



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Einfluss von Natriumbutyrat auf die Regulation der
Serotoninsynthese im Modell von enterochromaffinen
Zellen des Darms

verfasst von / submitted by

Hüseyin TOLUAY

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ. -Prof. Dr. Ina Bergheim

Danksagung

Zuerst gebührt mein Dank Fr. Univ. Prof. Dr. Ina Bergheim, die meine Diplomarbeit betreut hat und mir die Möglichkeit gegeben hat diese Diplomarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Dr. Anja Baumann für ihre langfristige Unterstützung von Anfang bis Ende.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Freunden und meiner Freundin bedanken, die für mich immer da waren und mich stets seelisch unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1 Der Darm und das enterische Nervensystem	9
1.1.1 Zellen und Mediatoren des enterischen Nervensystems	10
1.1.2 Das serotonerge System und der Serotonin Wiederaufnahme Transporter (SERT).....	11
1.1.3 Enterochromaffine Zellen des Darms	12
1.2 Kurzkettige Fettsäuren und ihre physiologische Bedeutung in der intestinalen Homöostase	14
1.3 Das enterische Nervensystem und kurzkettige Fettsäuren.....	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Materialien	19
2.1 Zellkultur	19
2.2 Messung der Serotoninkonzentration mittels ELISA	20
2.3 Immunohistochemische Färbung von Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäuse	21
2.4 Analyse der Genexpression	22
2.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	23
2.6 Allgemeine Geräte	24
2.7 Software.....	25
3. Methoden	26
3.1 Kultivierung von BON-Zellen	26
3.2 Herstellung der Stammlösungen	28
3.2.1 Natriumbutyrat Stammlösung	28
3.2.2 Fructose-Stammlösung	29
3.3 Behandlung von BON-Zellen	30
3.4 Messung der Serotoninkonzentration mittels ELISA	31
3.5 Immunohistochemische Färbung von Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäuse	32
3.6 Analyse der Genexpression	35
3.7 Statistische Auswertung.....	40
4. Ergebnisse	41
4.1.1 Einfluss von Natriumbutyrat auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen	41
4.1.2 Einfluss von Fructose auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen	43

4.2 Expression von SLC6A4 (SERT) mRNA im proximalen Dünndarm von Fructose-gefütterten C57BL/6J Mäusen	45
5. Diskussion.....	48
5.1 Die BON-Zelle als Modell der EC-Zellen des Darms	48
5.2 Einfluss von Natriumbutyrat und Fructose auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen	49
5.3 Expression von SLC6A4 (SERT) mRNA im proximalen Dünndarm von C57BL/6J Mäusen	52
Schlussfolgerung	55
Zusammenfassung.....	56
Summary	58
Literaturverzeichnis.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des enterischen Nervensystems und des Darms	10
Abbildung 2: BON-Zellen als Modell für enterochromaffine Zellen des Darms	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung für die Regulation der Energie-Homöostase	17
Abbildung 4: Behandlungsschema mit Natriumbutyrat und eine Vorschau für die Plattenbelegung	30
Abbildung 5 Behandlungsschema mit Fructose-Lösungen und eine Vorschau für die Plattenbelegung	31
Abbildung 6: Illustration eines immunohistochemischen Nachweises.....	33
Abbildung 7: Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 2 Stunden mit 0, 0,03mM, 0,3mM/3mM Natriumbutyrat behandelt wurden (n=5).....	41
Abbildung 8 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 18 Stunden mit 0-3mM Natriumbutyrat behandelt wurden (n=5).....	42
Abbildung 9 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 2 Stunden mit.....	43
Abbildung 10 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 18 Stunden mit 0-50mM Fructose-Lösung behandelt wurden (n=6).	44
Abbildung 11 mRNA Expression vom SLC6A4-Gen bei Mäusen die mit Standarddiät+Natriumbutyrat (n=4), Standarddiät+Fructose (n=4) und mit einer Mischung aus Standarddiät+Fructose+Natriumbutyrat (n=6) für acht Wochen behandelt wurden. ...	45
Abbildung 12 Einfluss von Standarddiät, Standarddiät +Natriumbutytrat, Standarddiät +Fructose, Standarddiät+Fructose+Natriumbuytrat auf die SERT-Proteinkonzentration im proximalen Dünndarm der für acht Wochen behandelten C57BL/6J Mäusen.....	48

*Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber*innen der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.*

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verhältnis der SCFA's im Caecum von Menschen (post mortem) (J H CUMMINGS, 1987):	16
Tabelle 2: Verwendete Primersequenzen	23
Tabelle 3: Ablauf des DNase-Verdaus.....	36
Tabelle 4: Herstellung einer Mastermix für die cDNA-Synthese.....	37
Tabelle 5: Synthesetemperaturen für cDNA	37
Tabelle 6: Herstellung des Mastermix für Real-Time-PCR	38
Tabelle 7: Bedingungen für die Messung der Genexpression	39

Abkürzungsverzeichnis

ΔCT	Delta CT
5-HT	Serotonin
ACh	Acetylcholin
BON	Willkürlich ausgewählter Name für die Zelllinie
C57BL/6J	Inzuchtstamm von Mäusen
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyrionukleinsäure
Cl	Chlorid
DMEM:F12	Dulbeco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
EC	Enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Bovine Serum
FFAR	Free Fatty Acid Receptor Fettsäurerezeptor
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GLP-1	Glukagon Ähnliches Peptid
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Horse Radish Peroxidase
IL6	Interleukin 6
KG	Körpergewicht
MCT-1	Monocarboxylat-Transporter 1
MetOH	Methanol
Na	Natrium

NaB	Natriumbutyrat
NAFLD	Nicht Alkoholische Fettleber Krankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PYY	Peptid YY
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren/Short Chain Fatty Acids
SERT	Serotonin Wiederaufnahme Transporter/Serotonin Reuptake Transporter
SLC6A4	Für SERT codierende Gensequenz
TNFα	Tumor Nekrose Faktor alpha

1. Einleitung

1.1 Der Darm und das enterische Nervensystem

Der Darm spielt mit seiner Gesamtlänge von ungefähr fünf Metern eine entscheidende Rolle im menschlichen Körper (Helander, 2014). Eine optimale Darmfunktion wird durch die Zusammenarbeit von mehreren Komponenten, darunter das Epithel, das Mikrobiom und das enterische Nervensystem, gewährleistet. Das Darmepithel, kennzeichnet sich durch eine säulenartig geformte Struktur, die an ihrer Basis ein Zylinderepithel (Lamina epithelialis mucosae) enthält. Zur Verbesserung des Stoffaustausches und der Vergrößerung der Resorptionsfläche ist das Darmepithel mit Darmzotten ausgestattet (Zemper, 2018). Eine Selbstverdauung des Darmepithels wird durch die Glykokalyx vermieden. Die Glykokalyx setzt sich aus Proteoglykanen und Glykosaminglucanen zusammen und bildet eine dünne Schutzschicht über dem Darmepithel (N L Pillinger, 2017).

In Form von exokrinen und intestinalen Sekreten erfolgt die Verwertung von Nährstoffen und die Elimination von schädlichen Stoffen. Durch Kontraktion der glatten Muskulatur im Darmtrakt wird die Fortbewegung der Nahrung und auch das mechanische Vermischen der Nahrung erreicht (S K Sarna, 1989). Das Darmepithel wird täglich gesäubert. Somit kann einerseits das Darmepithel von Nahrungsresten befreit werden und andererseits kann dadurch das Überwachsen von Bakterienstämmen unterbunden werden. Ist eine Nahrung für den Körper unverwertbar, so wird sie unter Zusammenarbeit des enterischen Nervensystems, des zentralen Nervensystem, der glatten Muskelzellen und des Zwerchfells, ausgestoßen (S K Sarna, 1989). Dabei wird ein Brechreiz ausgelöst und somit wird das Brechzentrum im Gehirn aktiviert und die Nahrungsbestandteile stoßartig nach außen transportiert (Carey D. Balaban, 2016).

Das enterische Nervensystem besteht aus einer Vielzahl von Neuronen und Gliazellen und hat motorische und sensorische Funktionen im Körper. Verglichen mit den Astrozyten im zentralen Nervensystem sind die Gliazellen, im Verhältnis zu den Neuronen, in Überzahl (1:4-1:10) (Nathalie Vergnolle, 2018). Das enterische Nervensystem kann auch unabhängig vom zentralen Nervensystem arbeiten. Mittels Versuche an isolierten Darmstücken konnte dieses Phänomen nachgewiesen werden (W. M. Bayliss, 1899).

Das enterische Nervensystem ist gekennzeichnet durch zwei Schichten, die sich aus Neuronen und Gliazellen zusammensetzen. Der Plexus myentericus befindet sich zwischen

den ringförmigen und den longitudinalen Muskelfasern. Der Plexus submucosus hingegen befindet sich in den oberen Schichten des Darms somit zwischen der Schleimhaut und den zirkulären Muskeln. Gemeinsam koordinieren beide Nervenfasergeflechte die Feinmotorik und Peristaltik des Darms (G S Taylor, 1988).

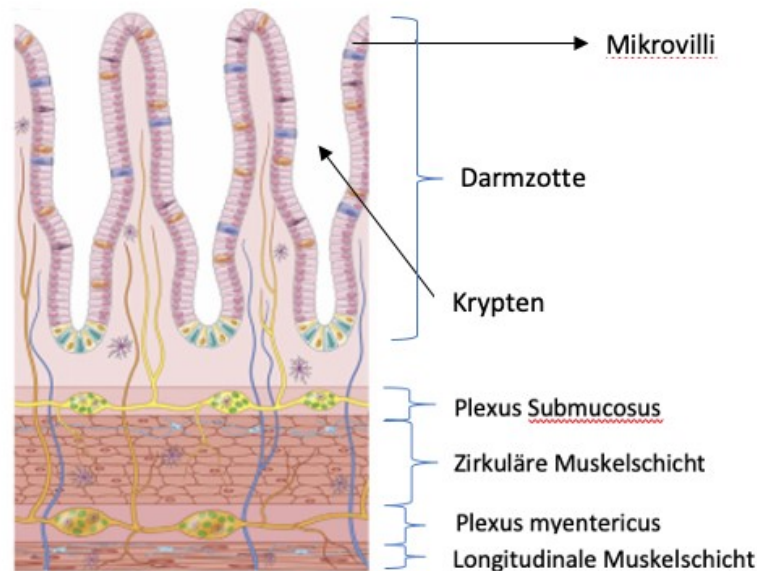


Abbildung 1 Schematische Darstellung des enterischen Nervensystems und des Darms

Sichtbar sind verschiedene Zelltypen im Bereich der Darmzotte (blau, orange, türkis und gelb (oranger Zellkern)). Oberhalb des Plexus submucosus befindet sich die Darmzotte mit den Mikrovilli. Ebenfalls sichtbar sind die Gliazellen (gelbe und orange kugelige Knäuel) Quelle: (Zemper, 2018)

Die Kommunikation zwischen dem Epithel und dem enterischen Nervensystem beruht auf parakrinen Signalmechanismen. Die Kommunikation der enterischen Neuronen mit den Gliazellen beruht auf Purinen, die von einem Pannexin-Kanal freigesetzt werden und auf die benachbarten Gliazellen wirken (Werend Boesmans, 2019).

1.1.1 Zellen und Mediatoren des enterischen Nervensystems

Da die Funktionsweise des enterischen Nervensystems auf Reizweiterleitung beruht, ist Acetylcholin einer der wichtigsten Neurotransmitter. Bei der Proliferation der Schleimhaut und synaptischen Nerven haben Noradrenalin und das Serotonin (5HT-3) ebenfalls eine bedeutende Funktion (Zemper, 2018).

Das Serotonin wurde erstmals mittels Chromsalzen (Heidenhain, 1870) in Sekretgranula der enterochromaffinen Zellen des Darms nachgewiesen und bekam den Namen „Enteramin“. Serotonin gehört zu den biogenen Aminen. Serotonin ist im Körper an einer Vielzahl von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen beteiligt (L F Mohammad-Zadeh, Pubmed, 2008). Die Hauptfunktion des Serotonins besteht darin, in Zusammenarbeit mit dem enterischen Nervensystem die Motilität des Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) zu steuern (Damien J Keating, 2018).

1.1.2 Das serotonerge System und der Serotonin Wiederaufnahme Transporter (SERT)

Studien weisen darauf hin, dass das serotonerge System in einer Vielzahl von alltäglichen Ereignissen und Krankheiten involviert ist (Dubravka Švob Štrac, 2016). Serotonin fungiert im Darm als Neurotransmitter (D Sarrouilhe, 2015). Ebenfalls reguliert Serotonin den Schlaf, den Appetit, die Schmerzempfindung und motorische Aktivitäten (Dubravka Švob Štrac, 2016). Die Wirkung vom Serotonin im Körper basiert auf der Modulation von verschiedenen Neuronentypen. Zu diesen Neuronentypen gehören die dopaminergen, cholinergen und GABAergen Neuronen. Serotonin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Daher wird das Serotonin im zentralen Nervensystem aus Vorstufen synthetisiert (D. Jokisch, 2005). Die Synthese des Serotonins geht von der Aminosäure Tryptophan aus. Zwei Enzyme spielen bei der Synthese von Serotonin eine wichtige Rolle: Tryptophanhydroxylase und Decarboxylase (Diego J Walther, 2003). Serotonin wird im Magen-Darm-Trakt zur Synthese von Melatonin verwendet. Melatonin hingegen antagonisiert die Wirkung des Serotonins im Gastrointestinaltrakt (Sarah J MacEachern, 2018).

Es sind viele Serotonin-Rezeptoren bekannt: 5HT1-7. Bis auf 5HT3 sind alle Serotonin-Rezeptoren G-Protein gekoppelt. Beim 5HT3 Rezeptor handelt es sich um einen ligandengesteuerten Ionenkanal. 5-HT1A-, 5-HT1B- und 5-HT1D sind präsynaptisch lokalisiert und führen zu einer Hyperpolarisation. Die 5-HT2A und 5-HT4 Rezeptoren haben hingegen eine depolarisierende Wirkung auf die Serotoninweiterleitung. Beim 5HT2C Rezeptor handelt es sich um einen spezifischen Rezeptortyp, der nur im zentralen Nervensystem vorkommt (George K. Papadimasa, 2012).

Wird dem Darm eine erhöhte Konzentration von kurzkettigen Fettsäuren zugeführt, so reagiert das enterische Nervensystem mit einer erhöhten Freisetzung von 5-HT3 (Serotonin)

aus enterochromaffinen Zellen des Darms. Damit verbunden wird eine Signalkaskade gestartet und am Ende dieser Kaskade wird vermehrt Acetylcholin (Ach) aus dem Myenteric Plexus freigegeben und dieses führt dann zu einer Muskelkontraktion im Darmtrakt (Satoshi Fukumoto, 2003).

Serotonin wird in den enterochromaffinen Zellen (EC) des Darms synthetisiert und in Sekretgranula gespeichert. Die enterochromaffinen Zellen befinden sich vor allem in der Darmschleimhaut (Sonja Bialowas, 2016). Das aus den enterochromaffinen Zellen des Darms ausgeschüttete Serotonin kann mittels Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter (SERT) wieder in die Zellen aufgenommen werden. Dieses findet zwischen dem präsynaptischen und synaptischen Spalt statt. Das Grundgerüst des SERT besteht aus zwei Sialinsäureresten die auf zwei Oligosacharridmolekülen verankert sind (Jonathan A Coleman E. M., 2016). Das Gen SLC6A4 kodiert für den SERT und ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Einige Krankheiten, darunter Autismus, sind mit der Expressionsrate des SERT direkt verbunden. (James S. Sutcliffe, 2005). Der SERT besitzt 12 transmembranäre Domänen und gehört zu der Gruppe der Na^+/Cl^- - abhängigen Transportproteinen (Rudnick, 2000). Frühere Publikationen zeigten, dass SERT-Knockout Mäuse nach einer achtwöchigen fructosereichen Fütterung mit einer Abnahme an SERT reagierten. Die Abnahme der intestinalen SERT ist einer der möglichen Gründe für eine Fettleber (Synia Haub G. K., 2010).

