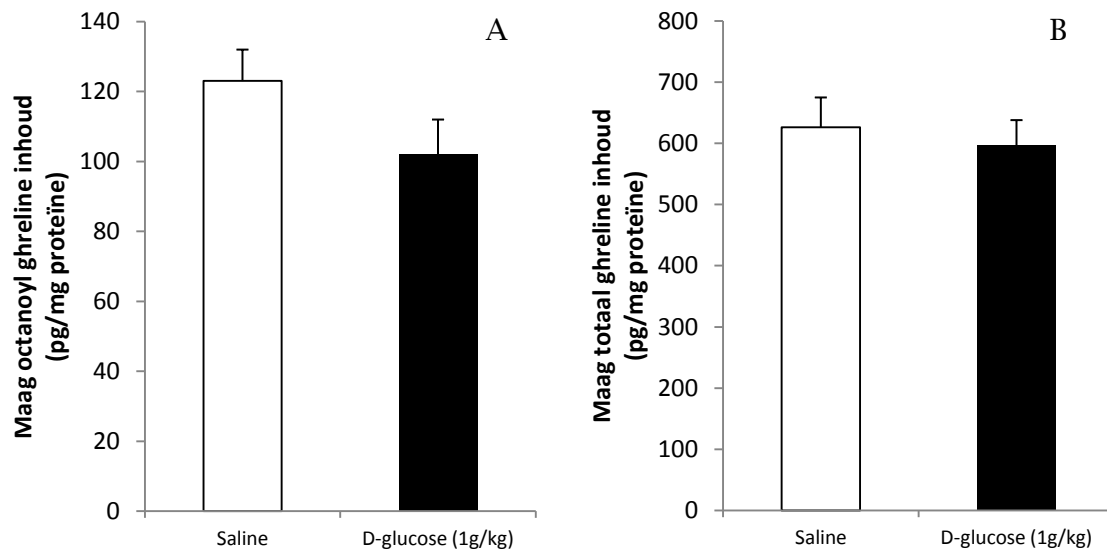
Intraveneuze injectie met saline en 1 g/kg D-glucose veroorzaakt geen significant verschil **Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.** in octanoyl en totale ghreline inhoud van het duodenum bij WT muizen. In Figuur 32 zijn de resultaten weergegeven van dit experiment.



Figuur 32: Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op de octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte van weefselextracten van het duodenum. het duodenum werd 40 minuten na gavage verwijderd. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

6.2.2.3 INVLOED VAN D-GLUCOSE OP GHRELINE INHOUD VAN DE MAAG

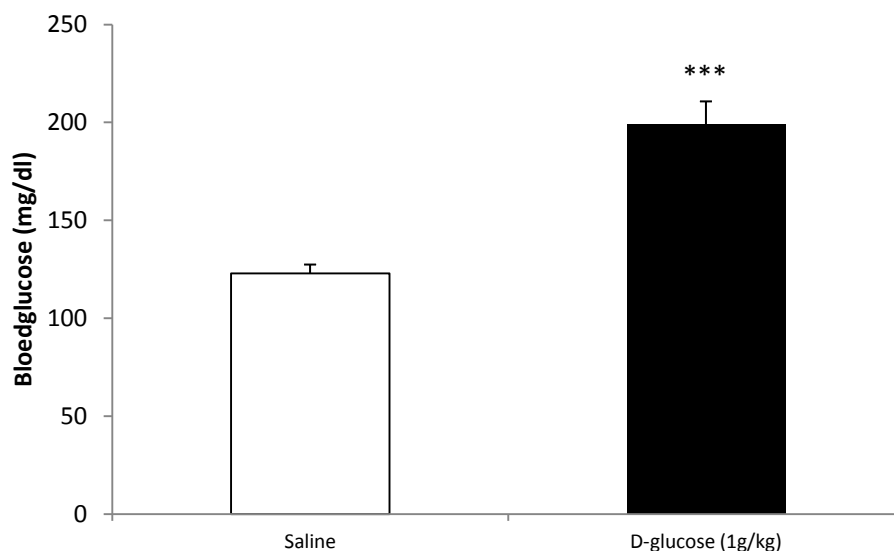
Intraveneuze injectie van saline en 1g/kg D-glucose veroorzaakt geen significant verschil in octanoyl en totale ghreline inhoud van de maag bij WT muizen. In Figuur 33 zijn de resultaten van dit experiment weergegeven.



Figuur 33 Effect van intraveneuze toediening van saline en 1 g/kg D-glucose op de octanoyl (A) en totaal (B) ghrelinegehalte van weefselextracten van de maag. De maag werd 40 minuten na gavage verwijderd. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM).

6.2.2.4 INVLOED VAN D-GLUCOSE OP BLOEDGLUCOSEWAARDEN

Intraveneuze injectie met saline en 1g/kg D-glucose veroorzaakt een significante stijging van bloedglucosewaarden van WT muizen ($P < 0,001$) (WT; Saline: $122,9 \pm 4,5$ pg/ml versus 1g/kg D-glucose: $199,1 \pm 11,6$ pg/ml). In Figuur 34 zijn de resultaten weergegeven van dit experiment.



Figuur 34: Effect van intragastrische toediening van saline en 4g/kg D-glucose op de Bloedglucosewaarden van wildtypen en α -gust^{-/-} muizen. Bloedglucosewaarden werden 40 minuten na gavage bepaald. Resultaten zijn weergegeven als gemiddelde \pm Standard Error of Mean (SEM). *** $P < 0,001$ versus controle.

7 DISCUSSIE

Er is nog maar weinig geweten over de invloed van zoetstoffen op de ghrelinesecretie en over de detectie van nutriënten door chemosensorische cellen in het GI-stelsel. In deze thesis werd er getracht om hierin wat meer duidelijkheid te brengen en verder onderzoek omtrent dit onderwerp aan te moedigen.

Het waarnemen van voedingsstoffen in het GI-stelsel speelt een belangrijke fysiologische rol in de regulatie van de voedselopname. Hoewel geweten is dat koolhydraten een inhiberend effect hebben op de ghrelinevrijstelling, is het waarnemingsmechanisme en de signaaltransductiecascade, betrokken in het effect van de zoetstoffen op de ghrelinesecretie, nog niet opgehelderd. Het effect van zoetstoffen op GLP-1 secretie is echter al wel uitvoerig bestudeerd. Uit literatuuronderzoek kan geconcludeerd worden dat zoetstoffen waarschijnlijk via ondermeer de interactie met de zoetreceptor en glucosetransporters hun effect op GLP-1 secretie uitoefenen. Het doel van deze studie was dan ook om meer klaarheid te scheppen in het effect van zoetstoffen op de vrijstelling van het orexigene peptide, ghreline, en te achterhalen welke receptor deze vrijstelling reguleert. Hierbij werd voortgegaan op de bestaande hypothese dat zoetreceptoren TAS1R2-TAS1R3 een rol kunnen spelen in de detectie van zoetstoffen door endocriene cellen. Dit werd eerst en vooral *in vitro* in een ghrelinomacellijn onderzocht. Naderhand werden *in vivo* proeven gebruikt om te bepalen hoe D-glucose en oligofruuctose de ghrelinesecretie in een diermodel beïnvloeden. Door middel van een α -gustducine knockout model werd het belang van de smaakreceptor in dit effect onderzocht. Tevens werd door middel van intragastrische en intraveneuze toediening van D-glucose bepaald of D-glucose in het lumen van de darm of via aanreiking door het bloed, door de ghrelinecel waargenomen wordt.

