

**Untersuchungen zur Rolle des intestinalen
serotonergen Systems in der Entstehung von
Adipositas und der nahrungsinduzierten nicht-
alkoholbedingten Fettlebererkrankung im
Mausmodell**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Ernährungsmedizin

vorgelegt von
Synia Haub

aus Darmstadt
2011

Dekan bzw. Dekanin: Prof. Dr. Hans Breer

1. berichtende Person: Prof. Dr. Stephan Bischoff

2. berichtende Person: Prof. Dr. Hans Breer

Eingereicht am: 17.01. 2011

Mündliche Prüfung am: 12.05.2011

Die vorliegende Arbeit wurde am 04.04.2011 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Abkürzungsverzeichnis	10
1. Einleitung	12
1.1 Die Adipositas	12
1.2 Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD).....	17
1.3 Das intestinale serotonerge System	22
1.4 Ziel der Arbeit.....	28
2. Material und Methoden.....	29
2.1 Material	29
2.1.1 Verwendete Tiermodelle.....	29
2.1.2 Genotypisierung von Mäusen	29
2.1.3 Charcoal-Gavage zur Bestimmung der Dünndarmmotilität	29
2.1.4 Gewebeentnahme und Fixierung.....	29
2.1.5 Triglyceridextraktion aus dem Lebergewebe	30
2.1.6 Histologische Färbungen.....	30
2.1.7 Untersuchungen des intestinalen serotonergen Systems	31
2.1.8 Alaninaminotransferase Enzymaktivitäts-Test	31
2.1.9 β -Hydroxybutyrate Enzymaktivitäts-Test	32
2.1.10 Endotoxin Messung.....	32
2.1.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	32
2.1.12 Untersuchungen der Genexpression auf mRNA-Ebene.....	32
2.1.13 Isolation von Gesamtprotein	33
2.1.14 Western Blot.....	33
2.1.15 Zellkulturversuch mit CaCo2 Zellen	34
2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	35
2.3 Software.....	35
2.4 Methoden	36
2.4.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Fütterungsstudien	36
2.4.1.1 Genotypisierung der verschiedenen genetisch veränderten Mäuse.....	36
2.4.1.2 Behandlung mit 30%iger Glukose- oder Fruktose Trinklösung und Tropisetron (Navoban)	38

2.4.1.3 Fütterung mit 30%iger Glukose- oder Fruktose-Trinklösung	39
2.4.1.4 Behandlung von genetisch bedingten adipösen Ob/Ob Mäusen mit Tropisetron (Navoban)	39
2.4.1.5 Charcoal-Gavage zur Untersuchung der Dünndarmmotilität.....	39
2.4.1.6 Gewebeentnahme	40
2.4.2 Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts	40
2.4.3 Histologische Färbungen	41
2.4.4 Untersuchung des serotonergen Systems im Darm.....	45
2.4.5 Kinetische Messung der Alaninaminotransferase (ALT) im Plasma	46
2.4.6 Messung der β -Hydroxybutyrat-Enzymaktivität im Plasma	47
2.4.7 Bestimmung der Endotoxinkonzentration im Plasma	47
2.4.8 Proteinbestimmung nach Bradford	48
2.4.9 RNA-Isolation	49
2.4.10 Western Blot zur Bestimmung der SERT (Serotonin Wiederaufnahme-Transporter) und Occludin Proteinkonzentration	50
2.4.11 In vitro Versuch mit CaCo2 Zellen	53
2.4.12 Statistik.....	54
3. Ergebnisse	56
3.1 Einfluß des 5-HT3 Antagonisten Tropisetron auf die Entwicklung des glukoseinduzierten Übergewichtes	56
3.2 Untersuchungen zur Rolle von Serotonin und SERT (Serotonin Wiederaufnahme-Transporter) in der Pathogenese der zuckerinduzierten NAFLD im Mausmodell	63
3.3 Einfluss der Behandlung von Ob/Ob Mäusen mit dem 5-HT3 Antagonisten Tropisetron auf die Entwicklung von Adipositas und die Manifestation der NAFLD	73
4. Diskussion.....	78
4.1 Die Rolle des intestinalen serotonergen Systems in der Entwicklung der glukoseinduzierten Adipositas	78
4.2. Einfluß des intestinalen serotonergen Systems auf die Entwicklung der zuckerinduzierten NAFLD.....	84
4.3 Die Rolle des intestinalen serotonergen Systems in der Entwicklung von NASH in einem genetisch adipösen Mausmodell	88
5. Zusammenfassung.....	93

6. Summary.....	96
Literaturverzeichnis	99
Danksagung.....	116
Curriculum Vitae.....	117
Eidesstattliche Erklärung.....	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Internationaler Vergleich des BMIs von Männern und Frauen.....	12
Abbildung 1.2 Biosynthese und Abbau von Serotonin.....	23
Abbildung 3.1.1 Effekt der 30%igen Glukoselösung mit gleichzeitiger Tropisetron- Behandlung auf die Gewichtszunahme	58
Abbildung 3.1.2 Effekt der Glukoseaufnahme auf die Anzahl der Serotonin-positiven Zellen im Duodenum	59
Abbildung 3.1.3 Effekt der Glukoseaufnahme im Trinkwasser und der gleichzeitigen Behandlung mit Tropisetron auf die Expression der Glukosetransporter im Duodenum und der Leber	60
Abbildung 3.1.4 Effekt von Tropisetron auf ChREBP, FAS und die Triglyceride in der Leber.....	61
Abbildung 3.1.5 Effekt von Tropisetron auf die Bdh1 Expression in der Leber und die Ketonkörper-Konzentration im Plasma.....	62
Abbildung 3.2.1 Effekt der chronischen Aufnahme von Glukose- und Fruktoselösung auf die Lipidakkumulation in der Leber von Mäusen.....	64
Abbildung 3.2.2 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf das intestinale serotonerge System von Mäusen und CaCo2 Zellen.....	65
Abbildung 3.2.3 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf die hepatische Lipidakkumulation von SERT-/- Mäusen.	67
Abbildung 3.2.4 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf die Endotoxinspiegel im Plasma	68
Abbildung 3.2.5 Konzentration an 4-Hydroxynonenal-Addukten und TNF α mRNA- Expression in der Leber von Wild-Typ und SERT-/- Mäusen nach chronischer Aufnahme von Wasser oder Zuckerlösungen.....	69
Abbildung 3.2.6 Effekt der Zuckerlösungen auf die Proteinkonzentration des Tight- Junction-Proteins Occludin im Duodenum von Mäusen.....	70
Abbildung 3.2.7 Auswirkung von Tropisetron auf die Lipidakkumulation in der Leber von zuckergefütterten Mäusen.....	71
Abbildung 3.2.8 Effekt von Serotonin auf die Permeabilität und die Protein- konzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin in vitro.	72
Abbildung 3.3.1 Effekt von Tropisetron auf die Pathologie der Leber in Ob/Ob Mäusen	75
Abbildung 3.3.2 Endotoxin im Plasma, MyD88 und TNF α mRNA-Expression in der	

Leber von Ob/Ob Mäusen nach der Behandlung mit Tropisetron	76
Abbildung 3.3.3 Effekt der Tropisetron-Aufnahme bei Ob/Ob Mäusen auf die Proteinkonzentration von Occludin im Duodenum.....	76
Abbildung 3.3.4 Effekt der Tropisetron-Aufnahme bei Ob/Ob Mäusen auf das intestinale serotonerge System.	77
Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des protektiven Effektes des Tropisetrons im Zusammenhang mit glukoseinduzierter Adipositas im Mausmodell.....	82
Abbildung 4.2 Möglicher Mechanismus wie das intestinale serotonerge System involviert ist in die Entwicklung der zuckerinduzierten NAFLD im Mausmodell..	86
Abbildung 4.3 Möglicher Mechanismus wie Tropisetron zur Verbesserung der Leberparameter in Ob/Ob Mäusen führt.....	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.4.1 Lysis-Puffer zur Isolation von DNA aus Mausschwanzgewebe	36
Tabelle 2.4.2 TE-Puffer zum Lösen der isolierten DNA	37
Tabelle 2.4.3 Pipettierschema für einen PCR-Ansatz	37
Tabelle 2.4.4 Primersequenzen für die Genotypisierung	37
Tabelle 2.4.5 PCR-Protokoll für die Genotypisierung.....	37
Tabelle 2.4.6 Verdau des PCR-Produktes von Ob/Ob Mäusen	37
Tabelle 2.4.7 TAE-Puffer für die Herstellung des Gels	38
Tabelle 2.4.8 5x Ladepuffer für die Beladung des Gels	38
Tabelle 2.4.9 Bandenfragmente zur Ermittlung des Genotyps	38
Tabelle 2.4.10 4% PBS-gepuffertes Formalin zur Fixierung von Gewebe	40
Tabelle 2.4.11 Einbettung von Gewebe für immunohistochemische Färbungen.....	42
Tabelle 2.4.12 Befundungsskala nach Nanji et al. zur Ermittlung des Grades der Leberverfettung (%), Inflammation und Nekrose im Lebergewebe	42
Tabelle 2.4.13 Färbung von Gewebeschnitten mit Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase.....	43
Tabelle 2.4.14 Fixierlösung der Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung.....	44
Tabelle 2.4.15 Färbelösung der Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung	44
Tabelle 2.4.16 Färbeprotokoll nach Anleitung des Herstellers	44
Tabelle 2.4.17 5-HT ELISA: Acylierung der Proben und Kontrollen	46
Tabelle 2.4.18 5-HT ELISA: Durchführung	46
Tabelle 2.4.19 Endotoxin: Verdünnungsreihe des E. coli Control Standard.....	47
Tabelle 2.4.20 Bradford: Pipettierschema zur Generierung einer Proteinstandard- kurve mit 100 mg/ml BSA Stammlösung	48
Tabelle 2.4.21 Durchführung der cDNA-Synthese.....	49
Tabelle 2.4.22 Primersequenzen und Gewebe, in denen diese detektiert wurden (Duodenum = D; Leber = L)	50
Tabelle 2.4.23 Realtime RT-PCR Protokoll	50
Tabelle 2.4.24 Zusammensetzung des RIPA-Puffers zur Proteinisolation	51
Tabelle 2.4.25 Zusammensetzung des 10%-igen Trenngels für Western Blot.....	51
Tabelle 2.4.26 Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels für Western Blot.....	52
Tabelle 2.4.27 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers (10x) für Western Blot	52
Tabelle 2.4.28 Zusammensetzung des Transferpuffers für Western Blot	53

Tabelle 2.4.29 Zusammensetzung des TBST-Puffers für Western Blot	53
Tabelle 2.4.30 Eigenschaften der Zelllinie CaCo2	53
Tabelle 2.4.31 Zusammensetzung des Zellkulturmediums zur Anzucht von CaCo2	54
Tabelle 2.4.32 Zusammensetzung des Starvationmediums zur Versuchsvorbereitung von CaCo2	54
Tabelle 3.1 Effekt der Aufnahme einer 30%iger Glukoselösung auf die Gewichtszunahme, die Kalorienaufnahme, die Dünndarmmotilität und die Anzahl Serotonin-positiver Zellen im Darm.	56
Tabelle 3.2 Effekt der Aufnahme einer 30%iger Glukoselösung und der gleichzeitigen Behandlung mit Tropisetron auf die Kalorienaufnahme und die Dünndarmmotilität	57
Tabelle 3.3 Auswirkung der chronischen Aufnahme von zuckergesüßtem Wasser auf die Gewichtszunahme, das Lebergewicht und das Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis	64
Tabelle 3.4 Effekt der Tropisetron-Behandlung auf das Körpergewicht, das Lebergewicht, das Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis, die Plasma ALT-Aktivität und die infiltrierten Neutrophilen in der Leber	73

Abkürzungsverzeichnis

ALD	alcoholic liver disease
ALT	Alaninaminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse
BMI	Body Mass Index
	Verhältnis von Körpergewicht zu (Körpergröße) ²
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	copy-DNA
ChREBP	Carbohydrate responsive binding element protein
cMet	hepatocyte growth factor receptor
dd H ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Mischung von Nukleotiden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere (Kollegen)
EtOH	Ethanol
F	Fruktose
FAS	Fatty acide synthetase
g	Gramm
G	Glukose
Glut2	Glukosetransporter 2
g/d	Gramm pro Tag
h	Stunde
HFCS	high fructose corn syrup
iNOS	inducible nitric oxide synthase
in vitro	in der Zellkultur (hier: CaCo-2)
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
K	Kontrollgruppe
KG	Körpergewicht
l	Liter
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
μ	mikro (10 ⁻⁶)
m	milli (10 ⁻³)
M	Mol
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH + H ⁺	reduzierte Form des NAD ⁺
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease

NASH	non-alcoholic steatohepatitis
Ob/Ob Knockout Mäuse	Leptin defiziente Mäuse
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxide species
TER	Transepithelialer Widerstand
rpm	rotations per minute
TLR-4	toll-like receptor 4
TNF α	tumor necrosis factor α
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	realtime polymerase chain reaction
sec	Sekunde
SEM	standard error of mean
SERT	Serotonin Wiederaufnahme-Transporter
5-HT	Serotonin
5-HT3R	Serotonin Rezeptor 3
5-HT3aR	Serotonin Rezeptor 3 Untereinheit a
SGLT1	Natrium-abhängiger Glukosetransporter 1
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WT	Wild-Typ
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens 1

1. Einleitung

1.1 Die Adipositas

Prävalenz, Verbreitung und Folgen von Adipositas

Nach Definition der Weltgesundheitsorganisation (WHO) spricht man bei einem Body Mass Index (BMI) $25 \leq 30$ von Übergewicht. Eine Adipositas liegt bei einem BMI von $30 \leq 35$ laut WHO vor (WHO, 2006). Nach Schätzung der WHO waren im Jahr 2005 weltweit ca. 1.6 Mrd. Menschen, die älter als 15 Jahre waren, übergewichtig. Davon waren ca. 0.4 Mrd. Menschen adipös (WHO, 2006). Weltweit gilt Adipositas als das am schnellsten wachsende Gesundheitsproblem. Die WHO spricht daher inzwischen sogar von einer „globalen Adipositasepidemie“. In Deutschland wird die Zahl der Übergewichtigen zurzeit auf ca. 75% der männlichen und 59% der weiblichen Bevölkerung geschätzt (ISAO, 2007). Im internationalen Vergleich liegen somit

sowohl deutsche Frauen als auch Männer nach den USA an der Spitze bezüglich der Prävalenz von Übergewicht (siehe auch Abbildung 1.1).

Adipositas ist definiert als eine Zunahme von Körpergewicht, die durch eine über das Normalmaß

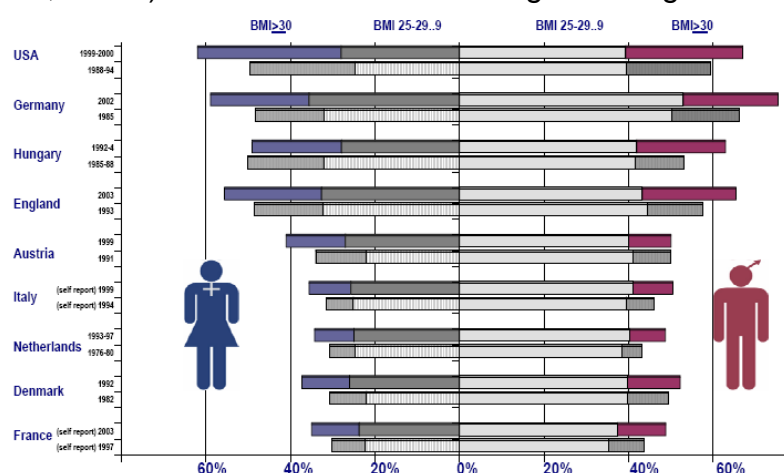


Abbildung 1.1 Internationaler Vergleich des BMIs von Männern und Frauen aus: Platform on Diet, Physical Activity and Health, International Obesity Task Force EU Briefing Paper, März 2005, Seite 7.

hinausgehende, exzessive Vermehrung des Körperfettanteils verursacht wird und zu einer Beeinträchtigung der Gesundheit führen kann (Deutsche Adipositas Gesellschaft, 2007). Die gesteigerte Fettmasse bei Adipösen ist ein entscheidender pathologischer Faktor des metabolischen Syndroms. Das Fettgewebe ist wesentlich an der Produktion und Freisetzung von (pro)-inflammatorischen Botenstoffen/Adipokinen beteiligt. So konnte nachgewiesen werden, dass Fettgewebe neben den proinflammatorischen Zytokinen Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) und Interleukin-6 (IL-6) auch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), Leptin, Angiotensin und Resistin freisetzt (zur Übersicht siehe Havel, 2004; Trayhurn & Wood, 2004). Personen mit erhöhten Anteil an visceralem Fett scheinen ein

größeres Risiko zu haben, eine nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD) zu entwickeln, denn diese Art der Fettverteilung begünstigt möglicherweise den direkten Transport von freien Fettsäuren über die Portalvene in die Leber (Bugianesi, 2005; Sabir et al., 2001; Stranges et al., 2004). Die Prävalenz von NAFLD steigt auf 74% bei adipösen Menschen und ca. 90% bei morbid Adipösen (Abrams et al., 2004; Angulo & Lindor, 2002; Ratziu et al., 2000). Mit einer zunehmenden Fettansammlung steigt das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko an und die Lebensqualität kann nachhaltig beeinflusst werden (Branca F & WHO Regional Office for Europe, 2007). Schwerwiegende Folgeerkrankungen sind Diabetes Typ 2, Bluthochdruck (arterielle Hypertonie), Störungen des Fett- und Harnsäurestoffwechsels sowie Erkrankungen des Muskel- und Skelettsystems. Außerdem liegt nicht selten eine beträchtliche Beeinflussung der psychosozialen Gesundheit und der Lebensqualität vor (Hebebrand et al., 2004; Wiegand, 2007).

Die medizinischen Behandlungskosten von Personen mit starker Adipositas ($BMI \geq 35$) liegen in Deutschland um ca. 50% über denen von Normalgewichtigen (von Lengerke et al., 2006). In Deutschland wurden die volkswirtschaftlichen Kosten der Adipositas im Jahr 2001 auf 530 Mio. Euro pro Jahr, unter Berücksichtigung der Begleiterkrankungen auf über 5 Mrd. Euro pro Jahr geschätzt (John, 2005). Die Daten des Ernährungsberichtes der DGE von 2008 weisen darauf hin, dass bei Kindern und Jugendlichen sowie jungen Erwachsenen die Häufigkeit von Übergewicht und Adipositas zunimmt. Männer sind häufiger übergewichtig als Frauen. Normalgewichtige Männer sind in Deutschland ab 35 Jahren und normalgewichtige Frauen ab 55 Jahren gegenüber übergewichtigen Personen in der Minderheit. Adipositas betrifft den gesamten Lebenszyklus: Adipöse Mütter haben mit größerer Wahrscheinlichkeit übergewichtige Babys bzw. übergewichtige Kinder, die wiederum ein hohes Risiko haben, später adipöse Erwachsene zu werden (Kurth, 2007). Adipositas führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für gesundheitliche Probleme und Einschränkungen, Frührente oder Arbeitsunfähigkeit und somit soziale Zuwendung durch den Staat als auch erhöhte Sozioökonomische Probleme (Enzi, 1994; Wolf & Colditz, 1998).

Adipositas: Mögliche Pathomechanismen

Die hohe Inzidenz von Adipositas im Erwachsenenalter lässt die Schlussfolgerung zu, dass in Zeiten des Nahrungsüberflusses und des Bewegungsmangels Adipositas

(fast) unweigerlich die Folge ist, wenn nicht bewusst gegengesteuert wird. Dabei ist Übergewicht/Adipositas als eine physiologische Reaktion auf eine chronisch positive Energiebilanz anzusehen. Die Gene des Menschen und der dadurch gesteuerte Stoffwechsel sind daher darauf eingerichtet, Situationen des Hungers und des Mangels, nicht aber solche der Überernährung zu meistern (Speakman, 2004). Einerseits haben die stark veränderten Lebensbedingungen in der Industriegesellschaft innerhalb sehr kurzer Zeit zu einer starken Abnahme der körperlichen Aktivität in Beruf und Freizeit geführt, ohne dass die Ernährung an den verringerten Energiebedarf angepasst wurde. Andererseits führten grundlegende Veränderungen im Essverhalten und der Esskultur sowie das große Angebot von immer und überall verfügbaren, preiswerten und schmackhaften Lebensmitteln dazu, dass es immer schwieriger wird, dauerhaft eine ausgeglichene Energiebilanz zu erreichen. Der vermehrte Verzehr von fett- und zuckerreichen Lebensmitteln mit hoher Energiedichte und hohem glykämischen Index, ein gesteigener Fast-Food-Verzehr, eingeschobene fettreiche Snacks (Drummond et al., 1996) sowie zunehmende Portionsgrößen von Lebensmitteln und Mahlzeiten wurden in wissenschaftlichen Studien als mögliche beitragende Komponenten identifiziert (Drewnowski, 2004; Elliott et al., 2002; Rolls et al., 2006). Der physiologische Effekt der Energieaufnahme auf die Sättigung unterscheidet sich bei Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme. Die Flüssigkeitsaufnahme führt zu einer reduzierten Dehnung des Magens und einer schnelleren Transitzeit im Darm. Energiereiche Getränke werden weniger vom Organismus als Energielieferant erkannt als Festnahrung und könnten so zur zusätzlichen Kalorienaufnahme führen (Mattes, 1996). Die Folge sind zusätzliche Kalorien die der Körper eigentlich nicht benötigt. Nielsen & Popkin (2004) konnten nachweisen, dass sich die tägliche Aufnahme an gesüßten Getränken in den letzten 20 Jahren von 2.8% auf 7% der täglichen Kalorienaufnahme erhöht hat. In verschiedenen epidemiologischen Untersuchungen zum Thema Übergewicht und Aufnahme von „high fructose corn syrup“ (zur Übersicht siehe Bray et al., 2004) konnte nachgewiesen werden, dass eine steigende Aufnahme an Zuckern (insbesondere Fruktose & Glukose) in Form von „Softdrinks“ und Fruchtsäften mit dem steigenden Übergewicht in den USA korreliert. Spitzer & Rodin (1987) stellten fest, dass die Nahrungsaufnahme, nach einer vorherigen Glukose-Gabe in Form einer Trinklösung, erhöht wird. Die Aufnahme von Glukose gesüßten Getränken führt zu einer erhöhten Kalorienaufnahme, Gewichtszunahme und Körperfetteinlagerung

bei Mäusen (Bergheim et al., 2008; Brito et al., 2007; Lindqvist et al., 2008; Sclafani & Xenakis, 1984).

Die Rolle des Darms in der Pathogenese der Adipositas

Übergewichtige Patienten leiden häufig unter gastrointestinalen Beschwerden wie Konstipation, Diarrhöe, Magen-Darm-Krämpfen und Blähungen (Crowell et al., 1994) oder Magenentleerungs- und Darmmotilitätsveränderungen (Tosetti et al., 1996). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass bei Übergewichtigen im Vergleich zu Normalgewichtigen eine veränderte Motilität vorliegt (Wisén & Hellström, 1995). So resultiert der Verzehr einer einmaligen proteinreichen Mahlzeit bei Übergewichtigen in eine verlangsamte Magenentleerung, wohingegen eine einmalige kohlenhydratreiche Mahlzeit die Magenentleerung im Vergleich zu Kontrollen beschleunigt (Segura et al., 2006).

Bei Übergewichtigen wurde nachgewiesen, dass die magendehnungsgesteuerte Sättigung aufgrund der schnelleren Magenentleerung im Vergleich zu Normalgewichtigen verzögert ist. Gleichzeitig wurde in diesen Untersuchungen gemessen, dass eine erhöhte Ausschüttung von CCK wirkungslos auf die Magenentleerung bleibt (French et al., 1995; Geliebter, 1988). Weiterhin fand sich in einer Humanstudie eine signifikant verringerte Pankreassekretion, Gallenblasenkontraktion und verkürzte Transitzeit im Dünndarm bei Übergewichtigen im Vergleich zu Schlanken. Trotz dieser Symptome scheinen Übergewichtige mehr Energie aus der aufgenommenen Nahrung zu resorbieren als schlanke Personen (Wisén & Johansson, 1992; Wisén & Hellström, 1995). Untersuchungen von Park & Camilleri (2005) weisen darauf hin, dass die Veränderungen der Magenmotilität und sensorischer Funktionen bei Adipösen möglicherweise Störungen in diesen regulatorischen Mechanismen widerspiegeln, die zur Entwicklung und Aufrechterhaltung des adipösen Zustandes beitragen. Kürzlich wiesen Ley et al. (2005) in tierexperimentellen Untersuchungen nach, dass offenbar die bakterielle Besiedelung im Darm eine Rolle spielt. Sie konnten nachweisen, dass die ausbalancierte Koexistenz von Bacteroides und Firmicutes in übergewichtigen Tieren zu Firmicutes hin verschoben ist (Ley et al., 2005). In wiefern das intestinale serotonerge System und vorallem der Rezeptor 5-HT₃, über den sowohl die Motilität als auch möglicherweise die Nahrungsaufnahme reguliert wird, in der Pathogenese

der Adipositas von Bedeutung sind, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht untersucht worden.

Therapien zur Behandlung der Adipositas

Die im Moment verfügbaren Therapieformen und Behandlungsmethoden sind Lebensstilintervention (Nahrungsumstellung & Bewegungstherapie), Verhaltenstherapie sowie pharmakologische und chirurgische Interventionen. Die pharmakologische Therapie kommt sowohl bei der leichten als auch schweren Adipositas zum Einsatz und oft werden auch mehrere Präparate gleichzeitig eingesetzt. Die üblichen Zeitspannen, in denen solche Medikamente eingenommen werden, liegen bei ca. einem Jahr. In diesem Zeitraum soll durch Nahrungsumstellung und Verhaltenstherapie erlernt werden, wie nach der medikamentösen Therapie eine Gewichtsreduktion beibehalten werden kann (Joyal, 2004; Klein, 2004). Medikamente zur Behandlung der Adipositas können zum einen die Serotonin Rezeptor Bindung beeinflussen (Fenfluramin, Dexafenfluramin), den Serotonin Wiederaufnahme-Transporter (SERT) (Fluoxetin, Setrulin) blockieren oder die Lipidabsorption im Darm (Orlistat) inhibieren (Bray, 2001). Sibutramin, ein SERT-Blocker und Noradrenalin-Transporter-Blocker, führt zu einem erhöhten Magentonus und einem verminderten Magenvolumen im Hungerzustand, reduziert die Nahrungsaufnahme und erhöht die Sättigung sowie den Energieverbrauch durch eine erhöhte Thermogenese (Casado et al., 2003; Jackson et al., 1997). Beschriebene Nebenwirkungen können neben Kopfschmerzen, Verstopfung, Mundtrockenheit auch erhöhter Blutdruck sein. Orlistat ist ein intestinaler Lipaseinhibitor und induziert somit einen partiellen Status von Fett-Malabsorption; dies führt zu einer 33% verminderten Resorption der durch die Nahrung aufgenommenen Fette (Padwal & Majumdar, 2007). Ein Gewichtsverlust von 5-10% kann zur Verbesserung der gesundheitlichen Folgen beitragen wie z.B. verbesserte Leberparameter und Lungenfunktion, reduzierter Blutdruck, längere Frequenzen bis zur nächsten Schlafapnoe und Schmerzreduzierung bei Osteoarthritis. Verfügbare Medikamente, die den 5-HT₃ Rezeptor blockieren, werden zurzeit nicht im Rahmen der Adipositastherapie untersucht und angewendet.

1.2 Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (NAFLD)

Prävalenz der NAFLD

Die nicht-alkoholbedingte Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) ist eine Erkrankung, die sich in den letzten Jahren zu einer der häufigsten auftretenden chronischen Lebererkrankung entwickelt hat (Clark et al., 2002; Ludwig et al., 1980; Mishra & Younossi, 2007). Die Prävalenz von NAFLD liegt in der US-Bevölkerung bei durchschnittlich 20% (17-33%) (Farrell & Larter, 2006; Ruhl & Everhart, 2004). Ähnliche Daten wurden auch für die japanische und italienische Bevölkerung erhoben (Bellentani et al., 1994; Jimba et al., 2005). In Deutschland wird die Zahl der Erkrankten auf rund 10% geschätzt. Die NAFLD umfasst ein weites morphologisches Spektrum an reversiblen und irreversiblen Leberläsionen (Brunot et al., 1999). Die Pathophysiologie der NAFLD ist komplex und bis zum heutigen Tag nicht vollständig geklärt. Die im Moment verfügbaren Daten lassen vermuten, dass Umweltfaktoren sowie die Ernährung, körperliche Aktivität und Toxine eine entscheidende Rolle in der Entstehung und Weiterentwicklung der Krankheit spielen (Cotrim et al., 1999). Die Tatsache, dass die Prävalenz von NAFLD sich zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen unterscheidet (Browning et al., 2004; Solga et al., 2004) und dass das Voranschreiten der Erkrankung zwischen Personen mit ähnlichen Risikofaktoren unterschiedlich schnell stattfindet, spricht dafür, dass auch eine genetische Prädisposition hierbei eine Rolle spielt (Willner et al., 2001). Der größte Teil der NAFLD-Erkrankungen tritt zusammen mit dem metabolischen Syndrom auf, in dem eine Insulinresistenz eine Schlüsselrolle spielt (Bugianesi, 2005; Diehl, 2005). Die Prävalenz des metabolischen Syndroms (22%) und der NAFLD (20%) in der US-Bevölkerung sind ungefähr gleich hoch (Alberti et al., 2005). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die primäre NAFLD eine hepatische Komplikation des metabolischen Syndroms ist. Eine wesentlich seltenere Ursache der NAFLD (sekundäre NAFLD) sind Drogen/Medikament/Hormon-Einnahmen wie z.B. Glukokortikoide, Tamoxifen, Isomiazid, chirurgische Eingriffe, totale parenterale Ernährung, Alkohol und Lipodystrophie (Baddeley, 1985; Blackburn & Mun, 2004; Bode & Bode, 2003; McFarland et al., 1985; Powell et al., 1989; Pratt et al., 1995).

Pathogenese der NAFLD

Während die Akkumulation von Triglyceriden in der Leber in Abwesenheit von Alkohol bereits in den 60er Jahren dokumentiert wurde (zur Übersicht siehe, Schreuder et al., 2008), publizierte Ludwig et al. (1980) die Erstbeschreibung der nicht-alkoholbedingten Steatohepatitis (non-alcoholic steatohepatitis, NASH). Er beschrieb die NASH als ein neues Syndrom, das insbesondere bei Frauen mit Übergewicht, zumeist in Kombination mit Diabetes Typ 2, jedoch ohne vorherigen Konsum von Alkohol auftrat. Von Drenick et al. (1982) wurde NASH als eine Komplikation beim jejuniolealen Bypass zur Gewichtsreduktion bei morbid adipösen Patienten beschrieben. Diese konnte durch die Behandlung mit Antibiotika (Metronidazol) behandelt werden. Weiterhin kam es aufgrund der jejuniolealen Bypass Operationen bei einigen Patienten zur NASH assoziierten Lebertransplantation. Die Folge war, dass die NASH sich auch schnell wieder im neuen Organ manifestierte, was die Vermutung aufbrachte, dass die Darmflora an der Entwicklung der NAFLD beteiligt ist (Kim et al., 1996). Das erste Stadium der NAFLD ist - ähnlich der alkoholbedingten Lebererkrankung, (alcoholic liver disease, ALD) - durch die Akkumulation von Lipiden in der Leber charakterisiert (Steatose). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann sich aus der Steatose eine Steatohepatitis entwickeln, die dann zur Fibrose voranschreiten und letztlich zu einer Zirrhose, Leberversagen, hepatozellulärem Karzinom und dem Tod führen kann (Bogdanova et al., 2006; Gill & Wu, 2006). Während die Stadien der Steatose sowie der NASH reversibel sind, kann die NAFLD ab dem Stadium der Fibrose lediglich stagnieren oder einen irreversiblen Verlauf nehmen (Adams & Angulo, 2007).

Nahrungsassoziierte Entwicklung der NAFLD beim Menschen

In der Vergangenheit galten Diäten, die reich an gesättigten Fettsäuren sind, als die Ursachen von Gewichtszunahme, Insulinresistenz und Hyperlipidämie bei Mensch und Tier (Literatur zur Übersicht siehe Hu et al., 2001). Als Folge wurde eine Vielzahl von „low fat“- Produkten und Diäten eingeführt, die jedoch nicht zum erwarteten Rückgang des Übergewichts, sondern eher zu einem entgegengesetzten Trend führten (Zur Übersicht siehe Willett, 2000). Die Folge war ein erhöhter Konsum von Kohlenhydraten in Form von Zuckern (Mono- und Disaccharide); dennoch kam es nicht zur erhofften Gewichtsreduktion. Mittlerweile wird der steigende Konsum von

Fruktose in Form des aus Mais gewonnenen High Fructose Corn Syrup (HFCS) in „Softdrinks“, Fruchtsäften und gesüßten Lebensmitteln als ein weiterer Grund für den Anstieg der Prävalenz von Übergewicht und des metabolischen Syndroms in den USA diskutiert (Gross et al., 2004; Havel, 2004). So fanden Schulze et al. (2004) eine positive Assoziation zwischen der Aufnahme von gesüßten Getränken, der Gewichtsentwicklung und der Prävalenz von Diabestes Typ 2. Auch Ludwig et al. (2001) konnten einen Zusammenhang der Gewichtszunahme und dem Konsum zuckergesüßter Getränke bei Schulkindern belegen. Basciano et al. (2005) berichten weiter, dass zwischen 1970 und 1997 der Fruktosekonsum in den USA um das 100-fache gestiegen war. In Deutschland erhöhte sich der Pro-Kopf-Verbrauch an Zuckern - insbesondere an Fruktose und Saccharose - in den letzten 30 Jahren um ca. 10% (Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., 2004). Während in Deutschland immer noch hauptsächlich mit der aus Zuckerrüben hergestellten Saccharose gesüßt wird, geht mittlerweile auch in vielen Ländern außerhalb Amerikas nicht zuletzt wegen der 1.6-mal höheren Süßkraft der Trend hin zum Süßen mit dem billigeren HFCS (Berneis, 2006). Das Disaccharid Saccharose besteht zu gleichen Teilen aus Fruktose und Glukose, im Gegensatz dazu enthält der gebräuchliche HFCS 55% Fruktose und 45% Glukose (Jurgens et al., 2005).

Die Ergebnisse neuerer Untersuchungen weisen darauf hin, dass nicht nur ein Zusammenhang zwischen dem Fruktosekonsum und der Entstehung der Adipositas und des metabolischen Syndroms besteht, sondern auch mit der Pathogenese der NAFLD. In den Studien von Ouyang et al. (2008), sowie Zelber-Sagi et al. (2007) fand sich ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von HFCS in Softdrinks und der Prävalenz der NAFLD. In einer kürzlich veröffentlichten Pilotstudie der eigenen Arbeitsgruppe (Thuy et al., 2008) fand sich ein signifikant höherer Konsum von Fruktose bei Patienten mit NAFLD im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die im Jahr 2008 veröffentlichte DONALD Studie (Libuda et al., 2008) deutet auch auf die Assoziation zwischen Fruchtsaft- und Softdrink-Aufnahme und dem Risiko des sich entwickelnden Übergewichts bei Erwachsenen hin. In tierexperimentellen Untersuchungen und Interventionsstudien bei Menschen konnte weiter nachgewiesen werden, dass ein erhöhter Konsum von Fruktose zu Dyslipidämie, hepatischer Insulinresistenz und Verfettung der Leber führen kann (Ackerman et al., 2005; Bergheim et al., 2008; Faeh et al., 2005; Jurgens et al., 2005; Swarbrick et al., 2008). Die Untersuchungen von Solga et al. (2004) und Toshimitsu et al. (2007)

deuten darauf hin, dass ein erhöhter Kohlenhydratkonsum das relative Risiko der späten Phase der NAFLD erhöht.