1.1.3 Enterochromaffine Zellen des Darms

Die enterochromaffinen Zellen sind für die Ausschüttung von Histamin und Serotonin zuständig. Über 90% des Gesamtserotonins, welches für die Motilität und Peristaltik des Darms verantwortlich ist, wird von den EC-Zellen produziert. Diese regulieren den pH-Wert im Darmbereich (Andromeda Linan-Rico, 2016). Die enterochromaffinen Zellen des Darms sind bis heute nicht eindeutig klassifizierbar, da sie sowohl neuronalen Ursprungs (Catherine S. Lee, 2002), aber auch endodermalen Ursprungs (M Skipper, 2000) sein können. Als Modell für die enterochromaffinen Zellen des Darms werden BON-Zellen eingesetzt. Serotonin greift aktiv ins Wachstum der BON-Zellen ein, indem es mittels SR1A-1B (zuständiges Gen) über ein cAMP-Signalweg das Zellwachstum reguliert (Courtney M. Townsend, 2009).

Fructose beeinflusst ebenfalls die Serotoninsynthese in den enterochromaffinen Zellen des Darms. Ab einer Konzentration von 50mM hat Fructose keinen positiven Einfluss auf die

Serotoninsynthese (M Kim, Pubmed, 2001). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Fructose zu einer Abnahme des SERT führt und somit die Serotoninwiederaufnahme hemmt (Synia Haub G. K., 2010). Galaktose hingegen lieferte bei derselben Konzentration Hinweise auf eine Stimulation der Serotoninsynthese (M Kim, Pubmed, 2001).

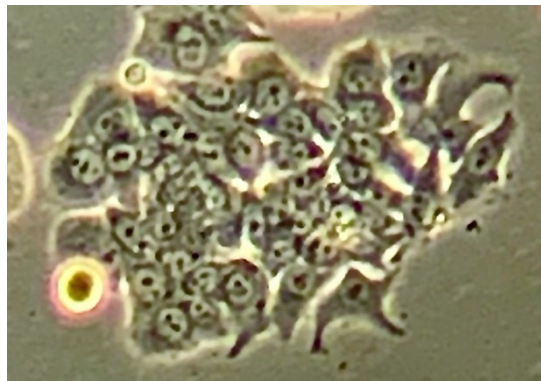


Abbildung 2: BON-Zellen als Modell für enterochromaffine Zellen des Darms

Die sekretgefüllten Granula (kugelige Strukturen mit schwarzen Punkten) sind deutlich zu erkennen. Quelle:
Selbstaufnahme

1.2 Kurzkettige Fettsäuren und ihre physiologische Bedeutung in der intestinalen Homöostase

Der Intestinaltrakt spielt eine lebensnotwendige Rolle, wenn es um die Verwertung und Aufnahme von Nährstoffen geht. Es gibt Hinweise darauf, dass etwa 1000 verschiedene Bakterienstämme den menschlichen Intestinaltrakt besiedeln (Martha Douglas-Escobar, 2013). Unter Mithilfe von Bakterien und körpereigenen Enzymen werden lösliche Ballaststoffe und unverdauliche Stärken zu kurzkettigen Fettsäuren weiterverarbeitet (Medha Priyadarshini, 2019). Zu den wichtigsten kurzkettigen Fettsäuren gehören Butyrat, Propionat und Acetat. Vor allem das Butyrat ist an einer Vielzahl an physiologischen Vorgängen im Körper beteiligt (Henagan, 2017).

Die kurzkettigen Fettsäuren werden im Körper durch das Vorhandensein bestimmter Rezeptoren in den Epithelzellen des Darms aufgenommen und ins Blutsystem abgegeben und zu verschiedenen Stellen des Körpers transportiert. Die Aufnahme erfolgt vor allem über die Fettsäurerezeptoren „free fatty acid receptor 3“ (FFAR3) und FFAR2. Diese beiden Rezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Zhiwei Ang, 2017). FFAR3 besitzt im Vergleich eine höhere Affinität zum Propionat als zum Butyrat und Acetat. Sowohl FFAR3 als auch FFAR2 kommen auch in anderen Organen außerhalb des Intestinaltrakt vor (C S Byrne E. S., 2015).

Der Transport von Butyrat erfolgt durch den Monocarboxylat-Transporter (MCT1). Dieser Transporter ist ebenfalls der Transporter von L-Lactat. Somit konkurrieren diese beiden Substanzen miteinander um die Bindungsstellen. Butyrat wird jedoch beim Vorhandensein von L-Lactat bevorzugt (Armin Ritzhaupt, 1998). In den Epithelzellen des Colons ist der MCT1 vor allem auf der luminalen Seite der Membran exprimiert und bei höheren Konzentrationen an Butyrat konnte auch eine erhöhte Expression von diesem Transporter auf der luminalen Seite der Kolonmembran nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu haben Acetat und Propionat keine Auswirkung auf die Expression von MCT1 (Mark A Cuff, 2002).

Durch die Bindung von kurzkettigen Fettsäuren kommt es zur Aktivierung des G-Protein-gekoppelten-Signalwegs und es werden weitere Mediatoren wie endokrinen Hormone (glucagonartig-Peptid 1 (GLP-1) und Peptid YY (PYY)) freigegeben (Gwen Tolhurst, 2012). Kurzkettige Fettsäuren sind Alkylmonocarboxylate, die unverzweigt und gesättigt sind und meist eine Länge von 6 Kohlenstoffatomen nicht überschreiten (Brian T Layden, 2013). Kurzkettige Fettsäuren spielen bei Chemotaxis (Jian Tan, 2014) und bei der Produktion von

reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle. Ebenfalls sind sie an der Zellproliferation beteiligt und haben anti-entzündliche, antikarzinogene und antimikrobielle Effekte und regulieren die intestinale Homöostase (R.Mackay Laurence Macia, 2014).

Kurzkettige Fettsäuren, insbesondere Butyrat, wirken präventiv bei der Entstehung von Kolonkarzinomen, da sie als Histondeacetylaseinhibitor (HDACi) fungieren und somit kanzerösen Kolonzellen mittels Apoptose gezielt eliminieren (Bultman, 2015).

Da die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren im Darm vor allem durch die Ernährung reguliert wird, sieht man anhand der erhöhten Prävalenz von entzündlichen Erkrankungen in westlichen Ländern, dass möglicherweise mit den Jahren die Ballaststoffmenge in der Nahrung zurückgegangen ist. Hierfür fehlen jedoch noch nähere Informationen (R.Mackay Laurence Macia, 2014).

Studien weisen darauf hin, dass auch die oral zugeführten kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) äquivalent zu den fermentativ hergestellten kurzkettigen Fettsäuren verwendet werden. Die orale Zufuhr von Butyrat erhöht demnach die Insulinsensitivität und senkt die Wahrscheinlichkeit an Adipositas zu erkranken (Henagan, 2017).

Die höchste Konzentration an kurzkettigen Fettsäuren konnte vor allem im ersten und zweiten Abschnitt (Caecum Colon und Ascending Colon) des menschlichen (post mortem) Dickdarms mit 131 mmol/kg (Caecum c.) und 123mmol/kg (Ascending c.) nachgewiesen werden. Die Produktion der kurzkettigen Fettsäuren sinkt demnach in den letzten zwei Abschnitten des Dickdarms: Colon Descendes (absteigender Teil des Colons) und Colon Sigmoidum (letzter Abschnitt des Dickdarms vor dem Rectum) mit 80mmol/kg und 100mmol/kg. Der Dünndarm ist ein ungeeigneter Produktionsort für kurzkettige Fettsäuren (13mmol/kg). Der pH-Wert der Darmabschnitte hat einen direkten Einfluss auf die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren. Für die fermentative Herstellung der kurzkettigen Fettsäuren sind vor allem die Bifidobakterien und die Faecalibakterien zuständig (Jean Guy LeBlanc, 2017). So besiedeln diese Bakterienstämme eher den Dickdarm, da dort die besten Bedingungen für ihre Vermehrung herrschen. Die relativen Werte für die Zusammensetzung der erzeugten kurzkettigen Fettsäure im Blinddarm (Caecum) sind wie folgt (siehe Tabelle 1) (J H CUMMINGS, 1987):

Tabelle 1: Verhältnis der SCFA's im Caecum von Menschen (post mortem) (J H CUMMINGS, 1987):

Acetat	69 mmol/kg	Propionat	25mmol/kg	Butyrat	26mmol/kg
--------	------------	-----------	-----------	---------	-----------

Das grampositive Bakterium *Faecalibacterium prausnitzii* ist mit seinem ungefähr 5% Gesamtkeimzahl (S Miquel 1, 2013) im gesamten Körper für die fermentative Herstellung von Butyrat zuständig. Bei der Ernährung von vier Bakterienstämmen mit Fructose konnte nur *Faecalibacterium prausnitzii* Fructose zum Butyrat verstoffwechseln (Frédéric Moens, 2016).

Eine gesunde Darmflora ist für den vollständigen Erhalt der Darmfunktion unentbehrlich. So wurde bei Kindern, die im Laufe des Lebens eine Atopie entwickelten, ein erhöhter Gehalt an Clostridien nachgewiesen, wobei bei Kindern ohne Atopie, die Zahl der Bifidobakterien (im Gegensatz zu Clostridien) und damit direkt verbunden eine höhere Produktionsrate an kurzkettigen Fettsäuren nachgewiesen werden konnte (M Kalliomäki, 2001).

1.3 Das enterische Nervensystem und kurzkettige Fettsäuren

Das hauptsächlich im Blinddarm und im aufsteigenden Teil des Colons gebildete Butyrat und Propionat haben stimulierende Auswirkungen auf die Darmmotilität in Hunden (P S Kamath, 1987). Eine hochdosierte (500mM) Zufuhr von SCFA's (kurzkettige Fettsäuren) senkt die Darmmotilität. Senkt man die Konzentration von SCFA's jedoch auf 50- 100mM so wird die Darmmotilität wieder gesteigert (Mark P Rondeau, 2003). Dieses Phänomen beruht auf die dosisabhängige Regulation des enterischen Nervensystem. Wird eine erhöhte Konzentration von Butyrat zugeführt, so reagiert das enterische Nervensystem mit einer erhöhten Freisetzung von 5HT₃ (Serotonin) aus enterochromaffinen Zellen des Darms (Satoshi Fukumoto, 2003). Damit verbunden wird eine Signalkaskade gestartet und am Ende dieser Kaskade wird vermehrt Acetylcholin aus dem Myenteric Plexus freigegeben und dieses führt dann zu einer Muskelkontraktion im Darmtrakt (Satoshi Fukumoto, 2003).

Kurzkettige Fettsäuren haben eine positive Auswirkung auf die Energiehomöostase (C S Byrne E. S., 2015). Die orale Zufuhr von kurzkettigen Fettsäuren zeigte sich in Mausversuchen als präventiv gegen die Ausbildung von nichtalkoholischem Steatohepatitis (Cheng Jun Jin, 2015).

Obwohl die kurzkettigen Fettsäuren, chemisch gesehen eine ähnliche Struktur haben, sind sie in der Wirkung auf die Motilität (konzentrationsabhängig) doch unterschiedlich. Bei

einem Versuch mit männlichen Wistar Ratten konnte mit einer je 5mM konzentrierten oralen Natrium-Acetat-, Natrium-Propionat- und Natrium-Butyrat-Zufuhr unterschiedliche Effekte nachgewiesen werden. Natrium-Acetat führte zu einer Abnahme der Darmmotilität, wobei Natrium-Propionat zu einer Erhöhung der Darmkontraktion und das Natrium-Butyrat zu einer vorübergehenden Kontraktion führten (Sean M. McNabney, 2017).

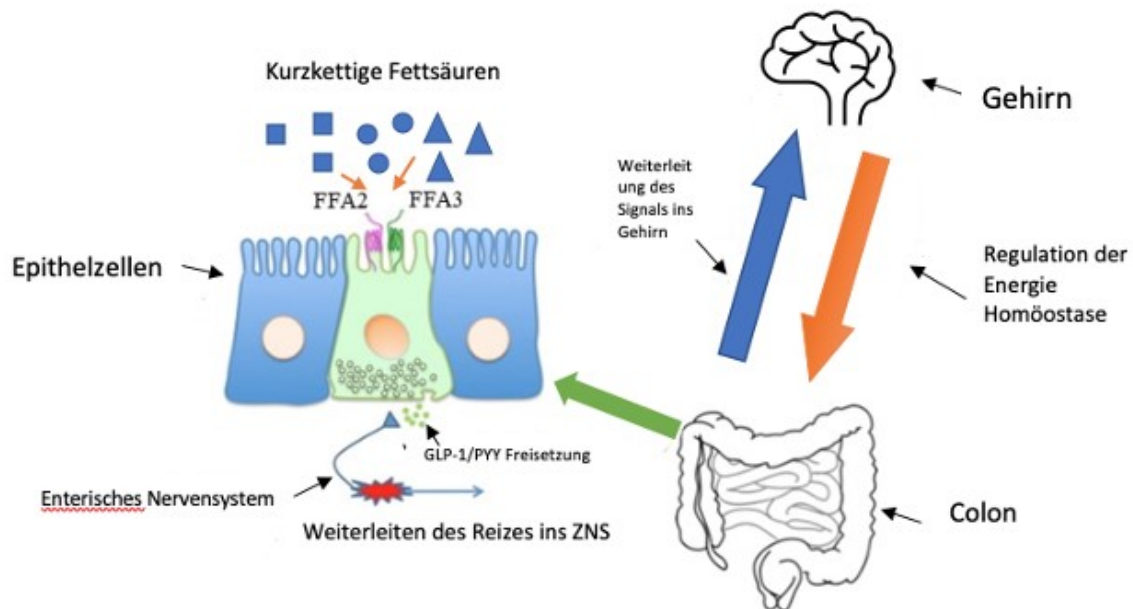


Abbildung 3: Schematische Darstellung für die Regulation der Energie-Homöostase

Nach der Bindung von kurzkettigen Fettsäuren kommt es zur Bindung dieser an FFAR2/3. Dadurch werden erhöht GLP-1/PYY aus den Epithelzellen freigesetzt. Das enterische Nervensystem registriert diesen Reiz und leitet ihn mittels Vagusnerven ins zentrale Nervensystem. Daraufhin wird das Colon vom Gehirn zur Regulierung der Energie-Homöostase beauftragt.

Quelle: Eigenproduktion

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Studien weisen darauf hin, dass Fructose und Natriumbutyrat die Freisetzung des Serotonins im Darm modulieren können.

Bisher sind jedoch die molekularen Mechanismen, die sowohl die Wirkung der Fructose als auch des Butyrat auf das intrinsische serotonerge System wenig untersucht.

Ausgehend von diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Natriumbutyrat und Fructose auf die Produktion von Serotonin im in vitro Modell (BON-Zellen) der enterochromaffinen Zellen und die Expressionsrate von SERT bei C57BL/6J-Mäusen, zu ermitteln.

Folgende Fragestellungen sollen durch diese Arbeit beantwortet werden:

1. Wie beeinflussen Natriumbutyrat und Fructose die Serotoninkonzentration in den BON-Zellen?
2. Gibt es eine dosisabhängige Beeinflussung des Serotonins bei der Behandlung mit unterschiedlichen Mengen an Natriumbutyrat und Fructose?
3. Welche Auswirkungen haben eine orale Supplementation von Natriumbutyrat auf die Expression des Serotonintransporters im Duodenum in Fructose-gefütterten C57BL/6J-Mäusen?