7.1 *IN VITRO* EXPERIMENTEN

7.1.1 TIJDSAFHANKELIJKE EFFECTEN VAN DE ZOETSTOFFEN OP DE VRIJSTELLING VAN OCTANOYL GHRELINE

Eerst en vooral werd het tijdsafhankelijk effect van verschillende zoetstoffen op de ghrelinesecretie nagegaan. Uit de resultaten van de tijdskinetiek van de zoetstoffen op de vrijstelling van octanoyl ghreline, blijkt dat na stimulatie gedurende 16 en 24 uur met 20 mM sucralose en 25% oligofruuctose er een significante daling van octanoyl ghrelinesecretie plaatsvindt. Incubatie met 20 mM fructose beïnvloedt de octanoyl ghrelinesecretie niet.

Steinert et al. (2011) bestudeerde het effect van koolhydraten en zoetstoffen in een humane studie. Ze concludeerden dat hoewel D-glucose een significante daling van plasmaghreline waardes veroorzaakte, een equivoete hoeveelheid fructose, sucralose, aspartaam of acesulfame K (3 artificiële zoetstoffen) geen effect op plasma ghrelinegehalten toonden. Het effect van sucralose kan in deze studie mogelijks verklaard worden door de lage concentratie die gebruikt werd (0.65mM) aangezien onze studies pas bij 20mM duidelijke effecten van sucralose aantoonde. De hoeveelheid fructose die gebruikt werd was echter 550mM, een hoeveelheid die bijna 30x hoger ligt dan onze testoplossing. Naast de gebruikte hoeveelheden verschilt ook het bestudeerde tijdsinterval. In de studie van Steinert et al. (2011) werd het effect van de zoetstoffen na een intragastrische toediening bekeken, waarna het ghrelineverloop gedurende 2 uur bekeken werd. [85] In de opzet van de uitgevoerde *in vitro* proeven had 6 uur incubatie met 20mM sucralose en 25% oligofructose geen effect, hiervoor was een langere incubatieperiode vereist.

7.1.2 DE ROL VAN DE ZOETRECEPTOR IN DE INHIBITIE VAN OCTANOYL GHRELINE

VRIJSTELLING DOOR DE ZOETSTOFFEN

Nadat de optimale stimulatie duur bepaald werd, werd er nagegaan of de zoetreceptor een rol speelt in het waarnemen van zoetstoffen door de ghrelinecel. Hiervoor werd gebruik gemaakt van gurmarine, een antagonist van de zoetreceptor. Uit de stimulatie-experimenten blijkt dat gurmarine een effect heeft op de basale secretie. Daarnaast werd er ook een significante interactie waargenomen tussen het effect van 20 mM sucralose in aan-en afwezigheid van gurmarine. Deze interactie werd niet waargenomen voor D-fructose, terwijl we bij oligofructose een neiging tot een effect waarnamen.

Door het effect van gurmarine op de basale secretie kan niet geconcludeerd worden dat de zoetreceptor een rol speelt in het sucralose geïnduceerde ghreline-effect. Een verklaring voor dit effect van gurmarine kan mogelijks gevonden worden in de samenstelling van het testmedium. DMEM bevat namelijk 20 mM D-glucose, een monosacharide dat op zich ook zoet smaakt en mogelijks kan interageren met de zoetreceptor. [59] Dit zou echter impliceren dat D-glucose op zich een stijging van het octanoyl ghrelinegehalte induceert, terwijl literatuur suggereert dat koolhydraten de ghrelinesecretie doen dalen. Zo toont Cummings et al. (2001) aan dat in humaan plasma, de ghrelineconcentraties na het nuttigen van een maaltijd binnen het uur met 50% afnemen. [3] In een studie van Sakata et al (2012) werd het effect van D-glucose op maagmucosacellen van mannelijke C57BL6/J muizen (8-12 weken oud) onderzocht. Er wordt geschat dat 0,3-1% van deze gemengde populatie aan cellen bestaat uit ghrelinecellen. In deze studie werd aangetoond dat de ghrelinesecretie omkeerbaar verlaagd wanneer de cellen blootgesteld werden aan D-glucose. [86] Dit effect gaat verder uitgeklaard

worden. Deze proeven gaan herhaald worden in afwezigheid van 20mM D-glucose om de mogelijke interactie van D-glucose met de zoetreceptor uit te sluiten. Deze experimenten moeten echter nog uitgevoerd worden.

7.1.3 EXPRESSIE VAN GHRELIN, GOAT, TAS1R3, SGLT1 EN GLUT2 IN MGN3-1 CELLEN.

Aangezien stimulatie met de zoetstoffen pas na 16-24 uur een significant effect in de ghrelinesecretie induceert en geen kortetermijn effect teweegbrengt, wordt het effect van de zoetstoffen op de expressie van ghreline, GOAT, TAS1R3, SGLT1 en GLUT2 nagegaan.

Expressie van ghreline neemt significant toe na 24 uur stimulatie met 20 mM sucralose en neemt significant af na 24 uur stimulatie met 25% oligofruuctose. Dit resultaat met 20 mM sucralose is niet in lijn met wat bekomen wordt bij de stimulatie van de MGN3-1 cellen gedurende 24 uur met 20 mM sucralose. De cellen secreteren octanoyl ghreline in lagere hoeveelheden, terwijl de ghreline-expressie significant toegenomen is. Dit is mogelijks te wijten aan een compensatiemechanisme dat optreedt. Door de onderdrukte ghrelinesecretie kan de cel meer RNA gaan maken in een poging te basale ghrelinesecretie te herstellen. Deze redenering gaat echter niet op voor oligofruuctose. Hierbij merken we een daling in octanoyl ghreline secretie en expressie. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het compensatiemechanisme misschien nog niet in werking getreden is. Bij de stimulatie-experimenten nemen we reeds waar dat oligofruuctose minder potent lijkt te zijn dan sucralose in het inhiberen van de glucosesecretie. Dit kan mogelijks verklaren waarom hier nog geen compensatiemechanisme in werking is getreden. Eveneens is de expressie van GOAT significant gestegen in de MGN3-1 cellen na 24 uur stimulatie met 20mM sucralose. Dit correleert met de verhoogde ghreline-expressie zoals hierboven beschreven. Mogelijks kan dit ook verklaard worden door een compensatiemechanisme.