Die Rolle des Darms in der Pathogenese der NAFLD

Die Ergebnisse von Human- und Tierstudien weisen darauf hin, dass ähnlich der alkoholbedingten Lebererkrankung, auch bei der NAFLD eine intestinale bakterielle Fehlbesiedlung und die daraus resultierende Endotoxinämie von pathophysiologischer Bedeutung sein könnten (Brun et al., 2007; Cope et al., 2000; Nair et al., 2001; Wigg et al., 2001). Wigg et al. (2001) fanden in ihren Untersuchungen bei Patienten mit NAFLD signifikant häufiger eine bakterielle Fehlbesiedlung im Vergleich zu Kontrollen. Weiterhin war auch die basale Alkoholkonzentration in der Atemluft - ohne vorherigen Konsum von Alkohol - bei übergewichtigen Patientinnen mit NAFLD und genetisch bedingten adipösen Mäusen (Ob/Ob) im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht - ein Befund, der als Folge einer gesteigerten Ethanolbildung im Gastrointestinaltrakt gedeutet wurde (Cope et al., 2000; Diehl, 2004; Li et al., 2003). Unter anaeroben Bedingungen können intestinale Bakterien zugeführte Kohlenhydrate über den Pyruvat-Metabolismus zu Acetaldehyd und Ethanol abbauen (Logan & Jones, 2000; McManus et al., 1960). Diese Stoffwechselprodukte treten vor allem dann auf, wenn es zu einer erhöhten bakteriellen oder Hefe-Besiedelung des Dünndarms kommt. Eine Behandlung mit Antibiotika resultierte in einer Verminderung der Alkoholkonzentration sowie des Nüchterninsulinspiegels bei Patienten mit NAFLD und den untersuchten Ob/Ob Mäusen (Cope et al., 2000; Sajjad et al., 2005).

Da die Leber zu 2/3 portalvenös durchblutet wird und keine aktiven Kontrollmechanismus zur Regulation des Einstroms von portalvenösem Blut besitzt, wird die Leber kontinuierlich mit Blut aus dem Gastrointestinaltrakt durchspült und steht somit in enger und unmittelbarer Beziehung zum Darm und dem darin enthaltenen translozierten Endotoxinen. In mehreren tierexperimentellen sowie humanen Studien konnte eine erhöhte Permeabilität der Darmwand des Intestinaltraktes für bakterielle Lipopolysaccharide nach akuter oder chronischer Exposition mit Alkohol nachgewiesen werden (Literatur zur Übersicht siehe Bode & Bode, 2005). Interessanterweise resultierte die Sterilisation des Darms mit den Antibiotika Neomycin und Polymyxin B in einer signifikanten Verminderung der intestinalen Translokation von Endotoxinen und dem Grad der Leberschädigung

(Adachi et al., 1994; Enomoto et al., 2000). Des Weiteren konnten Bergheim et al. (2008) im Mausmodell nachweisen, dass die Endotoxinkonzentration im Plasma der Tiere, die mit Fruktose gefüttert wurden, signifikant erhöht war gegenüber den mit Wasser oder Süßstoff gefütterten Tieren. Thuy et al. (2008) fanden in einer Humanstudie bei Patienten mit NAFLD sowohl eine signifikante Erhöhung von Endotoxin im Plasma als auch der mRNA-Expression des hepatischen Endotoxin Rezeptor Toll-like receptor 4 (TLR-4) im Vergleich zu gesunden Probanden. Auch in Tierstudien von Rivera et al. (2007) wurde ein Zusammenhang zwischen dem hepatischen TLR-4 und der Pathogenese der NAFLD hergestellt. Das Endotoxin bindet an den auf der Kupffer-Zelle befindlichen CD14-/ TLR-4 Rezeptor (Dunzendorfer et al., 2004). Als Folge kann es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und einer Aktivierung des redox-sensitiven nuklearen Transkriptionsfaktor-kappa-B (NFκB) (zur Übersicht siehe Wheeler, 2003) kommen, was möglicherweise zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt. Hierbei könnte vor allem die Induktion von TNFα eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der ALD spielen, da es möglicherweise über TNFα-abhängige Signalwege zur Fettakkumulation in Hepatozyten kommt (Bergheim et al., 2006).

Die kürzlich veröffentlichten Daten einer Humanstudie deuten daraufhin, dass die Behandlung von Patienten mit Steatohepatitis mit dem Serotonin Rezeptor 4 Agonisten Cisparide, der in der Therapie der Obstipation verwendet wird, zu einer Verkürzung der orocecalen Transitzeit und einer Verminderung des Anti-Endotoxin Core (Endo CAB) IgG im Plasma führt (Fu & Jiang, 2006). In tierexperimentellen Untersuchungen konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die Steatohepatitis bei Ob/Ob Mäusen mit einer verlangsamten intestinalen Motilität und aufgrund einer verminderten Occludin Proteinkonzentration mit einer erhöhten Darmpermeabilität sowie erhöhten Endotoxinspiegeln im Pfortaderblut gekennzeichnet ist (Brun et al., 2007). Dies kann durch die Behandlung mit Probiotika verhindert werden (Nair et al., 2001). Die Entstehung und Manifestierung der NAFLD scheint nach diesen Untersuchungen von verschiedenen Darmparametern wie der Flora, Permeabilität und dem daraus resultierenden Endotoxingehalt im Blut abhängig zu sein. Die Rolle des intestinalen serotonergen Systems, das sowohl Motilität als auch die intestinale Permeabilität mit reguliert, ist noch unbekannt.

1.3 Das intestinale serotonerge System

Allgemeine Funktion von Serotonin im Körper

Nachdem seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt war, dass beim Zerfall von Thrombozyten eine blutdrucksteigernde Substanz im Serum auftritt, gelang es der Arbeitsgruppe um Rapport (Rapport et al., 1948d; Rapport et al., 1948a; Rapport et al., 1948b; Rapport et al., 1948c) im Jahre 1948 aus 210 Litern Rinderblutserum wenige Milligramm einer kristallinen Substanz zu isolieren, die aufgrund ihrer Herkunft und der „gefäßtonisierenden“ Wirkung als *Serotonin (5-HT)* bezeichnet wurde. 5-HT wirkt im Organismus von Säugetieren als Neurotransmitter und Mediator und spielt bereits während der frühen Embryonalentwicklung als morphogenetisches Signal in der Regulation von Differenzierungsprozessen eine Rolle (Hüther, 2000). Im zentralen Nervensystem befinden sich viele Zellkörper der serotonergen Neuronen in den Raphe-Kernen im Mittelhirn. Von hier aus innervieren sie mit langen und verzweigten Projektionen das gesamte Gehirn (Baumgarten, 1997). Viele zentralnervös gesteuerte Funktionen werden dem Einfluss serotonerger Mechanismen zugeschrieben, wie zum Beispiel die Homöostase des Hormon- und Immunsystems (Mossner & Lesch, 1998; Zdrojewicz et al., 1998). Außerdem nimmt Serotonin Einfluss auf die Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus (Ursin & Bjorvatn, 1998), die Nahrungsaufnahme (Leibowitz & Alexander, 1998), auf Stimmung und Verhalten (veaugh-Geiss, 1993), Lernen und Gedächtnis (Buhot et al., 1999), Schmerzübertragung (Gupta et al., 1999) und den Brechreflex (Endo et al., 2000). Verschiedene Erkrankungen werden deshalb mit einer gestörten Serotoninfunktion in Verbindung gebracht. Hierzu zählen u.a. Depression (Blier & de, 1994), Angststörungen (Gordon & Hen, 2004) und Schizophrenie (Iqbal & van Praag, 1995). Die höchsten Serotoninkonzentrationen finden sich in den enterochromaffinen Zellen und den Nervenzellen des Gastrointestinaltraktes (Facer et al., 1979; Gershon et al., 1977), in Thrombozyten (Vashkinel' et al., 1975) und im ZNS u.a. in den Raphe-Kernen (Nuclei raphi) und im Hypothalamus (Saavedra, 1977).

Die Verteilung von Serotonin im Gastrointestinaltrakt

Der Darm muss sich einer physiologischen Herausforderung stellen, denn er muss den luminalen Gehalt an komplexen und sehr unterschiedlichen Makro- und

Mikronährstoffen, Bakterien, Bakterienprodukten, Verdauungsenzymen, verdaulichen Ballaststoffen und Wasser detektieren, analysieren und darauf reagieren, um eine adäquate Absorption der Nährstoffe zu erreichen und gleichzeitig die Barrierefunktion aufrecht zu erhalten. Die Detektion und Reaktion auf den Inhalt des Lumens schließt extrinsische als auch intrinsische Neuronen und somit die Aktivierung des Reflexsystems des Darms mit ein. Diese Reflexe sind notwendig um die intestinale Sekretion und Motilität zu koordinieren, aus der dann eine ausbalancierte Aufnahme von Nährstoffen aus den verschiedenen Segmenten des Darms resultieren kann, um die Effizienz der Verdauung und Absorption zu gewährleisten (Raybould, 2002). Einen direkten Kontakt von Nervenendigungen und den luminalen Bestandteilen gibt es nicht. Somit ist das intestinale Epithel entscheidend für die Rolle der Übermittlung von Nährstoffsignalen über die Darmwand hinweg (Berthoud & Neuhuber, 2000). Spezielle enteroendokrine Zellen in der Epithelschicht des Darms sind spezialisierte Zellen, die als chemosensorische Zellen agieren (Grundy, 1988). Enterochromaffine (EC) Zellen sind serotoninhaltige, enteroendokrine Zellen im gastrointestinalen Trakt. In diesen Zellen wird mehr als 90% des gesamten Serotoningehaltes des Körpers synthetisiert, gespeichert und freigesetzt (Erspamer, 1966). Die enteroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes stellen somit das größte endokrine Organ im Körper dar (Rehfeld, 1998). Das im Darm befindliche Serotonin liegt zu ca. 5 % in Neuronen des enterischen Nervensystems und zu 95% in den EC Zellen vor (Spiller, 2001). Diese sind im Epithel des gesamten Gastrointestinaltraktes vorhanden und besitzen viele Sekretgranula, in denen Serotonin gespeichert wird. Serotonin wird durch verschiedene Stimuli aus den eingelagerten Vesikeln freigesetzt wie

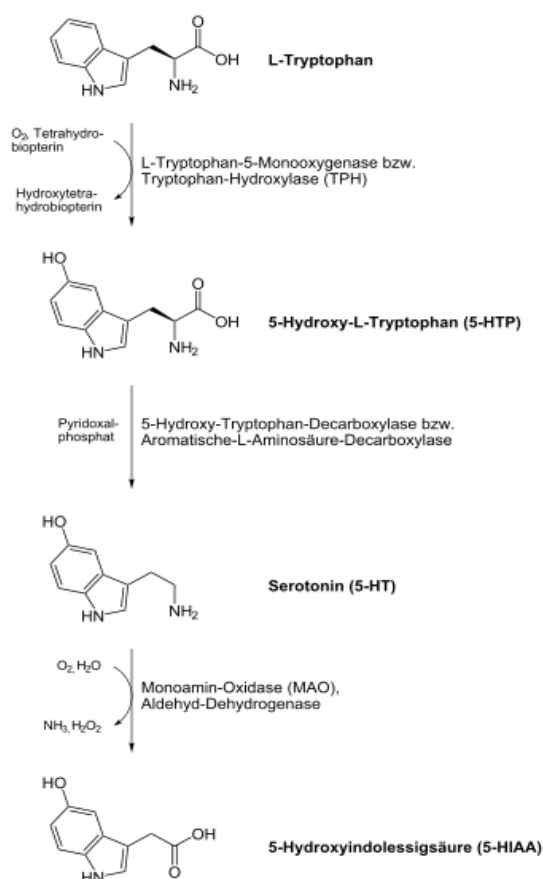


Abbildung 1.2 Biosynthese und Abbau von Serotonin.

z.B. mechanische Reizung, intraluminaler Druck, Glukose und hyperosmotische Lösungen (Fujimiya et al., 1997; Kim et al., 2001).

Die Bioverfügbarkeit und die weiterführende Wirkung des Serotonins werden über den Serotonin Wiederaufnahme-Transporter (SERT) reguliert. Enterozyten und serotonerge Neuronen im zentralen und peripheren Nervensystem exprimieren diesen spezifischen Natrium-Chlorid-abhängigen Transporter. Die Serotonin-Biosynthese erfolgt aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan (siehe Abbildung 1.2). Dieses wird in chromaffinen Zellen und Neuronen durch die Tryptophanhydroxylase, die nur in Serotonin produzierenden Zellen nachzuweisen ist, zu 5-Hydroxytryptophan umgewandelt (Grahame-Smith, 1964). Durch eine unspezifische Decarboxylase entsteht anschließend Serotonin. Hauptsächlich die Monoaminoxidase A (MAO-A) katalysiert den Abbau zur 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), welche über den Urin ausgeschieden wird.

Rezeptoren für Serotonin und deren Funktion im Darm

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand werden die 5-HT Rezeptoren in sieben Familien eingeteilt: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ und 5-HT₇. Von diesen sieben Familien spielen aber nur 5-HT₁₋₄ und 5-HT₇ im Darm eine Rolle. Der 5-HT₃ Rezeptor nimmt unter den Serotonin Rezeptoren eine Sonderstellung ein. Während alle anderen 5-HT Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit second-messenger-gesteuerter Signaltransduktion sind, handelt es sich bei den 5-HT₃ Rezeptoren um ligandenaktivierte Ionenkanäle. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass die Bindung des spezifischen Neurotransmitters direkt, d.h. ohne zwischengeschaltete Signalkaskaden, eine Änderung des Isomerisierungszustandes des Kanalproteins und damit die Öffnung des Ionenkanals bewirkt. Eine Aktivierung führt zur Depolarisation und schnellem Ca²⁺-Anstieg im Zytosol sowie zur Modulation der Freisetzung anderer Transmitter wie Dopamin, Acetylcholin und GABA oder Neuropeptide wie Substanz P und Serotonin selbst (Greenshaw & Silverstone, 1997). 5-HT₃ Rezeptoren kommen im peripheren (PNS) und im zentralen Nervensystem (ZNS) vor. Im PNS konnten 5-HT₃ Rezeptoren v.a. in Nozizeptoren sowie in autonomen Neuronen und in Neuronen des enterischen Nervensystems nachgewiesen werden, aber auch auf nicht neuronalen Zellen wie enteroendokrinen Zellen (z.B. EC-Zellen) und interstitial Zellen von Cajal (Freeman et al., 2006; Glatzle et al., 2002). Die höchste Rezeptorendichte im ZNS befindet sich somit u.a. in

Regionen, die am Brechreflex, an der Schmerzverarbeitung und an der Steuerung emotionalen Verhaltens beteiligt sind (Barnes & Sharp, 1999; Tecott et al., 1993). Die Blockade des 5-HT₃ Rezeptors im Verdauungstrakt führt neben einer Inhibition viszeraler sensorischer Afferenzen zu einer gesteigerten Flüssigkeits- und Elektrolytresorption im Dünndarm. Über eine Modulation des peristaltischen Reflexes führt die Antagonisierung des 5-HT₃ Rezeptors zu einer Verzögerung der Transitzeit im unteren Magen-Darm-Trakt (Gershon, 1999; Humphrey et al., 1999). Mit Hilfe experimenteller Klonierungsstudien konnten Untereinheiten des 5-HT₃ Rezeptors identifiziert werden: 5-HT_{3A} und 5-HT_{3B} (Belelli et al., 1995; Davies et al., 1999), außerdem wurden die Gene für weitere Untereinheiten, 5-HT_{3C}, 5-HT_{3D} und 5-HT_{3E}, beim Menschen gefunden (Niesler et al., 2003).

Folgen der Serotonin-Rezeptor-Interaktion im Darm

Durch Serotonin wird im Darm die Sekretion von Wasser und Elektrolyten (Cooke et al., 1997; Sidhu & Cooke, 1995), die Darmmotilität (Grider et al., 1996; Wade et al., 1996) sowie die Inhibition der Magenentleerung und Stimulation der Pankreassekretion reguliert (Raybould et al., 2003). Serotonin wirkt einerseits direkt auf die Enterozyten, andererseits indirekt über enterische Nerven. Auf enterischen Neuronen sind die Rezeptortypen 5-HT₃, 5-HT₄ und zum kleineren Teil 5-HT_{1P} und 5-HT₂ Rezeptoren nachgewiesen worden (Gershon, 1999; Spiller, 2001; Talley, 2001). Die unterschiedlichen Rollen der verschiedenen Serotonin Rezeptoren auf enterischen Neuronen oder auf Enterozyten sind noch nicht vollständig erforscht. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass eine sekretorische Wirkung hauptsächlich durch 5-HT₃ Rezeptoren hervorgerufen wird.

Wie bei der Sekretion kann Serotonin auf die Darmmotilität erregend oder hemmend wirken, über eine direkte Wirkung auf Muskelzellen oder über Sensorische-, Inter- und Motoneuronen. Auf Interneuronen und Motoneuronen wurden überwiegend 5-HT₃ Rezeptoren gefunden (Briejer & Schuurkes, 1996). Die Bedeutung von unterschiedlichen Serotonin Rezeptoren variiert in den unterschiedlichen Regionen des Gastrointestinaltrakts, wodurch eine detaillierte Aussage über den Wirkungsweg von Serotonin erschwert wird. Li et al. (2001) konnten zeigen, dass die intraduodenale Applikation von Serotonin dosisabhängig die pankreatische Sekretion stimulierte. Dieser Effekt des Serotonins wurde durch eine Stimulation von afferenten vagalen Nervenendigungen, durch 5-HT₃ Rezeptoren, erklärt. So wurde auch

beschrieben, dass biogene Amine wie Serotonin und Histamin einen Effekt auf die Translokation von Endotoxin haben und so die Gefäßpermeabilität beeinflussen können (Ditter et al., 1983). Doch nicht nur die Gefäßpermeabilität sondern auch die intestinale epitheliale Permeabilität für bakterielles Endotoxin kann über die Wirkung von Serotonin am 5-HT₃ Rezeptor moduliert werden (Yamada et al., 2003).

Parallel zu diesen Untersuchungen gibt es Arbeiten, die Veränderungen des Neurotransmitters Serotonin im Darm nach dem Konsum von einzelnen Nahrungskomponenten zeigen und somit möglicherweise eine Beeinflussung des enterischen Nervensystems aufweisen. Serotonin moduliert sowohl die Nahrungsaufnahme und somit die Portionsgröße als auch die Dauer der Nahrungsaufnahme. Der dabei involvierte Rezeptor ist der 5-HT₃ Rezeptor der zusammen mit CCK über die magendehnungsgesteuerte Feedbackregulation zur Regulation der Nahrungsaufnahme beiträgt (Burton-Freeman et al., 1999; Hayes & Covasa, 2005). Leibowitz und Alexander (1998) haben in einem Rattenmodell nachgewiesen, dass die 5-HT_{1b} und 5-HT_{1c} Subgruppen eine suppressorische Wirkung auf die Nahrungsaufnahme haben wohingegen der 5-HT_{1a} Rezeptor zur Hyperphagie führen kann.

Veränderungen des Serotonin-Signalweges im Darm wurden bereits bei verschiedenen gastrointestinalen Erkrankungen wie Reizdarmsyndrom sowie chronischer Verstopfung, Diarrhö und funktioneller Dyspepsie gezeigt (Crowell, 2004).

Einsatz von Pharmaka zur Modulation des serotonergen Systems

Die therapeutischen Effekte vieler unterschiedlicher Pharmaka beruhen auf direkten und indirekten Interaktionen mit den Serotonin Rezeptoren. So ist seit langem bekannt, dass Substanzen, die die Serotonin-Wiederaufnahme durch Blockade des präsynaptischen Transporters hemmen oder den Serotoninabbau durch Inhibition der Monoaminoxidase (MAO) blockieren, antidepressiv wirken können (Murphy et al., 1986). Übersichten über die historische Entwicklung dieser Erkenntnisse geben Blier und de Montigny (1999) sowie Feighner (1999). Die klinisch eingesetzten Pharmaka, die die Serotonin-Wiederaufnahme hemmen, gehörten zur strukturchemischen Gruppe der trizyklischen Antidepressiva, wie z.B. Fluoxetin (Fluctin, in den USA: Prozac), Paroxetin (Seroxat) oder selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Reboxetin, Edronax). Therapeutisch sind bei gesteigertem Appetit bzw.

Essverhalten Serotonin-Wiederaufnahmehemmer wie z.B. Fenfluramin wirksame Appetitzügler. Die 2-wöchige Einnahme von Fluoxetin bei übergewichtigen Patientinnen resultiert in einer geringeren Nahrungsaufnahme (Lawton et al., 1995) im Vergleich zu unbehandelten Patientinnen. Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass der 5-HT₃R durch die Inhibition der Magenentleerung an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt ist (Hayes & Covasa, 2006a; Hayes & Covasa, 2006b; Hayes et al., 2006; Savastano & Covasa, 2007). So resultierte die Behandlung von Ratten mit dem 5-HT₃R Antagonisten Ondansetron in eine beschleunigte Magenentleerung und somit in einer möglichen Erhöhung der Nahrungsaufnahme im Vergleich zu unbehandelten Tieren.

Zu den 5-HT₃ Rezeptor Antagonisten zählen u.a. Tropisetron (Navoban), Ondansetron (Zofran), Granisetron (Kevatril) und Dolasetron (Anamet). Die Rezeptorblockade durch Tropisetron kann selbst durch hohe Serotoninkonzentrationen nicht aufgehoben werden; dies ist bei der Blockade durch Ondansetron möglich (Wolf, 2000). Medizinische Anwendung finden 5-HT₃ Antagonisten seit Beginn der 90er Jahre v.a. bei Übelkeit und Erbrechen, die bei Zytostatikabehandlung (Jantunen et al., 1997), Strahlenbehandlung (Feyer et al., 1998) oder auch postoperativ (Alon & Biro, 1996) auftreten sowie bei Reizdarmsyndrom (Camilleri, 2000; Hammer et al., 1993; Humphrey et al., 1999; Prior & Read, 1993).

Das Spektrum an Erkrankungen, in denen das serotonerge System mit involviert ist, erfasst eine Vielzahl von unterschiedlichen Krankheitsbildern. Bei vielen ist die Rolle des intestinalen serotonergen Systems im Einzelnen noch nicht untersucht und oft werden nur Wirkungen auf das zentrale serotonerge System betrachtet. Vorallem im Kontext der Nahrungsaufnahme und Regulation der intestinalen Permeabilität ist das intestinale serotonerge System nur ansatzweise untersucht worden. Der Zusammenhang von Fehl- und Überernährung die mit Adipositas und NAFLD und den bereits beschriebenen Modulationen im Intestinaltrakt dieser Erkrankungen einhergehen können, sind bis jetzt nicht mit möglichen Veränderungen im intestinalen serotonergen System assoziiert worden.

1.4 Ziel der Arbeit

Trotz einer zunehmenden Zahl von Studien sind die molekularen Mechanismen der Adipositas sowie der NAFLD bisher nicht geklärt. Abgesehen von einer Lebensstilintervention und Gewichtsreduktion, die mit hohen Rückfallquoten behaftet ist, steht bis zum heutigen Zeitpunkt keine Therapie zur Verfügung, die den Verlauf beider Erkrankungen aufhält oder gar umkehrt. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der Adipositas sowie der NAFLD führen, wären für mögliche Präventionsmassnahmen sowie für die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen zur Behandlung der frühen und reversiblen Phase dieser Erkrankung von besonderer Bedeutung.

Wie in der Einleitung ausgeführt, scheinen Veränderungen auf der Ebene des Darms sowohl in der Pathogenese der Adipositas als auch der NAFLD eine entscheidende Rolle zu spielen. Ob jedoch auch Veränderungen des intestinalen serotonergen Systems in der Pathogenese der Adipositas und/oder der NAFLD von Bedeutung sind, ist bisher nicht geklärt.

Ausgehend von diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht:

1. Spielt das intestinale serotonerge System bei der Entwicklung des glukoseinduzierten Übergewichts eine Rolle im Mausmodell? Und wenn ja, hat die Behandlung mit einem 5-HT₃R Antagonist einen protektiven Effekt auf die Entstehung des glukoseinduzierten Übergewichts im Mausmodell?
2. Sind Veränderungen im intestinalen serotonergen System an der Entwicklung der fruktoseinduzierten NAFLD beteiligt? Und wenn ja, welche Rolle spielen Serotonin und der dazugehörige Transporter SERT in der Pathogenese der zuckerinduzierten NAFLD?
3. Welche Rolle spielt das intestinale serotonerge System in der Entstehung von NASH und Adipositas bei Ob/Ob Mäusen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Tiermodelle

C57Bl6/J6-Mäuse	Janvier S.A.S., Le-Genest-St-Isle, Frankreich
Leptin defiziente Ob/Ob Mäuse	Jackson Laboratories, Main, USA
Futter ssniff® M-Z Reich	ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
Futter ssniff® Sondermischung (Nährstoffreich)	ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest
Glukose	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Fruktose	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Tropisetron (Navoban®)	Novartis, Nürnberg

2.1.2 Genotypisierung von Mäusen

TRIS	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol ≥99,5%	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
EDTA	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
NaCl	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Proteinase K	PeQlab, Erlangen
Hot-Taq DNA Polymerase Kit	PeQlab, Erlangen
Dde1	New England Biolabs, Frankfurt
Agarose	SeKam, Cambrix, Rockland, USA
Ethidiumbromid	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ladder 100bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Primer: SERT3	MWG-Biotech, Ebersberg
SERT4	MWG-Biotech, Ebersberg
Neo5	MWG-Biotech, Ebersberg
Leptin 1	MWG-Biotech, Ebersberg
Leptin 2	MWG-Biotech, Ebersberg
Restriktionsenzym Dde1	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gelelektrophorese-Einheit	Bio-Rad Laboratories, München
PCR-Gerät iCycler iQ™5	Bio-Rad Laboratories, München
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA
Inkubator	INFORS AG, Bottmingen
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.3 Charcoal-Gavage zur Bestimmung der Dünndarmmotilität

Charcoal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gummi Arabigum	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
NaCl	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

Gavagenadel

2.1.4 Gewebeentnahme und Fixierung

Ketamin	BelaPharm GmbH, Feichta
Xylazin	Bayer AG, Leverkusen
Fragmin P Forte	Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl), ≥99,8%	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
OCT	medite Medizintechnik, Burgdorf
Waage	
Spritzen Omnifix 1ml	B/Braun Melsungen, Melsungen
Nadeln (Sterican)	B/Braun Melsungen, Melsungen
Schere	
Pinzette	

Stickstoff, flüssig
 Formalin (4% in PFA)
 Dinatriumhydrogenophosphat (Na₂HPO₄)
 Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)
 Einbettkassetten

CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 Neolab, Heidelberg

Ethanol
 Roti Histol
 Histowax
 Inkubator
 Paraffinausgießstation EG 1150H
 Kühlplatte Leica EG 1150C

Merk, Darmstadt
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 Histolab Products AB, Göteborg, Schweden
 Heraeus, Thermo, Langenselbold
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms

2.1.5 Triglyceridextraktion aus dem Lebergewebe

Chloroform
 Methanol
 BSA
 NaCl
 Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
 Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)
 Radox TRIGS Triglycerid-Kit (Nr.: 121047)
 Kontrollseren Level 2 und 3

CarlRoth & Co, Karlsruhe
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 Radox Laboratories LTD., Crumlin, UK
 Radox Laboratories, Krefeld

96-Well-Platte, U-Form
 Glashomogenisator
 Ultraschallgerät, SonoPuls
 Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4
 Zentrifuge 5417 R
 Vakuumzentrifuge Concentrator 5301

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 Bandelin, Berlin
 Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Histologische Färbungen

Hämatoxylin & Eosin-Färbung

Ethanol
 Roti Histol
 Hämatoxylin
 Eosin
 Entellan
 Objektträger Super Frost
 Kryotom Leica RM2255
 Wasserbad Leica HI1210
 Mikroskop Leica DM1000
 MikroskopAxioVert 200M
 Software AxioVision Release 4.5

Merk, Darmstadt
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 Merck, Darmstadt
 Menzel GmbH & Co, Braunschweig
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Zeiss, Jena

Oil Red O-Färbung

Oil Red O
 Isopropanol ≥99,5%
 Hämatoxylin
 Wässriges Eindeckmedium MEDITE
 Schälchen Cryomold Standard
 OCT

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
 medite Medizintechnik, Burgdorf

Objektträger Super Frost
 Kryotom Leica CM3050J
 Mikroskop Leica DM1000
 MikroskopAxioVert 200M
 Software AxioVision Release 4.5

Menzel GmbH & Co, Braunschweig
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Zeiss, Jena

Neutrophilen-Färbung

Naphthol AS-D Choloracetat-Esterase-Kit
 Ethanol
 Roti Histol
 Aceton
 Formalin 37%
 Hämatoxylin
 Wässriges Eindeckmedium MEDITE
 Schälchen Cryomold Standard
 Objektträger Super Frost
 Kryotom Leica RM2255
 Wasserbad Leica HI1210
 Mikroskop Leica DM1000
 MikroskopAxioVert 200M
 Software AxioVision Release 4.5

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 Merk, Darmstadt
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
 Menzel GmbH & Co, Braunschweig
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Zeiss, Jena

4-Hydroxynonenal-Färbung

Antiserum zu 4-Hydroxynonenal
 Ethanol
 Roti Histol
 TRIS
 Tween
 DAKO Envision Kit
 Hämatoxylin
 Entellan
 Objektträger Super Frost
 Kryotom Leica RM2255
 Wasserbad Leica HI1210
 Mikroskop Leica DM1000
 MikroskopAxioVert 200M
 Software AxioVision Release 4.5

A.G. Scientific, INC. San Diego, USA
 Merk, Darmstadt
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 DAKO, CA, USA
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 Merck, Darmstadt
 Menzel GmbH & Co, Braunschweig
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Zeiss, Jena
 Zeiss, Jena

2.1.7 Untersuchungen des intestinalen serotonergen Systems

Serotonin-Färbung

Serotonin Antikörper
 DAKO Envision Kit
 Hämatoxylin
 TRIS
 Tween
 Objektträger Super Frost
 Kryotom Leica CM3050J
 Mikroskop Leica DM1000
 MikroskopAxioVert 200M
 Software AxioVision Release 4.5

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 DAKO, CA, USA
 medite Medizintechnik, Burgdorf
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 Menzel GmbH & Co, Braunschweig
 Leica Camera AG, Solms
 Leica Camera AG, Solms
 Zeiss, Jena

Serotonin-ELISA

ELISA
 HCL
 Ascorbinsäure
 Stößel
 Ultraschallgerät SonoPuls
 Zentrifuge 5417 R
 Orbitalschüttler Shaker PSU-2T plus
 Wasserbad SWB 20
 Mehrkanalpipette

IBL, Hamburg
 CarlRoth & Co, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
 CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
 Bandelin, Berlin
 Eppendorf, Hamburg
 Boeco, Hamburg
 MS Laborgeräte, Wiesloch
 Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Alaninaminotransferase Enzymaktivitäts-Test

ALT (GPT) opt.

Randox Laboratories LTD., Crumlin, UK

Kontrollseren Level 2 und 3	Randox Laboratories, Krefeld
96-Well-Platten, U-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.1.9 β -Hydroxybutyrate Enzymaktivitäts-Test

Ranbut-Kit, D-3-Hydroxybutyrate	Randox Laboratories LTD., Crumlin, UK
Kontrollseren Level 2 und 3	Randox Laboratories, Krefeld
96-Well-Platten, U-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.1.10 Endotoxin Messung

Limulus Amebocyte Lysate Endochrome	Charles River Endosafe, Charleston, USA
Glasröhrchen	Multimed, Wicker, Kirchheim u. Teck
Endosafe, 96-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Essigsäure 99%	CarlRoth & Co, Karlsruhe
Wärmeschrank Medax	Medax GmbH & Co.KG, Rendsburg
Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.1.11 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

NaCl	CarlRoth & Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	CarlRoth & Co, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	CarlRoth & Co, Karlsruhe
Dye Reagent Konzentrat	Bio-Rad-Laboratories, München
BSA	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
96-Well-Platten, U-Form	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Photometer Bio-Tek Synergy HT, Software KC4	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall

2.1.12 Untersuchungen der Genexpression auf mRNA-Ebene

RNA-Isolation

peqGOLD TriFast™	PeQlab, Erlangen
Chloroform $\geq 99\%$	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Isopropanol $\geq 99,5\%$	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merk, Darmstadt
RNase-freies Wasser	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe

Elektrischer Homogenisator TissueRuptor	Quiagen GmbH, Hilden
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Wärmeschrank Medax	Medax GmbH & Co.KG, Rendsburg

cDNA-Synthese

5x MuIV Buffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNase (1U/ μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EDTA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Oligo dT	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf
dNTP	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
MuIV Reverse Transcriptase (20 U/ μl)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase-freies Wasser	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
UV-96-Well-Platten	BD Bioscience, Heidelberg
Photometer Bio-Tek Synergy HAT, Software KC4	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf

Realtime RT-PCR

SYBR® Green	Applied Biosystems, Darmstadt
-------------	-------------------------------

Primer: SGLT1	MWG-Biotech, Ebersberg
Glut2	MWG-Biotech, Ebersberg
FAS	MWG-Biotech, Ebersberg
ChREBP	MWG-Biotech, Ebersberg
Bdh1	MWG-Biotech, Ebersberg
TNF α	MWG-Biotech, Ebersberg
5-HT3aR	MWG-Biotech, Ebersberg
MyD88	MWG-Biotech, Ebersberg
β -Actin	MWG-Biotech, Ebersberg
RNase-freies Wasser	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
Strips, 200 μ l Thin Wall	Bio-Rad Laboratories, München
Filtertips Tip One (0.1-10 μ l; 1-20 μ l; 1-200 μ l; 101-1000 μ l)	Starlab GmbH, Ahrensburg
RT-PCR-Gerät iCycler iQ™5, Software iQ Version 2.0	Bio-Rad Laboratories, München
Primer3	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA

2.1.13 Isolation von Gesamtprotein

RIPA

MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaCl	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
NP-40-Lösung	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) >99%, p.a.	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
SDS 10% (Natriumdodecylsulfat)	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Stößel	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ultraschallgerät SonoPuls	Bandelin, Berlin
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

Urea/DTT

Protein-Phase der Trizol Proben	
Isoporpanol > 99.5%	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol absolut	Merk, Darmstadt Guanidinhydrochlorid
Harnstoff	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Vakuumpzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Multi Gourmet	Braun, Frankfurt
Stößel	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe

2.1.14 Western Blot

DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ladungspuffer	
30% Acrylamid/Bis-Lösung	Bio-Rad Laboratories, München
Tris base	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
10% SDS (Natriumdodecylsulfat)	Gibco/Invitrogen Corp., Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin) ~99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
APS	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Glycin >99% p.a	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Methanol ROTISOLV® HPLC Ultra Gradient Grade	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Primäre Antikörper	
- SERT Goat (70 kDa)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

- Occludin Mous (65 kDa)	Zymed, Laboratories, San Francisco, USA
- β -Actin Rabbit (45 kDa)	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Sekundäre Antikörper	
- Anti-goat IgG, HRP-linked	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
- Anti-mouse IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., USA
- Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Full Range Rainbow Molekular Weight Markers (12000-225000Da)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
BSA	
Magermilch	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Tween [®] 20	Sucofin, Zeven
NaCl	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
PVDF-Membran Hybond-P	
Gel Blot Paper Whatman-Papier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK Whatman International Ltd, UK
Mini Vertical Gel System	
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Neolab, Heidelberg
Electroblotting System, Semi-Dry Hep-1 Panther	Pharmacia, Schweden
	Owl Seperation Systems, Portsmouth, USA
Wackeltisch ST5 CAT	Neolab, Heidelberg
Kamera + FluorChem Software	Alpha Innotech, Biozym Scientific GmbH, Oldenburg
2.1.15 Zellkulturversuch mit CaCo2 Zellen	
CaCo2, Humane endothelartige Kolonzellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Alpha Modification of eagle's medium, without ribosides & deoxyribosides, with L-Glutamine, endotoxin tested, sterile filtered FCS (Fetal Calf Serum)	
Penicillin-Strptomycin (10000 IU/ml-10000 μ /ml)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Ethanol, ROTIPURAN [®] , >99.8%, p.a.	CarlRoth GmbH & Co., Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching,
Österreich	
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V, ~99%, proteasefrei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblau-Lösung, 0.4%, steril filtriert, cell-culture tested	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
LPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Serotonin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glukose	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Fruktose	CarlRoth GmbH & Co, Karlsruhe
Millicell-ERS Instrument	Millipore, Bedford, USA
6-Wellplatten	
Membraneinsätze für 6-Wellplatte (0,4 μ m Porengröße)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Neubauer Zählkammer	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glaspipetten (10 ml, 20 ml)	Assistent, Kirchheim u. Teck
Combitips plus (1 ml, 5 ml)	Multimed Wicker GmbH, Hircheim u. Teck
Falcon Tubes, Cellstar [®] PP tubes with screw cap (15 ml, 50 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
INNOVA CO-120 CO ₂ Inkubator	Greiner, Frickenhausen
Laminar Flow Biosafe	
	New Brunswick Scientific, PeproTech, UK Dipl.-Ing. W. Ehret GmbH, Emmendingen

Pipettus®

GS-6R Zentrifuge
Zentrifuge 5417 R
Mikroskop

Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.,
Eberstadt
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Eppendorf AG, Hamburg
Olympus, Hamburg

2.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Reaktionsgefäße (0.65 ml, 1.5 ml, 2 ml)
Falcon mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)
Feinwaage Kern ARS 120-4
Vortex-Mixer 7-2020
Schälchen Cryomold Standard
Kolbenhubpipette
Spitzen für Kolbenhubpipette

Eppendorf, Hamburg
Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen
Kern, Balingen
Neolab, Heidelberg
Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Eppendorf, Hamburg
Sarsted AG & Co, Nümbrecht

2.3 Software

MS Office 2003
GraphPad Prism Version 4.00
Statistic SPSS Version 17.00

Microsoft Corporation
GraphPad Software, San Diego California
USA
SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.4 Methoden

2.4.1 Versuchstiere, Versuchstierhaltung und Fütterungsstudien

Alle Tierversuche wurden beim Regierungspräsidium Stuttgart, Ref. 35 Veterinärwesen, Lebensmittelüberwachung, im Versuchsantrag Nr. V222/05 EM, Nr. V249/07 EM und Nr. V251/08 EM beantragt und genehmigt. Sechs bis 8 Wochen alte C57BL/6J-Mäuse wurden von Janvier bezogen. Die verwendeten SERT-Knockout-Tiere, die kommerziell nicht erhältlich sind, waren ein Geschenk von Prof. Gershon von der Columbia Universität, New York, USA. Diese knockout Maus basiert auf der Ersetzung des SERT Exons 2 durch eine 1.8 kb PGK neomycin-ploy A Expressionskassette (Bengel et al., 1997; Bengel et al., 1998). Ein weiteres Modell, das in Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, waren Leptin-defiziente Mäuse (Ob/Ob) basierend auf einer spontanen Mutation im Leptin-Gen. Diese Tiere stammen von Jackson Laboratories (USA)-Tieren ab (Stock-Nummer: 000696). Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere unter kontrollierten Beleuchtungs- und Luftverhältnissen (Dunkelphase von 7.00 Uhr bis 19.00 Uhr; Lichtphase von 19.00 Uhr bis 7.00 Uhr; 50-60 % Luftfeuchtigkeit) in SPF-Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ gehalten. Während des gesamten Versuchszeitraums hatten die Tiere *ad libitum*-Zugang zu Standardfutter oder einem Nährstoffangereicherten Futter (M-Z Ereiche (mice-breeding, energy enriched oder Spezial (Nährstoffreich)) ssniff®) und Flüssigkeit.