2. Materialien

2.1 Zellkultur

BON-Zellen	Wird noch ergänzt	Wird noch ergänzt
DMEM:F12	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach/Deutschland
Penicillin:Streptomycin	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach/Deutschland
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer Marienfeld 0,00025mm ²	unbekannt
Pipetten (1-1000µl)	Eppendorf Research Plus	Hamburg/Deutschland
Zellkultur-Bench	Labogene Scandinavian by Design Mars 1800	Dänemark/ Allerød
Mikroskop	Zeiss Primovert Inverses Mikroskop	China/Shanghai
Wasserbad	Köttermann F019	Deutschland/ Uetze
Trypsin/EDTA	PAN Biotech	Aidenbach/Deutschland
FBS	PAN Biotech	Aidenbach/Deutschland
Fructose	Carl Roth GmbH + CO KG D- (-)Fructose	Karlsruhe/Deutschland
Natriumbutyrat	Laborbestand	
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Laborhandschuhe	Microflex Xceed Powder Free	Brüssel/Belgien
Mikrofilter (0,21 µm)	Carl Roth GmbH + CO KG	Karlsruhe/Deutschland

Spritzen (für Membranfilter)	BRAUN Omnifix Luer Lock Solo	Melsungen/Detuschland
Bechergläser	ILMABOR SCHOTT WR BRAND	Deutschland
Analysenwaage	Sartorius MC410 S	Göttingen/Deutschland
12er Well-Platten	Sarstedt AG & Co KG	Nümbrecht/Detuschland

2.2 Messung der Serotoninkonzentration mittels ELISA

Serotonin ELISA	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Mikrotiterplatte (96-Wells)	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Serotonin Antiserum	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Serotonin Biotin	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Enzymkonjugat (1:100 mit Assaypuffer verdünnt)	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Standarts A-G	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Kontrolle 1	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Kontrolle 2 (aus 0,5ml doppeldestilliertem Wasser hergestellt)	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Eppis	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Acylierungsreagenz	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Assaypuffer (1:10 mit bidest. Wasser verdünnt)	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Waschpuffer (1:20 mit bidest. Wasser verdünnt)	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Substrat	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland

Reagenzgläser (klein)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	Sondheim vor der Rhön /Deutschland
Stopplösung	IBL International GmbH	Hamburg/Deutschland
Vortex-Mixer	Heidolph REAX2000	Schwabach/Deutschland
Photometer	Molecular Devices SpectraMax M3	Deutschland
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Thermo-Shaker	Biosan PST-60HL	Riga/Lettland

2.3 Immunohistochemische Färbung von Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäuse

Vortex-Mixer	Heidolph REAX2000	Schwabach/Deutschland
Immunohistochemie Set	Alamone Labs	Jerusalem/Israel
Mikroskope	Leica DM6 B	Wetzlar, Deutschland
	Zeiss Lab A1 AXIO	München/Deutschland
Orbitalschüttler	Digital Orbital Shaker	Rugby/United Kingdom
Deckgläser	Laborbestand	
Objektträger	Laborbestand	
Feuchte Kammer	Simport	Canada/QC J3G 4S5
Roti Histol	Laborbestand	
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Tween 20	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Ethanol/Methanol	Laborbestand	
Wasserstoffperoxid	Laborbestand	
PBS	Laborbestand	
Destilliertes Wasser	Laborbestand	
Leitungswasser	Laborbestand	

2.4 Analyse der Genexpression

Photometer	Molecular Devices SpectraMax M3	Deutschland
Trizol	VWR Life Science	Leuven/Belgium
Darmgewebe	Laborbestand	
Vortex-Mixer	Heidolph REAX2000	Schwabach/Deutschland
Gewebelyse	Qiagen TissueLyser II	Hilden/ Deutschland
Chloroform	Laborbestand	
Isopropanol	Laborbestand	
Ethanol 75%	Laborbestand	
Zentrifuge	Hermle Z 216 MK	Wehingen/Deutschland
Wasser (Nuklease-frei, steril filtriert, autoklaviert)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Aidenbach/Deutschland
Aus Gewebe extrahierte RNA		
Filtertips	TIP ONE Starlab Group	Hamburg/Deutschland
Wasser (Nuklease-frei, steril filtriert, autoklaviert)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Aidenbach/Deutschland
Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
Mastermix	Laborbestand	
Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories	München, Deutschland
RQ1 Stop Solution	Promega Corporation	Madison/USA
RQ1 RNase-Free DNase 10x Reaction Buffer	Promega Corporation	Madison/USA
RQ1 RNase-Free DNase	Promega Corporation	Madison/USA
Primer	Eurofins Genomics	Ebersberg, Deutschland
iTaq Universal SYBR Green	Bio-Rad Laboratories	California/USA
Supermix		
Hard-Shell PCR Plates 96- Well, dünner Wand	Bio-Rad Labartories	München/Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Primersequenzen

Gen	Verwendete Primersequenz
Slc64A	Forward: 5´ - tgg ata gta cgt tcg cag gc -3´ Reverse: 5´ - cat acg ccc ctc ctg atg tc -3´
18S	Forward: 5´ -gta acc cgt tga acc cca tt-3´ Reverse: 5´ - cca tcc aat cgg tag tag cg -3´

2.5 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma	Herkunft
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Eppis	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Kolbenhubpipetten	Sarstedt AG& Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Ethanol feste Permanentstifte	Micronova LabMarker	California/USA
Wasserfeste Permanentstifte	STAEDTLER Mars GmbH & Co. KG	Nürnberg/Deutschland
Zellkulturflaschen (50ml, 100ml)	Sarstedt AG & CO KG	Nümbrecht/Deutschland
Pasteur Pipetten (Glas)	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH + Co KG	Karlsruhe/Deutschland
Laborhandschuhe	Microflex Xceed Powder Free	Brüssel/Belgien
Ethanol (70%)	Laborbestand	
Falcons	Sarstedt AG & CO KG	Nümbrecht/Deutschland
Plastikwannen und Wägeschiffchen	Laborbestand	
CO2-Flasche	Air Liquide	Schwechat/Österreich
Wasser-Bidest.	Rotipuran Carl Roth GmbH + CO KG	Karlsruhe/Deutschland

**Glasflaschen (1L, 500ml,
250ml, 100ml, 50ml)**

Carl Roth GmbH + Co KG

Karlsruhe/Deutschland

2.6 Allgemeine Geräte

<u>Gerätschaften</u>	<u>Firma</u>	<u>Herkunft</u>
Kühlschrank	Liebherr Premium	Ochsenhausen/Deutschland
Zentrifuge	Hermle Z446 K	Wehingen/Deutschland
Eppi-Zentrifuge	Hermle Z216 MK	Wehingen/Deutschland
Mikrotom	Leica RM2245	Deutschland
Pipettor (automatisch)	DLAB Levo ME	Kalifornien/USA
Pipettor (mechanisch)	BRAND Macro	Wertheim/Deutschland
Vakuumpumpe	DLAB Safevac	California/USA
Eiswürfelerzeuger	Hoshizaki HydroCarbonFreze	Amsterdam/Niederlande
Tiefkühler	Eppendorf CryoCube F570h	Hamburg/Deutschland
Heizschrank	WTC Binder	Tuttlingen/Deutschland
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co KG	Nümbrecht/Deutschland
Mikroskope	Leica DM6 B	Wetzlar, Deutschland
	Zeiss Lab A1 AXIO	München/Deutschland
Orbitalschüttler	Digital Orbital Shaker	Rugby/United Kingdom

2.7 Software

Applikation	Firma
Graphpad Prism 7	Graphpad Software
Microsoft Word	Microsoft Office
Microsoft Excel	Microsoft Office
Plattenreader Software	SoftMax Pro 7.0
Analyse der immunohistochemischen Färbung	LAS X, LAS V4.5
Schmelzkurvenanalyse	Bio Rad CFX Manager
Bestimmung der RNA-Integrität	Image Lab 5.0

3. Methoden

3.1 Kultivierung von BON-Zellen

Die BON-Zellen gehören zu den adhärenenten Zellen. Dieses Charakteristikum ist für die Auswahl der Zellkulturflasche von großer Bedeutung. Die bei -180 Celsius gelagerten BON-Zellen werden durch das langsame Herabsetzen der Umgebungstemperatur (Eis-Box) geschont aufgetaut und nachfolgend im frischen Nährmedium aufgenommen und anschließend bei Raumtemperatur und 200RCF für 5 Min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren werden die Zellen in eine kleinen Kulturschale (Volumen: 25cm³) mit 3ml Nährmedium und 2ml FBS aufgenommen. Für die größere Kulturschale (Volumen: 75cm³) werden die BON-Zellen in eine Mischung aus 5,4ml Nährmedium und 3,6ml FBS aufgenommen. Dies entspricht einer Konzentration von 40% FBS zu 60% Nährmedium (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS). Der hohe Anteil an FBS ist vor allem am Anfang des Auftauprozesses sehr wichtig, um den Zellen eine optimale Bereitstellung notwendiger Nährstoffe zu gewährleisten.

Die BON-Zellen werden in einer 1:1 Mischung von DMEM:F12 kultiviert. Zur Nährmediumflüssigkeit werden andere Substanzen wie 10% fetales bovines Serum (fötales Rinder Serum) und 1% Penicillin und Streptomycin zugesetzt. Die Zellen werden bei 5% CO₂ Atmosphäre und bei 37° Celsius kultiviert.

Es werden 10⁶ Zellen in die Kulturschale übergeführt und über die Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgt der Mediumwechsel. Die Zellen werden mit 5ml DPBS gespült und gewaschen. Nachdem die Zellen vollständig mit DPBS gewaschen wurden, wird das frische Nährmedium (bestehend aus DMEM: F12/FBS/Streptomycin: Penicillin) in die Zellkulturflasche gefüllt.

Nachdem die Konfluenz des Zellkulturbodens zu 80% erreicht wurde, muss ein Splittvorgang erfolgen. Das verbrauchte Nährmedium wird mittels Vakuumpumpe entfernt. Danach werden die Zellen jeweils mit 5ml PBS gewaschen und die gebrauchte PBS-Lösung wird verworfen. Es werden 3ml (25cm³) und 5ml (75cm³) Trypsin/EDTA dazugegeben. Die Mischung aus Trypsin/EDTA löst sowohl die Zell-Zellverbindungen als auch die Zell-Kulturschalenbodenverbindungen erfolgreich. Falls das nicht der Fall ist, wird ein Zellschaber verwendet. Eine Einwirkzeit von fünf Minuten wird eingehalten, um die Zellen abzulösen. Die Reaktion wird mit etwa 5ml Nährmedium (25cm³) und mit 9ml Nährmedium (75cm³)

unterbrochen. Die Zellen werden resuspendiert und in 10ml Falcons übergeführt und für 10 Minuten bei 300 RCF zentrifugiert.

Anschließend wird das Nährmedium entfernt und die Zellen in 1 ml frischem Zellmedium übergeführt und nach der Bestimmung der Zellzahl in die neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

Zur Bestimmung der Zellzahl werden 20µl Zellsuspension in ein kleines Reagenzgefäß gegeben. Danach erfolgt das Färben der Zellen mit 20 µl Trypanblau (1:1) und anschließend wird mittels einer Neubauer-Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt. Das

Funktionsprinzip der Neubauer-Zählkammer beruht darauf, dass auf einem Objektträger-ähnlichen Träger eine gefärbte Lösung von Zellen und Farbstoff aufgetragen wird. Auf der Zählfläche befinden sich 4x4 0,25mm große Quadrate. Abschließend wird die Zellzahl mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times 10000$$

Dann wird die nötige Anzahl an Zellen in die Kulturschale ausgesät. Zur Kontrolle werden die Kulturschalen unter dem Mikroskop betrachtet. Diese Methode färbt vor allem die toten Zellen blau, da der saure Farbstoff Trypanblau nur die geschädigte oder tote Zellmembran durchdringen kann. Lebende Zellen zeichnen sich durch eine leuchtende Farbe aus.

Die Zellen werden nach dem Waschen mit PBS in Nährmedium (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS) aufgenommen. Anschließend erfolgt der Zählvorgang und danach wird für 10 Minuten bei 300RCF (20°) zentrifugiert.

Die Zellen werden in einer DMSO/FBS-Mischung (1:10) aufgenommen und resuspendiert und in Kryoröhrchen übergeführt. Um ein Schockfrieren zu vermeiden werden die Kryoröhrchen in einem Behälter mit Isopropanol zunächst stufenweise (-20°) eingefroren und am nächsten Tag erfolgt der Transfer in -150°-Atmosphäre.

3.2 Herstellung der Stammlösungen

3.2.1 Natriumbutyrat Stammlösung

Für die Versuche werden folgende Konzentrationen festgelegt: 3 mM, 0,3 mM und 0,03 mM.

Die erforderliche Menge an Natriumbutyrat wird mittels einer Präzisionswaage abgewogen.

Um die Stabilität des Natriumbutyrrats zu gewährleisten, wird die abgewogene Substanz in einem 15ml Falcon dicht verschlossen und unter Lichtschutz (mittels Alufolie) aufbewahrt.

Es werden 16,51mg Natriumbutyrat abgewogen und im 50ml Nährmedium, welches 89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS enthält, gelöst.

Die Natriumbutyrratlösungen werden mit einem Filter (Porengröße 0,2 µm) steril filtriert. Die Herstellung der niedriger konzentrierten Natriumbutyrratlösungen erfolgt aus dem

Verdünnen der steril filtrierten Natriumbutyrratlösung. Hierfür werden 5ml von der 3mM NaB-Lösung entnommen und mit Nährmedium (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS) auf 50ml aufgefüllt (0,3mM NaB-Lösung). Für die 0,03mM konzentrierte NaB-Lösung werden 5ml 0,3mM NaB-Lösung mit 45ml Nährmedium (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS) auf 50ml aufgefüllt.

Rechnung:

M= 110,09 g/mol

3mM-> 330,27mg in 100ml Nährmedium ($110,09 \times 3 = 330,27\text{mg}$)

Oder 16,51mg in 50ml Nährmedium

Somit gilt:

3mM--> 16,51mg in 50ml Nährmedium*

0,3mM--> 5ml 3mM NaB-Lösung+ 45ml Nährmedium*

0,03mM--> 5ml 0,3mM NaB-Lösung+45ml Nährmedium*

***Nährmedium: (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS)**

3.2.2 Fructose-Stammlösung

Für die Versuche werden folgende Konzentration festgelegt: 50mM, 25mM, 10mM, 5mM, 2,5mM. Die festgelegte Menge an Feststoff wird mittels einer Präzisionswaage abgewogen und in ein 15 ml Falcon übergeführt und dann im 10ml Nährmedium (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS) gelöst und gevortext. Die Fructoselösung (50mM) wird abschließend mit einem Filter (Porengröße 0,2 µm) sterilfiltriert. Die Herstellung der 25mM, 10mM, 5mM und 2,5mM konzentrierten Fructose-Lösungen erfolgte durch das Verdünnen der 50mM Fructose Stammlösung.

Rechnung:

M (Fructose)= 180,16g/mol

50mM-->9,008g auf 1Liter

Oder 90,08mg auf 10ml

Somit gilt:

50mM-->90,08mg in 10ml Nährmedium*

25mM--> 5ml 50mM Fructose-Lösung+ 5ml Nährmedium*

10mM--> 4ml 25mM Fructose-Lösung+ 6ml Nährmedium*

5mM--> 5ml 10mM Fructose-Lösung+ 5ml Nährmedium*

2,5mM--> 5ml 5mM Fructose-Lösung+ 5ml Nährmedium*

***Nährmedium: (89% DMEM:F12, 1% Streptomycin/Penicillin und 10% FBS)**

3.3 Behandlung von BON-Zellen

Sowohl für die Versuche mit Fructose-Stammlösungen als auch für die Versuche mit Natriumbutyrat-Stammlösungen werden Zellen in einem Altersbereich von Passage 6 bis 14 eingesetzt. Ebenfalls werden bei beiden Versuchen festgestellt, dass 12 Wellplatten für die Versuchsdurchführung am besten geeignet sind.