[87] De discrepantie tussen oligofruuctose en sucralose kan mogelijks verklaard worden door hun bindingsplaats en affiniteit voor de zoetreceptor. Hoewel D-glucose, sucralose en oligofruuctose allen met de TAS1R2-TAS1R3 receptor binden, binden ze met een verschillende affiniteit. TAS1R3 knockout muizen hebben geen smaakpreferentie voor sucralose, terwijl de preferentie voor D-glucose slechts afneemt. Hiernaast tonen hersenscan studies in mensen aan dat er verschillen zijn in centrale activatie na inname van D-glucose en sucralose oplossingen. Dit verschil in bindingsaffiniteit -en plaats kan mogelijks ook de verschillen tussen oligofruuctose en sucralose verklaren.

Expressie van TAS1R2-TAS1R3 in de MGN3-1 cellen is significant gestegen na 24 uur stimulatie met 20 mM sucralose. Hieruit zou er geconcludeerd kunnen worden dat sucralose waargenomen wordt via de zoete smaakreceptoren. Zoals ook Jang et al (2007) in de NCI-H716 cellijn door middel van lactisole en siRNA knockdown, aantoonde. [59] Kojima et al. (2013) toonde door middel van experimenten in aanwezigheid van gurmarine, in MIN6 cellen (een pancreatische β -cellijn), aan dat sucralose in de pancreas de zoetreceptor kan activeren. [88]

24 uur stimulatie met 25% oligofructose doet de expressie van de glucosetransporter SGLT1 significant dalen terwijl 20 mM sucralose hier de neiging toe had. In een studie van Mace et al. (2007) werd aangetoond dat sucralose weinig effect heeft op SGLT1 expressie. [69] Dit is in tegenstelling met een studie van Margolskee et al. (2007) waarbij duidelijk aangetoond werd dat een dieet gesupplementeerd met sucralose de expressie van SGLT1 na 2 weken significant doet toenemen in WT muizen, dit effect verdween in TAS1R3 en α -gustducine knockout modellen. [7] Een mogelijke verklaring voor deze resultaten is de incubatietijd na dewelke SGLT-1 expressie bekeken werd en de manier van SGLT1 bepaling. Mace et al. bestudeerde proteïne gehalten aan de hand van western blotting, 30 min na incubatie met de zoetstof, terwijl Margolskee na 2 weken oligofructosesupplementatie SGLT1 expressie bestudeerde.

20 mM sucralose en 25% oligofructose inhiberen de expressie van GLUT2 significant na 24 uur incubatie. Deze resultaten zijn niet in lijn met een studie van Mace et al. (2007), zij toonden aan dat sucralose de GLUT2 transporter na 30 min, op proteïneniveau, doet toenemen. [69] Mogelijks wordt er een snelle upregulatie van GLUT2 bekomen na incubatie met de zoetstoffen, waardoor de aanwezige D-glucose efficiënt opgenomen wordt. Daarna kan er mogelijks een compensatiemechanisme optreden dat als doel heeft de GLUT2 expressie te normaliseren.

7.2 *IN VIVO* EXPERIMENTEN

7.2.1 EFFECT VAN INTRAGASTRISCHE ADMINISTRATIE VAN D-GLUCOSE EN OLIGOFRUCTOSE OP GHRELINEVRIJSTELLING IN MUIZEN

Intragastrische toediening van 4g/kg D-glucose veroorzaakt een significante daling in het plasma octanoyl en totaal ghrelinegehalte van WT en α -gust^{-/-} muizen. Het effect verschilde niet significant tussen de genotypes. Dit wijst erop dat α -gust^{-/-} en dus waarschijnlijk ook zoetreceptoren geen belangrijke rol spelen in het effect van zoetstoffen op de ghrelinesecretie maar dat het eerder gemedieerd is via glucosetransporters.

Met oligofructose worden er, in beide genotypes *in vivo*, geen significante effecten op ghrelinesecretie waargenomen. In de *in vitro* experimenten werd aangetoond dat oligofructose de octanoyl ghrelineproductie verlaagd. Eerdere *in vitro* studies toonden het effect van een andere zoetstof; sucralose op GLP-1 secretie reeds aan, [7] [59] maar deze studies zijn nooit bevestigd geweest in *in vivo* modellen. In studies van Ma et al. (2009), Steinert et al (2011) en Ford et al. (2011) verhoogt de GLP-1 concentratie in mensen niet door sucralose administratie, terwijl deze wel verhoogt na sucrose (een disacharide bestaande uit een D-glucose en D-fructose molecule) inname. [85] [82] Een studie van Parnell et al. (2009) toont aan dat 12 weken administratie van oligofructose bij obese personen, de ghrelinesecretie na een maaltijd tolerantie test (MTT) onderdrukt. [76] In een studie van Cani et al (2004) werd aangetoond dat bij ratten die gedurende 3 weken op een oligofructose-aangereikt dieet stonden, de actieve plasma ghrelineconcentraties lager liggen dan bij controleratten die op een normaal dieet stonden. [89] Andere studies tonen aan dat oligofructose de ghrelineconcentraties in het plasma bij mensen doet dalen. Deze studies vinden echter ook over geruime tijd plaats (meer dan 2 weken). [90] [76] [91] Dit doet vermoeden dat oligofructose geen acuut effect teweeg brengt, maar een langere inwerkingstijd nodig heeft, wat er ook waargenomen wordt bij de *in vitro* proeven, waar oligofructose er pas na 16 uur in slaagt een daling in octanoyl ghreline secretie te veroorzaken.

In deze *in vivo* experimenten werd ook waargenomen dat intragastrische toediening van D-glucose en oligofructose geen effect op de maag ghreline inhoud veroorzaakt. Een mogelijke verklaring kan gezocht worden in het steady-state principe. Tomasetto et al. (2000) toonde aan dat de maagmucosa de hoofdbron is van de circulerende concentraties aan ghreline. [92] Dit bevestigt de bevindingen dat hier steady-state concentraties moeten heersen. In de X/A-cellen in de maag werden twee ghrelinecelpopulaties aangetroffen. De eerste celpopulatie bestaat voor 60% uit ghrelinecellen die zowel octanoyl- als

desoctanoylghreline bevatten. Dit zijn ronde cellen van het gesloten type, ze staan niet rechtstreeks in contact met het lumen van de maag. De tweede populatie bevat enkel desoctanoylghreline. Deze cellen zijn van het type open cellen welke wel rechtstreeks in contact staan met het lumen. Dit verschil in celpopulaties kan mogelijks de verschillen tussen octanoyl en totaal ghreline gehaltes in het plasma verklaren. De rond compacte cellen die zowel octanoyl als totaal ghreline bevatten, staan niet rechtstreeks in contact met het lumen. Sakata et al (2001) toonde aan dat de open typen cellen verder distaalwaarts in het GI-stelsel aangetroffen worden, deze cellen staan aan de basis van de luminale detectie van macronutriënten in de voeding [24] en detecteren dus ook de intragastrische toegediende D-glucose in de muis. Dit kan mogelijks verklaren waarom we een stijging in octanoyl ghreline inhoud in het duodenum waarnemen. D-glucose wordt hier mogelijks waargenomen, waardoor het duodenum minder octanoyl ghreline gaat secreteren en meer gaat opstapelen. Dat we deze stijging ook waarnemen in α -gust^{-/-} muizen wijst erop dat het glucose-sensingsmechanisme in het duodenum waarschijnlijk eerder de glucosetransporters SGLT1 en GLUT2 gaan zijn.