2.4.1.1 Genotypisierung der verschiedenen genetisch veränderten Mäuse

Genomische DNA-Präparation aus Mausschwanzspitzen

Die frisch geschnittenen Mausschwanzspitzen wurden in 250 µl Lysis-Puffer mit 100 pg Proteinase K über Nacht bei 55°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min. Der Überstand wurde mit 250 µl Isopropanol gemischt und die Lösung sanft geschüttelt. Die ausgefallene genomische DNA wurde in 100 µl TE-Puffer überführt und bei 55°C in den folgenden 4 Stunden resuspendiert.

Tabelle 2.4.1 Lysis-Puffer zur Isolation von DNA aus Mausschwanzgewebe

Puffer für DNA Isolation aus Mausschwanzgewebe	
Tris (pH 8.5)	100 mM
NaCl	200 mM
EDTA	5 mM

SDS	0.2%
Proteinase K	100 µg

Tabelle 2.4.2 TE-Puffer zum Lösen der isolierten DNA

Puffer zur Lösung der aus Mausschwanzgewebe isolierten DNA	
Tris (pH 8.0)	10 mM
EDTA	1 mM

PCR zur Genotypisierung von transgenen Mäusen

Zur Analyse des Genotyps von transgenen Mäusen wurde die PCR-Analyse herangezogen. Es wurde 1 µl genomische DNA eingesetzt, sowie 300 nM Primer. Der Pipettieransatz für eine Probe ist in Tabelle 2.4.3 aufgelistet. Der Ansatz entspricht einem Gesamtvolumen von 19 µl der mit 1 µl DNA versetzt wurde.

Tabelle 2.4.3 Pipettierschema für einen PCR-Ansatz

Reagenzien in µl	SERT	Ob/Ob
H ₂ O	13.5	14.5
10x Reaktionspuffer S	2.0	2.0
10 mM dNTP's	0.4	0.4
Primer 1, 2, 3	1.0	1.0
Taq (1, 25 Units/Reak)	0.1	0.1

Tabelle 2.4.4 Primersequenzen für die Genotypisierung

	Primer-Sequenz
Sert 3	5'-CTG TCT GTC ATT GGC TAT GC-3'
Sert 4	5'-CTG ACT GCA GTA CAG GCT AG-3'
Neo 3	5'-CCA TCA TGG CTG ATG CAA TGC G-3'
Leptin 1	5'-TGT CCA AGA TGG ACC AGA CTC-3'
Leptin 2	5'-ACT GGT CTG AGG CAG GGA GCA-3'

Tabelle 2.4.5 PCR-Protokoll für die Genotypisierung

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1x	94°C	4 min
37x	94°C	15 sec
	60°C	30 sec
	72°C	1 min
1x	72°C	4 min
	4°C	∞

Anschließend wurde das PCR-Produkt der Ob/Ob Mäuse mit dem Restriktionsenzym Dde1 verdaut. Dies geschah nach folgendem Ansatz:

Tabelle 2.4.6 Verdau des PCR-Produktes von Ob/Ob Mäusen

	Dde1	Puffer3
20 µl DNA-Produkt	0.86 µl	2.29 µl

Nach eineinhalb Stunden bei 37°C wurde die Reaktion abgestoppt und das erhaltene Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Für die Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese wurden folgende Puffer benötigt:

Tabelle 2.4.7 TAE-Puffer für die Herstellung des Gels

50x TAE-Ansatz	
Tris-Essigsäure	2 M
EDTA	50 mM

Tabelle 2.4.8 5x Ladepuffer für die Beladung des Gels

50% Glycerol	5 ml
10% SDS	1 ml
0.05% Bromphenolblau	0.005 g
Tris (pH 6.8)	0.313 M
Wasser	ad 10 ml

Entsprechend der geringen Größe der aufzutrennenden Fragmente wurde ein 1.5% Agarosegel in 1x TAE-Puffer verwendet. Zur Färbung der DNA wurde dem Gel 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden vor dem Laden mit 5x Ladepuffer versetzt und anschließend bei 110 V für 45 min elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Lauf wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht (254 nm) analysiert und dokumentiert. In die Versuche wurden nur Tiere mit homozygotem Genotyps aufgenommen. Die Interpretation der erhalten Banden wurden wie in Tabelle 2.4.9 durchgeführt.

Tabelle 2.4.9 Bandenfragmente zur Ermittlung des Genotyps

	SERT	Ob/Ob
Wild-Typ (+/+)	230 bp	155 bp
Heterozygot (+/-)	600 bp	55/100/155 bp
Homozygot (-/-)	230/600 bp	55/100 bp

2.4.1.2 Behandlung mit 30%iger Glukose- oder Fruktose Trinklösung und Tropisetron (Navoban)

Sechs bis acht Wochen alte C57BL/6J Mäuse wurden 8 Wochen lang mit 30%iger Glukose-, Fruktoselösung oder Wasser als einzige Trinklösung gefüttert. Zusätzlich wurden einige Tiere parallel mit Tropisetron in der Trinklösung behandelt. Die verabreichte Konzentration (0.2 mg/kg) entspricht der empfohlenen Dosis für Kleinkinder. Der Tropisetrongehalt in den Trinklösungen wurde wöchentlich an das Gewicht der Versuchstiere angepasst. Während dieser 8-wöchigen Fütterungsphase wurden alle drei Tage die Trinklösungen erneuert, um einen eventuellen Verderb und Zerfall des Tropisetrons sowie der Zuckerlösungen zu vermeiden. Sowohl die Gewichtszunahme als auch die Futter- und Flüssigkeitsaufnahme wurden

regelmäßig dokumentiert. Da sich in den Untersuchungen von Bergheim et al. (2008) herausstellte, dass die glukosegefütterten Tiere weniger an Trockenfutter aufnehmen als die Kontrollen, bekamen diese ein spezielles Futter, das mit einer erhöhten Menge an Nährstoffen versetzt war (M-Z Ereiche Spezialfutter (Nährstoffreich), ssniff®). Am Ende der Fütterungsphase wurden die Tiere zur Gewebeentnahme terminal narkotisiert, zuvor erhielten die C57BL/6J Mäuse noch einen Bolus Charcoal-Suspension (siehe Abschnitt 2.4.1.5) um die intestinale Motilität zu bestimmen.

2.4.1.3 Fütterung mit 30%iger Glukose- oder Fruktose-Trinklösung

Sechs bis acht Wochen alte C57BL/6J, SERT-Knockout und SERT Wild-Typ Mäuse wurden 8 Wochen lang mit 30%iger Glukose-, Fruktoselösung oder Wasser als einzige Trinklösung gefüttert. Während dieser 8-wöchigen Fütterungsphase wurden alle drei Tage die Trinklösungen erneuert, um einen eventuellen Verderb der Lösungen zu vermeiden. Die Gewichtszunahme wurde einmal wöchentlich dokumentiert. Da sowohl die mit Glukose als auch mit Fruktose gefütterten Tiere weniger an Trockenfutter aufnahmen als die Kontrollen bekamen diese ein spezielles Futter, das mit einer erhöhten Menge an Nährstoffen versetzt war (M-Z Ereiche Spezialfutter (Nährstoffreich), ssniff®). Am Ende der Fütterungsphase wurden die Tiere zur Gewebeentnahme terminal narkotisiert, zuvor erhielten die C57BL/6J Mäuse noch einen Bolus Charcoal-Suspension (siehe Abschnitt 2.4.1.5).

2.4.1.4 Behandlung von genetisch bedingten adipösen Ob/Ob Mäusen mit Tropisetron (Navoban)

Vier Wochen alte Ob/Ob und schlanke Wild-Typ Mäuse erhielten 6 Wochen lang Wasser oder Wasser mit Tropisetron als Trinklösung. Die verabreichte Konzentration entspricht der Dosis für Kleinkinder und liegt bei 0.2 mg/kg Körpergewicht. Der Tropisetrongehalt in den Trinklösungen wurde wöchentlich an das Gewicht der Versuchstiere angepasst. Während dieser 6-wöchigen Fütterungsphase wurden alle drei Tage die Trinklösungen erneuert um einen Zerfall des Tropisetrons zu vermeiden. Die Gewichtszunahme wurde regelmäßig dokumentiert.

2.4.1.5 Charcoal-Gavage zur Untersuchung der Dünndarmmotilität

Am Versuchstag erhielten die Tiere fünf Minuten vor der terminalen Narkose (siehe Abschnitt 2.4.1.7) intragastral eine Charcoal-Suspension bestehend aus 0.5 g Charcoal, 0.25 g Gummi arabicum und 5 ml isotonische Lösung (0.9 % NaCl) mittels

Schlundsonde verabreicht (Körpergewicht des Tieres in Gramm multipliziert mit 15 = Suspensionsvolumen in μl). Zur Bestimmung der Dünndarmmotilität wurde 10 min nach terminaler Narkose die Wanderungsdistanz der Charcoal-Suspension im Dünndarm mit einem Lineal gemessen.

2.4.1.6 Gewebeentnahme

Mittels einer intraperitonealen Injektion eines Gemisches aus 80 mg Ketamin und 6 mg Xylazin pro kg Körpergewicht wurden die Tiere am Versuchsende terminal narkotisiert. Im Anschluß wurde das Abdomen geöffnet. Zunächst wurde Blut aus der *Vena portae* entnommen, das sofort mit 15 μl Heparin (1:10-Gemisches in 0.9%iger Natriumchloridlösung) versetzt und auf Eis gestellt wurde. Das Blut wurde zur Gewinnung von Plasma 14 min bei 1500 rpm und 15°C zentrifugiert und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die histologische Befundung der Leber wurde Gewebe des *Lobus sinister hepatis lateralis* entnommen und in 4% PBS-gepuffertem Formalin (siehe Tabelle 2.4.10) für mindestens 24 h fixiert.

Tabelle 2.4.10 4% PBS-gepuffertes Formalin zur Fixierung von Gewebe

Chemikalien	Menge
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	20 g
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	32.5 g
Formaldehydlösung 37%ig	500 ml
ddH ₂ O	4500 ml

Zusätzlich wurde ebenfalls ein Stück des *Lobus sinister hepatis lateralis* in OCT gefrierfixiert. Die restliche Leber wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend wurde das Duodenum entnommen und mit PBS und PBS/OCT-Gemisch (1:1) gespült. Der direkt an den Pylorus anschließende Darmabschnitt, wurde in ca. 0.5 cm lange Stücke geschnitten und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der folgende Darmabschnitt wurde zu einer Schnecke gedreht und in OCT gefrierfixiert. Beides wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts

Um die hepatischen Triglyceride basierend auf der Methode nach Folch et al. (1957) isolieren zu können, wurden 50 mg Lebergewebe in 1 ml 2x PBS (pH 7.4) in einem Glashomogenisator und durch Behandlung mit Ultraschall (30 sec, 6 cycles) homogenisiert. Zu 500 μl des Lebergesamthomogenats wurden 750 μl

Chloroform/Methanolgemisch (2:1) hinzugefügt. Die Proben wurden 10 min gevortext und weitere 30 min auf dem Schwenktisch geschüttelt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 4°C, 14000 rpm). Von der unteren organischen Phase wurden 200 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Vakuumzentrifugation wurde das Chloroform verdampft. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl BSA (5%) resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (20 sec, 6 Cycles). Nach Einfrieren bei -80°C und Wiederauftauen wurden die Proben erneut mit Ultraschall behandelt (20 sec, 6 cycles), gevortext und 30 min bei 37°C inkubiert. Mit einem kommerziell erhältlichen Kit (RANDOX), welches auf einem colorimetrischen Nachweisverfahren basiert, wurde die Bestimmung des hepatischen Triglyceridgehalts nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden bei 500 nm photometrisch gemessen und der Triglyceridgehalt wie folgt berechnet:

$$\text{Triglyceride [mg/100 ml]} = \text{Konzentration}_{(\text{Standard})} * (\text{Absorption}_{(\text{Probe})} / \text{Absorption}_{(\text{Standard})})$$

Der Gehalt an Triglyceriden wurde auf die Proteinkonzentration des Lebergesamthomogenats bezogen, die durch den Bradford-Assay bestimmt wurde (siehe Abschnitt 2.4.11).

2.4.3 Histologische Färbungen

Hämatoxylin und Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Struktur des Lebergewebes und der histologischen Befundung wurde das formalinfixierte Gewebe mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hierzu wurden bei der Gewebeentnahme Leberstücke zunächst in 4% PBS gepuffertem Formalin (Anleitung siehe Tabelle 2.4.10) fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (Anleitung siehe Tabelle 2.4.11). 5 µm dicke Gewebeschnitte wurden über ein Wasserbad (41°C) auf Objektträger überführt und bei 37°C für 48 Stunden getrocknet. Danach wurden die Schnitte für 10 min in RotiHistol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe in absolutem, 96%igem, 70%igem Ethanol und destilliertem Wasser (jeweils 2 min) rehydriert. Die Schnitte wurden dann zur Färbung der Zellkerne 2-5 min lang in Hämatoxylin inkubiert unter fließendem Leitungswasser gebläut und zur Abstopfung der Farbreaktion in destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte in einer 40%igen Ethanollösung 2 min und

anschließend 30-60 sec in der Eosin-Färbelösung inkubiert. Die Färbeintensität wurde unter dem Mikroskop geprüft. Bei positiver Färbung wurden die Proben in aufsteigender Alkoholreihe von 70%igem über 96%igem bis hin zum absoluten Ethanol dehydriert. Es folgte eine 10 min Inkubation in RotiHistol. Dann wurden die Proben mit Entellan eingedeckt. Bei einer 100-fachen Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop Aufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte gemacht und eine auf dem Befundungssystem von Nanji et al. (1989) basierende Auswertung der Leberhistologie vorgenommen, bei dem pro Schnitt in 10 verschiedenen Feldern der Grad der Verfettung, Inflammation und Nekrose bestimmt wurde (Bewertungsschema siehe Tabelle 2.4.12).

Tabelle 2.4.11 Einbettung von Gewebe für immunohistochemische Färbungen

Behandlung	Inkubationszeit
4%iges Formalin	≥ 24 h
Fließendes kaltes Leitungswasser	
75% EtOH	1 h
85% EtOH	1 h
95% EtOH	über Nacht
100% EtOH	1 h
100% EtOH	1 h
100% EtOH	1 h
100% EtOH : Roti-Histol (1:1)	30 min
Roti-Histol	1 h
Roti-Histol	1 h
Paraffin	30 min
Paraffin	30 min
Paraffin	30 min
Einbettung der Gewebeschnitte in Paraffin	

Tabelle 2.4.12 Befundungsskala nach Nanji et al. zur Ermittlung des Grades der Leberverfettung (%), Inflammation und Nekrose im Lebergewebe

Fetthaltige Hepatozyten	Inflammation	Nekrose	Punkte
< 25%	1 Stelle mit infiltrierten Zellen	1 Stelle mit nekrotisierten Zellen	+1
25% - 50%	2 Stellen und mehr mit infiltrierten Zellen	2 Stellen und mehr mit nekrotisierten Zellen	+2
50% - 75%	-	-	+3
> 75%	-	-	+4

Oil Red O-Färbung

Zur histologischen Darstellung der Lipidakkumulation im Lebergewebe wurden Gefrierschnitte des Lebergewebes mit Oil Red O gefärbt. Hierbei werden Fetttröpfchen in der Leber durch den roten Farbstoff angefärbt. 10 µm dicke Kryoschnitte (Lebergewebe gefrierfixiert in OCT) wurden 12 min mit Oil Red O

gefärbt. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 300 mg Oil Red O in 100 ml Isopropanol gelöst und zweimal filtriert. 48 ml dieser Stocklösung wurden mit 32 ml destilliertem Wasser gemischt und nach 10 min sofort zur Färbung verwendet. Anschließend wurden die Gewebeschnitte zweimal mit destilliertem Wasser, dann 5 min lang unter kaltem fließendem Leitungswasser und anschließend wiederum einmal mit destilliertem Wasser gespült. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte 45 sec in Hämatoxylin inkubiert und ca. 3 min lang unter kaltem fließendem Leitungswasser „gebläut“. Nach einmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit wässrigem Eindeckmedium eingedeckt. Bei 400-facher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop von den gefärbten Gewebeschnitten Aufnahmen gemacht und diese densitometrisch mit der Software AxioVision ausgewertet. Das Ausmaß der mit Oil Red O angefärbten hepatischen Lipideinlagerung wurde prozentual (% of microscope field) angegeben. Pro Gewebeschnitt wurden 5 Aufnahmen gemacht und der jeweilige Mittelwert der prozentualen Lipideinlagerung errechnet.

Neutrophilen-Färbung

Zur Färbung von neutrophilen Granulozyten in der Leber wurde ein kommerziell erhältliches Kit der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Hierzu wurde fixiertes Gewebe (Formalin oder Kryo) in Gegenwart eines Diazoniumsalzes inkubiert. Die enzymatische Hydrolyse von Esterverbindungen setzt freie Naphtholverbindungen frei, die sich im Folgenden mit dem Diazoniumsalz verbinden und an den Enzymaktivitätsstellen Ablagerungen intensiver Färbung bilden.

In den folgenden Tabellen sind die Arbeitsschritte der Einbettung (siehe Tabelle 2.4.11) und der Färbung der Lebern (siehe Tabelle 2.4.13-15) zusammengefasst.

Tabelle 2.4.13 Färbung von Gewebeschnitten mit Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase

Behandlung	Inkubationszeit
Roti-Histol	10 min
100% EtOH	5 min
96% EtOH	5 min
70% EtOH	5 min
ddH ₂ O	5 min
ddH ₂ O	5 min
Auftropfen von 1-4 Tropfen der Fixierlösung	30 sec
ddH ₂ O	60 sec
Inkubation der Schnitte bei 37°C in der Färbelösung	15 min
Kontrolle der Färbung mittels Mikroskop	
Gegenfärbung mit Hämatoxylin	15 sec

Eindecken der Gewebeschnitte mit MediMount
--

Tabelle 2.4.14 Fixierlösung der Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung

Chemikalien	Menge
Citratlösung	2.5 ml
Aceton	6.5 ml
37%iges Formalin	0.8 ml

Tabelle 2.4.15 Färbelösung der Naphthol AS-D Chloroacetat Esterase-Färbung

Chemikalien	Menge
ddH ₂ O (auf 37°C vorgewärmt)	40 ml
Sodium Nitrite Solution	1 ml
Fast Red Violet LB Base (mit Sodium Nitrite Solution gemischt ins vorgewärmte ddH ₂ O geben)	1 ml
TRIZMAL	5 ml
Naphthol AS-D Chloroacetate Solution	1 ml

Mit Hilfe eines Zeiss AxioVert 200M-Mikroskops und der Software AxioVision Release 4.5 wurden je Präparat fünf Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung gemacht und der Mittelwert der pro Schnitt ausgezählten neutrophilen Granulozyten gebildet.

4-Hydroxynonenal-Addukt-Färbung (4-HNE)

4-Hydroxynonenal, ist ein reaktives, α,β -ungesättigtes Aldehyd, das aus der Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren entsteht. Bei diesem Vorgang werden wiederum Proteine unter Bedingungen des oxidativen Stresses modifiziert, d.h. geschädigt. Für die Färbung wurde in Paraffin eingebettetes Lebergewebe verwendet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurden wie schon bei der H&E-Färbung beschrieben vorgenommen. Anschließend erfolgte die Färbung nach Anleitung des Herstellers mit einem entsprechenden primären Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.6). Bei 400-facher Vergrößerung wurden, unter dem Mikroskop von den gefärbten Gewebeschnitten Aufnahmen gemacht und diese densitometrisch mit der Software AxioVision ausgewertet. Das Ausmaß der Braunfärbung das die gebildeten 4-HNE-Addukte widerspiegelt, wurde prozentual (% of microscope field) angegeben. Pro Gewebeschnitt wurden 5 Aufnahmen gemacht und der jeweilige Mittelwert der prozentualen 4-HNE-Addukt Bildung errechnet.

Tabelle 2.4.16 Färbeprotokoll nach Anleitung des Herstellers

Behandlungsschritt	Zeit
Peroxidase-Block 1-2 Tropfen	5 min
Waschen in TBST	1 x 5 min
Primär Antikörper in gewünschter Verdünnung in TBST	30 min

Waschen in TBST	2 x 5 min
Labelled Polymer-HRP anti-rabbit (2. Antikörper)	30 min
Waschen in TBST	2 x 5 min
DAB+ Substratchromogen (Beobachtung der Braunfärbung unter dem Mikroskop)	ca. 5 min
ddH ₂ O	
Hämatoxylin	3-5 min
Leitungswasser	5-10 min
ddH ₂ O	
Eindecken mit Entellan/MediMount	

2.4.4 Untersuchung des serotonergen Systems im Darm

Serotonin-Färbung

Die Serotonin-positiven Zellen wurden in Kyrogewebeesschnitten von Duodenumpräparaten angefärbt. Die tiefgefrorenen Schnitte wurden kurz getrocknet und anschließend in TBST rehydriert, bevor diese wie in der Anleitung von DAKO beschrieben mit einem entsprechenden primär Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.7) gefärbt wurden. Bei 200-facher Vergrößerung wurden unter dem Mikroskop von den gefärbten Gewebeschnitten Aufnahmen gemacht und die angefärbten Zellen pro Feld gezählt. Pro Gewebeschnitt wurden 8 Aufnahmen gemacht und der jeweilige Mittelwert der Serotonin-positiven Zellen pro Präparat errechnet.

Messung des Serotonin-Gehalts

Der Serotonin-Gehalt im Duodenum wurde mittels eines Enzymimmunoassays von IBL ermittelt. Die tiefgefrorenen Duodenum Proben wurden in 10 µl/mg Gewebe 0.05 M HCL mit 0.1% Ascorbinsäure homogenisiert. Die anschließende Probenvorbereitung (Derivatisierung von Serotonin zu N-Acylserotonin) und die Durchführung des Assay wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Tabelle 2.4.17 und 2.4.18 zusammengefasst. Der kompetitive Enzymimmunoassay basierte auf der Konkurrierung des biotinylierten Antigens (Biotin) und des nicht biotinylierten Antigens (Probe) um die begrenzte Anzahl an Bindungsstellen des an die Wells der Mikrotiterstreifen gebundenen Antikörpers. Die Intensität der gebildeten Farbe nach der Substratreaktion war umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben. Die Ergebnisse der Proben konnten direkt anhand der Standardkurve (Konzentrationen des Standarts waren: 0; 0.08; 0.24; 0.73; 2.2; 6.6; 19.8 ng/ml) bestimmt werden.

Tabelle 2.4.17 5-HT ELISA: Acylierung der Proben und Kontrollen

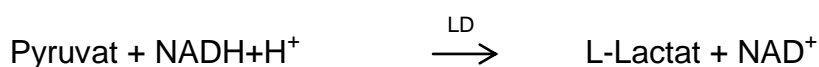
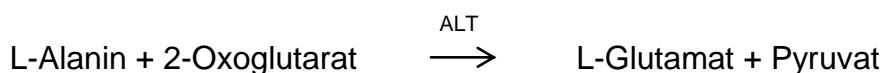
Nummer	Arbeitsschritt
1.	Je 20 µl der Kontrollen und Proben A in ein Eppi pipettieren.
2.	Je 100 µl verdünnten Assaypuffer in jedes Eppi pipettieren. Vortexen.
3.	Je 25 µl Acylierungsreagenz in jedes Eppi pipettieren. Jedes Eppi sofort nach dem Pipettieren vortexen.
4.	Eppi verschließen. 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubieren.
5.	Je 2 ml verdünnten Assaypuffer in jedes Eppi pipettieren. Vortexen.
6.	Alle Eppis 10 min bei 1500 x g zentrifugieren. Vorbereitete Proben müssen sofort analysiert werden. Der Überstand ist nur für 1 h bei RT stabil.

Tabelle 2.4.18 5-HT ELISA: Durchführung

Nummer	Arbeitsschritt
1.	Je 50 µl der Standards, acylierten Kontrollen und acylierten Proben in die entsprechenden Wells der Mikrotiterplatte pipettieren
2.	Je 50 µl Serotonin Biotin in jedes Well pipettieren.
3.	Je 50 µl Serotonin Antiserum in jedes Well pipettieren.
4.	Platte mit Haftklebefolie abdecken. Über Nacht (16-20 h) bei 2-8°C inkubieren.
5.	Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 3 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
6.	Je 150 µl frisch hergestelltes Enzymkonjugat in jedes Well pipettieren.
7.	Platte mit Haftklebefolie abdecken. 60 min bei RT (18-25°C) auf einem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubieren.
8.	Folie entfernen. Inkubationslösung verwerfen. Platte 3 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Restliche Flüssigkeit auf Papiertüchern ausklopfen.
9.	Substrat- und Stopplösung möglichst mit einer 8-Kanal-Pipette pipettieren und Substrat- und Stopplösung in denselben Zeitintervallen zugeben. Mit positivem Vorhub pipettieren, um die Bildung von Luftbläschen zu vermeiden.
10.	Je 200 µl frisch hergestellte PNPP Substratlösung in jedes Well pipettieren.
11.	30 min bei RT (18-25°C) auf einem Orbitalschüttler (500 U/min) inkubieren.
12.	Die Substratreaktion durch Zugabe von 50 µl PNPP Stopplösung in jedes Well stoppen. Platte kurz schütteln
13.	Die optische Dichte mit einem Photometer bei 405 nm (Referenzwellenlänge: 600-650 nm) innerhalb 60 min nach dem Pipettieren der Stopplösung messen

2.4.5 Kinetische Messung der Alaninaminotransferase (ALT) im Plasma

Die Alaninaminotransferase wurde mittels eines Enzymaktivitätstest der Firma Randox bestimmt. Die Ergebnisse der Messungen beruhen auf dem enzymatischen Prinzip der „International Federation of Clinical Chemistry“, welches in den folgenden Gleichungen zusammengefasst ist:

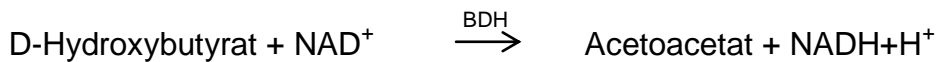


10 µl Plasma wurden mit 100 µl Enzym-Reagenz in einer 96-Wellplatte gemischt und bei 340 nm gemessen. Die Messungen erfolgten 1, 2 und 3 min nach Mischen von Plasma und Enzym-Reagenz. Aus den detektierten Extinktionswerten wurden die

Differenzen ermittelt und anschließend mit der Formel: $U/L = 1746 \times \Delta \text{ Absorption}$ (340 nm/min) die vorliegende ALT-Aktivität berechnet.

2.4.6 Messung der β -Hydroxybutyrat-Enzymaktivität im Plasma

β -Hydroxybutyrat (Ketonkörper) wurde mittels Enzymaktivitätstest von der Firma Randox bestimmt. Die enzymatische Reaktion beruht auf folgender Reaktion:



5 μ l Plasma wurden mit 200 μ l Enzym-Reagenz in einer 96-Wellplatte gemischt und bei 340 nm gemessen. Die Messungen erfolgten 1, 2 und 3 min nach Mischen von Plasma und Enzym-Reagenz. Aus den detektierten Extinktionswerten wurden die Differenzen ermittelt und anschließend mit dem mitgeführten Standard verrechnet.

$$\text{D-3-Hydroxybutyrat (Ketonkörper) Konzentration (mmol/l)} = \text{Konzentration}_{(\text{Standard})}^* \left(\frac{\text{Absorption}_{(\text{Probe})}}{\text{Absorption}_{(\text{Standard})}} \right)$$

2.4.7 Bestimmung der Endotoxinkonzentration im Plasma

Die Endotoxinkonzentrationen wurden mittels eines Kits der Firma Charles River Endosafe unter pyrogenfreien Bedingungen ermittelt. Die Bestimmung beruht auf der von Friberger et al. (1982) beschriebenen quantitativen Methode, die eine endotoxinabhängige Aktivierung des Pfeilschwanzkrebses *Limulus*-Amoebocyten-Lysates (LAL) beinhaltet.

Die verwendeten Plasma-Proben wurden 20 min bei 70-75°C erhitzt. Alle Arbeitslösungen wurden wie vom Hersteller empfohlen angesetzt. Der gefriergetrocknete *E.coli* Control Standard Endotoxin (CSE) wurde in der vorgeschriebenen Menge an LAL-Reagenzwasser gelöst und konnte dann zur Verdünnung der Standardreihe, wie in Tabelle 2.4.19 dargestellt, eingesetzt werden.

Tabelle 2.4.19 Endotoxin: Verdünnungsreihe des *E. coli* Control Standard

Nummer	Standard Konzentration EU/ml
Standard 1	0.125
Standard 2	0.0625
Standard 3	0.0312
Standard 4	0.01560
Standard 5	0.00781
Standard 6	0.00390
Standard 7	0.00195
Standard 8	0 (Wasser)

25 µl der Probe, des Standards bzw. Blank wurden in eine 96-Wellplatte pipettiert und 5 min bei 37°C erwärmt. Anschließend wurden 25 µl der LAL-Lösung hinzugefügt und erneut für eine vom Hersteller individuell festlegten Zeitraum bei 37°C inkubiert. Nach diesem Schritt wurden 50 µl des chromogenen Substrat-S-2423/Puffer-Gemisches zugegeben und nach Vorgabe des Herstellers bei 37°C inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 20%iger Essigsäure gestoppt und sofort im Photometer bei 405 nm detektiert. Zur Auswertung wurde mittels einer Geraden die Steigung ermittelt. So konnte für jede Probe die entsprechende Konzentration errechnet werden.

2.4.8 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde basierend auf der Methode nach Bradford (1976) aus den Leber- bzw. Duodenumgesamthomogenaten durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Messung einer Verschiebung des Absorptionsmaximums durch die spezifische Bindung des Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an hydrophobe Seitenketten der Proteine. Die aus der Komplexbildung resultierende Farbänderung von rot nach blau kann anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.

Zunächst wurde das Leber- bzw. Duodenumgesamthomogenaten 1:30 oder 1:50 mit 2x PBS (PH 7.4), RIPA oder Urea/DTT verdünnt. 5 µl der verdünnten Probe wurden mit je 200 µl verdünnter Färbelösung (5 ml Dye-Reagent + 20 ml dest. Wasser) 5 min in einer 96-Wellplatte inkubiert und bei 595 nm photometrisch gemessen. Als Standard diente eine BSA-Stammlösung (100 mg/ml), die in den Konzentrationen 1 mg/ml; 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml; 0.125 mg/ml; 0.0625 mg/ml; 0 mg/ml eingesetzt wurde (jeweils 5 µl Standard + 200 µl Dye-Reagent). Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde mittels der Standard-Geradengleichung die Proteinkonzentration der Leber- bzw. Duodenumproben berechnet.

Tabelle 2.4.20 Bradford: Pipettierschema zur Generierung einer Proteinstandardkurve mit 100 mg/ml BSA Stammlösung

Nummer			Konzentration
Standard 6	2 µl der BSA-Stammlösung	+ 198 µl Puffer	1 mg Protein / ml
Standard 5	100 µl aus Standard 6	+ 100 µl Puffer	0.5 mg Protein / ml
Standard 4	100 µl aus Standard 5	+ 100 µl Puffer	0.25 mg Protein / ml
Standard 3	100 µl aus Standard 4	+ 100 µl Puffer	0.125 mg Protein / ml
Standard 2	100 µl aus Standard 3	+ 100 µl Puffer	0.0625 mg Protein / ml
Standard 1	--	100 µl Puffer	0 mg Protein / ml

2.4.9 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA aus Leber- bzw. Darmgewebe wurde das kommerziell erhältliche peqGOLD TriFast™ verwendet. Diese Isolationsmethode basiert auf dem Verfahren von Chomczynski & Sacchi (1987), in dem das aus Guanidinisothiocyanat und Phenol bestehende peqGOLD TriFast™ in einer Einschnitt-Flüssigphasen-Separation eingesetzt wird. Die RNA aus Leber- bzw. Darmgewebe wurde mit peqGOLD TriFast™ isoliert. 50-100 mg Leber- oder Duodenumgewebe wurden mit einem elektrischen Homogenisator (TissueRuptor) in 1 ml TriFast™-Reagenz homogenisiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden dem Überstand je 200 µl Chloroform zugesetzt, die Proben 15 sec geschüttelt und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 5 min) wurde die farblose Schicht von den weißen DNA- und der rosafarbenen Protein-Phase getrennt und mit 500 µl Isopropanol 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C) wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol (75%) gewaschen und erneut zentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wurde in 100 µl RNase-freiem Wasser (DEPC-behandelt) bei 55°C gelöst und bei -80°C eingefroren. Die RNA-Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt und jeweils 1 µg der Gesamt-RNA mittels MuLV Reverser Transcriptase in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurde folgender Ansatz pipettiert (siehe Tabelle 2.4.21):

Tabelle 2.4.21 Durchführung der cDNA-Synthese

<i>Pipettierschema der cDNA-Synthese</i>	
1 µg RNA/20 µl H₂O	
DNase-Verdau:	
5x MuLV-Buffer	5 µl
DNase	1 µl
<i>Inkubation: 15 min, 37°C</i>	
Abstoppung der Reaktion:	
25 mmol EDTA	2.5 µl
<i>Inkubation: 10 min, 70°C</i>	
cDNA-Synthese:	
5x MuLV-Buffer	5 µl
Oligo dT Primer	2.5 µl
dNTP	4 µl
MuLV Reverse Transkriptase	1 µl
RNase-freies Wasser	9 µl
<i>Inkubation: 60 min, 37°C</i>	
RNase-freies Wasser	50 µl

Realtime RT-PCR

Mit Hilfe des Online-Programms ‚Primer 3‘ (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) wurden spezifische Primer „designed“, die in Tabelle 2.4.22 aufgeführt sind. Die Expression von SGLT1, Glut2, FAS, ChREBP, Bdh1, TNF α , MyD88, 5-HT3a und β -Actin wurde in den Proben mittels 3-stufiger realtimeRT-PCR bestimmt (siehe Tabelle 2.4.23). Pro Probe wurden 10 μ l SYBR[®]Green, 3 μ l RNase-freies Wasser, 1 μ l Primer forward, 1 μ l Primer reverse und 5 μ l cDNA angesetzt. Die Konzentration des Zielgens wurde mit der vergleichenden C_T-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) berechnet und auf das Referenzgen (β -Actin) normalisiert.