Abbildung 4: Behandlungsschema mit Natriumbutyrat und eine Vorschau für die Plattenbelegung

Die Behandlung der Zellen mit Natriumbutyrat erfolgte mit zwei unterschiedlichen Inkubationszeiten (2 Stunden und 18 Stunden).

Quelle: Eigenproduktion

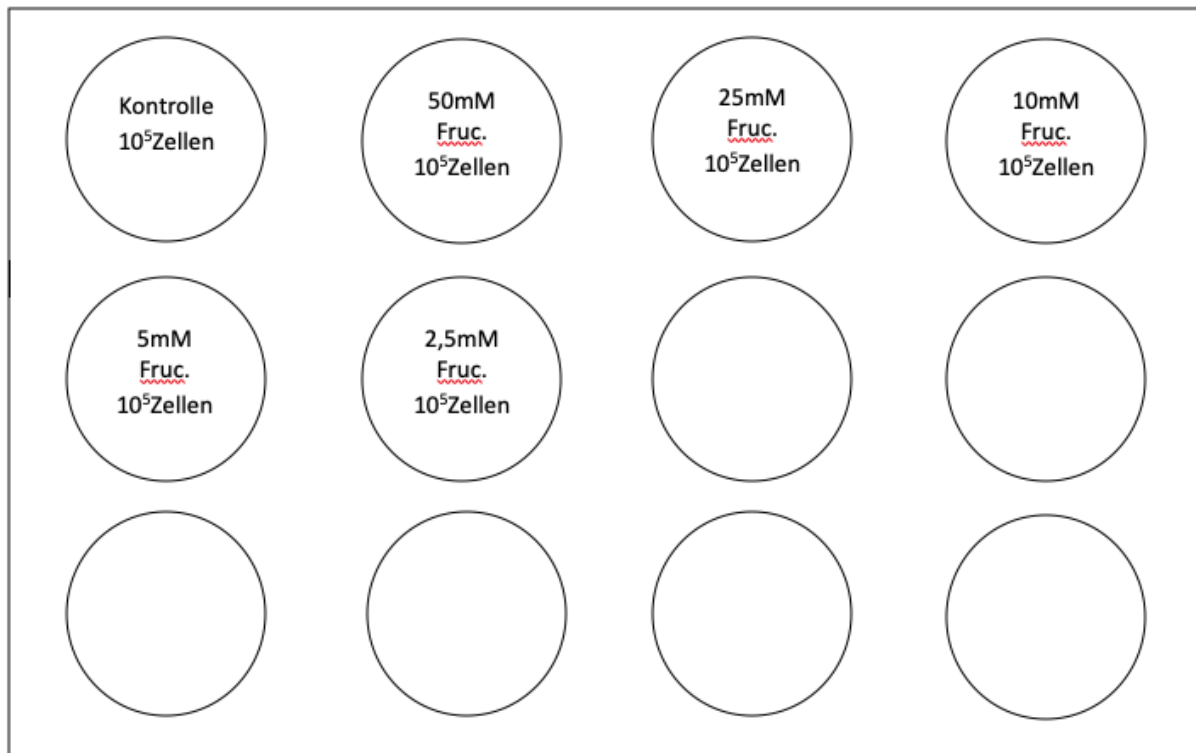


Abbildung 5 Behandlungsschema mit Fructose-Lösungen und eine Vorschau für die Plattenbelegung

Es wurden zwei unterschiedliche Inkubationszeiten (2 Stunden und 18 Stunden) verwendet.

Quelle: Eigenproduktion

3.4 Messung der Serotoninkonzentration mittels ELISA

Für die Messung werden die Zellüberschüsse verwendet. Die Zellüberschüsse stammen von Proben, die mit NaB (3µM/0,3µM/0,03µM) und mit Fructose (50mM/25mM/10mM/5mM/2,5mM) behandelt wurden. Für den Versuch mit dem Serotonin-Kit ist es erforderlich einen verdünnten Assay Puffer herzustellen, damit die Konzentration des Serotonins so weit erniedrigt wird, dass das ELISA-Kit diese problemlos innerhalb des Registrierungsbereichs erkennen kann. Es werden 20µl Kontrolle und 20µl Probe zuerst mit dem hergestellten und verdünnten Assay-Puffer nach dem Protokoll verdünnt. Anschließend erfolgte die Acylierung mit dem Acylierungsreagenz.

Nach der Erwärmung wird die Flüssigkeit in jedem Röhrchen mit einem Assay-Puffer verdünnt. Die hierfür erforderliche Menge ist vom ELISA-Kit abhängig und ist in der Gebrauchsanweisung zu finden. Dann wird die verdünnte Lösung für 10 Minuten bei 1500 RCF zentrifugiert. Etwa 50µl der zentrifugierten Lösung wird in die Wells pipettiert. Ebenfalls werden sieben unterschiedlich konzentrierte Standardlösungen und eine Kontrolllösung (die

Lösung wird durch das Lösen eines lyophilisierten Pulvers mit 0,5ml zweifach destilliertem Wasser hergestellt) mitdetektiert.

Die Konzentration der Standardlösungen ist bereits bekannt. Zu jedem Well werden 50µl Serotonin-Biotin und 50µl Serotonin-Antiserum dazugegeben. Die Wellplatte wird mit einem Orbitalschüttler bei 500 RPM für 90 Min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Schüttelvorgang werden die gefüllten Wells mit einer Waschpuffer-Lösung gewaschen. Der Waschvorgang wird dreifach wiederholt, um die restliche Lösung (Assaypuffer, Serotonin-Biotin und Serotonin-Antiserum) zu entfernen. Um die Reaktion zu katalysieren und später sichtbar zu machen, wird nach dem Waschen der Wells ein 1:100 (mit Assaypuffer verdünnt) verdünntes Enzymkonjugat dazugegeben und wiederum bei Raumtemperatur und 500 RPM für 60 Min geschüttelt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 200µl Substratlösung in jedes Well, um den kolorimetrischen Nachweis durchzuführen. Nach der Zugabe der Substratlösung wird ein drittes Mal bei Zimmertemperatur geschüttelt. Anschließend wird die Reaktion mit 50µl Stopplösung (pro Well) gestoppt.

Die Messung der Konzentration von Serotonin erfolgt mit einem Photometer. Dazu wird bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen (405nm und 600nm Referenzwellenlänge) gemessen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit dem Programm „Graphpad 7“. Dabei werden die Konzentrationen der Standards (A-G) in die X-Spalte eingetragen und die Extinktionen der Standards, der Proben und die Extinktionswerte der Kontrolle in die Y-Spalte eingetragen. Durch anschließende Log-Transformierung der X-Werte und Analyse der nichtlinearen Regression werden die Ergebnisse erhalten. Um die Ergebnisse nachvollziehbar darzustellen, werden die Parameter transformiert und die Kurven in einer Excel-Datei zusammengefasst.

3.5 Immunohistochemische Färbung von Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäuse

Das Funktionsprinzip der Immunohistochemie basiert auf der Reaktion eines Antikörpers mit einem Antigen. Erfolgt die Interaktion zwischen diesen beiden Komponenten, so erfolgt eine Färbereaktion, die eine visuelle Sichtbarkeit ermöglicht. Die Auswahl des primären Antikörpers ist von großer Bedeutung. Eine Kontrollgruppe wird ebenfalls mitbestimmt, damit eine Färbereaktion deutlich von einer Negativkontrolle unterschieden werden kann.

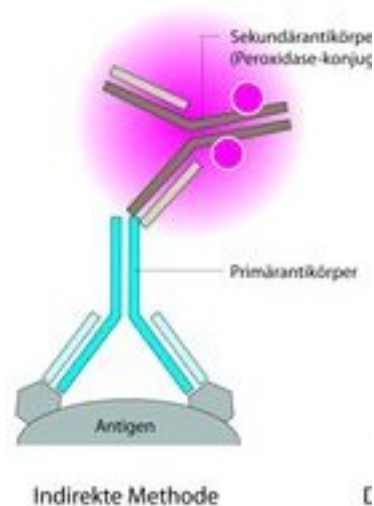


Abbildung 6: Illustration eines immunohistochemischen Nachweises

Nach dem Andocken des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper kommt es zu einer Signalverstärkung. Quelle: [Morphisto](#)

Bei den verwendeten Darmabschnitten handelt es sich um C57BL/6J Mäusen, die mit einer fructosereichen Flüssigdiät und natriumbutyrateichen Flüssigdiät gefüttert wurden. Die Konzentration des Natriumbutyrate betrug 0,6 g/kg KG/d. Die Dauer des Versuchs betrug 13 Wochen und für die Versuche wurden drei Monate alte Mäuse verwendet. Es wurden männliche Mäuse verwendet. Die Gewebeschnitte lagen bereits vor und müssen für den immunohistochemischen Nachweis zurechtgeschnitten werden. Zuvor tiefgefrorene Dünndarmabschnitte der C57BL/6J Mäusen, die in Form von Paraffinblöcken konserviert wurden, werden mittels eines Mikrotoms in 0,2µm dicke Schnitte geschnitten und für den Nachweis vorbereitet. Die Schnitte werden in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit Roti-Histol entparaffiniert. Hierfür werden die Gewebeschnitte mittels eines Orbitalschüttlers gleichmäßig in Bewegung gehalten. Anschließend erfolgt die stufenweise Entfernung des Roti-Histols und des Molekularwassers, welches in den Zellzwischenräumen enthalten ist, mit absteigender Ethanolkonzentration (100%,95%,70%) für jeweils zehn Minuten. Um das überschüssige Ethanol zu entfernen, werden die Gewebeschnitte im letzten Schritt mit destilliertem Wasser für fünf Minuten gewaschen.

Nach der Entparaffinierung und Dehydrierung der Gewebeschnitte erfolgt die Antigendemaskierung. Für die Antigendemaskierung wird eine Mischung folgender Substanzen verwendet: 0,2% Wasserstoffperoxidlösung in 0,1M Phosphatpuffer (auf pH 7,3 eingestellt), 0,05% Triton X-100 und 20% Methanol tropfenweise aufgetragen. Die

Gewebeschnitte werden anschließend für 25 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend werden die Gewebeschnitte in einem Behälter mit 0,02 M PBS für fünf Minuten geschüttelt. Nach fünf Minuten wird der Vorgang wiederholt. Nach dem Abstoppen der Reaktion wird der primäre Antikörper (Anti-Serotonin Transporter) in einer Konzentration von 1:400 auf die Gewebeschnitte übertragen und eine Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Eine Stunde später wird die feuchte Kammer mit den Gewebeschnitten bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Gewebsschnitte mit 0,02 M PBS fünf Minuten lang gewaschen. Nach fünf Minuten wird der Vorgang wiederholt.

Nach dem Waschen erfolgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper. Dieser Antikörper ist ein Anti-HRP-Rabbit und die Gewebeschnitte werden für 30 Minuten inkubiert. Nach der erfolgten Inkubation werden wiederum zwei Mal mit 0,02 M PBS für jeweils fünf Minuten gewaschen.

Um eine Detektierbarkeit der möglichen Antigen-Antikörper-Bindung zu gewährleisten, wird eine Mischung aus Chromogen und Substratlösung hergestellt (1 Tropfen Chromogen und 1 ml Substrat) und auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Mit einem Testversuch und der Beurteilung unter dem Mikroskop wurden zehn Sekunden als optimale Einwirkzeit festgelegt. Die Gewebeschnitte werden danach ins destillierte Wasser eingetaucht, um die Reaktion zu beenden. Im Anschluss erfolgt die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Hierfür werden die Gewebeschnitte für 20 Sekunden in einem Behälter mit Hämatoxylin eingetaucht. Nach 20 Sekunden werden die Gewebeschnitte in einen Behälter mit Leitungswasser übergeführt. Dieser Schritt ist zum Bläuen der Gewebeschnitte nötig. Dieser Vorgang wird mit frischem Leitungswasser wiederholt und anschließend wird die Reaktion mit destilliertem Wasser unterbrochen.

Im Anschluss erfolgt die Rehydrierung der Gewebeschnitte mit aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol (70%, 95%, 100%). Nach dem Rehydrierungsschritt erfolgt die Wiederaufnahme der gefärbten Gewebeschnitte im Roti-Histol. Anschließend werden die Gewebeschnitte mit Entellan eingedeckt. Die Objektträger werden für ca. zwei bis drei Stunden unter dem Abzug getrocknet und danach wird die Färbung unter dem Mikroskop beurteilt.

Unter dem Mikroskop werden mittels eines Programms mehrere Fotos gemacht. Die Fotos werden vor allem von der Basis der Darmzotten gemacht. Beurteilt wird die Färbung bezogen auf den verwendeten Ernährungsplan der C57BL/6J Mäuse.

3.6 Analyse der Genexpression

Die in diesem Versuch verwendeten Dünndarmstücke stammen von Mäusen, die mit fructosereicher oder natriumbutyratreicher Flüssigdiät gefüttert wurden. Die Gewebestücke werden bis zum Zeitpunkt der Verwendung in einem Tiefkühlgerät aufbewahrt.

Die Dünndarmstücke werden in 500µl Trizol aufgenommen und mittels einer Gewebe Grinder (TissueLyzer II Frequenz: 300 Schwingungen/Minute) homogenisiert. Das in Trizol enthaltene Guanidinisothiocyanat lysiert die Zellen und macht so die RNA leichter zugänglich. Nach der Homogenisation wird für 30 Sekunden gevortext und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt werden die Proben mit 200µl Chloroform versetzt und zuerst mit der Hand geschüttelt und nachfolgend mit einem Vortexer für 15 Sekunden gevortext. Danach wird das Homogenat für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 12000 RCF und 4° Celsius zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren erfolgen die weiteren Schritte auf Eis. Die obere klare Phase enthält die benötigte RNA und wird separat in einem Behältnis aufgefangen und mit 500µl Isopropanol versetzt und anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Isopropanol fällt die RNA und ermöglicht so die Trennung der RNA-Phase von der flüssigen Phase. Nach der Inkubation erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 12000 RCF, 4°C). Der Überstand wird vorsichtig in ein anderes Behältnis übergeführt. Das Pellet wird mit 1ml 75% Ethanol gewaschen und anschließend acht Minuten lang bei 7500 RCF und 4° Celsius zentrifugiert und nach dem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und neues Ethanol wird dazugegeben. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt. Nach dem Waschschrift erfolgt das Trocknen der Pellets. Nachdem die Pellets vollständig luftgetrocknet sind, werden die Pellets mit 10-20 µl DNase- und RNase- freiem Wasser bei 55° Celsius und für zehn Minuten gelöst. Die Integrität der RNA wird mittels Gelelektrophorese (1,5% Agarose-Gel, 130ml Puffer, 45 Min bei 110V) bestimmt und anschließend wird die RNA-Konzentration gemessen. Hierfür werden 5µl RNA mit 95µl RNase- und DNase-freiem Wasser (pro Well) verdünnt. Ebenfalls wird ein Blankwert als 100

µl destilliertem Wasser festgelegt. Die Absorption wird bei jeweils 230nm, 260 nm und 280 nm gemessen.

Durch das Einsetzen in folgende Formel wird abschließend die RNA Konzentration bestimmt:

$$C [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient.}$$

Das Ergebnis lieferte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 (ein Nachweis für sauber extrahierte RNA)

Für die cDNA-Synthese wurden 1,11 µg RNA eingesetzt.