Martin et al (2000) toonde aan dat de glucosetransporter SGLT1 enkel voorkomt in de dunne darm en niet in de maag. [93] Een tweede mogelijke verklaring van de niet wijzigende ghrelineconcentraties in de maag bij intragastrische toediening van D-glucose kan ondermeer te wijten zijn aan het ontbreken van de SGLT1 glucose transporter.

Door intragastrische toediening van 4 g/kg D-glucose in WT en α -gust^{-/-} muizen stijgt het bloedglucosegehalte significant. Waarbij de bloedglucosewaarden significant meer stijgt in het knockout model. Dit kan verklaard worden door het incretine-effect. D-glucose gaat waargenomen worden via ondermeer de zoetereceptoren en zo GLP-1 vrijzetting stimuleren. GLP-1 gaat op zijn beurt de pancreas aanzetten tot verhoogde insulievrijzetting wat voor efficiënte glucose opname zorgt. In het knockoutmodel gaat D-glucose minder efficiënt GLP-1 vrijzetten waardoor ook de insulievrijzetting niet optimaal gebeurt. Hierdoor gaat de bloedglucosewaarde hoger liggen door inefficiënte opname.

Intragastrische toediening van 5,63 g/kg oligofruuctose veroorzaakt in beide genotypen geen significante verschillen in bloedglucosewaarden. Dit is een logisch resultaat, aangezien oligofruuctose een zoetstof is die niet opgenomen wordt.

7.2.2 INVLOED VAN INTRAVENEUZE TOEDIENING OP GHRELINSECRETIE

Er worden geen significante verschillen waargenomen door intraveneuze toediening van 1g/kg D-glucose bij de WT muizen op zowel plasma octanoyl- en totale ghrelineconcentratie. Dit wijst erop dat D-glucose niet via het bloed waargenomen wordt door de ghrelinecel. Ook bij octanoyl- en totale ghreline inhoud van het duodenum en maag worden geen significante verschillen waargenomen bij de intraveneuze toediening van 1 g/kg D-glucose. Op de bloedglucosewaarden wordt er wel een significant verschil waargenomen bij intraveneuze injectie met 1 g/kg D-glucose bij de WT muizen.

ALGEMENE CONCLUSIE:

Uit deze experimenten kan besloten worden dat D-glucose aan de luminale kant door de ghrelinecellen in het duodenum, en niet via de bloedbaan waargenomen wordt. Tevens concluderen we dat de zoetreceptoren waarschijnlijk niet betrokken zijn in de glucose geïnduceerde ghrelinevrijstelling. Oligofruuctose oefent op korte termijn geen effect uit op ghrelinevrijstelling, deze zoetstof heeft waarschijnlijk een effect op langere termijn.

8 LITERATUURLIJST

- [1] "Over obesitas," 2011. [Online]. Available: <http://www.uza.be/over-obesitas>. [Accessed 19 03 2014].
- [2] N. Esser, S. Legrand-Poels, J. Piette, A. J. scheen and N. Paquot, "Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.," *Diabetes research and clinical practice*, pp. 1-10, 2014.
- [3] D. E. Cummings, J. Q. Purnell, R. S. Frayo, K. Schmidova, B. E. Wisse and D. S. Weigle, "A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans," *Diabetes*, vol. 50, pp. 1714-1719, 2001.
- [4] T. E. Finger and S. C. Kinnamon, "Taste isn't just for taste buds anymore," *F1000 reports biology*, vol. 3, no. 20, pp. 1-7, 2011.
- [5] S. K. McLaughlin, P. J. McKinnon and R. F. Margolskee, "Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins.," *Nature*, vol. 357, pp. 563-569, 1992.
- [6] N. Hass, K. Schwarzenbach and H. Breer, "A cluster of gustducin-expressing cells in the mouse stomach associated with two distinct populations of enteroendocrine cells," *Histochem cell biol*, vol. 128, pp. 457-471, 2007.
- [7] R. F. Margolskee, J. Dyer, Z. Kokrashvili, K. S. Salmon, E. Ilegems, K. Daly, E. L. Maillet, Y. Ninomiya, B. Mosinger and S. P. Shirazi-Beechey, "T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺ - glucose cotransporter 1," *PNAS*, vol. 104, no. 38, pp. 15075-15080, 2007.
- [8] M. Kojima, H. Hosoda, H. Matsuo and K. Kangawa, "Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor," *Trends in endocrinology & metabolism*, vol. 12, no. 3, pp. 118-126, 2001.
- [9] M. Kojima and K. Kangawa, "Ghrelin: Structure and Function," *The American Physiological society*, vol. 85, pp. 495-522, 2005.
- [10] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa, "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach.," *Nature*, vol. 402, pp. 656-660, 1999.
- [11] M. Kojima and K. Kangawa, "Ghrelin: Structure and Function," vol. 85, 2005.
- [12] C. Delporte, "Structure and Physiological Actions of Ghrelin," *Scientifica*, vol. 2013, pp. 1-25, 2013.
- [13] H. Ohgusu, K. Shirouzu, Y. Nakamura, Y. Nakashima, T. Ida, T. Sato and M. Kojima, "Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor.," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 386, pp. 153-158, 2009.