Tabelle 2.4.22 Primersequenzen und Gewebe, in denen diese detektiert wurden (Duodenum = D; Leber = L)

	Primer-Sequenz forward	Primer-Sequenz reverse
SGLT1 (D)	5'-CAC CCA TCC CGT CCT ACG AG-3'	5'-CAA TCG GCC ACC ACA CCA TA-3'
Glut2 (D)	5'-ACT GGA AGC AGA GGG CGA TG-3'	5'-CAT GTC GGT GGG ACT TGT GC-3'
FAS (L)	5'-TCT GGG CCA ACC TCA TTG GT-3'	5'-GAA GCT GGG GGT CCA TTG TG-3'
ChREBP(L)	5'-CTG GAC CGA CCC CTC TCC TT-3'	5'-TTG TGG GTG CAG GAA GCG TA-3'
Bdh1 (L)	5'-GAA TTC AGC CTG CCG GTT TG-3'	5'-TGC ATC CCG CTG TCA GGT AA-3'
TNFα (L)	5'-CCA GGC GGT GCC TAT GTC TC-3'	5'-CAG CCA CTC CAG CTG CTC CT-3'
MyD88 (L)	5'-CAA AAG TGG GGT GCC TTT GC-3'	5'-AAA TCC ACA GTG CCC CCA GA-3'
5-HT3a (D)	5'-ACA CCA TCC AGG ACA TCA AC-3'	5'-CCA TGC ACA CCA CAA AGT AG-3'
β-Actin (L/D)	5'-GGC TCC TAG CAC CAT GAA -3'	5'-AGC CAC CGA TCC ACA CAG A -3'

Tabelle 2.4.23 Realtime RT-PCR Protokoll

Protokoll zur Messung der mRNA-Expression mittels realtime RT-PCR		
Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1x	95°C	3 min
50x	95°C	15 sec
	60°C	30 sec
	72°C	30 sec
71x	60°C	10 sec

2.4.10 Western Blot zur Bestimmung der SERT (Serotonin Wiederaufnahme-Transporter) und Occludin Proteinkonzentration

RIPA-Proteinisolation

Ca. 20 mg Darmgewebe wurde mit 200 μ l RIPA-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.4.24), dem Proteaseinhibitoren zugesetzt waren, in einem Eppendorf Tube und mit Hilfe eines Stößels homogenisiert. Nach 5 min zentrifugieren bei höchster

Geschwindigkeit und 4°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene Proteinmenge mittels Bradford (siehe Abschnitt 2.4.8) bestimmt.

Tabelle 2.4.24 Zusammensetzung des RIPA-Puffers zur Proteinisolation

RIPA		
MOPS (pH=7)	20 mM	209 mg
NaCl	150 mM	408 mg
EDTA	1 mM	250 µl (200 mM Stocklösung)
Nonidet P-40	1 % v/v	500 µl
Natriumdeoxycholat	1 % w/v	500 mg
SDS	(0.1 % w/v)	500 µl (10 %iges SDS)

Urea/DTT-Proteinisolation

Hier wurde die gewonnene untere Phase aus der RNA-Isolation (siehe Abschnitt 2.4.12) weiterverarbeitet, die die Proteine enthielt. Die Phenol/Ethanol-Phase wurde mit Isopropanol versetzt um das Protein auszufällen. Anschließend wurde dieses dreimal mit 0.3 M Guanidinhydrochlorid in 95% Ethanol und einmal mit 100% reinst Ethanol gewaschen. Das Proteinpellet wurde dann in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 10 M Harnstoff/ 50 mM DTT gelöst. Die Proben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem Stößel nochmals homogenisiert. Abschließend wurden die Proben für 10 min bei 10.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die vorliegende Proteinkonzentration mittels Bradford (siehe Abschnitt 2.4.8) bestimmt.

Gelelektrophorese

Nach der Proteinbestimmung wurden die jeweiligen Proteinextrakte aus RIPA (SERT) und Urea/DTT (Occludin) mit Ladungspuffer verdünnt, so dass je 10-30 µg Protein/Tasche auf das Gel aufgetragen wurden. Nach Zusatz von je 2 µl DTT wurden die Proben anschließend 5 min bei 95°C inkubiert.

10%-ige SDS-Polyacrylamidgele wurden zur Auftrennung der Proteine verwendet. Für 2 Trenngele (siehe Tabelle 2.4.25) wurde folgender Ansatz pipettiert:

Tabelle 2.4.25 Zusammensetzung des 10%-igen Trenngels für Western Blot

10%-iges Trenngel (Ansatz für 2 Gele)	
H ₂ O <small>bidest</small>	4.2 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung	3.3 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.6 ml

10% SDS	100 μ l
TEMED	6 μ l
10% APS	100 μ l

Nach ca. 20 min Auspolymerisieren wurde das Trenngel mit einem 4%-igen Sammelgel (siehe Tabelle 2.4.26) überschichtet.

Tabelle 2.4.26 Zusammensetzung des 4%-igen Sammelgels für Western Blot

4%-iges Sammelgel (Ansatz für 2 Gele)	
H ₂ O <small>bidest</small>	1.492 ml
30% Acrylamid/Bis-Lösung	333 μ l
0.5 M Tris (pH 6.8)	625 μ l
10% SDS	25 μ l
TEMED	3 μ l
10% APS	25 μ l

Für die Elektrophorese wurde der 10x Elektrophoresepuffer (siehe Tabelle 2.4.27) 1:10 verdünnt. Bei 90 V lief das Gel ca. 1:40 h.

Tabelle 2.4.27 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers (10x) für Western Blot

10x Elektrophoresepuffer	
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
H ₂ O <small>bidest</small>	1000 ml

Semy-Dry-Blotting

Nach der Elektrophorese wurden das Gel, die Whatmanpapiere und die zuvor mit Methanol aktivierte Hybond-P Polyvinylidendifluorid-Membran ca. 5 min in Transferpuffer (siehe Tabelle 2.4.28) inkubiert. Mittels eines Semy-Dry-Elektroblotters wurden anschließend die Proteine auf die Membran übertragen (bei 2 Gelen: 80 mA, 55 min). Zur Überprüfung einer gleichen Beladung mit Protein wurde die Membran nach einer Trocknungszeit von mindestens einer Stunde mit Ponceau S-Lösung angefärbt. Nach 45 min blocken mit Magermilch (5% in TBST für Occludin, 1% in TBST für SERT) oder mit BSA (2.5% in TBST für β -Actin) wurde die Membran jeweils mit dem primären Antikörper für SERT (1:500 verdünnt in 1% Magermilch in TBST), Occludin (1:500 verdünnt in 5% Magermilch in TBST), oder β -Actin (1:750 verdünnt in 2.5% BSA in TBST) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit den jeweiligen sekundären HRP-gekoppelten Antikörpern (1:5000 verdünnt) 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran erneut gewaschen und mit Substratlösung 5 min lang im Dunkeln inkubiert, 5 min lang belichtet und eine Aufnahme zur densitometrischen

Auswertung mit der zur Kamera gehörenden Software gemacht. Die Intensität der Banden für SERT und Occludin wurden auf das Referenzprotein β -Actin normalisiert.

Tabelle 2.4.28 Zusammensetzung des Transferpuffers für Western Blot

Transferpuffer	
Tris-Base	5.8 g
Glycin	2.9 g
SDS	0.37 g
Methanol	200 ml
H ₂ O <small>bidest</small>	ad 1000 ml

Tabelle 2.4.29 Zusammensetzung des TBST-Puffers für Western Blot

TBST	
Tris	8.77 g
NaCl	6.06 g
H ₂ O <small>bidest</small>	1000 ml
PH 7.6	
Tween [®] 20	1 ml

2.4.11 In vitro Versuch mit CaCo2 Zellen

Tabelle 2.4.30 Eigenschaften der Zelllinie CaCo2

CaCo2-Zelllinie	
Zellart	Humane ephileartige Kolonzellen
DSMZ-Nummer	ACC 169
Herkunft	im Jahr 1974 aus einem Primären Kolontumor von einem 72 Jahre alten Mannes gewonnen
Morphologie	Epithelial adherente Zellen; nach dem Splitten wachsen die Zellen in Kolonien
Verdopplungszeit	ca. 80 h

Zellkulturversuche zur Untersuchung der Permeabilität

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium (siehe Tabelle 2.4.31) gewechselt. Für die Inkubationsversuche wurden die Zellen in einer Dichte von 1-10⁶ pro Well in 6-Well Membraneinsätzen ausgesät. Die Zellen waren ab dem neunten Tag ausdifferenziert und konnten in den Versuch aufgenommen werden. Vorab wurde jeden zweiten Tag der transepitheliale Widerstand gemesse, um die Dichte der Zellen zu ermitteln. Ab dem Zeitpunkt der Ausdifferenzierung wurden die Zellen 24 h mit einem Starvationmedium (siehe Tabelle 2.4.32) inkubiert. Anschließend wurde dieses Medium basolateral durch ein weiteres Starvationmedium ersetzt, das keine Antibiotika enthielt und mit verschiedenen Konzentrationen an Serotonin (0-2.5 mM) supplementiert war. Damit wurden die Zellen für 20 min inkubiert, bevor apikal das Medium durch Antibiotika-freies Starvationmedium ersetzt wurde, dem 5 μ g LPS/ml zugesetzt war. Die Zellen wurden dann für 24 und 48 h inkubiert, bevor basolateral Medium entnommen wurde,

das bis zur Messung des Endotoxingehaltes bei -80°C gelagert wurde. Anschließend wurde das Protein mittels RIPA isoliert (siehe Abschnitt 2.4.15) und für Western Blot zu Ermittlung des Occludin Proteingehaltes herangezogen. Alle Zellkulturexperimente wurden dreimal angefertigt.

Tabelle 2.4.31 Zusammensetzung des Zellkulturmediums zur Anzucht von CaCo2

Zellkulturmedium	
α -Modification of Eagle's Medium	80%
FCS (hitze-inaktiviert)	20%
NEA	1%
Pen/Strep	1%

Tabelle 2.4.32 Zusammensetzung des Starvationmediums zur Versuchsvorbereitung von CaCo2

Starvationmedium	
α -Modification of Eagle's Medium	98%
NEA	1%
Pen/Strep	1%

Zellkulturversuche zur Untersuchung der SERT-Proteinkonzentration nach Inkubation mit Glukose oder Fruktose

Die Zellen wurden wie schon im Abschnitt zuvor beschrieben gehalten und für den Versuch kultiviert. Ab dem Zeitpunkt der Ausdifferenzierung wurden die Zellen 24 h mit einem Starvationmedium (siehe Tabelle 2.4.32) inkubiert. Anschließend wurde dieses Medium basolateral durch ein weiteres Starvationmedium ersetzt, das auch keine Antibiotika mehr enthielt. Apikal wurde Antibiotika-freies Starvationmedium mit 25 mM Fruktose oder 50 mM Glukose supplementiert zugesetzt. Die Zellen wurden dann für 24 h inkubiert und nach RIPA Protein isoliert (siehe Abschnitt 2.4.15) das dann für Western Blot eingesetzt wurde, um die Proteinkonzentration von SERT zu ermitteln. Alle Zellkulturexperimente wurden dreimal angefertigt.

2.4.12 Statistik

Innerhalb der einzelnen Gruppen wurde auf Varianzhomogenität (Test nach Bartlett) geprüft, um die Bedingungen für die Anwendung der ANOVA zu erfüllen. Zur Berechnung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurde eine Analyse der Varianzen (one-way-ANOVA) mit einem anschließenden post-hoc-Test nach Tukey durchgeführt. Ein t-test (two-way, unpaired) wurde durchgeführt um die statistische Signifikanz zwischen nur zwei individuellen Gruppen zu bestimmen (Statistic SPSS Version 17.0 Software; Graph Pad Prism Version 4.00, GraphPad

Software, San Diego, California, USA). Unterschiede wurden als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0.05$ war.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluß des 5-HT₃ Antagonisten Tropicsetron auf die Entwicklung des glukoseinduzierten Übergewichtes

Auswirkungen der Aufnahme einer 30%igen Glukoselösung auf das Körpergewicht, die Nahrungsaufnahme, die Motilität und die Anzahl Serotonin-positiver Zellen im Duodenum

Die Fütterung von Mäusen mit 30%iger Glukoselösung über 8 Wochen führte zu einer signifikant erhöhten Gewichtszunahme im Vergleich zu Kontrollen (+~1.9-fach) (siehe Tabelle 3.1). Zudem wiesen die glukosegefütterten Mäuse eine um ~34% höhere Flüssigkeitsaufnahme auf im Vergleich zu den Kontrollen. Die Aufnahme von Trockenfutter war bei den mit Glukoselösung gefütterten Tieren um ca. 60% reduziert im Vergleich zu den Kontrollen. Trotz dieser reduzierten Futterraufnahme war die Gesamtkalorienaufnahme der glukosegefütterten Tiere um das ~1.4-fache höher als das der Kontrollen. Für die Erfassung der möglichen Veränderungen im intestinalen serotonergen System der glukosegefütterten Mäuse wurden die Motilität und die Anzahl Serotonin-positiver Zellen im Duodenum erfasst. Hierbei wiesen, im Vergleich zu den Kontrollen, die glukosegefütterten Tiere eine signifikant um ~28% erhöhte Motilität sowie eine um das ~1.7-fache erhöhte Anzahl an Serotonin-positiven Zellen auf. Diese Ergebnisse könnten darauf hin deuten, dass das intestinale serotonerge System bei der glukoseinduzierten Adipositas involviert ist. Da die Motilität über den 5-HT₃ Rezeptor reguliert wird, wurde in weiteren Untersuchungen dieser 5-HT₃ Rezeptor mittels eines Antagonisten blockiert. Zusätzlich spielt dieser serotonerge Rezeptor eine Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme, die bei den Tieren in der glukosegefütterten Gruppe signifikant vermindert war (Hayes & Covasa, 2005).

Tabelle 3.1 Effekt der Aufnahme einer 30%iger Glukoselösung auf die Gewichtszunahme, die Kalorienaufnahme, die Dünndarmmotilität und die Anzahl Serotonin-positiver Zellen im Darm.

	Kontrolle	Glukose
N	7	7
Gewichtszunahme (in g)	3.3 ± 0.4	6.3 ± 0.7 ^a
Flüssigkeitsaufnahme (in ml/Woche)	50.7 ± 1.4	67.5 ± 2.2 ^a
Futterraufnahme (in g/Woche)	23.9 ± 0.6	9.7 ± 0.3 ^a
Gesamtkalorienaufnahme (pro Woche)	80.5 ± 1.9	115.7 ± 2.3 ^a
Motilität (Distanz in cm)	14.4 ± 0.7	18.4 ± 0.6 ^a
Serotonin-positive Zellen (Anzahl pro Feld)	12.4 ± 1.1	21.5 ± 1.1 ^a

Die Fütterung von gesüßtem Wasser ist im Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.4.1.2) beschrieben. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n = 7). ^ap < 0.05 im Vergleich zu Wasserkontrollen.

Effekt der 30%igen Glukoselösung und der gleichzeitigen Tropisetron-Behandlung auf die Dünndarmmotilität, Flüssigkeits-, Futter-, sowie Gesamtkalorienaufnahme und Gewichtszunahme in der Maus

Die Durchschnittliche Gewichtszunahme und repräsentative Bilder des Abdomens von allen vier Fütterungsgruppen (K, K+T, G, G+T) sind in Abbildung 3.1.1 dargestellt. In Tabelle 3.2 sind die Daten der Flüssigkeits-, Futter-, sowie Gesamtkalorienaufnahme und der Dünndarmmotilität zusammengefasst.

Die Dünndarmmotilität unterschied sich nicht zwischen Wasserkontrollen und Kontrollen, die im Wasser gleichzeitig Tropisetron erhielten. Im Gegensatz dazu war die Motilität bei den mit 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant um ~28% erhöht. Dies war bei den Mäusen die Glukose und Tropisetron in der Trinklösung erhielten vergleichbar zu Kontrollen.

Die durchschnittliche Flüssigkeits-, sowie Futteraufnahme war bei den mit Glukose gefütterten Tieren signifikant verändert im Vergleich zu den Kontrollen. Die gleichzeitige Behandlung mit Tropisetron hatte keine Auswirkungen auf die Flüssigkeits- und Futteraufnahme. Bei der Erfassung der Gesamtkalorienaufnahme pro Woche konnte eine signifikant höhere Aufnahme bei den mit 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen gemessen werden als bei den Kontrollen. Auch hierbei war die gleichzeitige Behandlung mit Tropisetron ohne Effekt auf den erfassten Parameter.

Tabelle 3.2 Effekt der Aufnahme einer 30%iger Glukoselösung und der gleichzeitigen Behandlung mit Tropisetron auf die Kalorienaufnahme und die Dünndarmmotilität

	Kontrolle	Kontrolle +Tropisetron	Glukose	Glukose +Tropisetron
N	7	7	7	7
Gewicht der Tiere zu Versuchsbeginn (in g)	18.5 ± 0.5	18.8 ± 0.2	18.9 ± 0.3	18.8 ± 0.5
Flüssigkeitsaufnahme (in ml/Woche)	50.7 ± 1.4	56.3 ± 1.6	67.5 ± 2.2 ^{a,b}	73.1 ± 0.7 ^{a,b}
Futteraufnahme (in g/Woche)	23.9 ± 0.6	23.8 ± 0.5	9.7 ± 0.3 ^{a,b}	9.2 ± 0.6 ^{a,b}
Gesamtkalorienaufnahme (pro Woche)	80.5 ± 1.9	81.5 ± 1.9	115.7 ± 2.3 ^{a,b}	121.6 ± 2.7 ^{a,b}
Motilität (Distanz in cm)	14.4 ± 0.7	16.8 ± 1.1	18.4 ± 0.6 ^{a,d}	13.4 ± 2.3

Die Fütterung von gesüßtem Wasser ist im Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.4.1.2) beschrieben. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n = 7). ^ap < 0.05 im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron, ^dp < 0.05 im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung + Tropisetron gefütterten Mäusen.

Wie in den repräsentativen Bildern des Abdomens der Mäuse in Abbildung 3.1.1 zu sehen, fand sich bei den mit Glukose gefütterten Tieren eine massive Fetteinlagerung. Eine ähnlich starke Verfettung des Abdomens war bei den mit Tropisetron behandelten Glukose gefütterten Tieren nicht zu finden.

Die erhöhte Kalorienaufnahme spiegelte sich auch in der Gewichtszunahme der glukosegefütterten Tiere wieder. Interessanterweise führte die gleichzeitige Behandlung mit Tropisetron bei den mit Glukose gefütterten Tieren zu keiner signifikanten Gewichtszunahme. Das Anfangsgewicht der Tiere war bei Versuchsbeginn in allen Gruppen ausgeglichen.

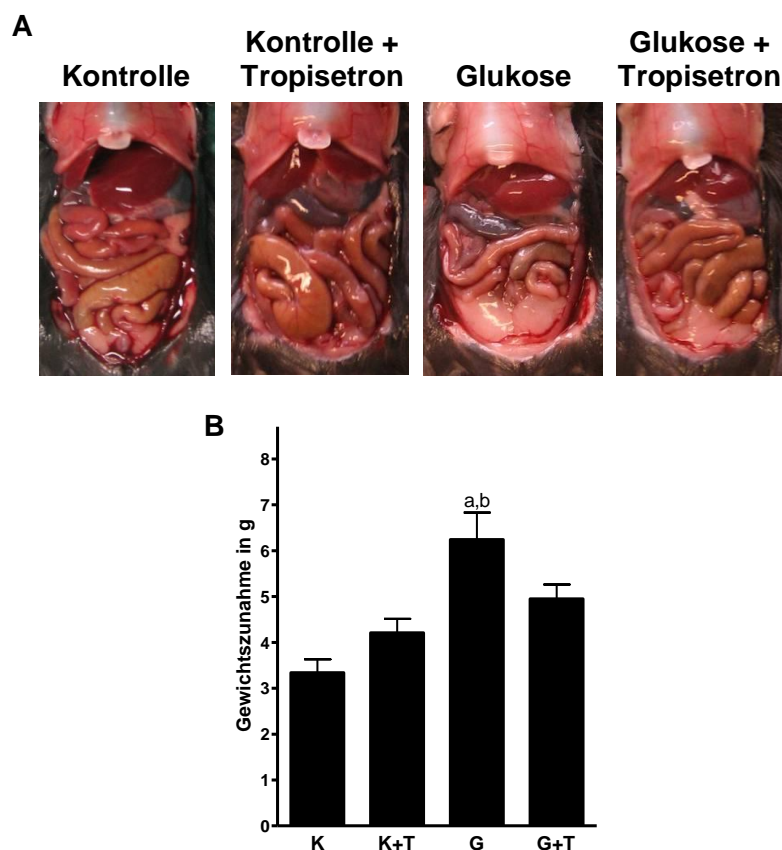


Abbildung 3.1.1 Effekt der 30%igen Glukoselösung mit gleichzeitiger Tropisetron-Behandlung auf die Gewichtszunahme. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) Repräsentative Aufnahmen des Abdomens aller Fütterungsgruppen. (B) Gewichtszunahme der Tiere während der 8-wöchigen Fütterung. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 7$). K – Kontrolle; K+T – Kontrolle + Tropisetron; G – Glukose; G+T – Glukose + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron.

Auswirkung der 30%igen Glukoselösung und der gleichzeitigen Tropisetron-Behandlung auf die Anzahl der Serotonin-positiven Zellen im Duodenum

Um festzustellen, ob die verminderte Gewichtszunahme bei den Tieren, die gleichzeitig Glukose und Tropisetron erhielten, mit Veränderungen im intestinalen

serotonergen System einhergeht, wurde die Anzahl der Serotonin-positiven Zellen im Duodenum untersucht. Die Fütterung mit Glukose führte im Gegensatz zu den Kontrollen und Kontrollen mit Tropisetron gefütterten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der Serotonin-positiven Zellen im Duodenum (Abbildung 3.1.2). Die zusätzliche Behandlung mit Tropisetron hatte keinen Einfluß auf die Anzahl an Serotonin-positiven Zellen im Duodenum.

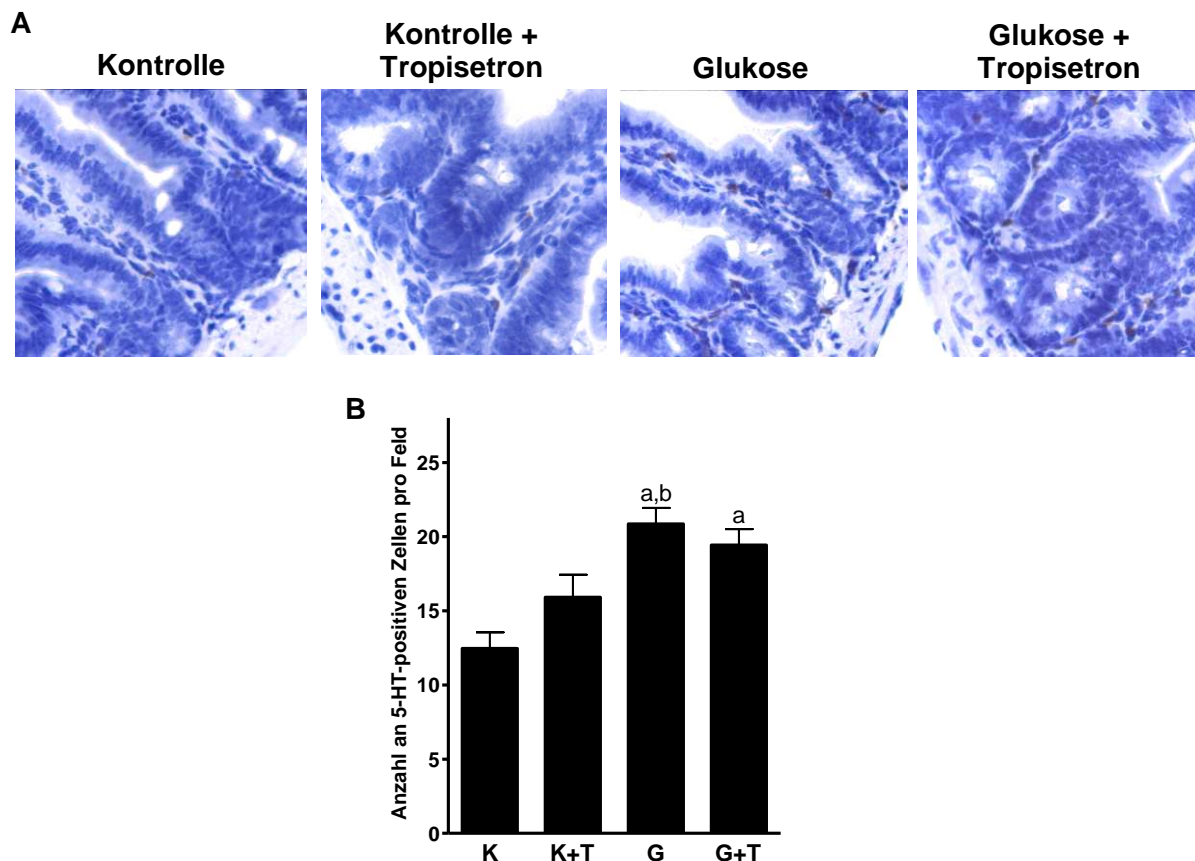


Abbildung 3.1.2 Effekt der Glukoseaufnahme auf die Anzahl der Serotonin-positiven Zellen im Duodenum. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) Repräsentative Bilder der Serotonin-Färbung an Duodenumschnitten (400x) und (B) grafische Auswertung der Serotonin-Färbung. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 7$). K – Kontrolle; K+T – Kontrolle + Tropisetron; G – Glukose; G+T – Glukose + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron.

Effekt der 30%igen Glukoselösung und der gleichzeitigen Tropisetron-Behandlung auf die Expression des Natrium-abhängigen Glukosetransporter (SGLT1) und des Glukosetransporters 2 (Glut2) im Duodenum und der Leber

Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt des Tropisetrons auf die Gewichtszunahme, der bei den mit Glukose gefütterten Mäusen gefunden wurde, mit einer Modulation der zuständigen Glukosetransporter im Darm oder der Leber assoziiert war, wurden diese mittels realtime RT-PCR näher untersucht.

Die Expression von SGLT1 und Glut2 im Duodenum unterschieden sich nicht zwischen Kontrollen mit und ohne Tropisetron-Behandlung und auch nicht bei den mit 30%iger Glukoselösung gefütterten Tieren. Überraschenderweise war die Expression von SGLT1 im Duodenum bei den Tieren die gleichzeitig mit Glukose und Tropisetron behandelt wurden signifikant um das ~1.9-fache im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht. Ebenso war die Expression von Glut2 im Duodenum nur in der Gruppe, die mit Glukose und Tropisetron behandelt wurde signifikant im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht (~4-fache). In der Leber fand sich kein Unterschied in der Expression von Glut2 zwischen Wasserkontrollen und glukosegefütterten Tieren. Jedoch resultierte die Behandlung mit Tropisetron sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei glukosegefütterten Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von Glut2 im Vergleich zu den Wasserkontrollen (~1.45-1.5-fache).

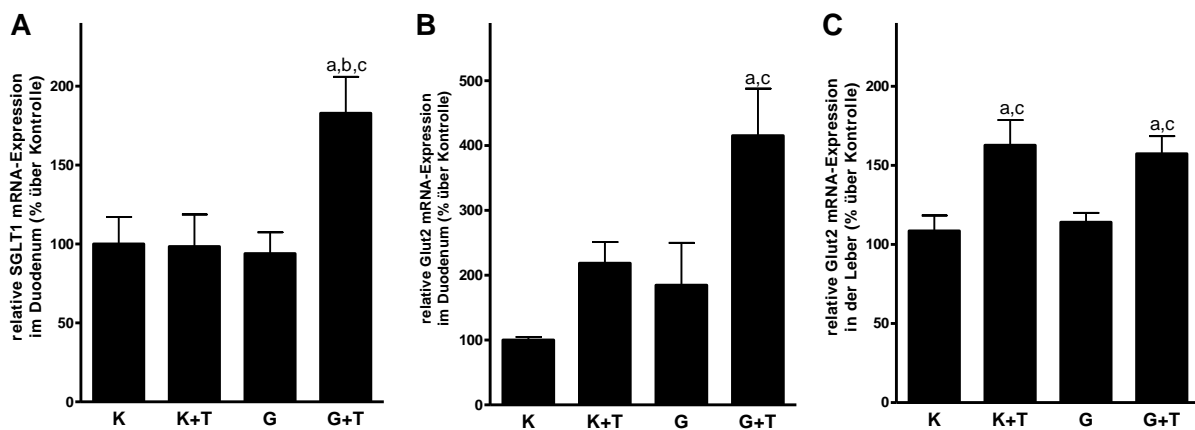


Abbildung 3.1.3 Effekt der Glukoseaufnahme im Trinkwasser und der gleichzeitigen Behandlung mit Tropisetron auf die Expression der Glukosetransporter im Duodenum und der Leber. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) Expression von SGLT1, (B) Glut2 im Duodenum und (C) Glut2 in der Leber. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 7$) und als % über Kontrolle. K – Kontrolle; K+T – Kontrolle + Tropisetron; G – Glukose; G+T – Glukose + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron, ^c $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen.

Effekt der 30%igen Glukoselösung und der gleichzeitigen Tropisetron-Behandlung auf die hepatische Expression des „carbohydrate response element binding protein“ (ChREBP) und der Fettsäure Synthase (FAS) sowie auf die Triglyceridakkumulation in der Leber von Mäusen

Um zu überprüfen ob Modulationen des Glukosemetabolismus in der Leber eine Rolle im protektiven Effekt des Tropisetron spielen wurde das „Carbohydrate responsive element binding protein“ (ChREBP) und die Fettsäure Synthase (FAS) in der Leber sowie der hepatische Triglyceridgehalt (siehe Abbildung 3.1.4) analysiert.

Die Expression von ChREBP unterschied sich nicht zwischen Kontrolltieren und Kontrollen die zusätzlich mit Tropisetron behandelt wurden. Wie erwartet, war die mRNA-Expression von ChREBP in der Leber von glukosegefütterten Mäusen signifikant um das ~1.5-fache erhöht im Vergleich zu den Wasserkontrollen. Interessanterweise verhinderte Tropisetron die Induktion von ChREBP komplett in der Glukose-Gruppe mit paralleler Tropisetron-Behandlung. Analoge Ergebnisse fanden sich auch bei der FAS mRNA-Expression in der Leber. Die Fütterung mit Glukose resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Triglyceridkonzentration in der Leber (~3.4-fache) im Vergleich zu den Kontrollen. Die gleichzeitige Behandlung mit Tropisetron schützte die Mäuse fast vollständig gegen die glukoseinduzierte frühe Phase der NAFLD.

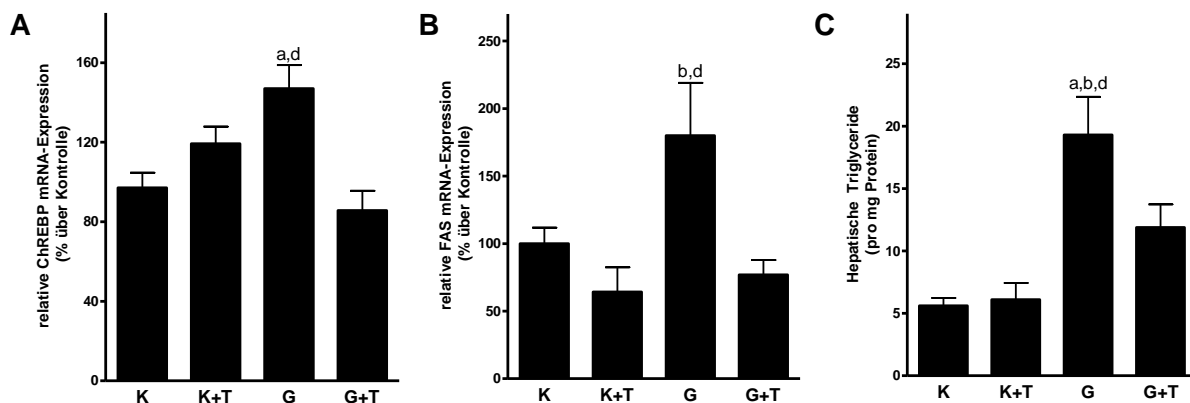


Abbildung 3.1.4 Effekt von Tropisetron auf ChREBP, FAS und die Triglyceride in der Leber. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) mRNA-Expression von ChREBP, (B) FAS und (C) Triglyceridgehalt in der Leber in % über Kontrolle. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 7$) und als % über Kontrolle. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron, ^d $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung + Tropisetron gefütterten Mäusen.

Effekt der 30%igen Glukoselösung und der gleichzeitigen Tropisetron-Behandlung auf die hepatische mRNA-Expression der 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase (Bdh1) und der Plasmakonzentration von 3-Hydroxybutyrat (Ketonkörper)

Um zu überprüfen, ob der protektive Effekt von Tropisetron gegen die glukoseinduzierte frühe Phase der NAFLD und gegen Übergewicht auf eine Beeinflussung des Triglycerid-Metabolismus zurückzuführen ist, wurden die mRNA-Expression von Bdh1 und die Konzentration von 3-Hydroxybutyrat im Plasma bestimmt (Abbildung 3.1.5). Die Expression von Bdh1 in der Leber unterschied sich nicht zwischen den beiden Kontroll-Gruppen und den mit 30%iger Glukoselösung

gefütterten Tieren. Doch in den Lebern der Tiere, die sowohl Glukose als auch Tropisetron erhielten, war die Bdh1 Expression signifikant um das ~1.3-1.5-fache im Vergleich zu den beiden Kontroll-Gruppen erhöht. In Übereinstimmung mit diesen Daten war die im Plasma detektierbare Konzentration an 3-Hydroxybutyrat bei den Tieren, die gleichzeitig mit Glukose und Tropisetron behandelt wurden, im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant um das ~5-fache erhöht. Jedoch hatte Tropisetron keinen Effekt auf die 3-Hydroxybutyrat-Konzentration bei den Mäusen, die ausschließlich Tropisetron erhielten.