Die so erhaltene Menge an RNA wird mittels cDNA-Synthese in eine cDNA umgewandelt. Zunächst wird mittels eines Photometers die Konzentration der RNA bestimmt. Hierfür werden 5µl RNA mit 95µl RNase- und DNase-freiem Wasser (pro Well) verdünnt. Ebenfalls wird ein Blankwert als 100 µl destilliertem Wasser festgelegt. Mit dem Photometer bestimmte man anschließend die Absorption bei 260-280 nm. Somit wird 1,11 µg in cDNA umgeschrieben.

Anschließend wird ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür werden folgende Konzentrationen pipettiert (siehe Tabelle 1):

Tabelle 3: Ablauf des DNase-Verdaus

DNase-Verdau	
1 µl	RQ1 RNase-freies DNase 10x Reaktionspuffer
1 µl	RQ1 RNase-Free DNase
Inkubation bei 37° und für 30 Minuten	

Nach dem DNase-Verdau wird die Reaktion mit der Zugabe von 1 µl RQ1 DNase Stop Solution und anschließender Inkubation bei 65° C für 10 Minuten abgestoppt.

Für die cDNA Synthese wird ein Mastermix mit folgendem Ansatz hergestellt (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Herstellung einer Mastermix für die cDNA-Synthese

Mastermix	
4 µl	25mM MgCl ₂
2 µl	Reverse Transkriptase Puffer
2 µl	10mM dNTP Mix
0,5 µl	RNAsin
1 µl	Oligo(dt)Primer
0,6 µl	15 Units AMV Reverse Transkriptase

10,1 µl Mastermix wird zu jeder Probe pipettiert. Nach dem Pipettieren wird mittels Thermocycler mit folgendem Ansatz cDNA synthetisiert (siehe Tabelle 4):

Tabelle 5: Synthesetemperaturen für cDNA

10 Minuten	25°C
15 Minuten	42°C
5 Minuten	95°C
5 Minuten	4°C

Abschließend wird zu jeder Probe 80µl reines Wasser dazugegeben und die erhaltenen cDNA-Fragmente werden bei -20°C gelagert.

Für die Bestimmung der Genexpression wird eine Real-time-RT-PCR durchgeführt. Die Besonderheit der Real-time-RT-PCR ist, dass eine Quantifizierung der Ergebnisse mittels Messung der Fluoreszenzintensität erfolgt, während die PCR-Zyklen in Echtzeit ablaufen. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt mit Anzahl der Vervielfältigungsschritte des interessierenden Gens proportional zu.

Dabei wird ein sogenanntes Interessensgen mithilfe eines Primers gebunden und vervielfältigt. Der Primer (ein Oligonucleotid) dient dabei als Startpunkt für die Polymerase und somit für den Start der Vervielfältigung. Das iTaq Universal SYBR Green dient als Fluoreszenzmarker und bindet an DNA-Doppelstrang und die Fluoreszenzintensität wird von einem Detektor gemessen.

Für die Messung ist das Slc64A-Gen das Interessensgen. Das SLC6A4-Gen codiert für den Serotonintransporter, welches ein integrales Membranprotein ist und für die Wiederaufnahme des Serotonins in die Zelle verantwortlich ist. Als Referenzgen wird das sogenannte Housekeeping-Gen 18S verwendet. Dieses Referenzgen dient der Normalisierung der gemessenen Expression.

Ein Mastermix wird mit folgendem Ansatz hergestellt:

Tabelle 6: Herstellung des Mastermix für Real-Time-PCR

	Slc6A4/18S
iTaq Polymerase	10 µl
DEPC-Wasser	3 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl

Somit werden 15 µl Mastermix in jedes Well pipettiert und 5 µl cDNA werden ebenfalls in die Wells pipettiert. Nach dem Pipettieren des Mastermix und der cDNA wird die Genexpression gemessen. Dafür wurden folgende Bedingungen festgelegt und angewendet:

Tabelle 7: Bedingungen für die Messung der Genexpression

Enzymaktivierung	10 Sekunden bei 95°C
Amplifizierung	5 Sekunden bei 95°C
Annealing für das Slc6A4	30 Sekunden bei 60°C
Annealing für das Referenzgen 18S	30 Sekunden bei 55°C

Innerhalb der Amplifizierung wurden die Zyklen 39 Mal wiederholt. Anschließend erfolgt nach der Messung der Genexpression eine Schmelzkurvenanalyse. Dieses Verfahren eliminiert etwaige mutierte Gene oder Gene, die nicht detektiert werden sollen, mittels Schmelzen. Der gebundene Anteil an Interessensgen schmilzt erst bei höheren Temperaturen.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit folgenden Formeln:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Die CT-Werte kennzeichnen jenen Schwellenwert, bei dem der Reporterfluoreszenz den Hintergrundfluoreszenz eindeutig übersteigt.

3.7 Statistische Auswertung

Sowohl bei den Ergebnissen der ELISA als auch bei den Ergebnissen der PCR wurde auf Ausreißer überprüft. Zur Ermittlung bestehender signifikanter Unterschiede wurden one-way ANOVA (ELISA) und two-way ANOVA (rt-PCR) durchgeführt. Der Bartlett's Test wurde für die Bestimmung der Varianzhomogenität verwendet. Nachdem die Überprüfung auf Varianzhomogenität keinen signifikanten Unterschied lieferte wurden die Daten mittels Logarithmieren transformiert. Die Unterschiede wurden ab einem p-Wert $<0,05$ als signifikant erkannt. Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurden diese als Balkendiagramm dargestellt. Die gesamte statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 7 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1.1 Einfluss von Natriumbutyrat auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen

Um zu untersuchen, ob Natriumbutyrat die Freisetzung vom Serotonin in BON- Zellen moduliert, werden BON-Zellen je 2 und 18 Stunden mit 0-3 mM Natriumbutyrat behandelt und die Serotoninkonzentration in Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. In Abb. 7 und 8 sind die Ergebnisse nach 2 Stunden bzw. nach 18 Stunden zusammengefasst.

Die Inkubation der BON-Zellen mit 0,03mM und 0,3mM Natriumbutyrat führt zu einer deutlichen Erhöhung der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand, wobei nur die Inkubation mit 0,3mM Natriumbutyrat zu einer signifikanten Erhöhung führt (0,03mM $p=0,07$; 0,3mM $p<0,05$). Im Gegensatz dazu resultiert die Inkubation mit 3mM Natriumbutyrat zu keiner signifikanten Veränderung der der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand.

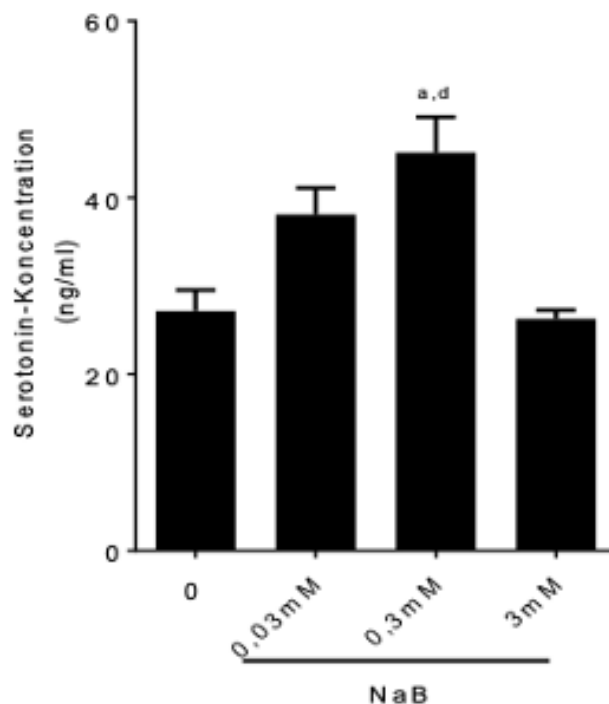


Abbildung 7: Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 2 Stunden mit 0-3mM Natriumbutyrat behandelt wurden (n=5).

a: $p < 0,05$ im Vergleich zu K

d: $p < 0,05$ im Vergleich zu 3mM Natriumbutyrat

Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

Auch nach 18 Stunden führt die Inkubation mit 0,3mM Natriumbutyrat zu einer signifikanten Erhöhung der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, aber auch im Vergleich zu den mit 0,03mM und 3 mM Natriumbutyrat behandelten Zellen. Auch nach 18 Stunden konnte eine deutliche Erhöhung (nicht signifikant) der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand der mit 0,03mM Natriumbutyrat behandelten BON-Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, gezeigt werden.

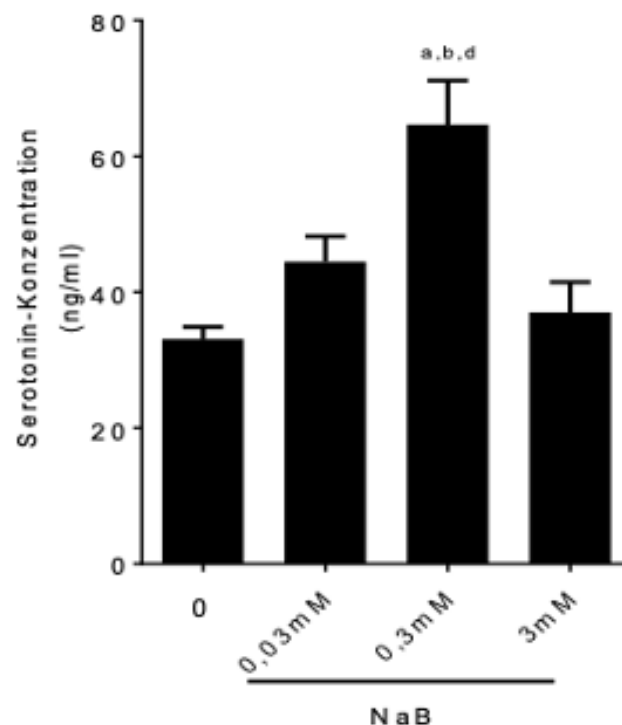


Abbildung 8 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 18 Stunden mit 0-3mM Natriumbutyrat behandelt wurden (n=5).

a: $p < 0,05$ im Vergleich zu 0mM Natriumbutyrat

b: $p < 0,05$ im Vergleich zu 0,03mM Natriumbutyrat

d: $p < 0,05$ im Vergleich zu 3mM Natriumbutyrat

Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

4.1.2 Einfluss von Fructose auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen

Um zu untersuchen, ob auch Fructose die Freisetzung von Serotonin in BON-Zellen verändert, werden die Zellen abermals für je 2 Stunden und 18 Stunden mit 0-50mM Fructose inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 9 und 10 zusammengefasst. Bei keiner der verwendeten Fructosekonzentrationen kommt es nach 2 Stunden oder 18 Stunden zu einer Änderung der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand. Eine leichte Erhöhung (nicht signifikant) konnte im Zellkulturüberstand der BON-Zellen, die mit 25mM Fructose behandelt wurden, gezeigt werden.

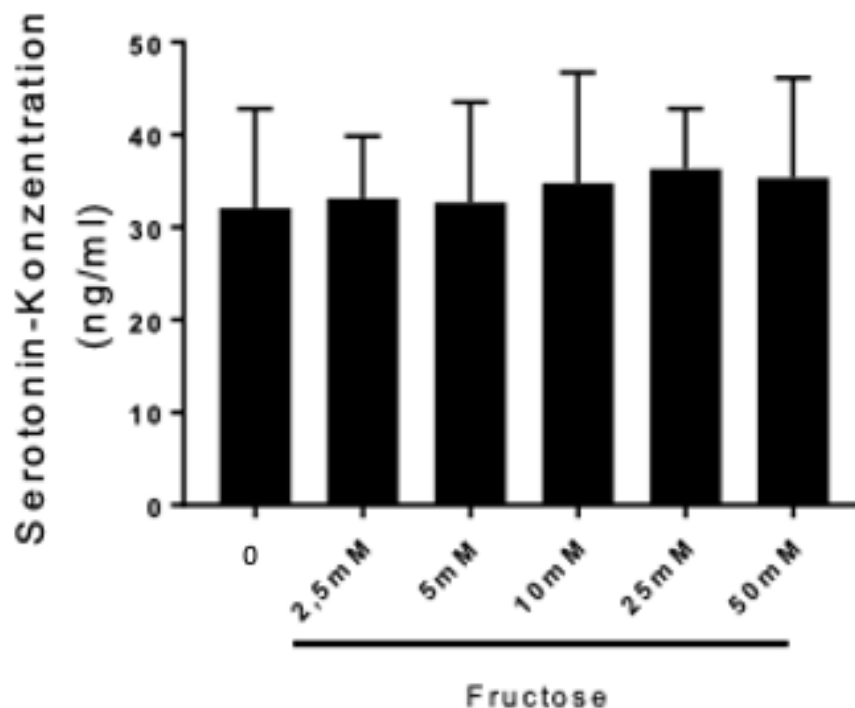


Abbildung 9 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 2 Stunden mit 0-50mM Fructose-Lösung behandelt wurden (n=6).

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben.

Auch nach 18 Stunden führt die Inkubation der BON-Zellen mit 0-50mM Fructose zu keiner signifikanten Änderung in der Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand. Die Serotoninkonzentration im Zellkulturüberstand wurde mit ELISA gemessen.

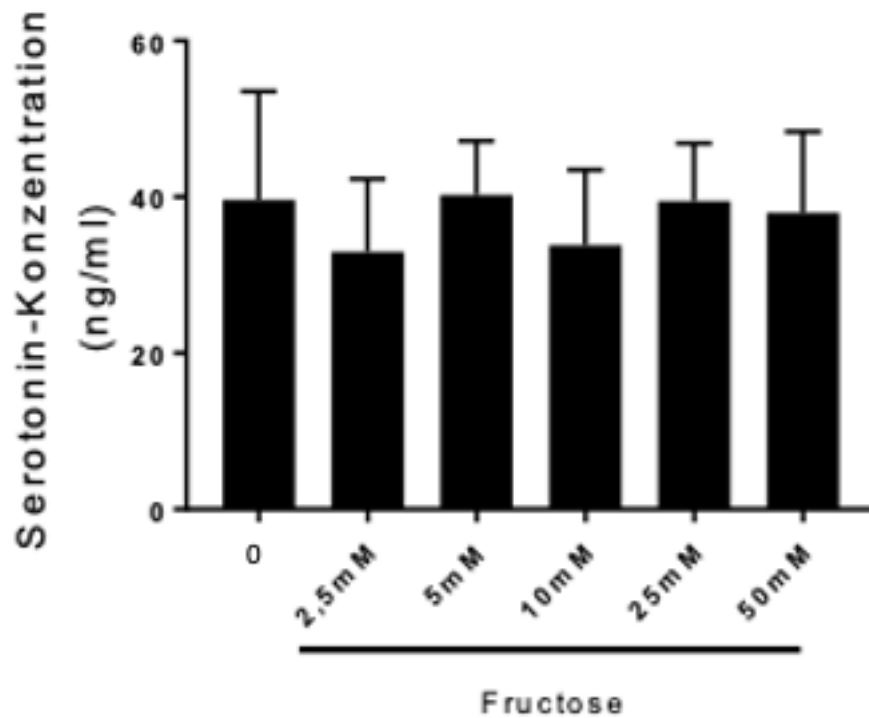


Abbildung 10 Serotoninkonzentration in Zellkulturüberständen der BON-Zellen, die für 18 Stunden mit 0-50mM Fructose-Lösung behandelt wurden (n=6).

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- SEM angegeben.