- [14] J. Yoh, Y. Nishi, H. Hosoda, Y. Tajiri, K. Yamada, T. Yanase, R. Doi, K. Yonemoto, K. Kangawa, M. Kojima, E. Tanaka and J. Kusukawa, "Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl-and active-form of ghrelin, in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics," *Regulatory peptides*, vol. 167, pp. 140-148, 2011.
- [15] S. Janssen en I. Depoortere, „Nutrient sensing in the gut: new roads to therpateutics?," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, pp. 92-100, 02 2013.
- [16] Martin S. Taylor, Travis R. Ruch, Po-Yuan Hsiao, Yousang Hwang, Pingfeng Zhang, Lixin Dai, Cheng Ran Lisa Huang, Christopher E. Berndsen, Min-Sik Kim, Akhilesh Pandey, Cynthia WolbergerRonen Marmorstein, Carolyn Machamer, Jef D. Boeke, Philip A. Cole, "Architectural Organization of the Metabolic Regulatory Enzyme Ghrelin O-Acyltransferase*," *The journal of biological chemistry*, vol. 288, no. 45, pp. 32211-32228, 2013.
- [17] Y. Shanado, M. Kometani, H. Uchiyama, S. Koizumi and N. Teno, "Lysophospholipase I identified as a ghrelin deacylation enzyme in rat stomach," *Biochemical and Biophysical research communications*, vol. 325, pp. 1487-1494, 2004.
- [18] J.-B. Soares and A. F. Leite-Moreira, "Ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin: Three pieces of the same puzzle," *ScienceDirect*, vol. 29, pp. 1255-1270, 2008.
- [19] C. De Vriese, M. Hacquebard, F. Gregoire, Y. Carpentier and C. Delporte, "Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins," *Endocrinology*, vol. 10, pp. 2355-2362, 2007.
- [20] J. Yang, M. S. Brown, g. Liang, N. V. Grishin and J. L. Goldstein, "Identification of the acyltransferase that octanoylates Ghrelin, an appetit-stimulating peptide hormone," *Cell*, vol. 132, pp. 387-396, 2008.
- [21] J. E. Darling, E. P. Prybolsky, M. Sieburg and J. L. Hougland, "A fluorescent peptide substrate facilitates investigation of ghrelin recognition and acylation by ghrelin O-acyltransferase," *analytical biochemistry*, vol. 437, pp. 68-76, 2013.
- [22] Y. Date, M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa and M. Nakazato, "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans," *Endocrinology*, vol. 141, no. 11, pp. 4255-4261, 2000.
- [23] O. A. Massadi, M. Tschöp and J. Tong, "Ghrelin acylation and metabolic control," *Peptides*, vol. 32, pp. 2301-2308, 2011.
- [24] I. Sakata, K. Nakamura, M. Yamazaki, M. Matsubara, Y. Hayashi, K. Kangawa and T. Sakai, "Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract," *Peptides*,

- vol. 23, pp. 531-536, 2002.
- [25] N. Wierup, H. Svensson, H. Mulder and F. Sundler, "The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas.," *Regulatory peptides*, vol. 107, pp. 63-69, 2002.
- [26] M. Barreiro, F. Gaytan, J. Caminos, L. Pinilla, F. Casanueva, E. Aguilar, C. Diéguez and M. Tena-Sempere, "Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis," *Biology of reproduction*, vol. 67, pp. 1768-1776, 2002.
- [27] Y. Yin, Y. Li and W. Zhang, "The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signalling and regulation," *International journal of molecular sciences*, vol. 15, pp. 4837-4855, 2014.
- [28] U. Mager, T. Degenhardt, L. Pulkkinen, M. Kolehmainen, A.-M. Tolppanen, J. Lindstrom, J. G. Eriksson, C. Carlberg, J. Tuomilehto and M. Uusitupa, "Variations in the Ghrelin Receptor Gene Associate with Obesity and Glucose Metabolism in Individuals with Impaired Glucose Tolerance," *PlosOne*, vol. 3, no. 8, pp. 1-10, 2008.
- [29] B. Holst, A. Cygankiewicz, T. H. Jensen, m. Ankerson and T. W. Schwartz, "High constitutive signalling of the ghrelin receptor - Identification of a potent inverse agonist," *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 11, pp. 2201-2210, 2003.
- [30] M. Nakazato, N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kanagawa and S. Matsukura, "A role for ghrelin in the central regulation of feeding," *Nature*, vol. 409, pp. 194-197, 2001.
- [31] A. Wren, L. Seal, M. Cohen, A. Brynes, G. Frost, K. Murphy, W. Dhillon, M. Ghatei and S. Bloom, "Ghrelin enhances appetit and increases food intake in humans," *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 86, no. 12, pp. 5992-5995, 2001.
- [32] C. B. Lawrence, A. C. Snape, F. M.-H. Baudoin and S. M. Luckman, "Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers," *Endocrine society*, vol. 143, no. 1, pp. 155-162, 2002.
- [33] W. A. Banks, M. Tschöp, S. M. Robinson and M. L. Heiman, "Extent and Direction of Ghrelin Transport Across the Blood-Brain Barrier is Determined by Its Unique Primary Structure," *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 302, no. 2, pp. 822-827, 2002.
- [34] J. Kamegai, H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara and I. Wakabayashi, "Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats," *Diabetes*, vol. 50, pp. 2438-2443, 2001.
- [35] H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, A. S. Chen, D. T. Weingarth, J. R. Adams, E. G. Frazier, Z. Shen, D. J. Marsh, S. D. Feighner, X.-M. Guan, Z. Ye, R. P. Nargund, R. G. Smith, L. H. T. Van Der Ploeg, A. D. Howard, D. J. Macneil and S. Qian, "Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by

- neuropeptide Y and agouti-related protein," *Endocrinology*, vol. 145, no. 6, pp. 2607-2612, 2004.
- [36] M. Tschöp, D. L. Smiley and M. L. Heiman, "Ghrelin induces adiposity in rodents," *Letters to nature*, vol. 407, pp. 908-913, 2000.
- [37] B. Porteiro, A. Diaz-Ruiz, G. Martinez, A. Senra, A. Vidal, M. Serrano, O. Gualillo, M. Lopez, M. M. Malagon, C. Diéguez and R. Nogueiras, "Ghrelin requires p53 to stimulate lipid storage in fat and liver," *Endocrinology*, vol. 154, no. 10, pp. 3671-3679, 2013.
- [38] A. P. Goldstone, E. L. Thomas, A. E. Brynes, G. Castroman, R. Edwards, M. A. Ghatge, G. Frost, A. J. Holland, A. B. Grossman, M. Korbonits, S. R. Bloom and J. D. Bell, "Elevated fasting plasma ghrelin in prader-willie syndrome adults is not solely explained by their reduced visceral adiposity and insulin resistance," *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, vol. 89, no. 4, pp. 1718-1726, 2004.
- [39] B. O. Yildiz, M. A. Suchard, M.-L. Wong, S. M. McCann and J. Licinio, "Alterations in the dynamics of circulating ghrelin, adiponectin, and leptin in human obesity," *PNAS*, vol. 101, no. 28, pp. 10434-10439, 2004.
- [40] K. Ogiso, A. Asakawa, H. Amitani and A. Inui, "Ghrelin and anorexia nervosa: a psychosomatic perspective," *Nutrition*, vol. 27, pp. 988-993, 2011.
- [41] Y. Masuda, T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa, "Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats," *Biochemical and Biophysical research communications*, vol. 276, pp. 905-908, 2000.
- [42] J. Tack, I. Depoortere, R. Bisschops, K. Verbeke, J. Janssens and T. Peeters, "Influence of ghrelin on gastric emptying and meal-related symptoms in idiopathic gastroparesis," *The authors*, vol. 22, pp. 847-853, 2005.
- [43] K. Fujino, A. Inui, A. Asakawa, N. Kihara, M. Fujimura and M. Fujimiya, "Ghrelin induces fasted motor activity of the gastrointestinal tract in conscious fed rats," *Journal of physiology*, vol. 550.1, pp. 227-240, 2003.
- [44] S. Perboni and A. Inui, "Appetite and gastrointestinal motility: Role of ghrelin-family peptides," *Clinical nutrition*, vol. 29, pp. 227-234, 2010.
- [45] Y. Date, M. Nakazato, S. Hashiguchi, K. Dezaki, M. S. Mondal, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, T. Arima, H. Matsuo, T. Yada and S. Matsukura, "Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion.," *Diabetes*, vol. 51, no. 1, pp. 124-129, 2002.
- [46] H. Cai, W.-n. Cong, C. M. Daimon, R. Wang, M. H. Tschöp, J. Sévigny, B. Martin and S. Maudsley, "Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice," *Plos one*, vol. 8, pp. 1-14, 2013.
- [47] T.-J. Zhao, I. Sakata, R. Lin Li, G. Liang, J. A. Richardson, M. S. Brown, J. L. Goldstein and J. M. Zigman, "Ghrelin secretion stimulated by beta1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice.,"