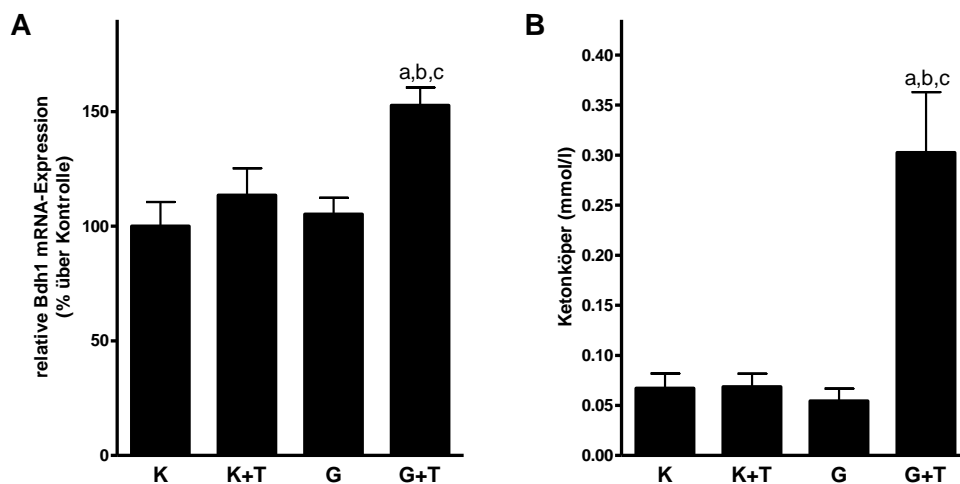


Abbildung 3.1.5 Effekt von Tropisetron auf die Bdh1 Expression in der Leber und die Ketonkörper-Konzentration im Plasma. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) Bdh1 Expression in der Leber und (B) β -Hydroxybutyrat-Konzentration im Plasma. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 7$) und als % über Kontrolle. K – Kontrolle; K+T – Kontrolle + Tropisetron; G – Glukose; G+T – Glukose + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Wasserkontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen+Tropisetron, ^c $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen.

3.2 Untersuchungen zur Rolle von Serotonin und SERT (Serotonin Wiederaufnahme-Transporter) in der Pathogenese der zuckerinduzierten NAFLD im Mausmodell

Effekt der Glukose- und Fruktose-Fütterung auf die Leberpathologie

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob Veränderungen des intestinalen serotonergen Systems eine Rolle in der Pathogenese der zuckerinduzierten NAFLD in der Maus spielen. Repräsentative Bilder der Oil Red O-Färbung und der Hämatoxylin und Eosin-Färbung sind in Abbildung 3.2.1 A dargestellt. Abbildung 3.2.1 B erfasst den hepatischen Triglyceridspiegel nach der 8-wöchigen Aufnahme von zuckergesüßtem Wasser. Wie bereits in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, führte die Fütterung einer 30%igen Glukoselösung zu einer ~2.7-fach höheren hepatischen Triglyceridkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen (siehe dazu auch Bergheim et al., 2008), die jedoch nicht signifikant war. In den Lebern der mit 30%iger Fruktoselösung gefütterten Mäuse waren die Triglyceridkonzentrationen doppelt so hoch wie bei den glukosegefütterten Tieren und ~5.3-mal höher als in den Kontrollen ($p < 0.05$). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch für weitere Parameter, die im Zusammenhang mit einer Leberschädigung stehen können (siehe Tabelle 3.3) (z.B. Lebergewicht und Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis). Weiterhin war auch die Anzahl an eingewanderten Neutrophilen in das Lebergewebe bei den mit Fruktose gefütterten Tieren, aber nicht bei den mit Glukose gefütterten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abbildung 3.2.3). Die deutlich höheren Werte an Triglyceriden in den fruktosegefütterten Mäusen, im Vergleich zu den Kontrollen, gingen mit einem signifikant angestiegenem Endotoxinspiegel im Pfortaderblut, einer höheren Konzentration an 4-Hydroxynonenal-Addukten sowie mit einer signifikant höheren Expression von TNF α in der Leber einher (siehe Abbildungen 3.2.1,3-5 und Bergheim et al. 2008). Ähnliche Veränderungen fanden sich nicht in den Lebern der mit Glukose gefütterten Mäuse.

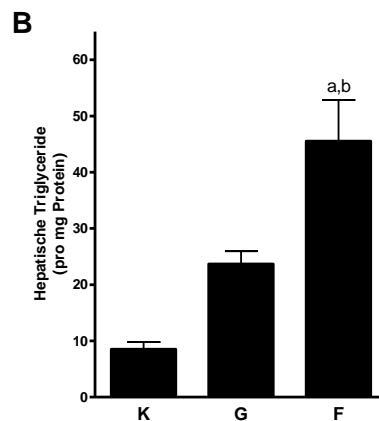
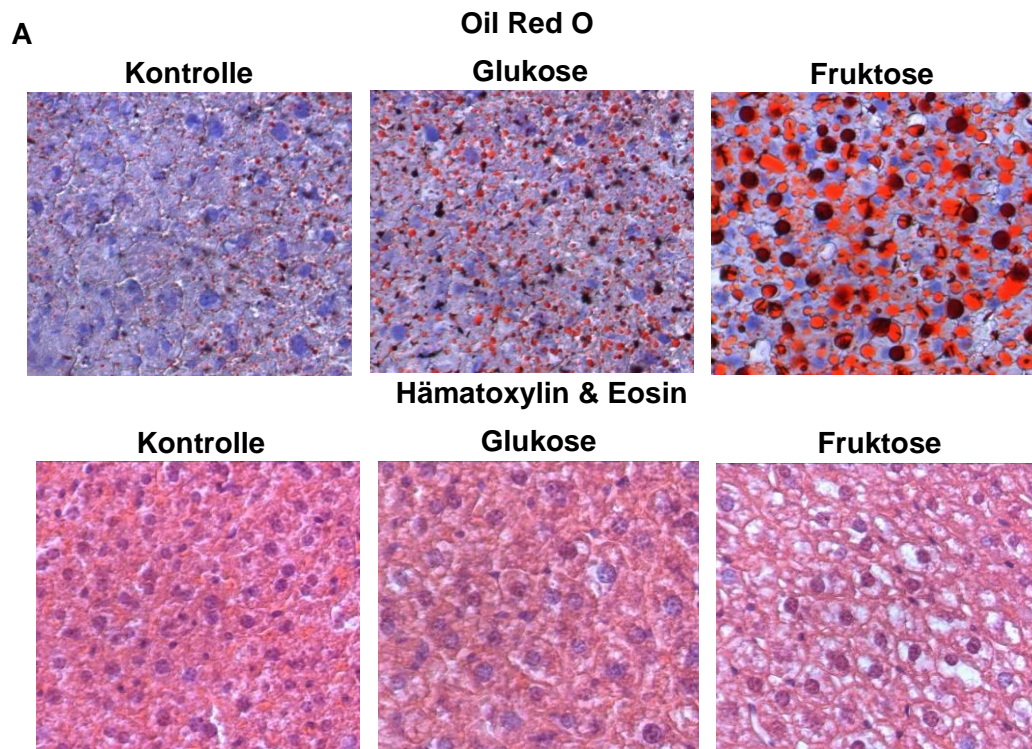


Abbildung 3.2.1 Effekt der chronischen Aufnahme von Glukose- und Fruktoselösung auf die Lipidakkumulation in der Leber von Mäusen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). (A) Repräsentative Aufnahmen der Oil Red O-Färbung (400x) und Hämatoxylin und Eosin-Färbung (400x). (B) Analyse der hepatischen Triglyceride. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen.

Tabelle 3.3 Auswirkung der chronischen Aufnahme von zuckergesüßtem Wasser auf die Gewichtszunahme, das Lebergewicht und das Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis

	Kontrolle	Glukose	Fruktose
N	7	7	7
Gewichtszunahme (in g)	3.3 \pm 0.3	6.5 \pm 0.8 ^a	4.3 \pm 0.5
Lebergewicht (in g)	1.1 \pm 0.05	1.1 \pm 0.05	1.4 \pm 0.07
Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis (in %)	4.9 \pm 0.2	4.9 \pm 0.08	6.2 \pm 0.2 ^a

Die Fütterung von gesüßtem Wasser ist in Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.4.1.3) beschrieben. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen.

Einfluss von Glukose- und Fruktosekonsum auf das intestinale serotonerge System des Duodenums in der Maus

Serotonin spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der intestinalen Motilität aber auch der Permeabilität und ist somit möglicherweise an der erhöhten Endotoxinkonzentration im Plasma der fruktosegefütterten Tieren mit beteiligt und damit an der Entstehung der Lebersteatose. Die intestinale Motilität war in der glukosegefütterten Gruppe leicht erhöht (~20%) im Vergleich zu den Kontrollen, obwohl sich der nachweisbare Serotonin-Gehalt des Gewebes zwischen den Gruppen nicht unterschied (siehe Abbildung 3.2.2 A und B). Im Vergleich zu den Kontrollen und glukosegefütterten Tieren war bei den mit Fruktose gefütterten Mäusen die Proteinkonzentration von SERT signifikant um ~55% vermindert (siehe Abbildung 3.2.2 C). Dieser Effekt von Fruktose konnte auch in humanen CaCo2 Zellen im Transwellssystem festgestellt werden (siehe Abbildung 3.2.2 D).

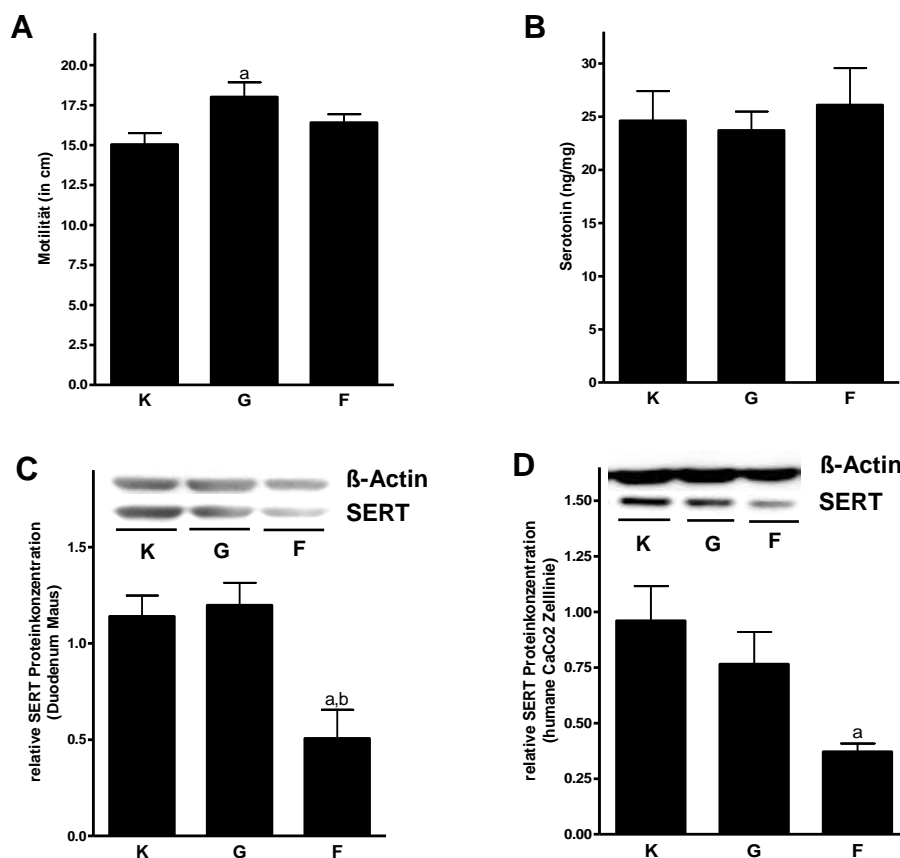
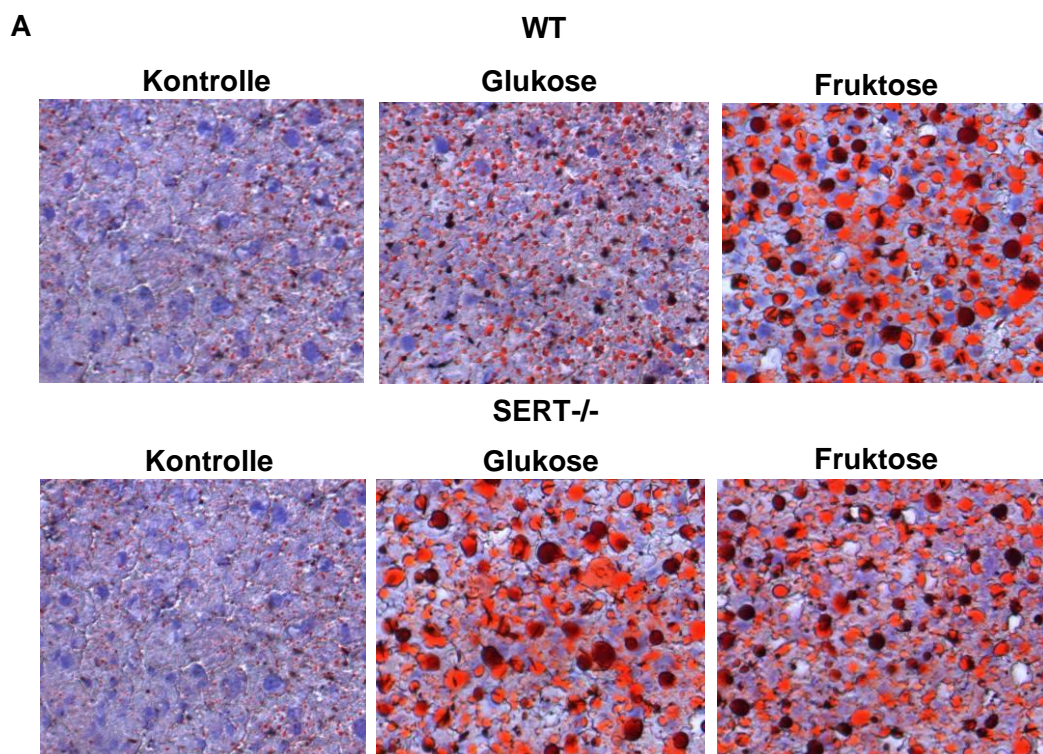


Abbildung 3.2.2 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf das intestinale serotonerge System von Mäusen und CaCo2 Zellen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). (A) Dünndarmmotilität in cm, (B) Serotonin-Gehalt des Duodenums, (C) repräsentativer Western Blot von SERT und β -Actin mit quantitativer Auswertung der Blots für die Maus und (D) für CaCo2 Zellen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 5-7$ (Maus) und $n = 3$ (Zellkultur)). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen.

Auswirkungen der Zuckerfütterung auf die Leber von SERT-Knockout-Mäusen

Da eine signifikante Verminderung von SERT-Protein im Darm der Fruktose-Gruppe nachweisbar war, sollte nun untersucht werden, ob dies in Verbindung mit den deutlich höheren Triglyceridwerten in den Lebern und der erhöhten Translokation von Endotoxin steht. Dazu wurde das Fütterungsexperiment mit SERT^{-/-} Mäusen wiederholt und mit den bekannten Daten der Wild-Typ Tiere verglichen. In Abbildung 3.2.3 sind repräsentative Bilder der Oil Red O-Färbung sowie die gemessenen hepatischen Triglyceridspiegel von Wild-Typ und SERT^{-/-} Mäusen dargestellt. Der hepatische Triglyceridgehalt unterschied sich nicht zwischen Wasser gefüttert Wild-Typ und SERT^{-/-} Tieren. Die chronische Aufnahme von 30%iger Glukoselösung führte hingegen zu einem deutlichen Anstieg der Triglyceride in den Lebern von SERT^{-/-} Tieren, diese waren ~2.6-mal höher als in Wild-Typ Tieren, die Glukose erhielten. In den Lebern der fruktosegefütterten SERT^{-/-} Mäuse war eine ähnlich hohe Triglycerideinlagerung nachweisbar, wie zuvor bei den Wild-Typ Tieren; diese war ~5-mal höher als in den Kontrolltieren. Auch die Anzahl an eingewanderten Neutrophilen in die Lebern der glukosegefütterten SERT^{-/-} Mäuse war signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen und auf dem Niveau der beiden Fruktose-Gruppen.



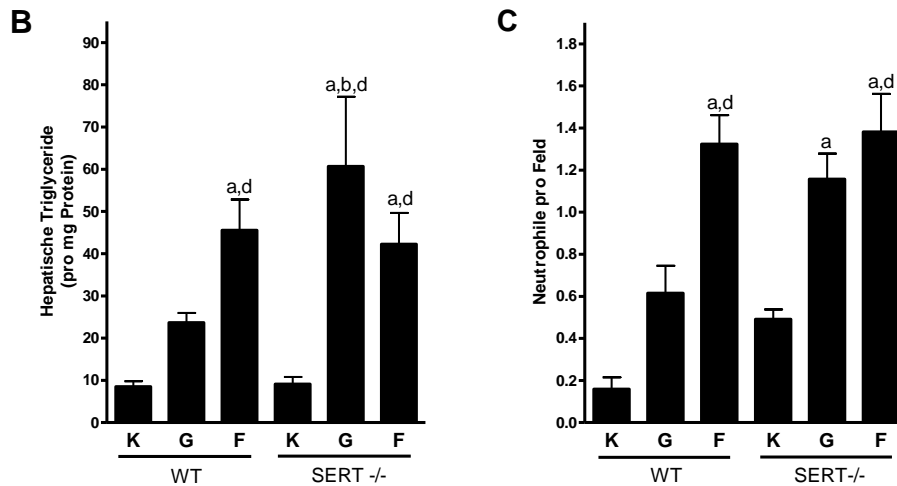


Abbildung 3.2.3 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf die hepatische Lipidakkumulation von SERT^{-/-} Mäusen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). (A) Repräsentative Bilder der Oil Red O-Färbung (400x), (B) hepatischer Triglyceridgehalt und (C) Neutrophile pro Feld. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^ap < 0.05 im Vergleich zu WT Kontrollen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten WT Mäusen, ^dp < 0.05 im Vergleich zu SERT^{-/-} Kontrollen.

Effekt der Glukose- und Fruktose-Fütterung auf den portalen Endotoxingehalt in SERT^{-/-} Mäusen

Die Endotoxinkonzentrationen von wassergefütterten Kontrolltieren sowohl der Wild-Typ Gruppe als auch der SERT^{-/-} Gruppe war sehr gering und unterschied sich nicht zwischen diesen beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.2.4). Analog zu dem Effekt auf die Triglycerideinlagerung in den glukosegefütterten SERT^{-/-} Mäuse war eine signifikante Erhöhung der Plasma Endotoxinkonzentration bei dieser Gruppe nachweisbar, die bei den mit Glukose gefütterten Wild-Typ Tieren nicht detektierbar war (+1.7-fache im Vergleich zu den Wild-Typ Glukose-Tieren und ~+3.9-fache im Vergleich zu den Kontrollen). Die Plasma Endotoxinkonzentration der fruktosegefütterten SERT^{-/-} Mäuse unterschied sich nicht von den fruktosegefütterten Wild-Typ Tieren (+4.2-fache im Vergleich zu den Kontrollen).

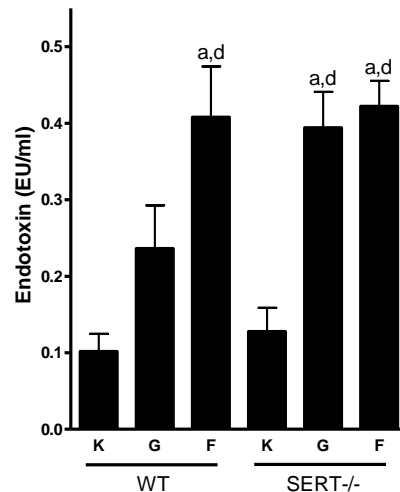


Abbildung 3.2.4 Effekt der chronischen Aufnahme von Zuckerlösungen auf die Endotoxinspiegel im Plasma. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 5-7$). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu WT Kontrollen, ^d $p < 0.05$ im Vergleich zu SERT^{-/-}-Kontrollen.

Einfluss der chronischen Glukose- und Fruktose-Fütterung von SERT^{-/-} Mäusen auf die hepatische Konzentration an 4-Hydroxynonenal-Addukten und die TNF α mRNA-Expression in der Leber

Die gebildeten 4-Hydroxynonenal-Addukte in der Leber von unbehandelten Wild-Typ Tieren sowie von SERT^{-/-} Mäusen waren minimal und unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.2.5). Ähnlich zu den Daten für die Triglyceridakkumulation und Endotoxinspiegel in SERT^{-/-} Mäusen, führte die chronische Aufnahme von 30%iger Glukoselösung zu einer signifikanten ~3.5-fachen Erhöhung von 4-HNE-Addukten in der Leber, welche in den glukosegefütterten Wild-Typ Tieren nicht nachweisbar war. Die 4-Hydroxynonenal-Bildung in den Lebern der SERT^{-/-} und Wild-Typ Mäuse, die Fruktose erhielten, unterschieden sich nicht (SERT^{-/-} Tiere: ~+4.3-fache und Wild-Typ Tiere: ~+4.8-fache im Vergleich zu Kontrollen). Im möglichen Zusammenhang mit diesen Ergebnissen stehen auch die erhaltenen Daten für TNF α , dessen Expression in SERT^{-/-} Tieren nach chronischer Glukoseaufnahme signifikant um das ~3.2-fache im Vergleich zu den glukosegefütterten Wild-Typ Tieren erhöht war. Dagegen war bei den fruktosegefütterten SERT^{-/-} Tieren die TNF α Expression ähnlich zu der in fruktosegefütterten Wild-Typ Tieren induziert (Wild Typ Tiere: +3.1-fache und SERT^{-/-} Tiere: +5.6-fache im Vergleich zu Kontrollen) (siehe Abbildung 3.2.5).

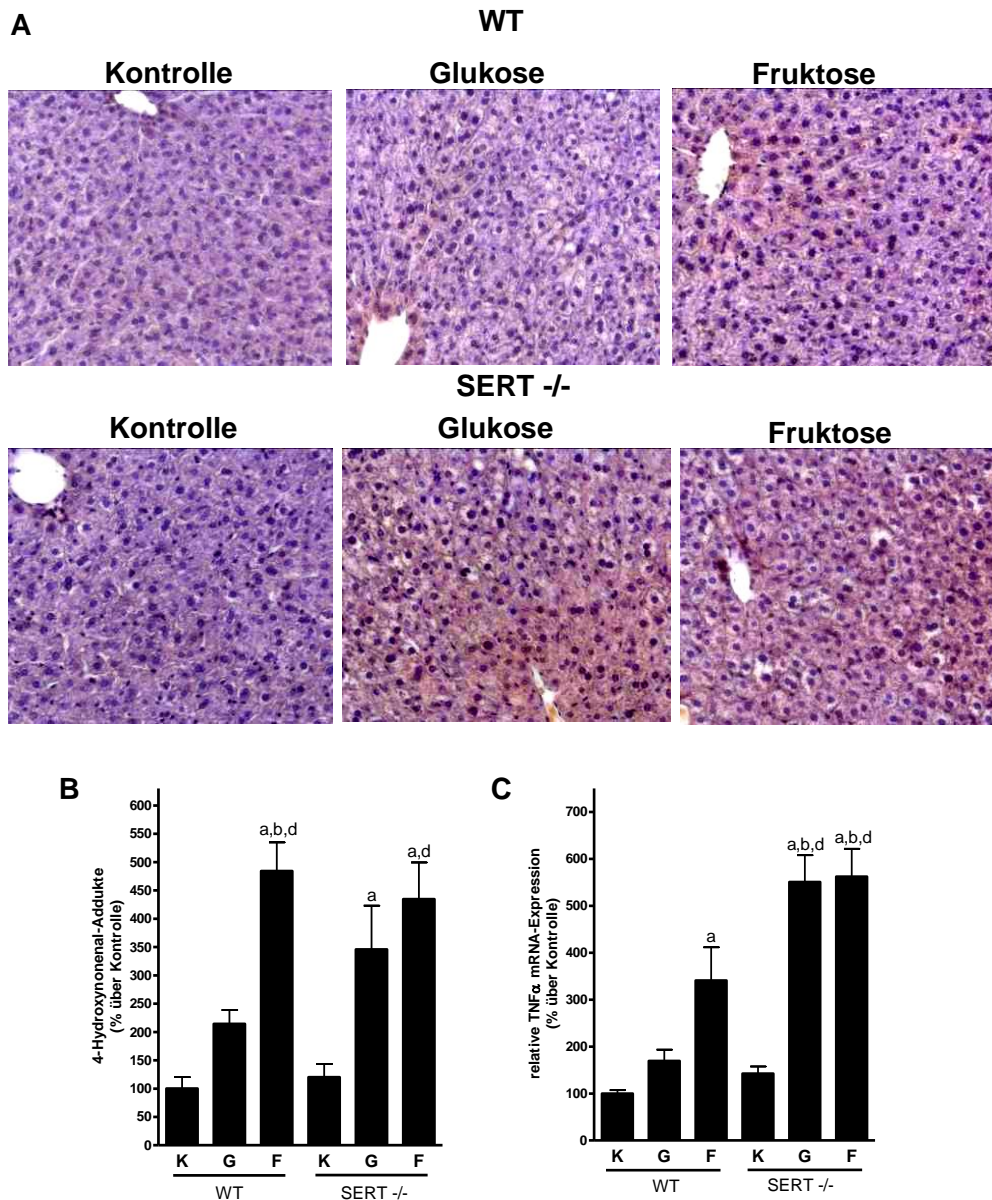


Abbildung 3.2.5 Konzentration an 4-Hydroxynonenal-Addukten und TNF α mRNA-Expression in der Leber von Wild-Typ und SERT $^{-/-}$ Mäusen nach chronischer Aufnahme von Wasser oder Zuckerlösungen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). (A) Repräsentative Bilder der 4-Hydroxynonenal-Addukt Färbung (200x), (B) die dazugehörige quantitative Auswertung der Immunofärbung und (C) TNF α Expression in der Leber. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7) und als % über Kontrolle. K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu WT Kontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten WT Mäusen, ^d $p < 0.05$ im Vergleich zu SERT $^{-/-}$ Kontrollen.

Effekt der Glukose- und Fruktose-Fütterung auf die Proteinkonzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin im Duodenum von SERT $^{-/-}$ Mäusen

Der Verlust von Occludin im Dünndarm ist assoziiert mit einer erhöhten intestinalen Translokation von Endotoxin, was letztlich zur Entwicklung von NASH bei genetisch adipösen Mäusen führen kann (Brun et al., 2007). Die Proteinkonzentration von Occludin im Duodenum war bei glukosegefütterten SERT $^{-/-}$ Tieren sowie fruktosegefütterten Wild-Typ Tieren im Vergleich zu den Kontrollen und zu den mit

Glukose gefütterten Wild-Typ Tieren nach 8 Wochen Fütterung signifikant um ~66% reduziert (siehe Abbildung 3.2.6).

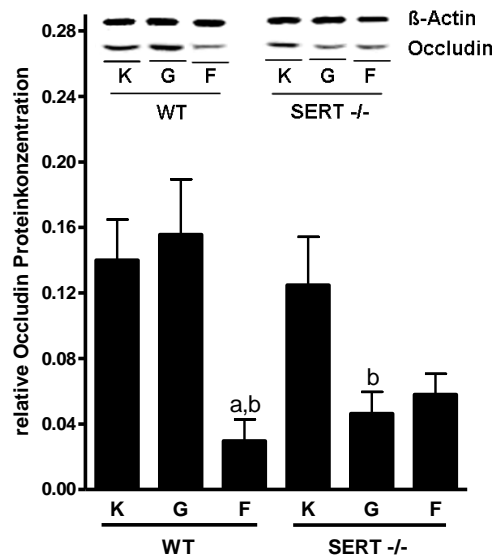


Abbildung 3.2.6 Effekt der Zuckerlösungen auf die Proteinkonzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin im Duodenum von Mäusen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.3). Repräsentativer Western Blot von Occludin und β -Actin und die quantitative Analyse dieser Blots. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose. ^ap < 0.05 im Vergleich zu WT Kontrollen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten WT Mäusen.

Wirkung von Tropicsetron auf die Lipidakkumulation in der Leber von zuckergefütterten Mäusen

Um zu überprüfen ob der Verlust von SERT in den fruktosegefütterten Mäusen mit Veränderungen im intestinalen serotonergen System assoziiert ist, wurde das Zuckerfütterungsexperiment mit C57BL/6J Mäusen und gleichzeitiger Tropicsetron-Behandlung durchgeführt. In Abbildung 3.2.7 sind repräsentative Bilder der Oil Red O-Färbung sowie die gemessenen hepatischen Triglyceridspiegel dargestellt. Der hepatische Lipid- und Triglyceridgehalt unterschied sich nicht zwischen Kontrollen mit und ohne Tropicsetron-Behandlung. Keine Unterschiede konnten ebenfalls in der hepatischen Triglyceridekonzentration von glukosegefütterten Mäusen mit und ohne Tropicsetron-Behandlung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war der Triglyceridgehalt in den Lebern von fruktosegefütterten Mäusen mit Tropicsetron-Behandlung signifikant geringer als in unbehandelten Tieren dieser Fütterungsgruppe.

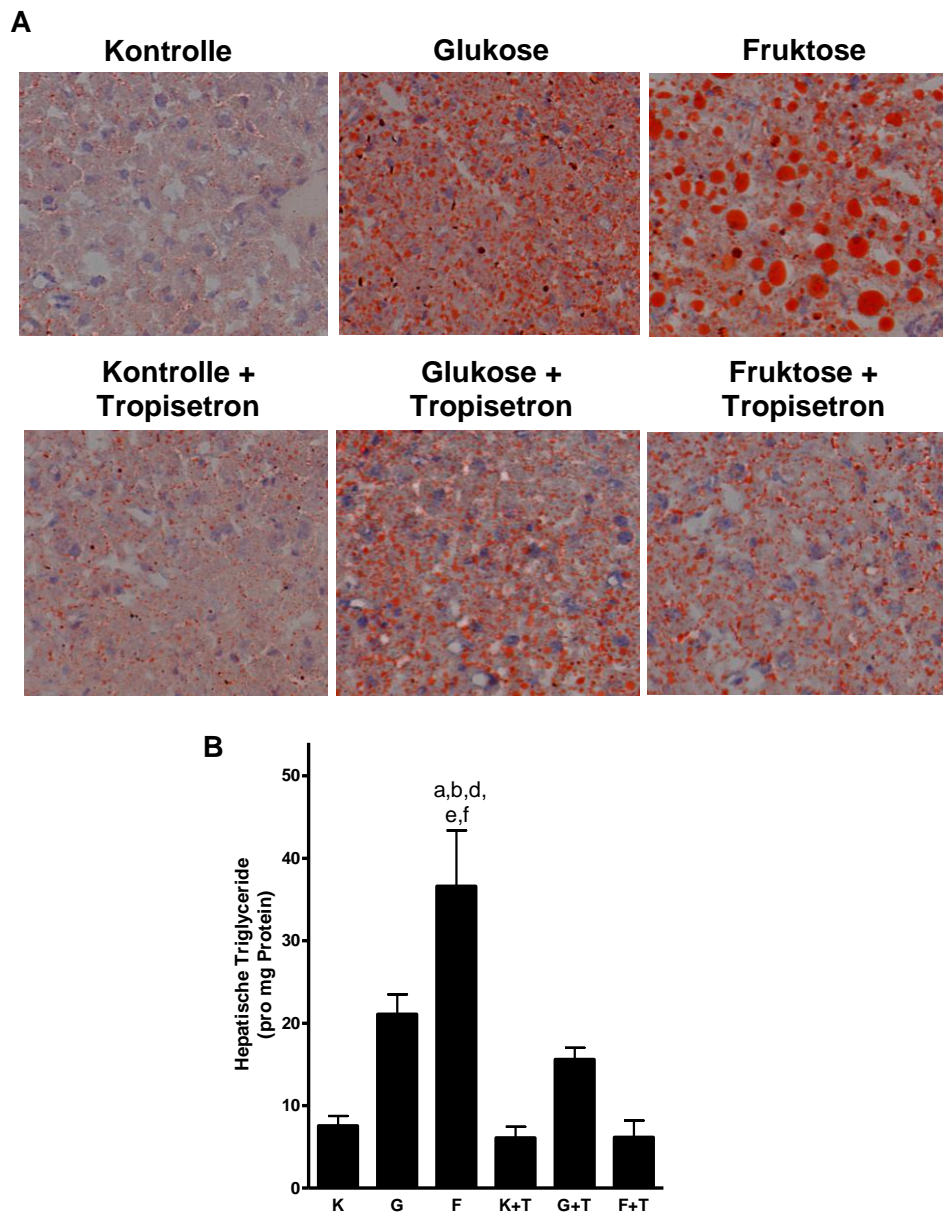


Abbildung 3.2.7 Auswirkung von Tropisetron auf die Lipidakkumulation in der Leber von zuckergefütterten Mäusen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.2). (A) Repräsentative Bilder der Oil Red O-Färbung (400x), (B) hepatischer Triglyceridgehalt. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 5-7$). K – Kontrolle; G – Glukose; F – Fruktose; K+T – Kontrolle + Tropisetron; G+T – Glukose + Tropisetron; F+T – Fruktose + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen, ^d $p < 0.05$ im Vergleich zu Kontrollen + Tropisetron, ^e $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Glukoselösung + Tropisetron gefütterten Mäusen, ^f $p < 0.05$ im Vergleich zu 30%iger Fruktoselösung + Tropisetron gefütterten Mäusen.

Auswirkungen von Serotonin auf die Permeabilität von ausdifferenzierten CaCo2 Monolayern, einem Zellkulturmodell für Enterozyten

Wie schon beschrieben scheint es eine Korrelation zwischen dem Verlust von SERT, was eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Serotonin vermuten lässt, der erhöhten Endotoxinkonzentration und hepatischen Triglyceridakkumulation nach chronischem

Zuckerkonsum zu geben. Aus diesem Grund wurde als nächstes untersucht, ob Serotonin einen Effekt auf die intestinale Permeabilität für Endotoxin hat. Dies wurde an einem *in vitro* Modell von Enterozyten getestet. Die basolaterale Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Serotonin führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Translokation von Endotoxin in das basolaterale Reservoir des Transwellsystems 24 und 48 Stunden nach apikaler Inkubation mit Endotoxin (siehe Abbildung 3.2.8 A). Die Proteinkonzentration an Occludin war vermindert, wie die erhöhte Permeabilität vermuten lässt. Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Serotonin führte in CaCo2 Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Proteingehaltes an Occludin im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 3.2.8 B).

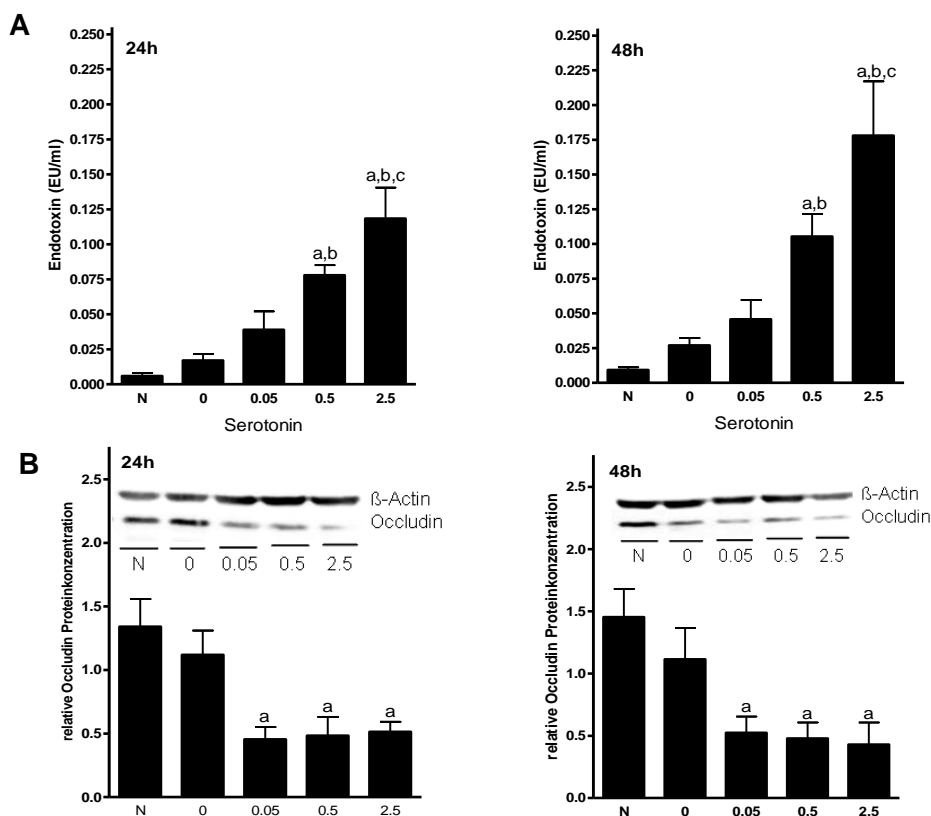


Abbildung 3.2.8 Effekt von Serotonin auf die Permeabilität und die Proteinkonzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin *in vitro*. (A) Endotoxinkonzentrationen, die basolateral im Medium der CaCo2 Zellkulturen detektiert wurden (nach 24h und 48h) und (B) repräsentative Western Blots von Occludin und β -Actin und die quantitative Analyse dieser Blots (nach 24h und 48h). Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 3$). N – Naïve Kontrolle; 0 mM – LPS kein 5-HT; 0.05 mM – LPS und 0.05 mM 5-HT; 0.5 mM – LPS und 0.5 mM 5-HT; 2.5 mM – LPS und 2.5 mM 5-HT. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu N, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu 0 mM, ^c $p < 0.05$ im Vergleich zu 0.05 mM.