4.2 Expression von SLC6A4 (SERT) mRNA im proximalen Dünndarm von Fructose-gefütterten C57BL/6J Mäusen

Nach der Bestimmung der Serotoninkonzentration in den Zellüberständen der BON-Zellen, wird die Genexpression von SLC6A4 im Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäusen bestimmt, um zu untersuchen, ob Fructose (30% Fructose im Trinkwasser) und Natriumbutyrat (0,6mg/kg) in vivo auch eine Auswirkung auf die SERT-Expression haben. Die C57BL/6J Mäuse wurden für acht Wochen nach dem jeweiligen Diätplan ernährt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 11 zusammengefasst. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

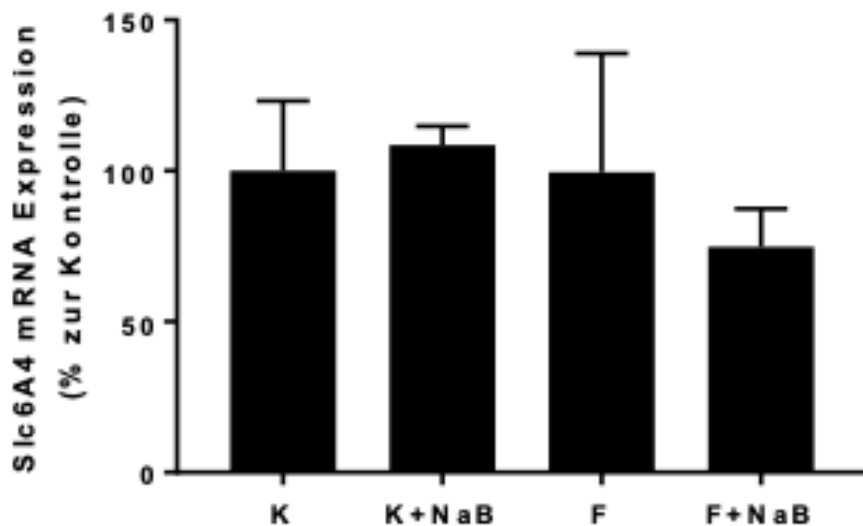


Abbildung 11 mRNA Expression vom SLC6A4-Gen bei Mäusen, die mit Standarddiät+Natriumbutyrat (n=4), Standarddiät+Fructose (n=4) und mit einer Mischung aus Standarddiät+Fructose+Natriumbutyrat (n=6) für acht Wochen behandelt wurden.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben.

F=Standarddiät+Fructose But=Standarddiät+Natriumbutyrat K=Standarddiät (Kontrolle)

Standarddiät= fructosereiche Nahrung

Zusätzlich zur Untersuchung der mRNA Expression werden repräsentative Färbungen von Paraffinschnitten, aus dem Dünndarmgewebe der C57BL/6J Mäuse, angefertigt. Auch hier ist kein bemerkenswerter Unterschied zu beobachten (siehe Abbildungen A-D). In den Abbildungen A sind die gefärbten SERT-Proteine der C57BL/6J Mäusen, die eine Standarddiät erhielten, zu sehen. Eindeutig sichtbar sind die braun-gelblich gefärbten Mikrovilli, die SERT exprimieren. Die C57BL/6J Mäuse, die zusätzlich 0,6g/kg KG Natriumbutyrat erhielten, zeigen eine ähnliche und zum Teil auch eine schwächere Intensität in der SERT-Färbung (siehe Abbildungen B). Bei den C57BL/6J Mäusen, die zusätzlich 30%ige Fructoselösung erhielten, kann man eine schwache Färbung beobachten (siehe Abbildungen C). Bei den C57BL/6J Mäusen, die zusätzlich 30%ige Fructoselösung und 0,6g/kg KG Natriumbutyrat erhielten, wurde eine starke Färbung des SERT beobachtet (siehe Abbildungen D). Eine densitometrische Auswertung ist aufgrund der intensiven und ungleichmäßigen Verteilung der Färbung in vielen Schnitten im Bereich der Zotten nicht möglich. Ein weiterer limitierender Faktor, für die Nicht-Durchführung der densitometrischen Färbung, sind qualitative Mängel des alten Gewebes, die in manchen Schnitten zu unregelmäßiger Verteilung der Färbung führte.

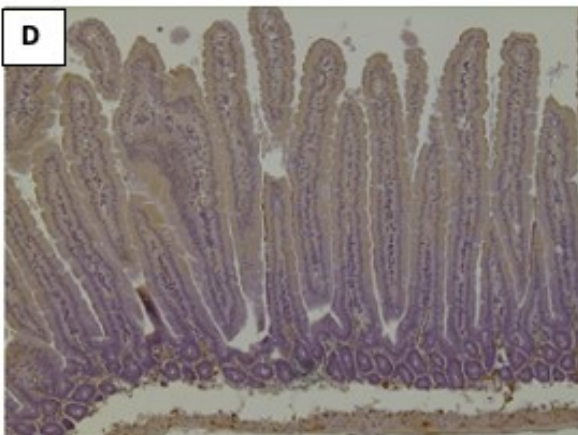
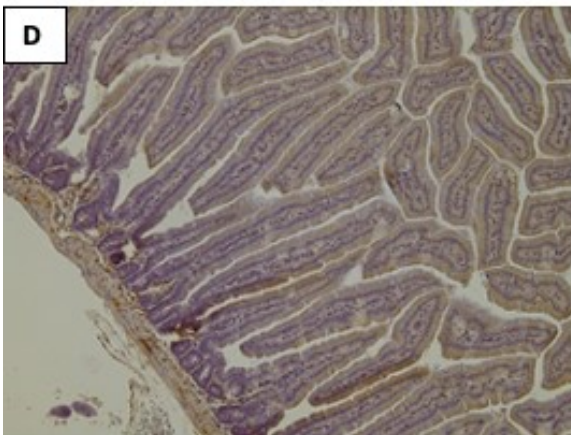
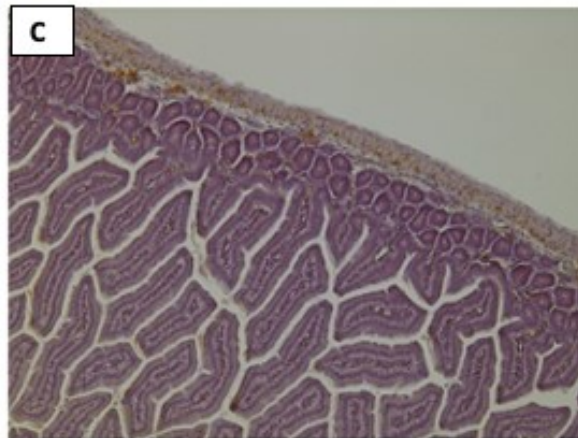
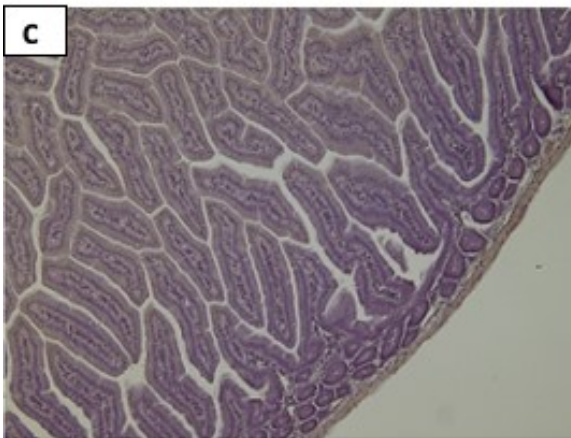
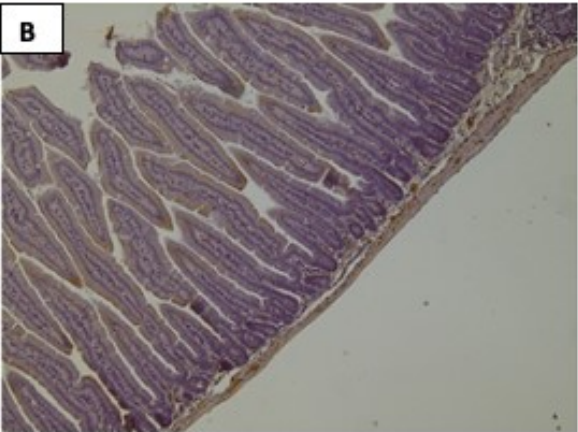
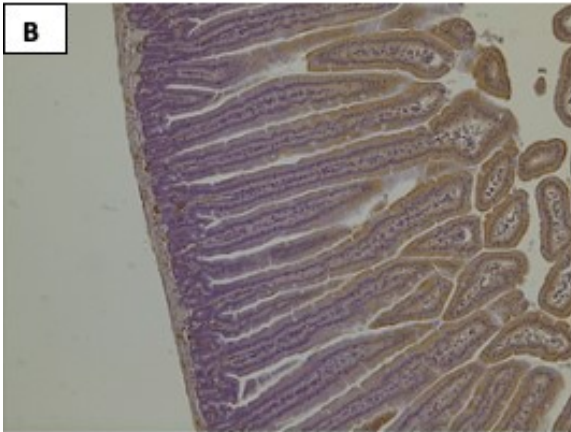
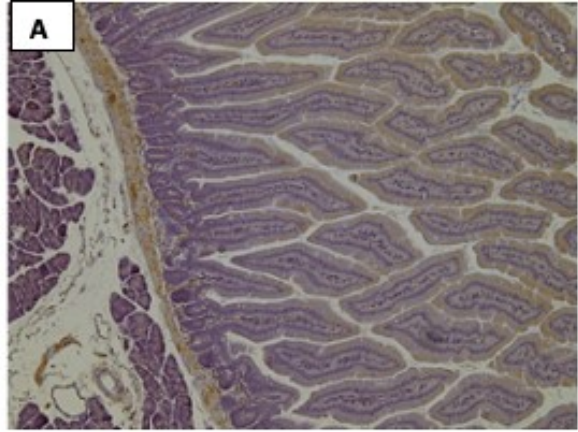
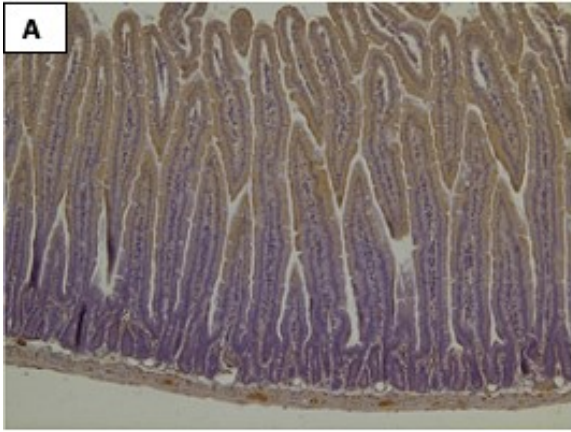


Abbildung 12 Einfluss von Standarddiät, Standarddiät +Natriumbutyrat, Standarddiät +Fructose, Standarddiät+Fructose+Natriumbutytrat auf die SERT-Proteinkonzentration im proximalen Dünndarm der für acht Wochen behandelten C57BL/6J Mäusen.

5. Diskussion

Die NAFLD stellt inzwischen die häufigste Lebererkrankung weltweit dar. Trotz aller Bemühungen sind jedoch die genauen Ursachen für die NAFLD noch nicht abschließend geklärt. Frühere Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass Natriumbutyrat die Entwicklung einer nichtalkoholischen Fettleber abschwächt (Baumann et al, 2020). Diese Ergebnisse stammen aus einem Mausmodell mit acht Wochen alten C57BL / 6J-Mäusen, die mit einer fettreichen und fructosereichen Diät gefüttert wurden. Nach acht Wochen erhielten die Mäuse zusätzlich eine Natriumbutyratsupplementierung. Mäuse, die eine Fett-Fructose-Cholesterinreiche Diät (FFC-Diät) erhielten, entwickelten eine nichtalkoholische Steatohepatitis, mit einer signifikanten Erhöhung der Entzündungsparameter $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 in der Leber (Baumann et al, 2020). Mit Natriumbutyrat gefütterte Mäuse zeigten wesentlich geringere Entzündungswerte, ebenfalls in der Leber. Die Natriumbutyratsupplementierung hatte jedoch keinen Einfluss auf den durch die FFC-Diät verursachten Verlust der Tight-Junctions - und damit die Darmbarrierefunktion - im Dünndarm (Baumann et al, 2020). Yabut et al konnten mit ihrer Studie eine positive Wirkung von Fettsäuren und Glukose auf die Serotoninproduktion in den enterochromaffinen Zellen des Darms nachweisen (Julian M Yabut, 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Natriumbutyrat und/oder Fructose einen Einfluss auf die Serotoninkonzentration in einem Modell der enterochromaffinen Zellen (BON-Zelllinie) hat.

5.1 Die BON-Zelle als Modell der EC-Zellen des Darms

Die enterochromaffinen Zellen des Darms sind zum Großteil an der Synthese des körpereigenen Serotonins beteiligt (Nicholas W. Bellono, 2018). Bis zu 95% des Gesamtgehalts an Serotonin im Körper wird von den enterochromaffinen Zellen bereitgestellt (Ravinarayan Raghupathi, 2016). Die BON-Zelllinie hat ihren Ursprung in den

EC-Zellen des Darms und kann Serotonin produzieren und sezernieren. Das genaue Funktionsprinzip ist bis heute unklar. Wahrscheinlich besitzt hierbei die Zusammenarbeit verschiedener Dopaminrezeptoren eine große Bedeutung (K Lemmer, 2002). Schäfermeyer et al konnten in der eigenen Studie zeigen, dass die BON-Zellen in Stimulationsexperimenten ähnliches Verhalten aufweisen (Schäfermeyer, Isolierung und funktionelle Charakterisierung der enterochromaffinen Zellen im Dünndarm, 2005). Dieses ähnliche Verhalten ist ein großer Vorteil um die Auswirkungen von bestimmten Stimuli im Modell der EC-Zellen des Darms zu untersuchen. Die BON-Zellen können in Inkubationsgeräten, unter Einhaltung der Bedingungen für das optimale Wachstum (siehe Material-Teil), aufbewahrt werden und für einige Zeit kultiviert werden. Durch die Simulation der EC-Zellen des Darms werden weniger Tiere für die Versuche benötigt. Als Modell für die enterochromaffinen Zellen stellen die BON-Zellen daher ein angemessenes System dar. Die BON-Zelllinie wurde ursprünglich aus einem 28-jährigen Pankreastumor-Patient gewonnen und eine kontinuierliche Zelllinie wurde etabliert. Der Name „BON“ ist willkürlich gewählt und hat keine eindeutige Bedeutung (B M Evers, 1994).

5.2 Einfluss von Natriumbutyrat und Fructose auf die Serotoninkonzentration in BON-Zellen

Natriumbutyrat steigert signifikant die Serotoninkonzentration in BON-Zellen.

Fructose führt zu keiner signifikanten Veränderung der Serotoninkonzentration in BON-Zellen.

Serotonin hat eine große Bedeutung für einige Abläufe im Körper. Die Hauptfunktion des Serotonins im enterischen Nervensystem besteht darin die Motilität des GI-Trakts zu steuern (Narek Israelyan, 2019) (Synia Haub G. K., 2010). Darüber hinaus werden der periphere und der zentrale Gefäßtonus mitreguliert. Eine Störung des Serotoninstoffwechsels könnte auch als ein Grund für die Entstehung des Reizdarmsyndrom diskutiert werden (Duo-Chen Jin, 2016). Auch bei Bluthochdruck wurden einige Auswirkungen des Serotonins auf den Körper beobachtet (L F Mohammad-Zadeh, Pubmed, 2008). Im Gastrointestinaltrakt erfolgt, aufgrund der Einwirkung von Stimuli (beispielsweise: Natriumbutyrat, Bombesin, Noradrenalin) die Einwanderung von Ca^{2+} vom Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum

und damit verbunden wird Serotonin vermehrt freigesetzt (Leah Zelkas, 2015). Serotonin (5-HT) reguliert ebenfalls die Permeabilität des Darms und Translokation von Endotoxinen (Ina Bergheim et al, 2008). Die Freisetzung und Wiederaufnahme des Serotonins erfolgt über einen spezifischen Serotonintransporter. Ist dieser Transporter in seiner Funktion gestört, so kann Serotonin seine physiologische Wirkung nicht ausüben und es entstehen, damit verbunden, Krankheiten in vielen Organen - darunter auch in der Leber (Synia Haub G. K., 2010).