- PNAS, vol. 107, no. 36, pp. 15868-15873, 2010.
- [48] P.-J. Verhulst and I. Depoortere, "Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator.," *World journal of gastroenterology*, vol. 18, no. 25, pp. 3183-3195, 2012.
- [49] N. Nirupa Chaudhari and S. D. Roper, "The cell biology of taste," *The journal of cell biology*, vol. 190, no. 3, pp. 285-296, 2010.
- [50] E. R. Liman, Y. V. Zhang and C. Montell, "Peripheral coding of taste," *Neuron*, vol. 81, pp. 984-1000, 2014.
- [51] M. Pi, L. Chen, M.-Z. Huang, W. Zhu, B. Ringhofer, J. Luo, L. Christenson, B. Li, J. Zhang, P. D. Jackson, P. Faber, K. R. Brunden, J. J. Harrington and D. Quarles, "GPRC6A Null Mice Exhibit Osteopenia, Feminization and metabolic syndrome," *PlosOne*, vol. 3, no. 12, pp. 1-10, 2008.
- [52] S. M. Busque, J. E. Kerstetter, J. P. Geibel and K. Insogna, "L-type amino acids stimulate gastric acid secretion by activation of the calcium-sensing receptor in parietal cells," *American journal of physiology*, vol. 289, pp. G664-G669, 2005.
- [53] J. Chandrashekar, M. A. Hoon, N. J. Ryba and C. S. Zuker, "The receptors and cells for mammalian taste," *Nature*, vol. 444, pp. 288-294, 2006.
- [54] K. L. Egerod, M. S. Engelstoft, K. V. Grunddal, M. K. Nohr, A. Secher, I. Skata, J. Pederson, J. A. Windelov, E.-M. Füchtbauer, J. Olsen, F. Sundler, J. P. Christensen, N. Wierup, J. V. Olsen, J. J. Holst, J. M. Zigman, S. S. Poulsen and T. W. Schwartz, "A major lineage of enteroendocrine cells coexpress CCK, secretin, GIP, GLP-1, PYY, and neurotensin but not somatostatin," *Endocrinology*, vol. 153, no. 12, pp. 5782-5795, 2012.
- [55] A. M. Habib, P. Richards, I. S. Cairns, G. J. Rogers, C. A. Bannon, H. E. Parker, T. C. Morely, G. S. Yeo, F. Reimann and F. M. Gribble, "Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry," *Endocrinology*, vol. 153, no. 7, pp. 3054-3065, 2012.
- [56] R. Steinert, A. Gerspach, H. Gutmann, L. Asarian, J. Drewe and C. Beglinger, "The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY)," *Clinical nutrition*, vol. 30, pp. 524-532, 2011.
- [57] N. Hass, K. Schwarzenbacher, Breer and Heinz, "T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach," *Cell tissue Res*, vol. 339, pp. 493-504, 2010.
- [58] F. Reimann, A. M. Habib, G. Tolhurst, H. E. Parker, G. J. Rogers and F. M. Gribble, "Glucose sensing in L cells: A primary cell study," *Cell metabolism*, vol. 8, pp. 532-539, 2008.
- [59] H.-J. Jang, Z. Kokrashvili, M. J. Theodorakis, O. D. Carlson, B.-J. Kim, J. Zhou, H. H. Kim, X. Xu, S. L. Chan, M. Juhaszova, M. Bernier, B. Mosinger, R. F. Margolskee and J. M. Egan, "Gut-expressed gustducin and taste

- receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1," *PNAS*, vol. 104, no. 38, pp. 15069-15074, 2007.
- [60] A. Gerspach, R. Steinert, L. Schönenberger, A. Graber-Maier and C. Beglinger, "The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY and CCK release in humans," *The American physiological society*, vol. 301, pp. 317-325, 2011.
- [61] V. Gorboulev, A. Schürmann, V. Vallon, H. Kipp, A. Jaschke, D. Klessen, A. Friedrich, S. Scherneck, T. Rieg, R. Cunard, M. Veyhl-Wichmann, A. Srinivasan, D. Balen, D. Breljak, R. Rexhepaj, H. E. Parker, F. M. Gribble, F. Reimann, F. Lang, S. Wiese, I. Sabolic, M. Sendtner and H. Koepsell, "Na⁺-D-glucose Cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion," *Diabetes*, vol. 61, pp. 187-196, 2012.
- [62] H. Parker, A. Adriaenssens, G. Rogers, P. Richards, H. Koepsell, F. Reimann and F. Gribble, "Predominant role of active versus facilitative glucose transport for glucagon-like peptide-1 secretion," *Diabetologia*, vol. 55, pp. 2445-2455, 2012.
- [63] M. C. P. Geraedts, T. Takahashi, S. Vignes, M. L. Markwardt, A. Nkobena, R. E. Cockerham, A. Hajnal, C. D. Dotson, M. A. Rizzo and S. D. Munger, "Transformation of postingestive glucose responses after deletion of sweet taste receptor subunits or gastric bypass surgery," *American journal of physiology endocrinology*, vol. 303, pp. E464-E474, 2012.
- [64] F. Reimann and F. M. Gribble, "Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells," *Diabetes*, vol. 51, pp. 2757-2763, 2002.
- [65] I. Depoortere, "Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease," *Gut*, vol. 63, pp. 179-190, 2014.
- [66] E. M. Wright, D. D. Loo and B. A. Hirayama, "Biology of human sodium glucose transporters," *Physiology*, vol. 91, pp. 733-794, 2011.
- [67] S. Shirazi-Beechy, A. Moran, D. Batchelor, K. Daly and M. Al-Rammahi, "Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport," *Proceedings of the nutrition society*, vol. 70, pp. 185-193, 2011.
- [68] G. L. Kellett and P. A. Helliwell, "The diffuse component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane," *Biochemical society*, vol. 350, p. 155-162, 2000.
- [69] O. J. Mace, J. Affleck, N. Patel and G. L. Kellett, "Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2," *The physiological society*, vol. 582.1, pp. 379-392, 2007.
- [70] P. V. Röder, K. E. Geillinger, T. S. Zietek, B. Thorens, H. Koepsell and H. Daniel, "The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing," *Plosone*, vol. 9, no. 2, pp. 1-10, 2014.
- [71] P. Widmayer, M. Küper, A. Königsrainer and H. Breer, "Altered expression