3.3 Einfluss der Behandlung von Ob/Ob Mäusen mit dem 5-HT₃ Antagonisten Tropisetron auf die Entwicklung von Adipositas und die Manifestation der NAFLD

Auswirkungen der Tropisetron-Behandlung auf das Körper- und Lebergewicht, das Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis, die ALT-Aktivität im Plasma und die infiltrierten Neutrophilen in der Leber von Ob/Ob Mäusen

Um zu untersuchen, ob das intestinale serotonerge System in der Entwicklung der NAFLD und Adipositas in einem genetisch bedingten adipösen Mausmodell eine Rolle spielt, wurden Ob/Ob Mäuse für 6 Wochen mit Tropisetron behandelt. Es fanden sich keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den unbehandelten und mit Tropisetron behandelten Kontrollen (WT) gemessen werden (siehe Tabelle 3.4). Beide Ob/Ob-Gruppen wiesen ein signifikant höheres Endgewicht auf, das fast doppelt so hoch wie das der Wild-Typ Gruppen war. Die Behandlung mit Tropisetron resultierte bei den Ob/Ob Mäusen nicht in eine reduzierte Gewichtszunahme, wie sie bei den glukosegefütterten Tieren nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.1.1). Das Lebergewicht und Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis unterschied sich nicht zwischen den beiden Wild-Typ Gruppen. Diese beiden Parameter waren in wassergefütterten Ob/Ob Mäusen signifikant um das ~1.1- und ~1.2-fache im Vergleich zu den mit Tropisetron behandelten Ob/Ob Tieren erhöht. Die ALT-Aktivität war in Ob/Ob Mäusen ohne Tropisetron-Behandlung am deutlichsten erhöht und war somit ~2.3-4.2-mal höher als in allen anderen Gruppen. Parallel dazu war auch die Zahl an eingewanderten Neutrophilen in der Leber der Ob/Ob Mäuse signifikant höher als in den beiden Wild-Typ Gruppen. Die Anzahl der Neutrophilen war in Ob/Ob Mäusen mit Tropisetron-Behandlung nicht signifikant unterschiedlich zu allen übrigen Gruppen.

Tabelle 3.4 Effekt der Tropisetron-Behandlung auf das Körpergewicht, das Lebergewicht, das Leber- zu Körpergewicht-Verhältnis, die Plasma ALT-Aktivität und die infiltrierten Neutrophilen in der Leber

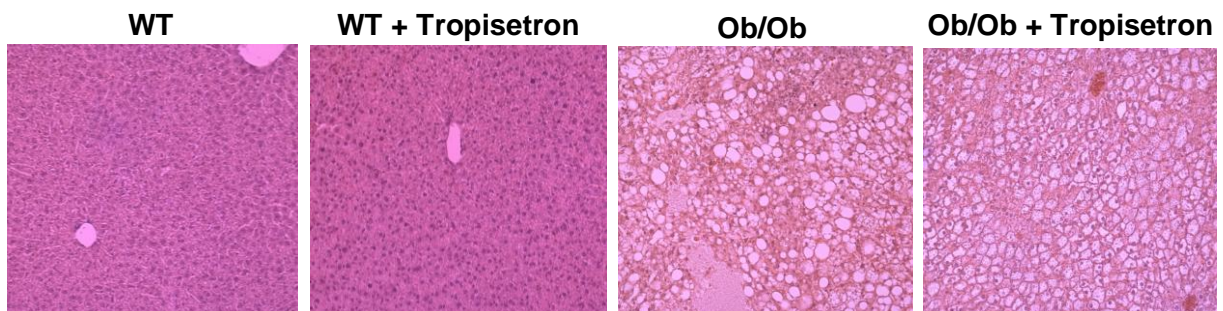
	WT	WT +Tropisetron	Ob/Ob	Ob/Ob +Tropisetron
N	7	7	6	5
Körpergewicht (in g)	23.5 ± 0.3	23.1 ± 0.3	45.8 ± 0.6 ^{a,b}	46.6 ± 0.5 ^{a,b}
Lebergewicht (in g)	1.3 ± 0.07	1.3 ± 0.04	3.7 ± 0.1 ^{a,b}	3.3 ± 0.08 ^{a,b,c}
Leber- zu Körpergewicht- Verhältnis (in %)	5.5 ± 0.2	5.6 ± 0.3	8.09 ± 0.26 ^{a,b}	6.9 ± 0.2 ^{a,b,c}
ALT (U/L)	14.02 ± 6.5	15.9 ± 5.5	60.3 ± 12.6 ^{a,b}	25.7 ± 2.1
Neutrophile (Anzahl pro Feld)	0.3 ± 0.09	0.63 ± 0.1	2.9 ± 0.8 ^{a,b}	1.4 ± 0.2

Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden (siehe 2.4.1.4) beschrieben. Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n = 5-7). ^ap < 0.05 im Vergleich zu WT Mäusen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu WT + Tropisetron, ^cp < 0.05 im Vergleich zu Ob/Ob Mäusen.

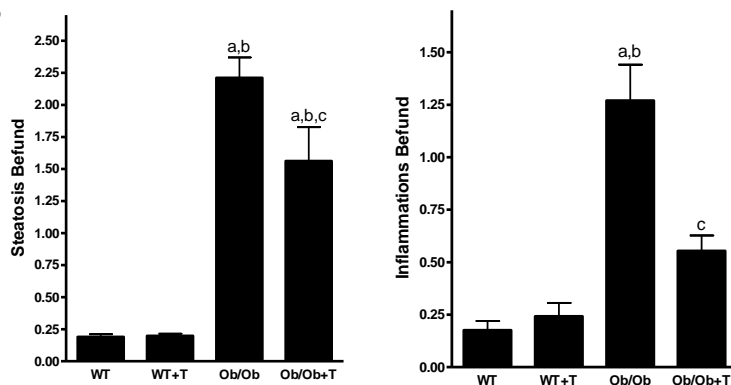
Effekt der chronischen Aufnahme von Tropisetron auf die Leberschädigung bei Ob/Ob Mäusen

In Abbildung 3.3.1 sind repräsentative Bilder der H&E-Färbung der Lebern von allen vier Tiergruppen (WT, WT+T, Ob/Ob, Ob/Ob+T) und die Auswertungen des pathologischen Befundes zur Erfassung der Leberschädigung dargestellt. In beiden Wild-Typ Gruppen konnten keine Veränderungen in der Leber gefunden werden. Im Vergleich zu den Kontrollen (WT) wiesen die Ob/Ob Mäuse eine signifikant erhöhte makro- und mikroversikuläre Steatose, Inflammation und Nekrose auf. Im Vergleich dazu waren die Ob/Ob Mäuse mit Tropisetron-Behandlung vor diesen verstärkten Leberschädigungen geschützt. Diese wiesen eine um ~30% reduzierte makrovesikuläre Triglyceridakkumulation auf, auch die Anzahl an Inflammationsherden und nekrotischen Hepatozyten war um ~58% vermindert im Vergleich zu den unbehandelten Ob/Ob Mäusen. Der Gesamtbefund fasst die einzelnen Befunde zusammen und verdeutlicht somit nochmals die verbesserte Leberhistologie der Ob/Ob Tiere bei Tropisetron-Behandlung.

A



B



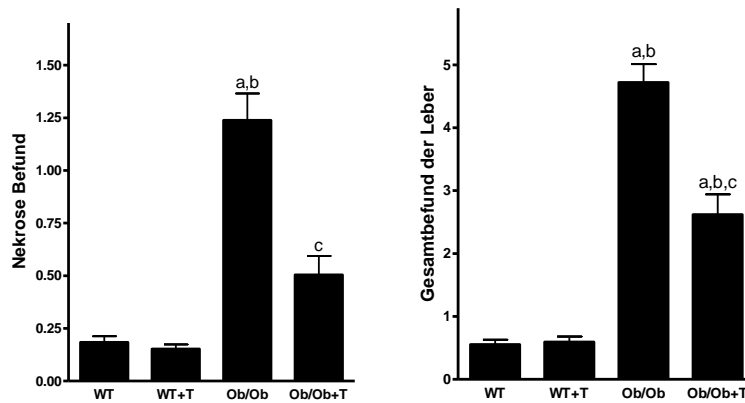


Abbildung 3.3.1 Effekt von Tropisetron auf die Pathologie der Leber in Ob/Ob Mäusen. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.4). (A) Repräsentative Bilder der Hämatoxylin und Eosin-Färbung (100x) und (B) grafische Darstellung des pathologischen Befundes der Lebern. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM ($n = 5-7$). WT – Wild-Typ; WT+T – Wild-Typ + Tropisetron; Ob/Ob – Ob/Ob Maus ohne Behandlung; Ob/Ob+T – Ob/Ob + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu WT Mäusen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu WT + Tropisetron, ^c $p < 0.05$ im Vergleich zu Ob/Ob Mäusen.

Die Endotoxinkonzentration und hepatische mRNA-Expression von MyD88 und TNF α in Ob/Ob Mäusen mit Tropisetron-Behandlung

Im Zusammenhang mit den zuvor dargestellten Daten zur Leberpathologie sollte nun erfasst werden, ob sich diese erkennbaren Verbesserungen der Leberhistologie auch auf weitere Leber-Parameter ausgewirkt haben (siehe Abbildung 3.3.2). Die Endotoxinkonzentrationen in den Wild-Typ Tieren mit und ohne Tropisetron-Behandlung sowie in den Ob/Ob Tieren mit Tropisetron-Supplementation waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (siehe Abbildung 3.3.2 A). In Ob/Ob Tieren ohne Supplementation von Tropisetron war die Endotoxinkonzentration signifikant zu allen anderen Gruppen erhöht (+~2.7-fach im Vergleich zu der Wild-Typ Gruppe; +~19-fach im Vergleich zu den mit Tropisetron behandelten Ob/Ob Tieren). Die mRNA-Expression von MyD88 und TNF α in der Leber waren signifikant um das ~1.9- und ~11-fache in unbehandelten Ob/Ob Mäusen im Vergleich zu beiden Wild-Typ Gruppen erhöht (siehe Abbildung 3.3.2 B und C). In Ob/Ob Mäusen mit Tropisetron Supplementation fanden sich keine Unterschiede in der Expression von MyD88 und TNF α im Vergleich zu den beiden Wild-Typ Gruppen.

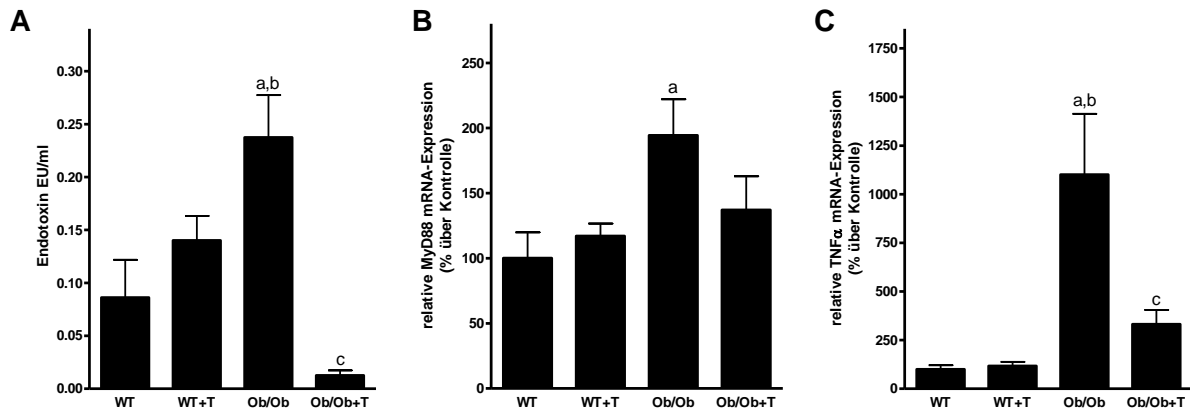


Abbildung 3.3.2 Endotoxin im Plasma, MyD88 und TNF α mRNA-Expression in der Leber von Ob/Ob Mäusen nach der Behandlung mit Tropisetron. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.4). (A) Endotoxinkonzentration, (B) MyD88 Expression und (C) TNF α Expression in der Leber. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). WT – Wild-Typ; WT+T – Wild-Typ + Tropisetron; Ob/Ob – Ob/Ob Maus ohne Behandlung; Ob/Ob+T – Ob/Ob + Tropisetron. ^a $p < 0.05$ im Vergleich zu WT Mäusen, ^b $p < 0.05$ im Vergleich zu WT + Tropisetron, ^c $p < 0.05$ im Vergleich zu Ob/Ob Mäusen.

Effekt der Tropisetron-Behandlung in Ob/Ob Mäusen auf die Proteinkonzentration von Occludin

Möglicherweise ist das Tight-Junction-Protein Occludin mit der Regulation der Permeabilität im Dünndarm assoziiert und könnte somit auch zur Entwicklung der NAFLD beitragen. Dies wurde von Brun et al. (2007) bereits für Ob/Ob Mäuse nachgewiesen. In diesem Versuch soll nun überprüft werden ob die Tropisetron-Behandlung einen Einfluss auf die Proteinkonzentration von Occludin im Duodenum hat. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Wild-Typ Gruppen und den Ob/Ob Mäusen ohne Tropisetron-Supplementation gemessen werden (siehe Abbildung 3.3.3). Die Ob/Ob Mäuse mit Tropisetron-Behandlung wiesen jedoch eine signifikante Erhöhung dieses Tight-Junction-Proteins auf. Die Konzentration war ~4.1-fach höher als die der wassergefütterten Wild-Typ Kontrollen.

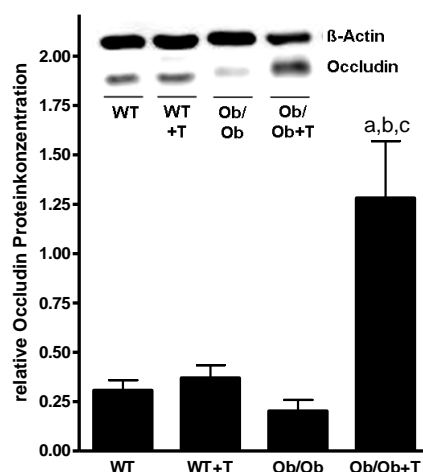


Abbildung 3.3.3 Effekt der Tropisetron-Aufnahme bei Ob/Ob Mäusen auf die Proteinkonzentration von Occludin im Duodenum. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.4). Repräsentativer Western Blot von Occludin und β -Actin und die quantitative Auswertung dieser Blots. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). WT – Wild-Typ; WT+T – Wild-Typ + Tropisetron; Ob/Ob – Ob/Ob Maus ohne Behandlung; Ob/Ob+T – Ob/Ob + Tropisetron. ^ap < 0.05 im Vergleich WT Mäusen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu WT + Tropisetron, ^cp < 0.05 im Vergleich zu Ob/Ob Mäusen.

Auswirkungen der Tropisetron-Behandlung auf den Serotonin-Gehalt, die SERT Proteinkonzentration und die 5-HT_{3a}R Expression im Duodenum von Ob/Ob Mäusen

Um herauszufinden, ob die reduzierte intestinale Permeabilität, die sich durch eine Hochregulation des Occludin-Proteins darstellt, mit Modulationen des intestinalen serotonergen Systems assoziiert ist, wurden der Serotonin-Gehalt im Duodenumgewebe und die SERT Proteinkonzentration untersucht (siehe Abbildung 3.3.4). Die Behandlung mit Tropisetron in Ob/Ob Mäusen resultierte in eine Reduktion um ~23% des Serotonin-Gehaltes auf das Niveau der Wild-Typ Gruppen. In den Wild-Typ Gruppen und den Ob/Ob Tieren mit Wasserfütterung unterschied sich die SERT-Proteinkonzentration nicht (siehe Abbildung B). Interessanterweise war die SERT-Proteinkonzentration im Duodenum um ~46% in den Ob/Ob Tieren mit Tropisetron-Behandlung im Vergleich zur den Kontrollen erhöht. In der Expression des 5-HT_{3a} Rezeptors wiesen die Ob/Ob Mäuse eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression im Duodenum im Vergleich zu den Kontrollen Gruppen auf.

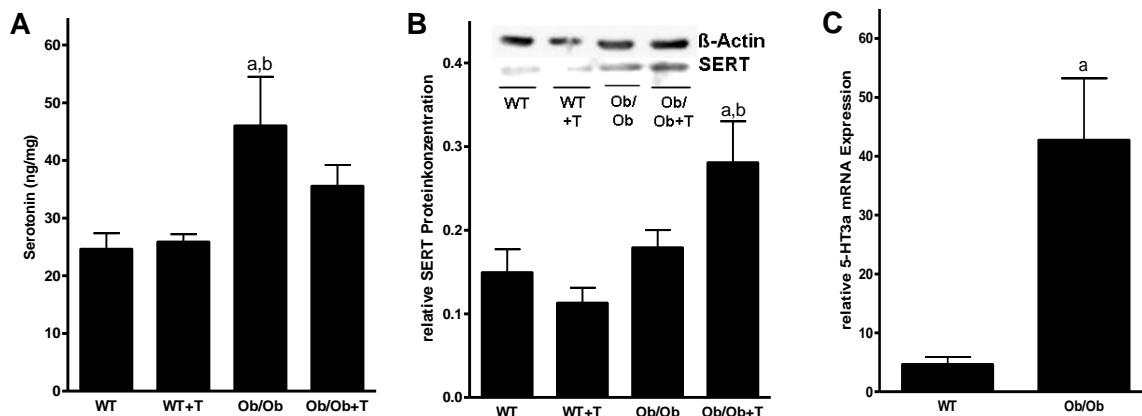


Abbildung 3.3.4 Effekt der Tropisetron-Aufnahme bei Ob/Ob Mäusen auf das intestinale serotonerge System. Die Behandlung der Tiere ist im Abschnitt Material und Methoden beschrieben (siehe 2.4.1.4). (A) Serotonin-Gehalt im Duodenum, (B) repräsentativer Western Blot von SERT und β -Actin und die quantitative Analyse der Blots und (C) Expression des 5-HT_{3a} Rezeptors im Duodenum. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SEM (n = 5-7). WT – Wild-Typ; WT+T – Wild-Typ + Tropisetron; Ob/Ob – Ob/Ob Maus ohne Behandlung; Ob/Ob+T – Ob/Ob + Tropisetron. ^ap < 0.05 im Vergleich zu WT Mäusen, ^bp < 0.05 im Vergleich zu WT + Tropisetron.

4. Diskussion

Weltweit hat die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen. Die Ursachen, die zur Entwicklung von Adipositas beitragen sind zahlreich und komplex, daher sind die zugrunde liegenden Mechanismen, die mit der Entwicklung der Adipositas assoziiert sind, nur geringfügig aufgeklärt. Das gleiche trifft auch auf die Entwicklung der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung (NAFLD), einer mit Übergewicht und Adipositas assoziierten Lebererkrankung, zu. Daher wäre ein besseres Verständnis der biochemischen und pathologischen Veränderungen, die Adipositas und NAFLD verursachen, wünschenswert, um die Präventionsmaßnahmen und auch Behandlungsstrategien verbessern zu können.

Überernährung wird vor allem neben einer fettreichen Ernährung, im zunehmenden Maß auch eine kohlenhydrat- und insbesondere fruktosereiche Ernährung als Risikofaktor für die Entwicklung von Adipositas und NAFLD diskutiert. Veränderungen im Gastrointestinaltrakt gehen häufig mit Adipositas einher. Ebenso wurden Modulationen der Darmflora und Darmmotilität bei NAFLD Patienten mehrfach beschrieben. Dies lässt auf eine Involvierung des intestinalen serotonergen Systems in diesen Erkrankungen schließen. Ausgehend von diesem Hintergrund war es das Ziel dieser Arbeit zur Klärung beizutragen, inwiefern das intestinale serotonerge System in der Adipositas und nahrungsinduzierten NAFLD in verschiedenen Mausmodellen eine Rolle spielt.

4.1 Die Rolle des intestinalen serotonergen Systems in der Entwicklung der glukoseinduzierten Adipositas

Hat Glukose Einfluß auf das intestinale serotonerge System und die Nahrungsaufnahme in einem 8-wöchigen Fütterungsmodell?

Die potentielle Rolle von Kohlenhydraten und hierbei im speziellen Mono- und Dissacharide (z.B. Glukose und Sachharose) in der Entwicklung der Adipositas wurde schon durch Human- und Tierstudien nachgewiesen (Drewnowski & Bellisle, 2007; Malik et al., 2006; Raben et al., 2002). Verschiedene Tiermodelle kamen bereits zum Einsatz, um die zugrunde liegenden Mechanismen der zuckerinduzierten Adipositas zu untersuchen (Brito et al., 2007; Sclafani & Xenakis, 1984). So hat Brito et al. (2007) Mäusen eine Glukose- oder Sacharoselösung (100 g/L) verabreicht und detektierte eine signifikant höhere Gewichtszunahme und abdominale

Fetteinlagerung als bei den Kontrolltieren. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Kanarek & Orthen-Gambill (1982) nachgewiesen. Sie verabreichten für 50 Tage eine 32%ige Glukoselösung. Trotz zahlreicher Studien ist die Rolle von Zuckern (wie z.B. Glukose) in der Entwicklung von Adipositas bisher nur geringfügig verstanden. Ein möglicher Mechanismus, durch den die Kohlenhydrataufnahme und hierbei im speziellen die Glukoseaufnahme reguliert wird, könnte auf Modulationen des intestinalen serotonergen Systems beruhen. Ergebnisse von früheren Studien wiesen darauf hin, dass der intestinale 5-HT₃ Rezeptor möglicherweise bei der Regulation der Nahrungsaufnahme involviert ist und hierbei vor allem die Glukose-Detektion im Darm übernimmt (Savastano et al., 2005; Zhu et al., 2001). Speziell in Kurzzeitstudien wurde beschrieben, dass der intestinale 5-HT₃R die polycose- und glukoseinduzierte Suppression der Nahrungsaufnahme vermittelt (Savastano et al., 2005). Weiterhin wurde von Raybould et al. (2003) nachgewiesen, dass der 5-HT₃R die Nahrungsaufnahme möglicherweise über einen Mechanismus modulieren kann, der über die Regulation der Magenentleerung läuft. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell mit moderater chronischer Glukose-Exposition bestehend aus einer ad libitum Gabe von 30%iger Glukoselösung oder Wasser eingesetzt. Einem Teil der angesetzten Trinklösungen wurde Tropisetron zugesetzt, um die Hypothese zu überprüfen, ob der intestinale 5-HT₃R eine Rolle in der Entwicklung von Adipositas spielt. Die Aufnahme der 30%igen Glukoselösung führte zu einer deutlichen Verminderung der Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den Kontrollen, doch die Flüssigkeitsaufnahme und somit auch die Gesamtkalorienaufnahme war signifikant erhöht. Daraus folgte eine signifikant höhere Gewichtszunahme der mit Glukose behandelten Tiere und auch Dünndarmmotilität im Vergleich zu den Kontrollen. Gegenteilig zu den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen wie z.B. Savastano et al. (2005) resultierte die Behandlung mit Tropisetron weder in eine veränderte Futter- noch Flüssigkeitsaufnahme bei den Wasserkontrollen. Stattdessen war die Gesamtkalorienaufnahme von glukosegefütterten Mäusen mit gleichzeitiger Tropisetron-Behandlung unverändert, im Vergleich zu den nur mit Glukose gefütterten Tieren. Die Motilität des Dünndarms war in den mit Glukose und Tropisetron gefütterten Tieren im Vergleich zu den nur mit Glukose gefütterten Mäusen signifikant vermindert. Dies entspricht den Erwartungen an diesen Antagonisten, da verschiedene 5-HT₃R Antagonisten zur Behandlung des Reizdarmsyndroms eingesetzt werden, um die damit assoziierte Diarrhö abzumildern

(Camilleri, 2000; Humphrey et al., 1999). Tropisetron wurde im Rahmen dieser Untersuchungen ausgewählt, da dieser Antagonist auch bei hoher umliegender Konzentration von Serotonin seine Äffinität für die Bindung an den 5-HT₃R nicht mindert, wie es für Ondansetron bereits beschrieben wurde (Wolf, 2000). Weiterhin war die Anzahl an 5-HT-positiven Zellen im Duodenum der glukosegefütterten Tiere erhöht. Die Tropisetron-Behandlung hatte darauf keinen Einfluss. Trotz der ähnlichen Kalorienaufnahme der mit Tropisetron behandelten und mit Glukose gefütterten Tiere und den nur mit Glukose gefütterten Tieren, war die Gewichtszunahme jedoch in der Gruppe mit Tropisetron-Behandlung deutlich verringert. Das serotonerge System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Nahrungsaufnahme (Blundell, 1977) und heute werden verschiedene Komponenten des serotonergen Systems im Rahmen der Adipositas-Therapie blockiert, um eine Reduktion der Nahrungsaufnahme zu erreichen. Hierbei werden sowohl Serotonin-Reuptake-Transporter Blocker/Inhibitoren (SSRIs) als auch verschiedene Serotonin Rezeptoren (5-HT_{1b} oder 5-HT_{2c}) blockiert (Fuller, 1995; Grignaschi et al., 1998; Halford et al., 2007; Ricca et al., 1996; Rosenzweig-Lipson et al., 2006; Wurtman & Wurtman, 1977). Dies lässt vermuten dass eine Inhibition/Blockade des serotonergen Systems mit der Gewichtsreduktion assoziiert ist. Ein anderer Aspekt der in diesem Kontext erwähnt werden sollte, ist dass Tropisetron auf die körperliche Aktivität (Bravo & Maswood, 2006; Nguyen et al., 2008) in zwei verschiedenen Rattenmodellen eine stimulierende Wirkung hatte. Die dabei durchgeführten Versuche sind jedoch schwer mit dem hier angewendeten Modell zu vergleichen. Zudem wurde in den dort beschriebenen Versuchen das Körpergewicht sowie die Futter- oder Kalorienaufnahme nicht untersucht. In der vorliegenden Studie fanden sich keine Anzeichen, dass die Tiere einen veränderten Energieverbrauch oder erhöhte körperliche Aktivität zeigten, denn die Futter- bzw. Kalorienaufnahme sowie das Körpergewicht war bei den Kontrolltieren mit Tropisetron-Behandlung unverändert im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

Unterschiede zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und anderen (Savastano et al., 2005) ergeben sich möglicherweise aus den unterschiedlichen experimentellen Studiendesigns der Tieruntersuchungen. So haben Savastano et al. (2005) z.B. den Effekt der 5-HT₃R Inhibition in einer Kurzzeitstudie untersucht, um die direkten Auswirkungen auf eine einzige Glukose-Gabe zu untersuchen, dabei wurden nur bis zu 60 min nach der Glukose-Gabe Messungen der Nahrungsaufnahme durchgeführt.

Außerdem wurde die Glukoselösung mittels eines duodenalen Katheters appliziert und spiegelt so nicht die natürliche Nahrungsaufnahme wieder. Das Interesse von Savastano et al. (2005) lag somit auf der direkten Wirkung der Glukose auf die Blockierung des 5-HT₃R und nicht auf der Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung der Tiere. Zudem waren die Tiere genüchtert und bekamen den Antagonisten i.p. verabreicht. In der hier vorliegenden Studie wurde die Glukoselösung ad libitum angeboten und war gleichzeitig mit dem Antagonisten angereichert. Zusammenfassend weisen die Daten dieser Arbeit darauf hin, dass der 5-HT₃R Antagonist Tropisetron keine Auswirkungen auf die Futter- und Flüssigkeitsaufnahme in einem chronischen Versuchsaufbau hat. Vielmehr scheint die Blockierung des 5-HT₃R die intestinale Motilität zu verringern und scheint auch keine Auswirkungen auf die Anzahl der 5-HT-positiven Zellen im Duodenum zu haben. Außerdem schützt diese Blockierung des 5-HT₃R vor der glukoseinduzierten Adipositas, die unabhängig von der Futter- und Flüssigkeitsaufnahme zustande kommt.

Verändert Tropisetron die Glukoseaufnahme im Darm?

Ein möglicher Mechanismus, durch den die Tropisetron-Behandlung vielleicht protektiv auf die glukoseinduzierte Gewichtszunahme wirkt, besteht in einer verminderten Aufnahme von Glukose im Darm und/oder in der Leber. Die dafür untersuchten Glukosetransporter im Darm SGLT1 und Glut2 waren signifikant höher expremiert in den mit Glukose und Tropisetron behandelten Tieren als in allen anderen Gruppen. Ein ähnlicher Effekt des Tropisetrons wurde auch in der Leber für den Glut2-Transporter nachgewiesen. Im Gegensatz dazu war die Expression der Glukosetransporter bei den mit 30%iger Glukoselösung gefütterten Mäusen nicht signifikant erhöht. Kishi et al. (1999) berichteten von einer ~50% erhöhten SGLT1 Expression, aber nicht von einer Veränderung der Glut2 Expression im Darm von Ratten nach 7-tägiger Zwangsfütterung mit einer Diät basierend auf 40%iger Sucrose. Die Daten der veränderten Glukosetransporter Expression deuten daraufhin, dass Tiere, die mit Tropisetron behandelt wurden, die Glukose weiterhin im Darm aufnehmen können und diese scheinbar auch in die Hepatozyten gelangt. Vielmehr lassen diese Untersuchungsergebnisse vermuten, dass die Glukoseaufnahme im Darm und der Leber in Mäusen mit Tropisetron-Behandlung

sogar noch erhöht sein könnte im Vergleich zu den unbehandelten glukosegefütterten Tieren.

Wie kommt der protektive Effekt des Tropisetrons in der glukoseinduzierten Gewichtszunahme zustande?

Eine andere Möglichkeit, wie Tropisetron die mit Glukose gefütterten Mäuse vor der Gewichtszunahme schützen könnte, ist durch Veränderungen des hepatischen Glukosemetabolismus. Kürzlich wurde beschrieben, dass Glukose ein spezifischer Regulator für das „Carbohydrate responsive element binding protein“ (ChREBP) ist und dadurch den hepatischen Glukose- und Energiemetabolismus modulieren kann (Davies et al., 2008). Vor allem Diäten, die mit Glukose angereichert sind, scheinen den hepatischen ChREBP Signalweg aktivieren zu können, was möglicherweise zu einer erhöhten Expression von Enzymen führt, die in die Bildung von Triglyceriden involviert sind

(Davies et al., 2008; Tsatsos & Towle, 2006). In der hier beschriebenen Studie konnte eine erhöhte Expression von ChREBP in der Leber von glukosegefütterten Tieren nachgewiesen werden. Dies ging mit einem erhöhten

Spiegel an FAS

und Triglyceriden in der Leber dieser Tiere einher. Ähnliche Veränderungen fanden sich nicht in den Lebern der mit Tropisetron und Glukose gefütterten Tiere. Dies deutet daraufhin, dass die aufgenommene Glukose in den mit Tropisetron

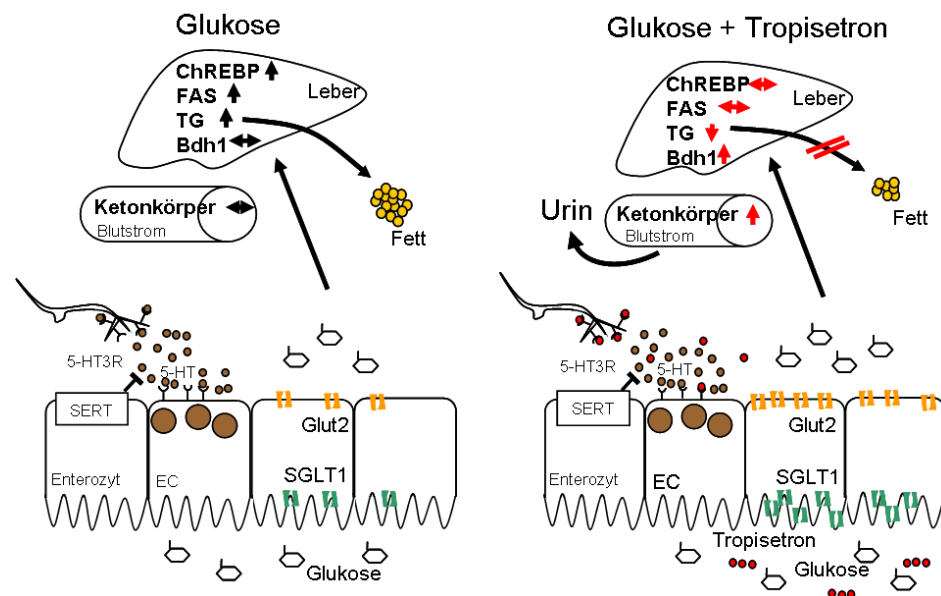


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des protektiven Effektes des Tropisetrons im Zusammenhang mit glukoseinduzierter Adipositas im Mausmodell. (EC – Enterochromaffine Zellen; TG – Triglyceridspiegel; ChREBP - carbohydrate responsive element binding protein; FAS - Fettsäure Synthase; Bdh1 - β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase; SGLT1 - Natrium-abhängiger Glukose-Cotransporter; Glut2 - Glukosetransporter 2; 5-HT – Serotonin; 5-HT3R – Serotonin Rezeptor 3).

behandelten Tieren nicht primär zu Triglyceriden metabolisiert wurde. Vielmehr konnte hier eine erhöhte Bdh1 Expression in den Lebern der mit Glukose und Tropisetron behandelten Gruppe detektiert werden und dies war mit einem erhöhten Plasmaspiegel an Ketonkörpern assoziiert (siehe Abbildung 4.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der protektive Effekt des 5-HT₃R Antagonisten Tropisetron gegen die glukoseinduzierte Adipositas möglicherweise, durch einen „Switch“ vom anabolen zum katabolen Metabolismus zustande kommt. Dies führt dazu, dass Glukose nicht mehr zu Triglyceriden umgewandelt wird, sondern wie durch eine fehlende Glukose-Detektion im Darm und/oder der Leber zu einer erhöhten Bildung von Ketonkörpern führt. Weiterhin deuten die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass der 5-HT₃R durch direkte Interaktion von Darm und Leber oder einem Signalweg, der die Darm-Hirn-Leber-Axe involviert, sowohl den Glukose- als auch den Energiemetabolismus in der Leber modulieren kann. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen und diesem metabolischen „Switch“ zugrunde liegen, ist noch nicht geklärt und muss durch weiterführende Studien untersucht werden.

So weisen die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass der 5-HT₃R möglicherweise ein entscheidender Regulator im hepatischen Glukosemetabolismus darstellt. Weiterhin deuten die Daten daraufhin, dass der 5-HT₃R Antagonist Tropisetron möglicherweise nicht nur die Darmmotilität verändert sondern auch vor der glukoseinduzierten Adipositas schützen kann. Weitere Studien sind nötig, um den gesamten Mechanismus, der in diesen protektiven Effekt involviert ist, zu ermitteln, um daraus auch mögliche Therapieansätze für die Behandlung und Prävention von Adipositas generieren zu können.

4.2. Einfluß des intestinalen serotonergen Systems auf die Entwicklung der zuckerinduzierten NAFLD

Hat die Aufnahme von Glukose- oder Fruktoselösung unterschiedliche Auswirkungen auf die Ausprägung der NAFLD und das intestinale serotonerge System?