Siddique et al. konnten zeigen, dass verschiedene Substanzen eine stimulierende Wirkung auf die Serotoninsynthese haben. Die BON Zellen konnten nach der Stimulation mit Isoproterenol (900nM), Cholecystokin(130nM), PACAP (0,12nM Hypophysenadenylatcyclase-aktivierendes Polypeptid), Bombesin (15nM) und Acetylcholin (0,2nM) die Serotoninsyntheserate erhöhen. Somatostatin wirkt inhibierend auf die Serotoninproduktion in den BON-Zellen (Zakiya-Luna Siddique, 2009). Ein signifikanter Anstieg der Serotoninkonzentration konnte durch die Inkubation von BON-Zellen mit unterschiedlich konzentrierten Glukoselösungen von 10-150mM erzielt werden (M Kim, Pubmed, 2001). Glukose konnte auch nach 12-stündiger Inkubation in einem Konzentrationsbereich von 50mM-150mM die Serotoninkonzentration in den BON-Zellen erhöhen. Die maximale Serotoninkonzentration wurde bei der Inkubation der BON-Zellen mit 50mM Glukoselösung erzielt. In derselben Arbeit konnten Mannitol (10mM-150mM) und Fructose (50mM, 20 Minuten Inkubationszeit) zu keiner Änderung der Serotoninkonzentration führen (M Kim, Pubmed, 2001). Die Anwendung höherer Fructosekonzentration (300mM) führte bei 8-16 Woche alten C57BL/6 Mäuse zu einer signifikanten Zunahme in der Serotoninkonzentration im Dünndarm der Tiere (Alyce M. Martin A. L., 2017). Einem tierexperimentellen Versuch zufolge konnten Silva et al. an 4-6 Woche alten athymischen Nacktmäusen zeigen, dass die Anwendung von absteigenden Konzentrationen des PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) zu einer Zunahme der Serotoninkonzentration führen (Scott R. Silva, 2011). Schäfermeyer et al konnten in ihrer Studie mit BON-Zellen, durch die Stimulation mit Noradrenalin (1mM) für 60 Min, die Serotoninkonzentration signifikant erhöhen. Der Versuch, die Serotoninfreisetzung mit 1ml Chromoglycinsäurelösung (200µg) zu hemmen lieferte dabei keine positiven Ergebnisse (Schäfermeyer, Isolierung und funktionelle Charakterisierung der enterochromaffinen Zellen im Dünndarm, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen einen signifikanten Einfluss von Natriumbutyrat auf die Serotoninkonzentration. Eine Inkubation mit 0,3mM Natriumbutyrat steigert sowohl nach 2 Stunden als auch nach 18 Stunden die Serotoninkonzentration im Zellkulturmedium der BON-Zellen. Eine Dosis-Wirkungs-Beziehung ist sichtbar. Somit wird gezeigt, dass Natriumbutyrat die Serotoninproduktion in enterchromaffinen Zellen des Darms steigert. Bislang wurden keine ähnlichen Arbeiten über den Einfluss von Natriumbutyrat auf die Serotoninkonzentration in den BON-Zellen durchgeführt. In keinen der obigen Literaturen liegen weiteren Indizien vor, die zeigen, dass bei einer niedrigeren Fructosekonzentration die Serotoninproduktion beeinflusst werden kann. Daher wurde bei dieser Arbeit ein Konzentrationsbereich von 2,5mM- 50mM Fructose angewandt. Die Ergebnisse zeigen, dass nach 2 Stunden Inkubationszeit, Fructose zu keiner signifikanten Veränderung in der Serotoninkonzentration im Zellkulturmedium der BON-Zellen geführt hat. Nach 18 Stunden konnte bei 2,5mM und bei 10mM eine Abnahme in der Serotoninkonzentration im Zellkulturmedium beobachtet werden, jedoch war die Abnahme nicht signifikant. Somit konnte gezeigt werden, dass Fructose bei keiner Konzentration die Serotoninkonzentration signifikant beeinflusst.

5.3 Expression von SLC6A4 (SERT) mRNA im proximalen Dünndarm von C57BL/6J Mäusen

Fructose und Natriumbutyrat führen zu keinem Unterschied in der Expression des SLC6A4 mRNA im proximalen Dünndarm von C57BL/6J-Mäusen.

In der vorliegenden Arbeit führte die chronische Aufnahme von Fructose zu keiner Veränderung in der SERT-Expression. Die Bestimmung der Genexpression von SLC6A4 (SERT) mRNA im proximalen Dünndarm von Fructose-gefütterten C57BL/6J Mäusen liefert keine signifikante Änderung aufgrund der Streuung der Daten innerhalb der Gruppe, die mit Fructose gefüttert wurden.

Der Serotonin-Wiederaufnahme-Transporter (SERT) reguliert das Gleichgewicht der Neurotransmitter im gesamten Körper (Jonathan A Coleman D. Y.-C., 2019). Ein Funktionsverlust des SERT kann zu schweren Leberstörungen, darunter die nichtalkoholische Fettleber, führen (Synia Haub G. K., 2010). Studien weisen darauf hin, dass die genetische Deletion von SERT in den C57BL/6J Mäusen die Entstehung von NAFLD begünstigt (Synia Haub G. K., 2010). Die in der Arbeit von Haub et al beschriebene Veränderung in der Expression von SERT in fructosegefügterten Mäusen konnte nicht bestätigt werden, da das benutzte Darmgewebe, aufgrund der längerfristigen Aufbewahrung bei kühlen Temperaturen, deutlich verändert war. Jin et al. konnten mit ihrer Arbeit aus dem Jahr 2016 zeigen, dass das Reizdarmsyndrom möglicherweise durch ein gestörtes serotonerges System verursacht sein könnte (Duo-Chen Jin, 2016). Coates et al. konnten zuvor zeigen, dass bei Menschen mit einem Reizdarmsyndrom eine geringere Expression von SERT in Darmmukosa zu finden ist (Matthew D Coates, 2004). Durch die geringe Expression des SERT wird weniger Serotonin aus dem präsynaptischen Spalt im Lamina propria im Darmmukosa aufgenommen und somit steigt die Konzentration des Serotonins im Darmlumen (Duo-Chen Jin, 2016).

Esmaili et al. konnten durch die Infektion der Caco-2 Zellen mit enterohepatischen E.coli zeigen, dass die SERT-Aktivität abnimmt (Ali Esmaili, 2009). Akiba et al. konnten in ihrer durchgeführten Studie zeigen, dass eine orale Supplementierung von L-Tryptophan zu einer Abnahme der Leberlipide, insbesondere Triglyceride, führt (Y Akiba, 1992). Eine orale Supplementierung des Tryptophans führte des weiteren, in einem Mausversuch mit C57BL/6J-Mäusen auch zu einem erniedrigten Auftreten von NAFLD (nicht alkoholische

Fettleber). Die erniedrigten Entzündungswerte (Interleukin 6, Tumornekrosefaktor alpha) deuteten auf ein vermindertes Auftreten von NAFLD hin (Eder Marcolin, 2012). Dass eine gestörte Darmbarrierefunktion eine wichtige Ursache für die Entwicklung einer NAFLD ist, wurde bereits mehrfach belegt (Synia Haub G. K., 2010) (Yvonne Ritze G. B., 2014). Die Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppen zeigten, dass unter der Zufuhr von oralen Natriumbutyrat die Entzündungswerte in der Leber im Mausmodell abnehmen und damit direkt verbunden auch die Wahrscheinlichkeit einer NAFLD minimiert wird (Baumann et al, 2020). In einem Mausmodell (C57BL-6 Mäuse) konnten Ritze et al. zeigen, dass die Anwendung von einfach ungesättigter oder gesättigter Fettsäure die Entwicklung einer Fettlebererkrankung fördern (Yvonne Ritze M. B., 2013). Jegatheesan et al. zeigten eine Zunahme des oxidativen Stress, der zur Erhöhung der Entzündungswerte in der Leber führt (Prasanthi Jegatheesan, 2017). Die Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe zeigte zuvor einen ähnlichen Anstieg in den Entzündungswerte unter einer fructosereichen Diät in SERT-knockout Mäusen (Synia Haub G. K., 2010). Eine Studie aus dem Jahr 2014 zeigte, dass eine orale Supplementierung von Tryptophan in 8 Woche alten C57BL/6J-Mäuse zu einer gesteigerten Synthese des tight junctions protein „Occludin“ führt, welche für die normale Darmbarrierefunktion von großer Bedeutung ist (Yvonne Ritze G. B., 2014). Ebenfalls konnte die minimalen SERT-Expressionen durch die orale Supplementierung von Tryptophan wieder normalisiert werden. Die dafür verantwortlichen Mechanismen für diesen Prozess sind jedoch bis heute nicht geklärt. Wahrscheinlich besteht ein kausaler Zusammenhang bei der Entstehung einer NAFLD zwischen einem gestörten serotonergen System im enterischen Nervensystem und der Abnahme der Darmbarrierefunktion (Yvonne Ritze G. B., 2014). Lowette et al konnten in einer Studie zeigen, dass chronische Fructosezufuhr zu einer Abnahme der SERT-Konzentration in männlichen Mäusen geführt haben (K Lowette, 2016). Nach einer 6-wöchigen Fructosediat wurden dabei die Genexpression und enterische neuronale Aktivität mittels RT-qPCR und Ca^{2+} -Imaging bestimmt (K Lowette, 2016). Auch die Anzahl an serotoninabhängigen Neuronen ist signifikant gesunken (K Lowette, 2016). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Immunohistochemische Färbung des Darmgewebes von Fructose-gefütterten C57BL-6 Mäuse lieferte keine eindeutigen Ergebnisse da eine densitometrische Auswertung, aufgrund der intensiven und ungleichmäßigen Verteilung der Färbung in vielen Gewebsschnitten im Bereich der Zotten, nicht möglich war.

Insgesamt ist eine Steigerung der SERT-Expression im Darm der C57BL/6J-Mäuse, die zusätzlich eine Natriumbutyrat-Diät erhalten haben, zu erkennen. Die vorliegende Arbeit unterstützt somit, die Ergebnisse von Baumann et al. Die Erhöhung der SERT durch Natriumbutyrat im Dünndarm könnte womöglich zu einer Abschwächung der Progression des NAFLD führen. Da die Erhöhung der SERT-Expression in diesen Mäusen nicht signifikant war, kann jedoch keine sichere Aussage getroffen werden.

Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Natriumbutyrat ein Modulator der endogenen Serotoninsynthese im Darm sein könnte. Da jedoch in der vorliegenden Arbeit ein in vitro Modell der enterochromaffinen Zellen verwendet wurde, sind weitere Untersuchungen nötig, um zu überprüfen, ob Natriumbutyrat auch in vivo einen Effekt auf die Serotoninsynthese im Darm hat. Die Ergebnisse weisen jedoch auf darauf hin, dass oral aufgenommenes Natriumbutyrat oder auch rektal zugeführtes Natriumbutyrat einen Einfluss auf Essgewohnheit und Peristaltik haben kann. Ob hier ein Kontext mit der Wirkung von Natriumbutyrat auf das Serotonin in der vorliegenden Arbeit besteht, muss noch geklärt werden.

Fructose hingegen hatte nach 2 Stunden Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Serotoninsynthese im Zellkulturmedium der BON-Zellen. Nach 18 Stunden konnte jedoch eine Abnahme der Serotoninkonzentration (besonders bei 2,5mM Fructoselösung und 10mM Fructoselösung) im Zellkulturmedium beobachtet werden. Die Hypothese, dass Fructose die Serotoninkonzentration signifikant erhöht, (Alyce M. Martin A. L., 2017) wurde sowohl im Zellkulturmodell als auch im Mausmodell teilweise widerlegt. Für eine abschließende Bewertung fehlen jedoch weitere Ergebnisse mit dem Zellkulturmodell. Auch Natriumbutyrat gefütterte C57BL/6J Mäuse (Standarddiät+Natriumbutyrat) zeigen einen leichten Anstieg der SERT-Expression. Dieses Ergebnis konnte zuvor auch durch die eigene Arbeitsgruppe bestätigt werden (Baumann et al, 2020). Ein möglicher Grund, dass der Einfluss von Natriumbutyrat auf die SERT-Expression nicht signifikant erhöht ist, könnte sein, dass nur wenig eingefrorenes Gewebe zur Beurteilung herangezogen wurde. Für eine abschließende Beurteilung fehlen auch hier weitere Daten. Eine densitometrische Analyse der Dünndarmgewebe von C57BL/6J-Mäuse konnte nicht durchgeführt werden, da das eingesetzte Gewebe nicht in allen Bereichen der Zotten einheitliche Färbung lieferte.

Für die Beurteilung, ob Natriumbutyrat in Zukunft für die Therapie von NAFLD eingesetzt werden kann, liefert die vorliegende Arbeit jedoch neue Ansatzpunkte für weitere Forschungen. Schlussfolgernd kann man sagen, dass das Natriumbutyrat in der vorliegenden Arbeit stimulierend auf die Serotoninkonzentration

Zusammenfassung

Die molekularen Mechanismen, die bei der Entstehung der NAFLD zugrunde liegen, sind bisher noch nicht abschließend geklärt. Studien weisen darauf hin, dass Veränderungen der intestinalen Mikrobiota und der Darmbarrierefunktion hier von Bedeutung sind. In diesem Kontext werden auch Störungen in der Serotoninsynthese und des Serotonin Reuptake Transporter diskutiert. Studien der eigenen Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass hier Fructose von Bedeutung sein könnte und das Natriumbutyrat diesen beeinflussen könnte. Dass die SERT-Expression, durch die Zufuhr von Fructose in C57BL/6J-Mäusen, abnimmt konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Weitere Studien sind notwendig, um diesen Effekt untersuchen zu können. Die Behandlung des funktionsgestörten SERT könnte in Zukunft eine mögliche Therapieoption für die Behandlung von NAFLD sein.

Um den Einfluss von Fructose und Natriumbutyrat auf die Serotoninsynthese zu untersuchen, wurden BON-Zellen jeweils für 2 Stunden und 18 Stunden mit 0-3mM Natriumbutyratlösung und 0-50mM Fructoselösung inkubiert. Nur die Zellen, die ein Alter von Passage 6-14 besitzen, wurden für die Durchführung der Messungen herangezogen. Die Messung der Serotoninkonzentration erfolgte mit einem Serotonin-ELISA-Kit.

Für die Untersuchung der Auswirkungen von Natriumbutyrat und Fructose auf die SERT-Expression wurden vorhandene Dünndarmstücke von C57BL/6J-Mäuse, die für 8 Wochen mit einer Standarddiät (Western-style Diät) und gleichzeitig mit Natriumbutyrat (0,6g/kg KG/d) oder Fructose+Natriumbutyrat oder Fructose gefüttert wurden, verwendet. Die Messung der Genexpression wurde mit einer Realtime-RT-PCR durchgeführt. Für die Beurteilung der SERT-Expression im Dünndarm wurde eine immunohistochemische Färbung der zuvor erwähnten Dünndarmstücke von C57BL/6J Mäuse durchgeführt.