- of gustatory-signalling elements in gastric tissue of morbidly obese patients," *International Journal of Obesity*, vol. 36, pp. 1353-1359, 2012.
- [72] R. L. Young, B. Chia, N. J. Isaacs, J. Ma, J. Khoo, T. Wu, M. Horowitz and C. K. Rayner, "Disordered control of intestinal sweet taste receptor expression and glucose absorption in type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 62, pp. 3532-3541, 2013.
- [73] L.-h. Zhou, X.-m. Liu, X.-h. Feng, L.-o. Han and G.-d. Liu, "Expression of alpha-gustducin in the circumvallate papillae of taste buds of diabetic rats," *Acta histochemica*, vol. 111, pp. 145-149, 2009.
- [74] K. R. Niness, "Inulin and Oligofructose: What Are They?," *The journal of nutrition*, vol. 129, pp. 1402-1406, 1999.
- [75] M. B. Roberfroid, J. A. Van Loo and G. R. Gibson, "The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products," *The journal of nutrition*, pp. 11-19, 1997.
- [76] J. A. Parnell and R. A. Reimer, "Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 89, pp. 1751-1759, 2009.
- [77] M. K. Norh, M. H. Pedersen, A. Gille, K. L. Egerod, M. S. Engelstoft, A. S. Husted, R. M. Sichlau, K. V. Grunddal, S. S. Poulsen, S. Han, R. M. Jones, S. Offermanns and T. W. Schwartz, "GPR41/FFAR3 and GPR43/FFAR2 as cosensors for short-chain fatty acids in enteroendocrine cells vs FFAR3 in enteric neurons and FFAR2 in enteric leukocytes.," *Endocrinology*, vol. 154, no. 10, pp. 3552-3564, 2013.
- [78] Federal Register, "food additives permitted for direct addition to food for human consumption: sucralose.," *Food and drug administrations*, vol. 63, no. 64, pp. 16417-16433, 1998.
- [79] J. Weder, "National industrial chemicals notification and assessment scheme," Commonwealth of Australia, Australië, 2003.
- [80] H. N. Saada, N. H. Mekky, H. A. Eldawy and A. F. Abdelaal, "Biological effects of sucralose in diabetic rats," *Biological effects of sucralose in diabetic rats*, vol. 4, pp. 82-89, 2013.
- [81] J. Ma, M. Bellon, J. M. Wishart, R. Young, L. A. Blackshaw, K. L. Jones, M. Horowitz and C. K. Rayner, "Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects," *American journal of physiology*, vol. 12, pp. G735-G739, 2009.
- [82] H. Ford, V. Peters, N. Martin, M. Sleeth, M. Ghatei, G. Frost and S. Bloom, "Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects.," *European journal of clinical nutrition*, vol. 65, pp. 508-513, 2011.
- [83] H. Iwakura, Y. Li, H. Ariyasu, H. Hosoda, N. Kanamoto, M. Bando, G. Yamada, K. Hosoda, K. Nakao, K. Kangawa and T. Akamizu,

- "Establishment of a Novel Ghrelin-Producing Cell Line," *Endocrinology*, vol. 151, no. 6, pp. 2940-2945, 2010.
- [84] Waters, "Waters Sep-Pak Sample Extraction Products Brochure," Water, September 2013. [Online]. Available: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000860en.pdf>. [Accessed September 2013].
- [85] R. E. Steinert, F. Frey, A. Töpfer, J. Drewe and C. Beglinger, "Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides.," *British journal of nutrition*, vol. 105, pp. 1320-1328, 2011.
- [86] I. Sakata, W.-m. Park, A. K. Walker, P. K. Piper, J.-C. Chuang, S. Osborne-Lawrence and J. M. Zigman, "Glucose-mediated control of ghrelin release from primary cultures of gastric mucosal cells.," *The American physiological society*, vol. 302, pp. E1300-E1310, 2012.
- [87] Y. Nie, S. Vignes, J. R. Hobbs, G. L. Conn and S. D. Munger, "Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli.," *Current biology*, vol. 15, pp. 1948-1952, 2005.
- [88] Y. Nakagawa, M. Nagasawa, H. Mogami, M. Lohse, Y. Ninomiya and I. Kojima, "Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists.," *Endocrine Journal*, vol. 60, no. 10, pp. 1191-1206, 2013.
- [89] P. D. Cani, C. Dewever and N. M. Delzenne, "Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats.," *British journal fo nutrition*, vol. 92, pp. 521-526, 2004.
- [90] N. M. Delzenne, P. D. Cani and A. M. Neyrinck, "Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data.," *The journal of nutrition*, pp. 2547S-2551S, 2007.
- [91] N. Daud, N. Ismail, E. Thomas, J. Fitzpatrick, J. Bell, J. Swann, A. Costabile, C. Childs, C. Pedersen, A. Goldstone and G. Frost, "The impact of oligofructose on stimulation of gut hormones, appetite regulation and adiposity.," *Obesity*, vol. 22, no. 6, pp. 1430-1438, 2014.
- [92] C. Tomasetto, C. Wendling, M.-C. Rio and P. Poitras, "Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus.," *Peptides*, vol. 22, no. 12, pp. 2055-2059, 2000.
- [93] M. G. Martin, J. Wang, R. S. Solorzano-vargas, J. T. Lam, E. Turk and E. M. Wright, "Regulation of the human Na-glucose cotransporter gene, SGLT1, by HNF-1 and Sp1.," *American journal of physiology*, vol. 278, pp. G591-G603, 2000.
- [94] S. Janssen, J. Laermans, P.-J. Verhulst, T. Thijs, J. Tack and I. Depoortere, "Bitter taste receptors and gustducin regulate the secretion of ghrelin