Eine erhöhte Fruktoseaufnahme wird als ein entscheidender Faktor in der Entwicklung von Adipositas, dem metabolischen Syndrom (Insulinsistenz und Dyslipidämie) und NAFLD diskutiert (Bray et al., 2004; Lin et al., 2000; Thuy et al., 2008). Ergebnisse von Tier- und Humanstudien deuten darauf hin, dass ähnlich zur alkohol-assoziierten Leberschädigung (Bode & Bode, 2003) Veränderungen der bakteriellen Besiedlung und eine erhöhte Translokation von bakteriellen Endotoxinen über die Darmwand in das Blutkreislaufsystem an der Pathogenese der NAFLD beteiligt sein könnten (Brun et al., 2007; Diehl, 2004; Wigg et al., 2001). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Kohlenhydrate, wenn im Darm eine Überwucherung mit Bakterien oder Hefen stattgefunden hat (Baraona et al., 1986; Brun et al., 2007; Mezey et al., 1975) oder wenn Kohlenhydrate exzessiv konsumiert werden, zu Ethanol reduziert werden können (Logan & Jones, 2000; McManus et al., 1960) und so zu einem erhöhten Ethanolspiegel im Pfortaderblut sowie möglicherweise zur Erhöhung der Endotoxinkonzentration beitragen. Mechanismen, die in Patienten mit NAFLD und in Mausmodellen der fruktoseinduzierten NAFLD zur Erhöhung der intestinalen Permeabilität und Translokation von Endotoxin beitragen, sind bis jetzt nur ansatzweise beschrieben und verstanden. In diesem Abschnitt der Arbeit mit der Hypothese, dass das intestinale serotonerge System an der Regulation der intestinalen Permeabilität involviert ist und daraus folgernd Einfluß auf die intestinale Translokation von bakteriellem Endotoxin nehmen kann, wurde in einem Mausmodell der zuckerinduzierten Steatose getestet. Übereinstimmend mit den früheren Ergebnissen aus der eigenen Arbeitsgruppe (Bergheim et al., 2008), führte der chronische Fruktose-, aber nicht Glukosekonsum zu der frühen Phase der NAFLD, welche durch hepatische Steatose, Neutrophilen-Infiltration, erhöhter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Induktion der Expression von TNF α in der Leber gekennzeichnet ist. Die Ausprägung der hepatischen Steatose, die durch 30%ige Fruktoselösung erreicht werden konnte, war assoziiert mit einem deutlichen Verlust von SERT-Protein im Duodenum dieser Mäuse. Dies konnte auch in vitro an CaCo2 Zellen reproduziert werden. Die Motilität war nur geringfügig bei den mit

Glukose gefütterten Tieren erhöht und der Serotonin-Gehalt im Duodenum unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass die hepatische Triglyceridakkumulation in fruktosegefütterten Tieren mit einem fast vollständigen Verlust von SERT-Protein im Duodenum assoziiert ist aber nicht mit Modulationen der Motilität und des Serotonin-Gehaltes des Darms.

Kann durch den Verlust von SERT-Protein im Darm NAFLD in glukosegefütterten Mäusen induziert werden?

Um weitergehend die Hypothese zu überprüfen, ob der Verlust von SERT im Darm zur Entwicklung der fruktoseinduzierten hepatischen Steatose beiträgt, wurden SERT-Knockout-Mäuse mit 30%iger Glukose- oder 30%iger Fruktoselösung über 8 Wochen hinweg gefüttert. Im Gegensatz zu der hepatischen Triglyceridakkumulation von Wild-Typ Tieren, die 30%ige Glukose erhielten, war in den SERT-/- Tieren die hepatische Steatose signifikant erhöht. Tatsächlich war die hepatische Steatose der mit Glukose gefütterten SERT-/- Tiere vergleichbar zu der mit Fruktose gefütterten Wild-Typ Tieren. Weiterhin wiesen die fruktosegefütterten Wild-Typ Mäuse, wie auch die SERT-/- Tiere mit 30%iger Glukosefütterung einen erhöhten Endotoxinspiegel auf. Auch weitere Leberparameter wie z.B. die 4-Hydroxynonenal-Addukt Bildung und die TNF α mRNA-Expression waren in den glukosegefütterten SERT-/- Tieren erhöht und vergleichbar zu den Werten der Wild-Typ Tiere nach Fruktose-Fütterung. Gestützt wird die Hypothese, dass der Verlust von SERT in Wild-Typ Tieren eine wichtige Rolle in der zuckerinduzierten NAFLD spielt, auch durch den Befund, dass in den fruktosegefütterten SERT-/- Tieren die Erhöhung der Endotoxinspiegel und die hepatische Schädigungen nicht weiter verschlimmert wurden, sondern auf dem Niveau der Wild-Typ Mäuse wiederfindbar war. Zusammenfassend bedeutet dies, dass die deutlich höhere Schädigung auf die Leber in Wild-Typ Tieren von der Fruktose aber nicht der Glukose ausgeht und dass hierbei zumindest zum Teil der Verlust von SERT im Duodenum und damit die Veränderungen der Serotonin-Bioverfügbarkeit im Darm assoziiert sind. Dies könnte möglicherweise dazu beitragen, dass es zu einer erhöhten intestinalen Translokation von bakteriellem Endotoxin kommt und damit zur Aktivierung von hepatischen Kupffer Zellen. Zudem deuten die Daten darauf hin, dass die chronische Aufnahme von Glukose vielleicht auch zu Veränderungen der bakteriellen Flora im Dünndarm führt ähnlich zu den fruktosegefütterten Tieren. Jedoch scheinen diese Veränderungen keine Folgen für

die bakterielle Translokation zu haben, wenn das intestinale serotonerge System intakt ist. Mechanismen, die bei Fruktose-, aber nicht Glukose-Fütterung zum Verlust von SERT im Duodenum führen, sind bis jetzt noch nicht geklärt.

Wie ist Serotonin in die Entwicklung der zuckerinduzierten NAFLD involviert?

Neben der Rolle als Regulator der intestinalen Motilität (Bulbring & LIN, 1958; Savastano et al., 2005; Zhu et al., 2001; Gershon, 2004) deuten die Ergebnisse verschiedener in vitro und in vivo Studien darauf hin, dass Serotonin möglicherweise auch bei der Regulation der Darmpermeabilität involviert ist (Bakker et al., 1993; Nylander & Pihl, 2006). So wurde von Bakker et al. (1993) nachgewiesen, dass im intestinalen Epithel des Goldfisches, das Vasoaktive Intestinale Polypeptid (VIP) und Serotonin die Ionen-Selektivität der Tight-Junctions mittels eines Mechanismus, der auf einer Erhöhung

von cAMP beruht, reduzieren können.

Weiterhin wurde bereits

beschrieben, dass luminaire Hypertonie die duodenale mukosale

Permeabilität über Serotonin-

abhängige

Signalwege wie den 5-HT₃ und 4

Rezeptor erhöht und dass der 5-HT₃

Rezeptor auch eine entscheidende Rolle in der intestinalen Translokation von Endotoxin in septischen Modellen spielen kann (Sheth et al., 2007; Stull et al., 2007; Yamada et al., 2003). Durch die Behandlung von C57BL/6J Mäuse mit Tropisetron konnte bei den fruktosegefütterten Mäusen eine deutliche Verringerung der hepatischen Lipidakkumulation im Vergleich zu den nicht mit Tropisetron behandelten Mäusen nachgewiesen werden. Dies bestätigt eine Rolle des 5-HT₃

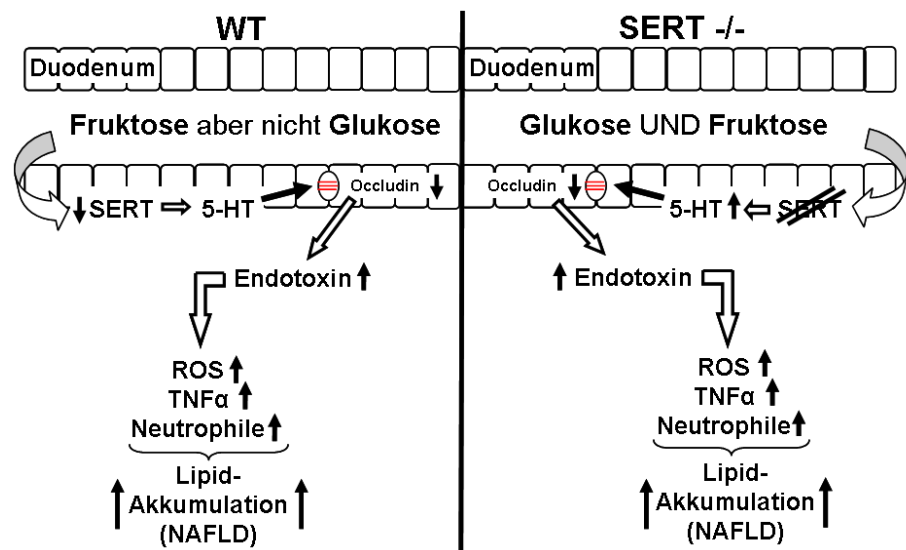


Abbildung 4.2 Möglicher Mechanismus wie das intestinale serotonerge System involviert ist in die Entwicklung der zuckerinduzierten NAFLD im Mausmodell. Schematische Darstellung der Ergebnisse von WT und SERT^{-/-} Mäusen. (ROS – Reaktive Sauerstoffspezies; 5-HT – Serotonin; TNF α - Tumor Nekrose Faktor α ; SERT – Serotonin Wiederaufnahme Transporter).

Rezeptors in der Regulation der intestinalen Permeabilität. Weiterhin wurde in dieser Arbeit verdeutlicht, dass Serotonin die Translokation von bakteriellem Endotoxin über den konfluenten Monolayer an intestinalen Enterozyten (d.h. konfluent gewachsenen CaCo2 Zellen) dosisabhängig erhöht und dies parallel mit einer Verminderung des Proteingehaltes von Occludin einem Tight-Junction-Protein einhergeht. Zudem war die Reduktion von SERT in den mit Fruktose gefütterten Wild-Typ Tieren mit einer nahezu vollständigen Verminderung von Occludin, im Duodenum assoziiert. Weitergehend unterstützt dieser Befund die Hypothese, dass dieses Tight-Junction-Protein möglicherweise eine wichtige Trigger-Funktion in der Erhöhung der intestinalen Translokation von Endotoxin in fruktosegefütterten Wild-Typ Tieren spielt. Die Proteinkonzentration von Occludin war in den glukose- und fruktosegefütterten SERT^{-/-} Mäusen gleichermaßen reduziert. Diese Verminderung des Occludins wurde nicht bei wassergefütterten SERT^{-/-} Tieren gemessen. Dies deutet darauf hin, dass weitere Faktoren wie z.B. bakterielle Abbauprodukte (z.B. Ethanol und Acetaldehyd (Baraona et al., 1986)) möglicherweise zu einer reduzierten Proteinkonzentration von Occludin und somit zu einer erhöhten Permeabilität führen. Diese Vermutung müsste durch weitere Studien präzisiert werden.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieses Projektteils darauf hin, dass die Verminderung von SERT-Protein im Duodenum zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität und Translokation von Endotoxin beiträgt und somit ein möglicher Mechanismus für die zuckerinduzierbare NAFLD im Mausmodell darstellt (siehe Abbildung 4.2) (Bergheim et al., 2008; Ouyang et al., 2008; Thuy et al., 2008). Weiterhin lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass ein erhöhter Konsum von Zucker - egal ob Glukose oder Fruktose - zu der Entwicklung der NAFLD beitragen kann, wenn das serotonerge System im Dünndarm gestört ist. Möglicherweise könnte aus diesen Erkenntnissen therapeutischer Nutzen gewonnen werden, der sich speziell auf die Ausschüttung von Serotonin oder die Wiederaufnahme durch SERT spezialisiert und somit zur Therapie oder der Prävention dieser weltweiten Erkrankung beiträgt. Hierfür sind noch weitere Studien nötig, um Interventionen auf Humanebene ermöglichen zu können.

4.3 Die Rolle des intestinalen serotonergen Systems in der Entwicklung von NASH in einem genetisch adipösen Mausmodell

Führt die Tropisetron-Behandlung zu einer Verbesserung der Leberhistologie in genetisch adipösen Ob/Ob Mäusen?

In den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit konnte bereits verdeutlicht werden, dass das intestinale serotonerge System eine wichtige Rolle in der Entwicklung der zuckerinduzierten Adipositas sowie der NAFLD spielt. Mit dem folgenden Modell sollte nun überprüft werden, inwiefern die Entstehung der Adipositas und der NAFLD in einem genetisch adipösen Mausmodell durch die Gabe von Tropisetron möglicherweise beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Behandlung mit dem 5-HT₃R Antagonisten Tropisetron die Plasma ALT-Aktivität reduziert und die Leberhistologie im Adipositas-assoziierten NAFLD Mausmodell (Ob/Ob Mäuse) verbessert. Die ALT-Aktivität steht in Relation zu der Leberverfettung und wird oft als ein Marker für Leberzellschädigung in epidemiologischen Studien herangezogen (Schindhelm et al., 2006). Der protektive Effekt der Tropisetron-Behandlung war mit einer deutlichen Minderung der intestinalen Translokation von bakteriellem Endotoxin und schlussfolgernd dem TLR-4 abhängigen Signalweg in der Leber assoziiert. Dies wurde über die MyD88 und TNF α mRNA-Expression erfasst. MyD88, ein Adapterprotein für die Toll-like Rezeptoren (TLR), führt zu einer schnellen Aktivierung von Nuklear Factor κ B (NF κ B) und einer erhöhten Produktion von TNF α in der Leber (Hritz et al., 2008).

Wie kommt der protektive Effekt des Tropisetron im genetisch adipösen Ob/Ob Mausmodell zustande?

Die Leber ist das Hauptziel von Endotoxin und gleichzeitig stellt es die „Hauptreinigungs- und Beseitigungsstelle“ für alle anfallenden mikrobiellen Produkte, einschließlich Endotoxin, im Körper dar (Tanikawa et al., 1998). Die Hauptquelle des Endotoxins sind die im Darmlumen befindlichen Bakterien. Mehrfach wurde bereits beschrieben, dass die intestinale Flora und Darmpermeabilität eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der alkoholinduzierten Leberschädigung spielen (Arteel, 2003; Bode & Bode, 2005), doch deren Funktionen in der Manifestierung und dem Voranschreiten der NAFLD sind erst ansatzweise verstanden. Die Erkenntnisse, dass chirurgische Eingriffe, wie z.B. ein jejunioilealer Bypass, zu einer bakteriellen

Überwucherung des Dünndarms führen können und dies zum Voranschreiten der Fettlebererkrankung bei Adipösen möglicherweise beiträgt, deutet darauf hin, dass die erhöhte bakterielle Produktexposition zur Entwicklung der NAFLD beitragen kann (Haines et al., 1981). Weiterhin deuten verschiedene Human- und Tierstudien darauf hin, dass eine erhöhte intestinale Translokation von bakteriellem Endotoxin ein kritischer Faktor in der Pathogenese der NAFLD ist (Brun et al., 2007; Farhadi et al., 2008; Katz et al., 1989). Ergebnisse aus Tierstudien lassen vermuten, dass Modulationen der intestinalen Flora, sei es durch die Gabe von Pre- oder Probiotika, die Leberhistologie verbessern können (Ackerman et al., 2005; Assy et al., 2008; Li et al., 2003; Yadav et al., 2007). Weiterhin wurde in Tierstudien nachgewiesen, dass bakterielles Endotoxin möglicherweise die Integrität des intestinalen Epithels moduliert, und so zu einem erhöhten portalen Endotoxinspiegel beiträgt. Die Folge wäre vermutlich eine erhöhte Exposition der Leber mit Endotoxinen (Yang et al., 1997). Die Daten von Brun et al. (2007) stellen einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von Tight-Junction-Proteinen wie ZO-1 und Occludin und der Entwicklung der NAFLD her. Zudem wurde von diesen Autoren nachgewiesen, dass in den Lebern von Ob/Ob Tieren im Vergleich zu den schlanken Kontrollen die hepatische Expression des Endotoxin-Rezeptors CD14 deutlich erhöht war. Dies lässt weiterhin vermuten, dass die intestinale Translokation von Endotoxin bei vorliegender Adipositas nochmals verstärkt ist und in Assoziation mit der Leberschädigung steht (Farhadi et al., 2008; Yang et al., 1997). Die Störung des Tight-Junction-Komplexes könnte durch eine Reihe verschiedenartiger Faktoren zustande kommen, möglicherweise durch bakterielles Endotoxin, Serotonin oder inflammatorische Mediatoren, die einen Transfer von Endotoxin aus dem Lumen über die Darmwand hinweg begünstigen und so die erhöhten Endotoxinspiegel im Blutkreislauf nach sich ziehen (Katz et al., 1989; Sheth et al., 2007; Stull et al., 2007). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Brun et al. (2007), weisen die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass der protektive Effekt von Tropicsetron mit einem deutlichen Anstieg der Proteinkonzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin assoziiert ist. Dies verdeutlicht erneut (wie zuvor in Abschnitt 4.2), dass Veränderungen des intestinalen serotonergen Systems die mit Adipositas und NAFLD einhergehenden Leberschädigungen modulieren können. Die Ausprägung der Adipositas konnte in diesem Modell durch die Behandlung mit Tropicsetron nicht verhindert werden, wie es zuvor bei der im Abschnitt 4.1 beschriebenen glukoseinduzierten Adipositas möglich

war. Die Gründe für eine unveränderte Gewichtszunahme im Ob/Ob Mausmodell mit Tropisetron-Behandlung könnten mit der Tatsache des Verlustes von Leptin verbunden sein. Leptin, das als Sättigungssignal im Kontext der Nahrungsaufnahme und somit der Gewichtsregulation eine Rolle spielt, scheint in diesem Kontext von Bedeutung zu sein. Zudem besteht die Möglichkeit, dass nur der hohe Konsum von Glukose parallel zur Tropisetron-Behandlung die schon in Abschnitt 4.1 beschriebenen Modulationen im Lebermetabolismus bewirkt und deshalb in diesem Modell der allgemeinen Übernahrung kein protektiver Effekt gegen die Gewichtszunahme nachgewiesen werden konnte. Weitergehend deuteten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Veränderung des 5-HT₃-abhängigen Serotonin-Signalweges hin, der die intestinale Permeabilität modulieren kann und somit protektive Auswirkungen auf die Leber hat. Immer öfter wird der experimentelle Nachweis erbracht, dass Serotonin nicht nur in der Regulation der Peristaltik, Sekretion und Detektion von vorhandenen Nahrungsbestandteilen im Darm (Gershon, 2004) eine Schlüsselrolle spielt, sondern auch bei der Regulation der epithelialen Tight-Junctions und somit an der Permeabilität des Darms beteiligt ist. Kubes & Gaboury (1996) konnten nachweisen, dass nach einer Infusion mit Serotonin die mikrovesikuläre Permeabilität in Ratten erhöht war. Diese endotheliale Störung wurde über den 5-HT₂ Rezeptor mediiert, wie in verschiedenen Arbeiten von Walther et al. (Walther et al., 2002; Walther et al., 2007) nachgewiesen wurde. Untersuchungsergebnisse von Yamada et al. (2003) wiesen darauf hin, dass intraluminales sowie intravenös verabreichtes Serotonin die intestinale Permeabilität für bakterielles Endotoxin über einen Mechanismus, der den 5-HT₃ Rezeptor mit einbindet, erhöhen kann. Weiterhin wurde an Milchdrüsen-Zellen nachgewiesen, dass Serotonin die Tight-Junction-Proteinkonzentration beeinflusst (Stull et al., 2007). Auch die Daten aus den CaCo2 Zellkulturversuchen aus Abschnitt 4.2 deuten auf den gleichen Effekt von Serotonin auf die Permeabilität und Proteinkonzentration an Occludin hin und unterstützen somit die vorangegangenen Daten. Die Ergebnisse in dem hier beschriebenen Mausmodell verdeutlichen, dass sowohl der Serotonin-Gehalt als auch die Expression des 5-HT_{3aR} signifikant im Duodenum der Ob/Ob Tiere erhöht war, wohingegen die Proteinkonzentration von SERT vergleichbar zu den schlanken Wild-Typ Mäusen war. Dies deutet auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit von Serotonin im Darm der Ob/Ob Tiere hin. Die Blockierung des 5-HT_{3R} mittels Tropisetron resultierte in einer Normalisierung des Serotonin-Gehaltes und einer

Induktion des SERT-Proteingehalts im Duodenum. Diese Veränderungen gingen einher mit einer signifikanten Induktion des Proteingehaltes des Tight-Junction-Proteins Occludin. Diese Induktion trug, wenn auch nur partiell, zur deutlichen Reduktion der intestinalen Translokation von bakteriellem Endotoxin und

ausfolgend einer Verbesserung der Leberhistologie in den mit Tropisetron behandelten Ob/Ob Mäusen bei. Zusammenfassend weisen diese Untersuchungen darauf hin, dass Serotonin und der 5-HT3R möglicherweise

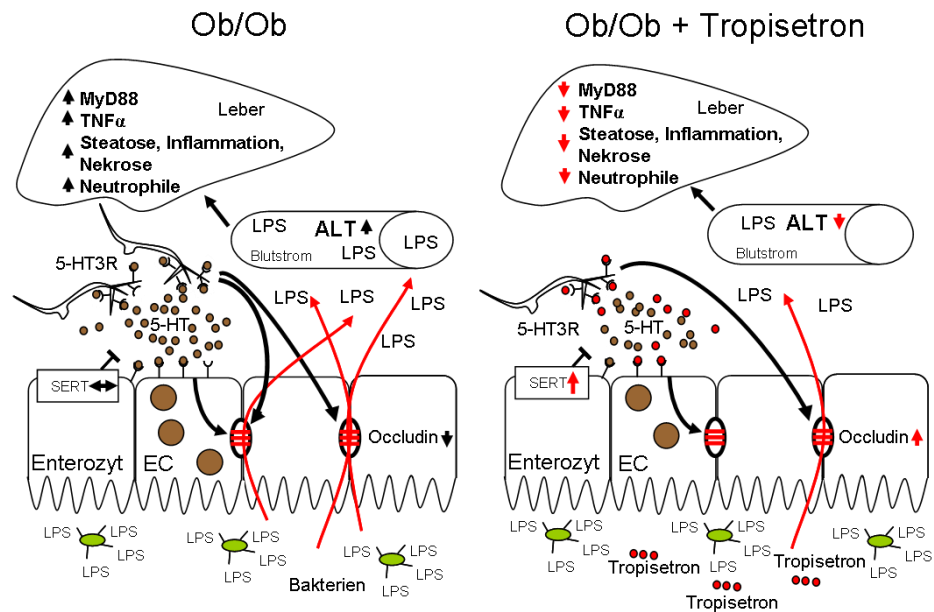


Abbildung 4.3 Möglicher Mechanismus wie Tropisetron zur Verbesserung der Leberparameter in Ob/Ob Mäusen führt. (MyD88 – Myeloid differentiation primary response gene (88); ALT – Alaninaminotransferase; 5-HT – Serotonin; 5-HT3R – Serotonin Rezeptor 3; TNF α - Tumor Nekrose Faktor α ; SERT – Serotonin reuptake transporter; EC – Enterochromaffine Zellen).

eine wichtige Rolle in der Regulation der intestinalen Permeabilität bei Ob/Ob Mäusen spielen und damit einen Beitrag in der Entwicklung der NAFLD aber nicht der Gewichtsregulation, bei Ob/Ob Mäusen leisten. Mechanismen, die sich hinter dieser Regulation verbergen, sind noch unbekannt. Abschließend konnte hiermit demonstriert werden, dass eine angegriffene intestinale Permeabilität in genetisch adipösen Ob/Ob Mäusen durch die Gabe eines 5-HT3 Antagonisten abgeschwächt werden kann. Dies erfolgt über eine Verminderung des Serotonin-Gehaltes im Darm und eine erhöhte SERT-Proteinkonzentration. Weiterhin führt dies zu einer verringerten Translokation von bakteriellem Endotoxin in den Blutkreislauf und somit zu einer reduzierten Leberschädigung (siehe Abbildung 4.3). Dies deutet darauf hin, dass der 5-HT3R, eine wichtige Rolle in der Entwicklung der NAFLD spielt und könnte so für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von NAFLD und der Prävention von NASH herangezogen werden.

Fazit

Aufgrund der in den letzten Jahren steigenden Zahl von Patienten mit Adipositas und NAFLD ist es notwendig, Therapien zu finden, die den Verlauf der Erkrankungen aufhalten oder sogar umkehren. Es steht bis zum heutigen Zeitpunkt keine 100%ige wirkungsvolle Therapie der Adipositas oder auch der NAFLD zur Verfügung. Verschiedene Lebensstilinterventionen, zeitbegrenzte pharmakologische Behandlungen oder chirurgische Eingriffe können eingesetzt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang der Entwicklung von Adipositas und NAFLD mit Modulationen des intestinalen serotonergen Systems nachgewiesen werden. Vor allem 5-HT, der 5-HT₃R und SERT spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Entwicklung der zuckerinduzierten Adipositas und NAFLD in verschiedenen Mausmodellen.

Vor diesem Hintergrund könnte die Möglichkeit bestehen, durch die Behandlung mit einem 5-HT₃R Antagonisten oder eine Reduzierung des 5-HT-Spiegels durch eine Erhöhung des SERT-Proteins im Darm in die Entwicklung von Adipositas und NAFLD eingreifen zu können. Die vorliegende Arbeit kann als möglicher Wegweiser für potentielle neue Therapieansätze gesehen werden. Hiermit könnte sich ein neues Feld der Forschung auf tun, um die zwei größten Weltgesundheitsprobleme eines Tages frühzeitig und vollständig behandeln zu können. Um jedoch sichere Aussagen treffen zu können, inwiefern diese neuen Erkenntnisse für die Humanforschung nutzbar wären, ist weitere Grundlagenforschung notwendig, die dazu beitragen sollte, die vollständigen mechanistischen Zusammenhänge der hier dargestellten Ergebnisse erfassen zu können.

5. Zusammenfassung

Weltweit hat die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas in den letzten Jahrzehnten dramatisch zugenommen. Die Ursachen, die zur Entwicklung von Adipositas beitragen, sind zahlreich und komplex. Gleiches trifft auch auf die Entwicklung der nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung (NAFLD) zu, die mit Übergewicht und Adipositas assoziiert ist. Die Hypothese, dass zuckergesüßte Getränke zur Entwicklung von Adipositas und NAFLD beitragen, wurde durch verschiedene Tierstudien bereits nachgewiesen. Neuerdings werden Veränderungen auf der Ebene des Gastrointestinaltraktes als mögliche Faktoren, die sowohl zur Entwicklung von Adipositas als auch NAFLD beitragen, diskutiert. Von besonderer Bedeutung könnte hierbei das enterische Nervensystem (ENS) sein, das wichtige Darmfunktionen wie Peristaltik, Sekretion und Permeabilität über seinen Haupt-Neurotransmitter Serotonin (5-HT) und dessen verschiedenen Rezeptoren reguliert. Durch den 5-HT-Wiederaufnahme Transporter (SERT) wird die Bioverfügbarkeit des Serotonins reguliert. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Rolle das intestinale serotonerge System und dabei im speziellen SERT und der 5-HT_{3R} in der Ausbildung der zuckerinduzierten Adipositas und NAFLD in verschiedenen Mausmodellen spielt.

Zuerst wurde die Hypothese untersucht, ob das intestinale serotonerge System eine Rolle in der zuckerinduzierten Adipositas spielt. Dazu wurden C57BL/6J Mäuse über 8 Wochen mit 30%iger Glukoselösung oder Wasser gefüttert. Zusätzlich wurden einige Tiere mit dem 5-HT_{3R} Antagonisten Tropisetron behandelt. Die Motilität, Gewichtszunahme und Gesamtkalorienaufnahme war signifikant erhöht in Mäusen mit Glukose-Fütterung. In Mäusen mit Glukose-Fütterung und Tropisetron-Behandlung war die Motilität und Gewichtszunahme nicht signifikant erhöht, trotz einer unveränderten Kalorienaufnahme. Der protektive Effekt von Tropisetron auf die zusätzliche Gewichtszunahme, war nicht mit einer reduzierten, sondern erhöhten mRNA-Expression der Glukosetransporter im Darm und Leber assoziiert. Die Untersuchung der Expression des Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) und der Fettsäure Synthase sowie der Triglyceridkonzentration in der Leber, der mit glukosegefütterten Tiere, war signifikant erhöht. Dies konnte nicht in den mit Glukose und Tropisetron behandelten Tieren nachgewiesen werden. Gleichzeitig war die β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase mRNA-Expression und der Plasmaspiegel an Ketonkörpern in den Glukose und Tropisetron gefütterten Tieren

signifikant erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der 5-HT₃R nicht nur in der Regulation der Motilität, sondern auch in den hepatischen Glukosemetabolismus involviert ist.

Zweitens wurde die Hypothese überprüft, ob Veränderungen des intestinalen serotonergen Systems eine Rolle in der Entwicklung der NAFLD spielen. Dazu wurden Wild-Typ Mäuse entweder mit Wasser, Wasser mit 30% Glukose oder 30% Fruktose für 8 Wochen gefüttert. Die chronische Zuckeraufnahme resultierte in eine signifikant erhöhte Lipideinlagerung in der Leber der mit Fruktose gefütterten Tiere im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Dies ging einher mit einer signifikanten Verminderung von SERT-Protein im Duodenum, wobei der Serotonin-Gehalt unverändert blieb. In der Gruppe der mit Glukose gefütterten Tiere waren keine Unterschiede dieser beiden Parameter messbar. Um zu überprüfen, ob der Verlust von SERT in den Fruktose-Tieren möglicherweise in einem kausalen Zusammenhang zur Entwicklung von NAFLD steht, wurde die Fütterung an SERT-Knockout-Mäusen wiederholt. In SERT^{-/-} Mäusen führte die Glukose-Fütterung zu einer signifikanten Lipideinlagerung in der Leber, die vergleichbar mit der von Fruktose gefütterten Wild-Typ Tieren war. Die erhöhte Lipidakkumulation ging mit erhöhten Entzündungsparametern wie TNF α , 4-Hydroxynonenal-Addukte, infiltrierten Neutrophilen in der Leber und erhöhten Endotoxinspiegel im Plasma einher. Der Effekt in den mit Fruktose gefütterten SERT^{-/-} Mäusen war nicht verstärkt im Vergleich zu den Wild-Typ Fruktose Mäusen. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des SERTs in der zuckerinduzierten NAFLD hin. Eine gleichzeitige Behandlung von Fruktose Mäusen mit Tropicsetron, einem 5HT₃R Antagonisten, resultiert in eine signifikante Verminderung der hepatischen Steatose. Die Glukose und Fruktose gefütterten SERT^{-/-} als auch Fruktose gefütterte Wild-Typ Mäuse wiesen eine Verminderung des Tight-Junction-Proteins Occludin auf. Durch einen in vitro Versuch mit konfluenten CaCo2 Zellen konnte nachgewiesen werden, dass 5-HT zu einem dosisabhängigen Anstieg der Endotoxinpermeabilität und Reduktion von Occludin-Protein führt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein erhöhter Konsum an Zuckern - sei es Glukose oder Fruktose - zu NAFLD führen kann, wenn das serotonerge System des Intestinaltraktes beschädigt ist.

Weitergehend wurde als drittes untersucht, ob SERT und der 5-HT₃R auch in der späten Phase der NAFLD und der Entwicklung der fortgeschrittenen Adipositas eine Rolle spielt. Dazu wurden vier Wochen alte Ob/Ob Mäuse und schlanke C57BL/6J

Mäuse mit Wasser oder Wasser mit Tropisetron für sechs Wochen gefüttert. Die Behandlung mit Tropisetron milderte signifikant die Entwicklung zur NASH in Ob/Ob Mäusen. Dieser protektive Effekt war assoziiert mit einer verminderten mRNA-Expression von MyD88 und TNF α in der Leber und reduzierten Endotoxinspiegel im Plasma von behandelten Ob/Ob Tieren. Die Proteinkonzentration des Tight-Junction-Proteins Occludin und SERT im Duodenum waren in den behandelten Ob/Ob Mäusen im Vergleich zu allen anderen Gruppen signifikant erhöht. Die Anzahl an 5-HT-positiven Zellen und der Serotonin-Gehalt im Duodenum waren in unbehandelten Ob/Ob Mäusen signifikant erhöht, jedoch unverändert in behandelten Ob/Ob Mäusen. Diese Daten deuten darauf hin, dass der 5-HT_{3R} eine Rolle in der Regulation der intestinalen Permeabilität und der Entwicklung der NASH in adipösen Ob/Ob Mäusen spielt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass das intestinale serotonerge System und hierbei im Speziellen 5-HT, 5-HT regulierendes SERT und 5-HT_{3R} eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Adipositas und der nahrungsinduzierten NAFLD spielen. Diese Daten könnten als Grundlage für weiterführende Forschung in Betracht gezogen werden um neue Therapien und Präventionsstrategien zur Behandlung von Adipositas und NAFLD zu entwickeln.

6. Summary

The worldwide prevalence of overweight and obesity has increased dramatically throughout the last decades. The causes of obesity are numerous and complex and the understanding of the mechanism(s) involved in the disease process are still limited. The same is true for the development of NAFLD, a liver disease for which a strong association with overweight and obesity has repeatedly been shown.

High dietary fat intake has long been thought to be the major cause of obesity and NAFLD. However, other factors like carbohydrate intake may also contribute. Alterations at the level of the intestinal tract have also been discussed to be associated with the development of NAFLD and obesity. The enteric nervous system (ENS) might be of particular importance in this context, regulating the fundamental intestinal functions like peristalsis, secretion and permeability through its main neurotransmitter serotonin (5-HT) and different 5-HT receptors. The termination of the 5-HT action is mediated by the 5-HT selective reuptake transporter (SERT), located on epithelial cells. Based on this background the aim of the present work was to investigate the role of the intestinal serotonergic system and herein particularly of SERT and 5-HT₃R in the onset of sugar-induced overweight and NAFLD as well as in the progression of NAFLD in mouse models.

To test the first hypothesis that the intestinal serotonergic system is involved in the onset of sugar-induced obesity, C57BL/6J mice had free access to chow and either water enriched with 30% glucose, or plain water. Some of these animals were treated with the 5-HT₃R antagonist tropisetron in parallel for 8 weeks. Total caloric intake, weight gain and intestinal motility were significantly increased in mice fed with glucose in comparison to controls. In contrast, mice fed with glucose and tropisetron showed a significantly attenuated additional weight gain, despite the fact that their caloric intake was similar to glucose fed mice and the motility was reduced to the level of the controls. The protective effect of tropisetron on the additional weight gain of glucose fed mice was not associated with a decreased mRNA expression of the intestinal and the hepatic glucose transporters; instead, these transporters were slightly increased by the 5-HT₃R antagonist treatment. However, the mRNA expression of carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and fatty acid synthase as well as triglyceride levels in the liver were only enhanced in mice fed glucose, but remained at an unchanged level with the controls when these mice were exposed to glucose and tropisetron. At the same time, β -hydroxybutyrate

dehydrogenase mRNA expression and plasma levels of ketone bodies were significantly increased. In conclusion, the results of this study indicate that the intestinal 5-HT_{3R} is not only a regulator of intestinal motility but also a novel regulator of the hepatic glucose metabolism.