Die Inkubation der BON-Zellen mit Natriumbutyrat führte sowohl nach 2 Stunden Inkubationszeit als auch nach 18 Stunden Inkubationszeit zu einer signifikanten Erhöhung der Serotoninkonzentration im Zellkulturmedium. Im Gegensatz dazu hatte Fructose nach 2 Stunden Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Serotoninkonzentration. Nach 18 Stunden konnte eine Abnahme in der Serotoninkonzentration im Zellkulturmedium beobachtet werden.

Die Messung der SERT-Expression mittels Realtime-RT-PCR im Dünndarm der C57BL/6J-Mäuse zeigte eine Zunahme der SERT-Expression in der Gruppe der Mäuse, die mit Standarddiät+ Natriumbutyrat behandelt wurden. Bei den Mäusen, die mit Standarddiät+ Fructose+ Natriumbutyrat behandelt wurden, konnte eine Abnahme in der SERT-Expression festgestellt werden.

Ob Natriumbutyrat eine direkte Auswirkung auf die Genexpression von SERT besitzt, sollte in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Weitere Studien sind notwendig, um die gleichen Auswirkungen von Natriumbutyrat auf die Serotoninkonzentration und die SERT-Expression im menschlichen Körper untersuchen zu können.

Summary

The molecular mechanisms underlying the development of NAFLD have not yet been completely resolved. Studies suggest that alterations in the intestinal microbiota and gut barrier function are also of significance. In this context, disorders in serotonin synthesis and the serotonin reuptake transporter are also discussed. Studies of own working group indicate that fructose could be of importance and that sodium butyrate could influence SERT. That SERT expression is decreased by fructose in C57BL/6J mice could not be confirmed in this work. Further studies are needed to investigate this effect. Treatment of the dysfunctional SERT may be a potential therapeutic option for the treatment of NAFLD in the future.

To investigate the effect of fructose and sodium butyrate on serotonin synthesis, BON cells were incubated with 0-3mM sodium butyrate solution and 0-50mM fructose solution each for 2 hours and 18 hours. Only the cells possessing an age of passage 6-14 were used to perform the measurements. Serotonin concentration was measured using a serotonin ELISA-Kit.

To study the effects of sodium butyrate and fructose on SERT expression, available small intestinal pieces from C57BL/6J mice fed a standard diet (Western-style diet) for 8 weeks additional to sodium butyrate (0.6g/kg BW/d) or fructose+sodium butyrate or fructose were used. Measurement of gene expression was performed using real-time RT-PCR. For assessment of SERT expression in the small intestine, immunohistochemical staining of the previously mentioned small intestinal sections of C57BL/6J mice was performed.

Incubation of BON cells with sodium butyrate resulted in a significant increase in serotonin concentration in the cell culture medium after both 2 hours of incubation and 18 hours of incubation. In opposite, fructose had no significant effect on serotonin concentration after 2 hours of incubation. After 18 hours, a decrease in serotonin concentration was observed in the cell culture medium.

Measurement of SERT expression by real-time RT-PCR in the small intestine of C57BL/6J mice showed an increase in SERT expression in the group of mice treated with standard

diet+ sodium butyrate. A decrease in SERT expression was seen in the mice treated with standard diet+ fructose+ sodium butyrate.

Whether sodium butyrate has a direct effect on SERT gene expression should be clarified in further studies. Additional further studies are needed to investigate the same effects of sodium butyrate on serotonin concentration and SERT expression in the human body.

Literaturverzeichnis

- Ali Esmaili, S. F. (10. September 2009). *Pubmed*. Von Enteropathogenic E coli Infection Inhibits Intestinal Serotonin Transporter (SERT) Function and Expression: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3727418/> abgerufen
- Alyce M. Martin, A. L. (2017). *Pubmed*. Von Regional differences in nutrient-induced secretion of gut serotonin: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371566/pdf/PHY2-5-e13199.pdf> abgerufen
- Andromeda Linan-Rico, F. O.-C.-A. (16. Dezember 2016). Von Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2016.00564/full> abgerufen
- Armin Ritzhaupt, I. S.-B. (15. Dezember 1998). *Pubmed*. Von Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: its potential to transport l-lactate as well as butyrate : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2231331/> abgerufen
- B M Evers, J. I. (September 1994). *Pubmed*. Von The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1712329/> abgerufen
- Baumann et al, C. J. (April 2020). *Pubmed*. Von Oral Supplementation of Sodium Butyrate Attenuates the Progression of Non-Alcoholic Steatohepatitis: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7231312/> abgerufen
- Brian T Layden, A. R. (März 2013). *Pubmed*. Von Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23146568/> abgerufen
- Bultman, S. J. (8. September 2015). *Pubmed*. Von The microbiome and its potential as a cancer preventive intervention: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26970128/> abgerufen
- C S Byrne, 1. E. (September 2015). *Pubmed*. Von The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4564526/> abgerufen
- Carey D. Balaban, B. J. (16. Juli 2016). *Pubmed*. Von What Is Nausea? A Historical Analysis of Changing Views: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5203950/> abgerufen
- Catherine S. Lee, N. P. (15. Juni 2002). *Pubmed*. Von Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186338/> abgerufen

- Cheng Jun Jin, C. S. (Dezember 2015). *Pubmed*. Von Supplementation of sodium butyrate protects mice from the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH): <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26450277/> abgerufen
- Courtney M. Townsend, J. I. (8. Juli 2009). *Studies of Growth Regulation in a Neuroendocrine*. Von <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/02841869309083900> abgerufen
- D Sarrouilhe, J. C. (2015). *Pubmed*. Von Serotonin and cancer: what is the link?: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601469/> abgerufen
- D. Jokisch, C. B. (2005). *Springer*. Von Das serotonerge System und Kognition: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-7985-1537-9_4 abgerufen
- Damien J Keating, N. J. (21. Juni 2018). *Pubmed*. Von What is the role of endogenous gut serotonin in the control of gastrointestinal motility?: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29935946/> abgerufen
- Diego J Walther, M. B. (1. November 2003). *Pubmed*. Von A Unique Central Tryptophan Hydroxylase Isoform: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14563478/> abgerufen
- Dubravka Švob Štrac, N. P.-Š. (9. Mai 2016). *Pubmed*. Von The serotonergic system and cognitive function: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5017596/> abgerufen
- Duo-Chen Jin, H.-L. C.-Q.-N.-M.-M. (September 2016). *Pubmed*. Von Regulation of the serotonin transporter in the pathogenesis of irritable bowel syndrome: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27688655/> abgerufen
- Eder Marcolin, B. S.-M.-G. (Oktober 2012). *Pubmed*. Von Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22915297/> abgerufen
- Frédéric Moens, S. W. (16. August 2016). *Pubemd*. Von Bifidobacterial inulin-type fructan degradation capacity determines cross-feeding interactions between bifidobacteria and *Faecalibacterium prausnitzii*: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27233082/> abgerufen
- G S Taylor, R. A. (Januar 1988). *Pubmed*. Von Intrinsic control of the gut : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3289636/> abgerufen
- Göthert, M. (2013). *Pubmed*. Abgerufen am 2020 von Serotonin Discovery and Stepwise Disclosure of 5-HT Receptor Complexity Over Four Decades. Part I. General Background and Discovery of Serotonin as a Basis for 5-HT Receptor Identification: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24145072/?from_term=enteramin+erspamer&from_exact_term=enteramine+erspamer&from_pos=1
- George K. Papadimasa, K. N. (09. 04 2012). *The emerging role of serotonin in liver regeneration*. Von <https://smw.ch/article/doi/smw.2012.13548> abgerufen

- Gwen Tolhurst, H. H. (Februar 2012). *Pubmed*. Von Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22190648/> abgerufen
- Heidenhain. (1870).
- Helander, H. (2014. April 2014). *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. Von Surface area of the digestive tract – revisited: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00365521.2014.898326?journalCode=igas20> abgerufen
- Henagan, S. M. (12. Dezember 2017). *Nutrients*. Von Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748798/pdf/nutrients-09-01348.pdf> abgerufen
- Ina Bergheim et al, S. W. (Juni 2008). *Pubmed*. Von Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18395289/> abgerufen
- J H CUMMINGS, E. W. (1987). *Pubmed*. Von Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1433442/pdf/gut00248-0039.pdf> abgerufen
- James S. Sutcliffe, R. J. (August 2005). *Pubmed*. Von Allelic Heterogeneity at the Serotonin Transporter Locus (SLC6A4) Confers Susceptibility to Autism and Rigid-Compulsive Behaviors: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1224529/> abgerufen
- Jean Guy LeBlanc, F. C.-H. (8. Mai 2017). *Pubmed*. Von Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5423028/> abgerufen
- Jian Tan, C. M. (2014). *Pubmed*. Von The role of short-chain fatty acids in health and disease: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24388214/> abgerufen
- Jonathan A Coleman, D. Y.-C. (Mai 2019). *Pubmed*. Von Serotonin transporter-ibogaine complexes illuminate mechanisms of inhibition and transport: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31019304/> abgerufen
- Jonathan A Coleman, E. M. (21. April 2016). *Pubmed*. Von X-ray Structures and Mechanism of the Human Serotonin Transporter: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27049939/?from_term=serotonin+transporter&from_pos=3 abgerufen
- Julian M Yabut, J. D. (1. August 2019). *Pubmed*. Von Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30901029/> abgerufen

- K Lemmer, G. A.-H.-S. (28. Juni 2002). *Pubmed*. Von Expression of dopamine receptors and transporter in neuroendocrine gastrointestinal tumor cells: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12072155/> abgerufen
- K Lowette, A.-S. D. (28. September 2016). *Pubmed*. Abgerufen am April 2021 von Fructose consumption impairs serotonergic signaling in the murine enteric nervous system: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27098706/>
- L F Mohammad-Zadeh, L. M.-B. (Juni 2008). *Pubmed*. Von Serotonin: a review: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18471139/> abgerufen
- Leah Zelkas, R. R. (15. Dezember 2015). *Pubmed*. Von Serotonin-secreting enteroendocrine cells respond via diverse mechanisms to acute and chronic changes in glucose availability: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-015-0051-0> abgerufen
- M Kalliomäki, P. K. (Januar 2001). *Pubmed*. Von Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11150002/> abgerufen
- M Kim, H. J. (Dezember 2001). *Pubmed*. Von D-glucose Releases 5-hydroxytryptamine From Human BON Cells as a Model of Enterochromaffin Cells: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11729119/?from_single_result=d+glucose+release+s+5+hydroxytryptamine+from+human+bon+cells abgerufen
- M Skipper, J. L. (Januar 2000). *Pubmed*. Von Getting to the guts of enteroendocrine differentiation: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10615112/> abgerufen
- Mark A Cuff, D. W.-B. (1. März 2002). *Pubmed*. Von Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2290148/> abgerufen
- Mark P Rondeau, K. M. (Juni 2003). *Pubmed*. Von Short chain fatty acids stimulate feline colonic smooth muscle contraction: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12765627/> abgerufen
- Martha Douglas-Escobar, E. E. (April 2013). *Pubmed*. Von Effect of intestinal microbial ecology on the developing brain: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23400224/> abgerufen
- Matthew D Coates, C. R. (Juni 2004). *Pubmed*. Von Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15188158/> abgerufen
- Medha Priyadarshini, K. U. (18. Juni 2019). *Pubmed*. Von Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6058973/pdf/nihms-981452.pdf> abgerufen

- N L Pillinger, P. K. (ai 2017). *Pubmed*. Von Endothelial glycocalyx: basic science and clinical implications: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28486888/> abgerufen
- Narek Israelyan, A. D. (August 2019). *Pubmed*. Von Effects of Serotonin and Slow-Release 5-Hydroxytryptophan on Gastrointestinal Motility in a Mouse Model of Depression: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31071306/> abgerufen
- Nathalie Vergnolle, C. C. (1. Juli 2018). *Pubmed*. Von Neurons and Glia in the Enteric Nervous System and Epithelial Barrier Function: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6088142/> abgerufen
- Nicholas W. Bellono, J. R. (29. Juni 2018). *Pubmed*. Von Enterochromaffin cells are gut chemosensors that couple to sensory neural pathways: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5839326/> abgerufen
- P S Kamath, M. T. (Oktober 1987). *Pubmed*. Von Short-chain fatty acids stimulate motility of the canine ileum: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3661705/> abgerufen
- Prasanthi Jegatheesan, J.-P. D. (9. März 2017). *Pubmed*. Von Fructose and NAFLD: The Multifaceted Aspects of Fructose Metabolism: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372893/> abgerufen
- R.Mackay Laurence Macia, J. T. (2014). *Elsevier*. Von The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128001004000039?via%3Dihub> abgerufen
- Ravinarayan Raghupathi, C. F. (Juli 2016). *Pubmed*. Von Fusion Pore Size Limits 5-HT Release From Single Enterochromaffin Cell Vesicles: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26574734/> abgerufen
- Rudnick, F. K. (14. März 2000). *Pubmed*. Von Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16200/> abgerufen
- S K Sarna, M. F. (18. Juni 1989). *Small intestinal physiology and pathophysiology*. Von Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2668175/> abgerufen
- S Miquel 1, R. M.-H. (Juni 2013). *Pubmed*. Von Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831042/> abgerufen
- Sarah J MacEachern, C. M. (Mai 2018). *Pubmed*. Von Alterations in melatonin and 5-HT signalling in the colonic mucosa of mice with dextran-sodium sulfate-induced colitis : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900989/> abgerufen
- Satoshi Fukumoto, M. T. (Mai 2003). *Pubmed*. Von Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12676748/> abgerufen
- Schäfermeyer, A. (2005). Isolierung und funktionelle Charakterisierung der enterochromaffinen Zellen im Dünndarm. TU München.

- Scott R. Silva, Y. Y. (April 2011). *Pubmed*. Von The Effect of PTEN on Serotonin Synthesis and Secretion from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3160779/pdf/nihms-318264.pdf>
 abgerufen
- Sean M. McNabney, T. M. (Dezember 2017). *Pubmed*. Von Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748798/> abgerufen
- Sonja Bialowas, M. H.-E. (26. Juli 2016). *Pubmed*. Von Rotavirus and Serotonin Cross-Talk in Diarrhoea:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961431/pdf/pone.0159660.pdf>
 abgerufen
- Synia Haub, G. K. (März 2010). *Pubmed*. Von Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19713474/> abgerufen
- W. M. Bayliss, E. H. (11. Mai 1899). *Pubmed*. Von The movements and innervation of the small intestine:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1516636/pdf/jphysiol02595-0001.pdf> abgerufen
- Welcome, M. O. (2018). *Gastrointestinal Physiology: Development, Principles and Mechanisms of Regulation*. Springer Verlag.
- Werend Boesmans, M. M. (Juni 2019). *Pubmed*. Von Structurally defined signaling in neuroglia units in the enteric nervous system: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30730592/> abgerufen
- Y Akiba, K. T. (August 1992). *Pubmed*. Von L-tryptophan alleviates fatty liver and modifies hepatic microsomal mixed function oxidase in laying hens:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1355043/> abgerufen
- Yvonne Ritze, G. B. (14. Juli 2014). *Pubmed*. Von Effect of tryptophan supplementation on diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24708895/> abgerufen
- Yvonne Ritze, M. B. (9. Dezember 2013). *Pubmed*. Von Role of serotonin in fatty acid-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029732/> abgerufen
- Zakiya-Luna Siddique, I. D. (18.. März 2009). *Pubmed*. Abgerufen am 2020 von KRJ-I and BON cell lines: defining an appropriate enterochromaffin cell neuroendocrine tumor model: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19295186/>
- Zemper, K. T. (18. September 2018). *The Enteric Nervous System for Epithelial Researchers: Basic Anatomy, Techniques, and Interactions With the Epithelium*. Von Pubmed:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6718943/pdf/main.pdf> abgerufen

Zhiwei Ang, D. X. (7. September 2017). *Pubmed*. Von FFAR2-FFAR3 receptor heteromerization modulates short-chain fatty acid sensing:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5731126/> abgerufen