- with functional effects on food intake and gastric emptying," *PNAS*, pp. 2094-2099, 2011.
- [95] P.-J. Verhulst and I. Depoortere, "Ghrelin's second life: From appetite stimulator to glucose regulator," *World Journal of Gastroenterology*, pp. 3183-3195, 2012.
- [96] C. M. Foster, A. Barkan, J. Z. Kasa-vubu and C. Jaffe, "ghrelin concentrations reflect body mass index rather than feeding status in obese girls," *Pediatric research*, vol. 62, pp. 731-734, 2007.
- [97] M. M. Schubert and S. Sabapathy, "Acute exercise and hormones related to appetite regulation: a meta-analysis," *Sports med*, vol. 44, pp. 387-403, 2014.
- [98] K. Nakahara, R. Okame, T. Katayama, M. Miyazato, K. Kangawa and N. Murakami, "Nutritional and environmental factors affecting plasma ghrelin and leptin levels in rats," *Journal of endocrinology*, vol. 207, pp. 95-103, 2010.
- [99] M. Brahmini, T. Keerthi, B. Priyadarshini and I. Sudheerbabu, "Myths and facts about aspartame and sucralose: a critical review," *International journal of research in ayurveda & pharmacy*, vol. 3, no. 3, pp. 373-375, 2012.
- [100] S. Janssen, J. Laermans, H. Iwakura, J. Tack and I. Depoortere, "Sensing of fatty acids for octanoylation of ghrelin involves a gustatory G-protein," *PlosOne*, vol. 7, no. 6, pp. 1-11, 2012.
- [101] L. Vancleef, *Effect van aminozuren op de vrijstelling van ghreline: rol van de calcium sensing receptor*, Leuven, 2012.
- [102] P. K. Olszewski, D. Li, M. K. Grace, C. J. Billington, C. M. Kotz and A. S. Levine, "Neural basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus," *Peptides*, vol. 24, pp. 597-602, 2003.
- [103] I. Depoortere, "Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake," *Regulatory peptides*, vol. 156, pp. 13-23, 2009.
- [104] J. Grossauer, S. Kosol, E. Schrank and K. Zangger, "The peptide hormone ghrelin binds to membran-mimetics via its octanoyl chain and an adjacent phenylalanine.," *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 18, pp. 5483-5488, 2010.
- [105] M. D. Gahete, D. Rincon-Fernandez, A. Villa-Osaba, D. Hormaechea-Agulla, A. Ibanez-Costa, A. J. Martinez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, J. P. Castano and R. M. Luque, "Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight," *Journal of endocrinology*, vol. 220, no. 1, pp. R1-R24, 2013.
- [106] M. Kojima, "Discovery of Ghrelin and Its Physiological Function," *Journal of medical sciences*, vol. 3, pp. 92-95, 2010.
- [107] D. Lin, Q. Wang, H. Ran, K. Liu, Y. Wang, J. Wang, Y. Liu, R. Chen, Y. Sun, R. Liu and F. Ding, "Abnormal response to the anorexic effect of GHS-R

- inhibitors and exenatide in male Snord116 deletion mouse model for Prader-Willi syndrome," *Endocrinology*, vol. 10, no. 1210, pp. 1-8, 2014.
- [108] B. R. Simon, B. S. Learman, S. D. Parlee, E. L. Scheller, H. Mori, W. P. Cawthorn, X. Ning, V. Krishnan, Y. L. Ma, B. Tyrberg and O. A. MacDougald, "Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass," *PlosOne*, vol. 9, no. 1, pp. 1-11, 2014.
- [109] T. Edholm, F. Levin, P. M. Hellstrom and P. T. Schmidt, "Ghrelin stimulates motility in the small intestine of rats through intrinsic cholinergic neurons," *Regulatory peptides*, vol. 121, pp. 25-30, 2004.
- [110] C. Cartoni, K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya and S. Damak, "Taste Preference for Fatty Acids Is Mediated by GPR40 and GPR120," *The journal of Neuroscience*, vol. 30, no. 25, pp. 8376-8382, 2010.
- [111] W. He, K. Yasumatsu, V. Varadarajan, A. Yamada, J. Lem, Y. Ninomiya, R. F. Margolskee and S. Damak, "Umami Taste Responses Are Mediated by alpha-Transducin and alpha-gustducin," *The journal of neuroscience*, vol. 24, no. 35, pp. 7674-7680, 2004.
- [112] G. T. Wong, K. S. Gannon and R. F. Margolskee, "Transduction of bitter and sweet taste by gustducin," *Nature*, vol. 381, pp. 796-800, 1996.
- [113] F. M. Gribble, L. Williams, A. K. Simpson and F. Reimann, "A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line," *Diabetes*, vol. 52, pp. 1147-1154, 2003.
- [114] D. Hofer, B. Puschell and D. Drenckhahn, "Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of alfa-gustducin," *Medical Sciences*, vol. 93, pp. 6631-6634, 1996.
- [115] H. Mohan and S. Unniappan, "Discovery of ghrelin O-acyltransferase," *The ghrelin system*, vol. 25, pp. 16-24, 2013.
- [116] X.-M. Guan, H. Yu, O. C. Palyha, K. K. McKee, S. D. Feighner, D. J. Sirinathsinghji, R. G. Smith, L. H. Van der Ploeg and A. D. Howard, "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues," *Molecular brain research*, vol. 48, pp. 23-29, 1997.
- [117] H. Hosoda, M. Kojima and K. Kangawa, "Biological, Physiological, and Pharmacological aspects of ghrelin," *Journal of pharmacological sciences*, vol. 100, pp. 398-410, 2006.
- [118] Z. Yu, J. Lowndes and J. Rippe, "High-fructose corn syrup and sucrose have equivalent effects on energy-regulating hormones at normal human consumption levels.," *Nutrition research*, vol. 33, pp. 1043-1052, 2013.
- [119] X. Ren, L. Zhou, R. Terwilliger, S. S. Newton and I. E. de Araujo, "Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor.," *Frontiers in integrative Neuroscience*, vol. 3, no. 12, pp. 1-15, 2009.

- [120] Y. Masubuchi, Y. Nakagawa, T. Sasaki, T. Kitamura, Y. Yamamoto, H. Kurose, I. Kojima and H. Shibata, "A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1.," *PlosOne*, vol. 8, no. 1, pp. 1-12, 2013.
- [121] M. Mizutani, K. Atsuchi, A. Asakawa, N. Matsuda, M. Fujimura, A. Inui, I. Kato and M. Fujimiya, "Localization of acyl ghrelin-and des-acyl ghrelin-immunoreactive cells in the rat stomach and their responses to intragastric pH.," *American journal of Physiology*, vol. 297, pp. G974-G980, 2009.
- [122] P. D. Cani, A. M. Neyrinck, N. Maton and N. M. Delzenne, "Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like peptide-1.," *Obesity research*, vol. 13, no. 6, pp. 1000-1007, 2005.

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Rol van smaakreceptoren in het waarnemen van zoetstoffen door de ghrelinecel

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2014**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Jacobs, Stephanie

Datum: **10/06/2014**