To test the second hypothesis that alterations of the intestinal serotonergic system are involved in the development of NAFLD, wild-type mice were either fed plain water or water enriched with 30% glucose or 30% fructose for 8 weeks. This resulted in a significant increase in hepatic steatosis in the fructose fed mice in comparison to water or glucose fed animals. The excessive hepatic fat accumulation was associated with a significant loss of SERT protein, but not with a reduction in the serotonin content in the duodenum. Glucose fed animals showed no changes in the SERT protein or serotonin content in the duodenum. To further investigate if the loss of SERT in fructose fed mice plays a causal role in the development of NAFLD a SERT knockout mouse model was employed. The chronic intake of 30% glucose resulted in a significant hepatic lipid accumulation in SERT^{-/-} mice which was similar to that found in wild-type mice fed with 30% fructose. The enhanced lipid accumulation found in glucose fed SERT^{-/-} mice was associated with an increased mRNA expression of tumor necrosis factor α (TNF α), elevated concentration of 4-hydroxynonenal adducts, and increased number of neutrophils in the liver and as well as markedly elevated endotoxin levels in the portal plasma. Interestingly, the effect of fructose on the liver was not exacerbating in fructose fed mice, further suggesting that a loss of SERT might be a crucial factor in sugar-induced NAFLD. Indeed in SERT^{-/-} mice fed fructose or glucose as well as in wild-type mice fed fructose, the decrease/loss of SERT was associated with an almost complete loss of the tight junction protein occludin. In fructose fed mice treated with the 5-HT₃ receptor antagonist tropisetron hepatic steatosis was significantly attenuated. Furthermore, in an in vitro experiment the incubation of confluent CaCo2 cells with 5-HT resulted in a significant increase of the endotoxin permeability of the monolayer and a reduced occludin protein content. These results suggest that an increased consumption of sugar, be it glucose or fructose, may lead to NAFLD if the serotonergic system in the small intestine is disturbed.

The third project had the goal to determine if SERT and 5-HT_{3R} are also involved in the later phase of NAFLD and the development of severe obesity. 4 week old ob/ob mice and C57BL/6J wild-type mice had either ad libitum access to plain water or

water containing tropisetron for 6 weeks. Treatment with tropisetron significantly blocked the development of NASH in ob/ob mice, as seen by a marked decrease in hepatic steatosis, inflammation and necrosis and plasma alanine aminotransferase levels. The protective effects of tropisetron treatment were associated with a significant decrease of MyD88, TNF α mRNA expression and portal endotoxin levels in ob/ob mice. Moreover, the protein concentration of the tight junction protein occludin and SERT in the duodenum of tropisetron treated ob/ob mice was markedly increased in comparison with all other groups. Here, the increased protein content of SERT in treated ob/ob mice seems to be part of the protective effect against the severe form of NAFLD. However, the number of 5-HT-positive cells in the duodenum was not affected by tropisetron treatment. This data suggests that 5-HT_{3R} may be involved in the regulation of intestinal permeability and subsequently the development of NASH in obese ob/ob mice.

All three parts of this work indicate that the intestinal serotonergic system and specially 5-HT, 5-HT regulating SERT and 5-HT_{3R} might play an important role in the development of obesity and NAFLD. These results could possibly be a new directory for human based research that might help to treat these two increasing world health problems in the future.

Literaturverzeichnis

- Abrams, G. A., Kunde, S. S., Lazenby, A. J., and Clements, R. H. (2004). *Portal fibrosis and hepatic steatosis in morbidly obese subjects: A spectrum of nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 40, 475-483.
- Ackerman, Z., Oron-Herman, M., Grozovski, M., Rosenthal, T., Pappo, O., Link, G., and Sela, B. A. (2005). *Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction*. *Hypertension*, 45, 1012-1018.
- Adachi, Y., Bradford, B. U., Gao, W., Bojes, H. K., and Thurman, R. G. (1994). *Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury*. *Hepatology*, 20, 453-460.
- Adams, L. A. and Angulo, P. (2007). *Role of liver biopsy and serum markers of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin Liver Dis*, 11, 25-35, viii.
- Alberti, K. G., Zimmet, P., and Shaw, J. (2005). *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. *Lancet*, 366, 1059-1062.
- Alon, E. and Biro, P. (1996). *[Prevention and treatment of postoperative nausea and vomiting with 5-HT₃-receptor blockers]*. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 31, 200-204.
- Angulo, P. and Lindor, K. D. (2002). *Non-alcoholic fatty liver disease*. *J Gastroenterol Hepatol*, 17 Suppl, S186-S190.
- Arteel, G. E. (2003). *Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease*. *Gastroenterology*, 124, 778-790.
- Assy, N., Nasser, G., Kamayse, I., Nseir, W., Beniashvili, Z., Djibre, A., and Grosovski, M. (2008). *Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors*. *Can J Gastroenterol*, 22, 811-816.
- Azpiroz, F. and Malagelada, J. R. (1985). *Intestinal control of gastric tone*. *Am J Physiol*, 249, G501-G509.
- Baddeley, R. M. (1985). *An epilogue to jejunoileal bypass*. *World J Surg*, 9, 842-849.
- Bakker, R., Dekker, K., De Jonge, H. R., and Groot, J. A. (1993). *VIP, serotonin, and epinephrine modulate the ion selectivity of tight junctions of goldfish intestine*. *Am J Physiol*, 264, R362-R368.
- Baraona, E., Julkunen, R., Tannenbaum, L., and Lieber, C. S. (1986). *Role of intestinal bacterial overgrowth in ethanol production and metabolism in rats*. *Gastroenterology*, 90, 103-110.
- Barnes, N. M. and Sharp, T. (1999). *A review of central 5-HT receptors and their function*. *Neuropharmacology*, 38, 1083-1152.

- Basciano, H., Federico, L., and Adeli, K. (2005). *Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia*. *Nutr Metab (Lond)*, 2, 5.
- Baumgarten, H. G. G. Z. (1997). *Anatomy of central serotonergic projection system*. *Handbook of Exptl Pharmacol* (pp. 41-90).
- Belelli, D., Balcarek, J. M., Hope, A. G., Peters, J. A., Lambert, J. J., and Blackburn, T. P. (1995). *Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit*. *Mol Pharmacol*, 48, 1054-1062.
- Bellentani, S., Tiribelli, C., Saccoccio, G., Sodde, M., Fratti, N., De, M. C., and Cristianini, G. (1994). *Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study*. *Hepatology*, 20, 1442-1449.
- Bengel, D., Jhren, O., Andrews, A. M., Heils, A., Mossner, R., Sanvitto, G. L., Saavedra, J. M., Lesch, K. P., and Murphy, D. L. (1997). *Cellular localization and expression of the serotonin transporter in mouse brain*. *Brain Res*, 778, 338-345.
- Bengel, D., Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H., and Lesch, K. P. (1998). *Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice*. *Mol Pharmacol*, 53, 649-655.
- Bergheim, I., Guo, L., Davis, M. A., Lambert, J. C., Beier, J. I., Dubeau, I., Luyendyk, J. P., Roth, R. A., and Arteel, G. E. (2006). *Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1*. *Gastroenterology*, 130, 2099-2112.
- Bergheim, I., Weber, S., Vos, M., Kramer, S., Volynets, V., Kaserouni, S., McClain, C. J., and Bischoff, S. C. (2008). *Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin*. *J Hepatol*, 48, 983-992.
- Berneis, K. (2006). *Steigender Fructosekonsum als Auslöser des metabolischen Syndroms?* *Schweiz Med Forum*, 6, 189.
- Berthoud, H. R. and Neuhuber, W. L. (2000). *Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system*. *Auton Neurosci*, 85, 1-17.
- Blackburn, G. L. and Mun, E. C. (2004). *Effects of weight loss surgeries on liver disease*. *Semin Liver Dis*, 24, 371-379.
- Blier, P. and de, M. C. (1994). *Current advances and trends in the treatment of depression*. *Trends Pharmacol Sci*, 15, 220-226.
- Blundell, J. E. (1977). *Is there a role for serotonin (5-hydroxytryptamine) in feeding?* *Int J Obes*, 1, 15-42.
- Bode, C. and Bode, J. C. (2003). *Effect of alcohol consumption on the gut*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 17, 575-592.

- Bode, C. and Bode, J. C. (2005). *Activation of the innate immune system and alcoholic liver disease: effects of ethanol per se or enhanced intestinal translocation of bacterial toxins induced by ethanol?* Alcohol Clin Exp Res, 29, 166S-171S.
- Bogdanova, K., Poczatková, H., Uherková, L., Riegrova, D., Rypka, M., Feher, J., Marchesini, G., and Vesely, J. (2006). *Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--a novel common aspect of the metabolic syndrome.* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 150, 101-104.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 72, 248-254.
- Branca F, Nikogosian H Lobstein T and WHO Regional Office for Europe. *The challenge of obesity in the WHO European Region and the strategies for response.* -Kopenhagen (2007). 2007.
- Bravo, G. and Maswood, S. (2006). *Acute treatment with 5-HT₃ receptor antagonist, tropisetron, reduces immobility in intact female rats exposed to the forced swim test.* Pharmacol Biochem Behav, 85, 362-368.
- Bray, G. A. (2001). *Drug treatment of obesity.* Rev Endocr Metab Disord, 2, 403-418.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., and Popkin, B. M. (2004). *Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity.* Am J Clin Nutr, 79, 537-543.
- Briejer, M. R. and Schuurkes, J. A. (1996). *5-HT₃ and 5-HT₄ receptors and cholinergic and tachykininergic neurotransmission in the guinea-pig proximal colon.* Eur J Pharmacol, 308, 173-180.
- Brito, V. B., Folmer, V., Soares, J. C., Silveira, I. D., and Rocha, J. B. (2007). *Long-term sucrose and glucose consumption decreases the delta-aminolevulinatase activity in mice.* Nutrition, 23, 818-826.
- Browning, J. D., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R., Nuremberg, P., Horton, J. D., Cohen, J. C., Grundy, S. M., and Hobbs, H. H. (2004). *Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity.* Hepatology, 40, 1387-1395.
- Brun, P., Castagliuolo, I., Di, L., V, Buda, A., Pinzani, M., Palu, G., and Martines, D. (2007). *Increased intestinal permeability in obese mice: new evidence in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292, G518-G525.
- Brunt, E. M., Janney, C. G., Di Bisceglie, A. M., Neuschwander-Tetri, B. A., and Bacon, B. R. (1999). *Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions.* Am J Gastroenterol, 94, 2467-2474.
- Bugianesi, E. (2005). *Review article: steatosis, the metabolic syndrome and cancer.* Aliment Pharmacol Ther, 22 Suppl 2, 40-43.

- Buhot, M. C., Malleret, G., and Segu, L. (1999). *Serotonin receptors and cognitive behaviour--an update*. *IDrugs*, 2, 426-437.
- Bulbring, E. and LIN, R. C. (1958). *The effect of intraluminal application of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptophan on peristalsis; the local production of 5-HT and its release in relation to intraluminal pressure and propulsive activity*. *J Physiol*, 140, 381-407.
- Burton-Freeman, B., Gietzen, D. W., and Schneeman, B. O. (1999). *Cholecystokinin and serotonin receptors in the regulation of fat-induced satiety in rats*. *Am J Physiol*, 276, R429-R434.
- Camilleri, M. (2000). *Pharmacology and clinical experience with alosetron*. *Expert Opin Investig Drugs*, 9, 147-159.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., and Burcelin, R. (2008a). *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. *Diabetes*, 57, 1470-1481.
- Cani, P. D., Delzenne, N. M., Amar, J., and Burcelin, R. (2008b). *Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding*. *Pathol Biol (Paris)*, 56, 305-309.
- Casado, A., Rodriguez, V. M., Portillo, M. P., Macarulla, M. T., Abecia, L. C., Echevarria, E., and Casis, L. (2003). *Sibutramine decreases body weight gain and increases energy expenditure in obese Zucker rats without changes in NPY and orexins*. *Nutr Neurosci*, 6, 103-111.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Clark, J. M., Brancati, F. L., and Diehl, A. M. (2002). *Nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 122, 1649-1657.
- Cooke, H. J., Sidhu, M., and Wang, Y. Z. (1997). *5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon*. *Neurogastroenterol Motil*, 9, 181-186.
- Cope, K., Risby, T., and Diehl, A. M. (2000). *Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis*. *Gastroenterology*, 119, 1340-1347.
- Cotrim, H. P., Andrade, Z. A., Parana, R., Portugal, M., Lyra, L. G., and Freitas, L. A. (1999). *Nonalcoholic steatohepatitis: a toxic liver disease in industrial workers*. *Liver*, 19, 299-304.
- Crowell, M. D. (2004). *Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome*. *Br J Pharmacol*, 141, 1285-1293.

- Crowell, M. D., Cheskin, L. J., and Musial, F. (1994). *Prevalence of gastrointestinal symptoms in obese and normal weight binge eaters*. *Am J Gastroenterol*, 89, 387-391.
- Davies, M. N., O'Callaghan, B. L., and Towle, H. C. (2008). *Glucose activates ChREBP by increasing its rate of nuclear entry and relieving repression of its transcriptional activity*. *J Biol Chem*, 283, 24029-24038.
- Davies, P. A., Pistis, M., Hanna, M. C., Peters, J. A., Lambert, J. J., Hales, T. G., and Kirkness, E. F. (1999). *The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function*. *Nature*, 397, 359-363.
- Deutsche Adipositas Gesellschaft. *Evidenzbasierte Leitlinie Prävention und Therapie der Adipositas*. 2007.
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V. *Ernährungsbericht*. 2004. Bonn.
- Diehl, A. M. (2004). *Obesity and alcoholic liver disease*. *Alcohol*, 34, 81-87.
- Diehl, A. M. (2005). *Hepatic complications of obesity*. *Gastroenterol Clin North Am*, 34, 45-61.
- Ditter, B., Urbaschek, R., and Urbaschek, B. (1983). *Ability of various adsorbents to bind endotoxins in vitro and to prevent orally induced endotoxemia in mice*. *Gastroenterology*, 84, 1547-1552.
- Drenick, E. J., Fisler, J., and Johnson, D. (1982). *Hepatic steatosis after intestinal bypass--prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition*. *Gastroenterology*, 82, 535-548.
- Drewnowski, A. (2004). *Obesity and the food environment: dietary energy density and diet costs*. *Am J Prev Med*, 27, 154-162.
- Drewnowski, A. and Bellisle, F. (2007). *Liquid calories, sugar, and body weight*. *Am J Clin Nutr*, 85, 651-661.
- Drummond, S., Kirk, T., and De, L. A. (1996). *Are dietary recommendations for dietary fat reduction achievable?* *Int J Food Sci Nutr*, 47, 221-226.
- Dunzendorfer, S., Lee, H. K., Soldau, K., and Tobias, P. S. (2004). *TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor*. *J Immunol*, 173, 1166-1170.
- Elliott, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K., and Havel, P. J. (2002). *Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome*. *Am J Clin Nutr*, 76, 911-922.
- Endo, T., Minami, M., Hirafuji, M., Ogawa, T., Akita, K., Nemoto, M., Saito, H., Yoshioka, M., and Parvez, S. H. (2000). *Neurochemistry and neuropharmacology of emesis - the role of serotonin*. *Toxicology*, 153, 189-201.
- Enomoto, N., Ikejima, K., Kitamura, T., Oide, H., Takei, Y., Sato, N., and Thurman, R. G. (2000). *Alcohol enhances lipopolysaccharide-induced increases in nitric*

- oxide production by Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. Alcohol Clin Exp Res, 24, 55S-58S.*
- Enzi, G. (1994). *Socioeconomic consequences of obesity: the effect of obesity on the individual. Pharmacoeconomics, 5, 54-57.*
- Erspamer, V. (1966). *Occurrence of indolealkylamines in nature. Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* (pp. 132-181). Springer Verlag, Berlin, Deutschland.
- Facer, P., Polak, J. M., Jaffe, B. M., and Pearse, A. G. (1979). *Immunocytochemical demonstration of 5-hydroxytryptamine in gastrointestinal endocrine cells. Histochem J, 11, 117-121.*
- Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J. M., Periasamy, R., Park, S., and Tappy, L. (2005). *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. Diabetes, 54, 1907-1913.*
- Farhadi, A., Gundlapalli, S., Shaikh, M., Frantzides, C., Harrell, L., Kwasny, M. M., and Keshavarzian, A. (2008). *Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. Liver Int, 28, 1026-1033.*
- Farrell, G. C. and Larter, C. Z. (2006). *Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. Hepatology, 43, S99-S112.*
- Feighner, J. P. (1999). *Overview of antidepressants currently used to treat anxiety disorders. J Clin Psychiatry, 60 Suppl 22, 18-22.*
- Feinle, C., Rades, T., Otto, B., and Fried, M. (2001). *Fat digestion modulates gastrointestinal sensations induced by gastric distention and duodenal lipid in humans. Gastroenterology, 120, 1100-1107.*
- Feyer, P., Zimmermann, J. S., Titlbach, O. J., Buchali, A., Hinkelbein, M., and Budach, V. (1998). *Radiotherapy-induced emesis. An overview. Strahlenther Onkol, 174 Suppl 3, 56-61.*
- Folch, J., LEES, M., and SLOANE STANLEY, G. H. (1957). *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem, 226, 497-509.*
- Freeman, S. L., Glatzle, J., Robin, C. S., Valdellon, M., Sternini, C., Sharp, J. W., and Raybould, H. E. (2006). *Ligand-induced 5-HT₃ receptor internalization in enteric neurons in rat ileum. Gastroenterology, 131, 97-107.*
- French, S. J., Murray, B., Rumsey, R. D., Fadzlin, R., and Read, N. W. (1995). *Adaptation to high-fat diets: effects on eating behaviour and plasma cholecystokinin. Br J Nutr, 73, 179-189.*
- Friberger, P., Knos, M., and Mellstam, L. (1982). *A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate. Prog Clin Biol Res, 93, 195-206.*

- Fu, X. S. and Jiang, F. (2006). *Cisapride decreasing orocecal transit time in patients with nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 5, 534-537.
- Fujimiya, M., Okumiya, K., and Kuwahara, A. (1997). *Immunoelectron microscopic study of the luminal release of serotonin from rat enterochromaffin cells induced by high intraluminal pressure*. *Histochem Cell Biol*, 108, 105-113.
- Fuller, R. W. (1995). *Serotonin uptake inhibitors: uses in clinical therapy and in laboratory research*. *Prog Drug Res*, 45, 167-204.
- Geliebter, A. (1988). *Gastric distension and gastric capacity in relation to food intake in humans*. *Physiol Behav*, 44, 665-668.
- Gershon, M. D. (1999). *Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel*. *Aliment Pharmacol Ther*, 13 Suppl 2, 15-30.
- Gershon, M. D. (2004). *Review article: serotonin receptors and transporters -- roles in normal and abnormal gastrointestinal motility*. *Aliment Pharmacol Ther*, 20 Suppl 7, 3-14.
- Gershon, M. D., Dreyfus, C. F., Pickel, V. M., Joh, T. H., and Reis, D. J. (1977). *Serotonergic neurons in the peripheral nervous system: identification in gut by immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3086-3089.
- Gill, H. K. and Wu, G. Y. (2006). *Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: effects of weight loss and a review of popular diets. Are low carbohydrate diets the answer?* *World J Gastroenterol*, 12, 345-353.
- Glatzle, J., Sternini, C., Robin, C., Zittel, T. T., Wong, H., Reeve, J. R., Jr., and Raybould, H. E. (2002). *Expression of 5-HT₃ receptors in the rat gastrointestinal tract*. *Gastroenterology*, 123, 217-226.
- Gordon, J. A. and Hen, R. (2004). *The serotonergic system and anxiety*. *Neuromolecular Med*, 5, 27-40.
- Grahame-Smith, D. G. (1964). *Tryptophan hydroxylation in brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 16, 586-592.
- Greenshaw, A. J. and Silverstone, P. H. (1997). *The non-antiemetic uses of serotonin 5-HT₃ receptor antagonists. Clinical pharmacology and therapeutic applications*. *Drugs*, 53, 20-39.
- Grider, J. R., Kuemmerle, J. F., and Jin, J. G. (1996). *5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis by activating 5-HT₄/5-HT_{1p} receptors on sensory CGRP neurons*. *Am J Physiol*, 270, G778-G782.
- Grignaschi, G., Invernizzi, R. W., Fanelli, E., Fracasso, C., Caccia, S., and Samanin, R. (1998). *Citalopram-induced hypophagia is enhanced by blockade of 5-HT(1A) receptors: role of 5-HT(2C) receptors*. *Br J Pharmacol*, 124, 1781-1787.

- Gross, L. S., Li, L., Ford, E. S., and Liu, S. (2004). *Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment*. *Am J Clin Nutr*, 79, 774-779.
- Grundey, D. (1988). *Speculations on the structure/function relationship for vagal and splanchnic afferent endings supplying the gastrointestinal tract*. *J Auton Nerv Syst*, 22, 175-180.
- Gupta, S., Vaswani, R., and Verma, D. (1999). *The 5HT₃ receptors and the descending nociceptive pathway--a review*. *Middle East J Anesthesiol*, 15, 247-258.
- Haines, N. W., Baker, A. L., Boyer, J. L., Glagov, S., Schneir, H., Jaspan, J., and Ferguson, D. J. (1981). *Prognostic indicators of hepatic injury following jejunoileal bypass performed for refractory obesity: a prospective study*. *Hepatology*, 1, 161-167.
- Halford, J. C., Harrold, J. A., Boyland, E. J., Lawton, C. L., and Blundell, J. E. (2007). *Serotonergic drugs : effects on appetite expression and use for the treatment of obesity*. *Drugs*, 67, 27-55.
- Hammer, J., Phillips, S. F., Talley, N. J., and Camilleri, M. (1993). *Effect of a 5HT₃-antagonist (ondansetron) on rectal sensitivity and compliance in health and the irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*, 7, 543-551.
- Havel, P. J. (2004). *Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism*. *Diabetes*, 53 Suppl 1, S143-S151.
- Hayes, M. R., Chory, F. M., Gallagher, C. A., and Covasa, M. (2006). *Serotonin type-3 receptors mediate cholecystokinin-induced satiation through gastric distension*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R115-R123.
- Hayes, M. R. and Covasa, M. (2005). *CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT₃ receptors*. *Peptides*, 26, 2322-2330.
- Hayes, M. R. and Covasa, M. (2006a). *Dorsal hindbrain 5-HT₃ receptors participate in control of meal size and mediate CCK-induced satiation*. *Brain Res*, 1103, 99-107.
- Hayes, M. R. and Covasa, M. (2006b). *Gastric distension enhances CCK-induced Fos-like immunoreactivity in the dorsal hindbrain by activating 5-HT₃ receptors*. *Brain Res*, 1088, 120-130.
- Hebebrand, J., Geller, F., Dempfle, A., Heinzl-Gutenbrunner, M., Raab, M., Gerber, G., Wermter, A. K., Horro, F. F., Blundell, J., Schafer, H., Renschmidt, H., Herpertz, S., and Hinney, A. (2004). *Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations*. *Mol Psychiatry*, 9, 796-800.
- Hritz, I., Mandrekar, P., Velayudham, A., Catalano, D., Dolganiuc, A., Kodys, K., Kurt-Jones, E., and Szabo, G. (2008). *The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in*

- alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88.* Hepatology, 48, 1224-1231.
- Hu, F. B., van Dam, R. M., and Liu, S. (2001). *Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate.* Diabetologia, 44, 805-817.
- Humphrey, P. P., Bountra, C., Clayton, N., and Kozlowski, K. (1999). *Review article: the therapeutic potential of 5-HT₃ receptor antagonists in the treatment of irritable bowel syndrome.* Aliment Pharmacol Ther, 13 Suppl 2, 31-38.
- Hüther, G. R. E. (2000). *Das serotonerge System.* UNI-MED Verlag AG, Bremen, Deutschland.
- Iqbal, N. and van Praag, H. M. (1995). *The role of serotonin in schizophrenia.* Eur Neuropsychopharmacol, 5 Suppl, 11-23.
- ISAO. International Association for the Study of Obesity. <http://www.ietf.org/database/index.asp>. 2007.
- Jackson, H. C., Needham, A. M., Hutchins, L. J., Mazurkiewicz, S. E., and Heal, D. J. (1997). *Comparison of the effects of sibutramine and other monoamine reuptake inhibitors on food intake in the rat.* Br J Pharmacol, 121, 1758-1762.
- Jantunen, I. T., Kataja, V. V., and Muhonen, T. T. (1997). *An overview of randomised studies comparing 5-HT₃ receptor antagonists to conventional anti-emetics in the prophylaxis of acute chemotherapy-induced vomiting.* Eur J Cancer, 33, 66-74.
- Jimba, S., Nakagami, T., Takahashi, M., Wakamatsu, T., Hirota, Y., Iwamoto, Y., and Wasada, T. (2005). *Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults.* Diabet Med, 22, 1141-1145.
- John, J. H. J. v. L. T. (2005). *The economic burden of obesity: estimates from Augsburg, 2001.* Eur J PublicHealth, Supple 1.
- Joyal, S. V. (2004). *A perspective on the current strategies for the treatment of obesity.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 3, 341-356.
- Jurgens, H., Haass, W., Castaneda, T. R., Schurmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A. R., Scherer, P. E., Spranger, J., Ristow, M., Joost, H. G., Havel, P. J., and Tschop, M. H. (2005). *Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice.* Obes Res, 13, 1146-1156.
- Kafatos, A., Diacatou, A., Voukiklaris, G., Nikolakakis, N., Vlachonikolis, J., Kounali, D., Mamalakis, G., and Dontas, A. S. (1997). *Heart disease risk-factor status and dietary changes in the Cretan population over the past 30 y: the Seven Countries Study.* Am J Clin Nutr, 65, 1882-1886.
- Kanarek, R. B. and Orthen-Gambill, N. (1982). *Differential effects of sucrose, fructose and glucose on carbohydrate-induced obesity in rats.* J Nutr, 112, 1546-1554.

- Katz, K. D., Hollander, D., Vadheim, C. M., McElree, C., Delahunty, T., Dadufalza, V. D., Krugliak, P., and Rotter, J. I. (1989). *Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their healthy relatives*. *Gastroenterology*, 97, 927-931.
- Kim, M., Cooke, H. J., Javed, N. H., Carey, H. V., Christofi, F., and Raybould, H. E. (2001). *D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells*. *Gastroenterology*, 121, 1400-1406.
- Kim, W. R., Poterucha, J. J., Porayko, M. K., Dickson, E. R., Steers, J. L., and Wiesner, R. H. (1996). *Recurrence of nonalcoholic steatohepatitis following liver transplantation*. *Transplantation*, 62, 1802-1805.
- Kishi, K., Tanaka, T., Igawa, M., Takase, S., and Goda, T. (1999). *Sucrase-isomaltase and hexose transporter gene expressions are coordinately enhanced by dietary fructose in rat jejunum*. *J Nutr*, 129, 953-956.
- Klein, S. (2004). *Long-term pharmacotherapy for obesity*. *Obes Res*, 12 Suppl, 163S-166S.
- Kubes, P. and Gaboury, J. P. (1996). *Rapid mast cell activation causes leukocyte-dependent and -independent permeability alterations*. *Am J Physiol*, 271, H2438-H2446.
- Kurth, B. M. (2007). *[The German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS): an overview of its planning, implementation and results taking into account aspects of quality management]*. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 50, 533-546.
- Lawton, C. L., Wales, J. K., Hill, A. J., and Blundell, J. E. (1995). *Serotonergic manipulation, meal-induced satiety and eating pattern: effect of fluoxetine in obese female subjects*. *Obes Res*, 3, 345-356.
- Leibowitz, S. F. and Alexander, J. T. (1998). *Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight*. *Biol Psychiatry*, 44, 851-864.
- Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., and Gordon, J. I. (2005). *Obesity alters gut microbial ecology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 11070-11075.
- Li, Y., Wu, X. Y., Zhu, J. X., and Owyang, C. (2001). *Intestinal serotonin acts as paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281, G916-G923.
- Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P. A., Moser, A. B., Desimone, C., Song, X. Y., and Diehl, A. M. (2003). *Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease*. *Hepatology*, 37, 343-350.
- Libuda, L., Alexy, U., Sichert-Hellert, W., Stehle, P., Karaolis-Danckert, N., Buyken, A. E., and Kersting, M. (2008). *Pattern of beverage consumption and long-term association with body-weight status in German adolescents--results from the DONALD study*. *Br J Nutr*, 99, 1370-1379.

- Lin, H. Z., Yang, S. Q., Chuckaree, C., Kuhajda, F., Ronnet, G., and Diehl, A. M. (2000). *Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice*. Nat Med, 6, 998-1003.
- Lindqvist, A., Baelemans, A., and Erlanson-Albertsson, C. (2008). *Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals*. Regul Pept, 150, 26-32.
- Logan, B. K. and Jones, A. W. (2000). *Endogenous ethanol 'auto-brewery syndrome' as a drunk-driving defence challenge*. Med Sci Law, 40, 206-215.
- Ludwig, D. S., Peterson, K. E., and Gortmaker, S. L. (2001). *Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis*. Lancet, 357, 505-508.
- Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B., and Oh, B. J. (1980). *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 55, 434-438.
- Malik, V. S., Schulze, M. B., and Hu, F. B. (2006). *Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review*. Am J Clin Nutr, 84, 274-288.
- Mattes, R. D. (1996). *Dietary compensation by humans for supplemental energy provided as ethanol or carbohydrate in fluids*. Physiol Behav, 59, 179-187.
- McFarland, R. J., Gazet, J. C., and Pilkington, T. R. (1985). *A 13-year review of jejunoileal bypass*. Br J Surg, 72, 81-87.
- McManus, I. R., Contag, A. O., and Olson, R. E. (1960). *Characterization of Endogenous Ethanol in the Mammal*. Science, 131, 102-103.
- Mezey, E., Imbembo, A. L., Potter, J. J., Rent, K. C., Lombardo, R., and Holt, P. R. (1975). *Endogenous ethanol production and hepatic disease following jejunoileal bypass for morbid obesity*. Am J Clin Nutr, 28, 1277-1283.
- Mishra, P. and Younossi, Z. M. (2007). *Abdominal ultrasound for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Am J Gastroenterol, 102, 2716-2717.
- Mossner, R. and Lesch, K. P. (1998). *Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions*. Brain Behav Immun, 12, 249-271.
- Murphy, D. L., Garrick, N. A., Tamarkin, L., Taylor, P. L., and Markey, S. P. (1986). *Effects of antidepressants and other psychotropic drugs on melatonin release and pineal gland function*. J Neural Transm Suppl, 21, 291-309.
- Nair, S., Cope, K., Risby, T. H., and Diehl, A. M. (2001). *Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis*. Am J Gastroenterol, 96, 1200-1204.
- Nanji, A. A., Tsukamoto, H., and French, S. W. (1989). *Relationship between fatty liver and subsequent development of necrosis, inflammation and fibrosis in experimental alcoholic liver disease*. Exp Mol Pathol, 51, 141-148.

- Nguyen, H., Wang, H., Ie, T., Ho, W., Sharkey, K. A., and Swain, M. G. (2008). *Downregulated hypothalamic 5-HT₃ receptor expression and enhanced 5-HT₃ receptor antagonist-mediated improvement in fatigue-like behaviour in cholestatic rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 20, 228-235.
- Nielsen, S. J. and Popkin, B. M. (2004). *Changes in beverage intake between 1977 and 2001*. *Am J Prev Med*, 27, 205-210.
- Niesler, B., Frank, B., Kapeller, J., and Rappold, G. A. (2003). *Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT₃ serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E*. *Gene*, 310, 101-111.
- Nylander, O. and Pihl, L. (2006). *Luminal hypotonicity increases duodenal mucosal permeability by a mechanism involving 5-hydroxytryptamine*. *Acta Physiol (Oxf)*, 186, 45-58.
- Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., and Abdelmalek, M. F. (2008). *Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease*. *J Hepatol*, 48, 993-999.
- Padwal, R. S. and Majumdar, S. R. (2007). *Drug treatments for obesity: orlistat, sibutramine, and rimonabant*. *Lancet*, 369, 71-77.
- Park, M. I. and Camilleri, M. (2005). *Gastric motor and sensory functions in obesity*. *Obes Res*, 13, 491-500.
- Powell, E. E., Searle, J., and Mortimer, R. (1989). *Steatohepatitis associated with limb lipodystrophy*. *Gastroenterology*, 97, 1022-1024.
- Pratt, D. S., Knox, T. A., and Erban, J. (1995). *Tamoxifen-induced steatohepatitis*. *Ann Intern Med*, 123, 236.
- Prior, A. and Read, N. W. (1993). *Reduction of rectal sensitivity and post-prandial motility by granisetron, a 5-HT₃-receptor antagonist, in patients with irritable bowel syndrome*. *Aliment Pharmacol Ther*, 7, 175-180.
- Raben, A., Vasilaras, T. H., Moller, A. C., and Astrup, A. (2002). *Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects*. *Am J Clin Nutr*, 76, 721-729.
- Rapport, M. M., GREEN, A. A., and PAGE, I. H. (1948a). *Crystalline Serotonin*. *Science*, 108, 329-330.
- Rapport, M. M., GREEN, A. A., and PAGE, I. H. (1948b). *Enzymatic inactivation of serum vasoconstrictor*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 68, 582-584.
- Rapport, M. M., GREEN, A. A., and PAGE, I. H. (1948c). *Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum*. *J Biol Chem*, 174, 735-741.
- Rapport, M. M., GREEN, A. A., and PAGE, I. H. (1948d). *Serum vasoconstrictor, serotonin; chemical inactivation*. *J Biol Chem*, 176, 1237-1241.

- Ratziu, V., Giral, P., Charlotte, F., Bruckert, E., Thibault, V., Theodorou, I., Khalil, L., Turpin, G., Opolon, P., and Poynard, T. (2000). *Liver fibrosis in overweight patients*. *Gastroenterology*, 118, 1117-1123.
- Raybould, H. E. (2002). *Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients*. *Gut*, 51 Suppl 1, i11-i14.
- Raybould, H. E., Glatzle, J., Robin, C., Meyer, J. H., Phan, T., Wong, H., and Sternini, C. (2003). *Expression of 5-HT₃ receptors by extrinsic duodenal afferents contribute to intestinal inhibition of gastric emptying*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284, G367-G372.
- Rehfeld, J. F. (1998). *The new biology of gastrointestinal hormones*. *Physiol Rev*, 78, 1087-1108.
- Ricca, V., Mannucci, E., di, B. M., Rizzello, S. M., Cabras, P. L., and Rotella, C. M. (1996). *Sertraline enhances the effects of cognitive-behavioral treatment on weight reduction of obese patients*. *J Endocrinol Invest*, 19, 727-733.
- Rivera, C. A., Adegboyega, P., van, R. N., Tagalicud, A., Allman, M., and Wallace, M. (2007). *Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. *J Hepatol*, 47, 571-579.
- Rolls, B. J., Roe, L. S., and Meengs, J. S. (2006). *Larger portion sizes lead to a sustained increase in energy intake over 2 days*. *J Am Diet Assoc*, 106, 543-549.
- Rosenzweig-Lipson, S., Zhang, J., Mazandarani, H., Harrison, B. L., Sabb, A., Sabalski, J., Stack, G., Welmaker, G., Barrett, J. E., and Dunlop, J. (2006). *Antiobesity-like effects of the 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-161503*. *Brain Res*, 1073-1074, 240-251.
- Ruhl, C. E. and Everhart, J. E. (2004). *Epidemiology of nonalcoholic fatty liver*. *Clin Liver Dis*, 8, 501-19, vii.
- Saavedra, J. M. (1977). *Distribution of serotonin and synthesizing enzymes in discrete areas of the brain*. *Fed Proc*, 36, 2134-2141.
- Sabir, N., Sermez, Y., Kazil, S., and Zencir, M. (2001). *Correlation of abdominal fat accumulation and liver steatosis: importance of ultrasonographic and anthropometric measurements*. *Eur J Ultrasound*, 14, 121-128.
- Sajjad, A., Mottershead, M., Syn, W. K., Jones, R., Smith, S., and Nwokolo, C. U. (2005). *Ciprofloxacin suppresses bacterial overgrowth, increases fasting insulin but does not correct low acylated ghrelin concentration in non-alcoholic steatohepatitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 22, 291-299.
- Savastano, D. M., Carelle, M., and Covasa, M. (2005). *Serotonin-type 3 receptors mediate intestinal Polycose- and glucose-induced suppression of intake*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288, R1499-R1508.

- Savastano, D. M. and Covasa, M. (2007). *Intestinal nutrients elicit satiation through concomitant activation of CCK(1) and 5-HT(3) receptors*. *Physiol Behav*, 92, 434-442.
- Schindhelm, R. K., Diamant, M., Dekker, J. M., Tushuizen, M. E., Teerlink, T., and Heine, R. J. (2006). *Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease*. *Diabetes Metab Res Rev*, 22, 437-443.
- Schreuder, T. C., Verwer, B. J., van Nieuwkerk, C. M., and Mulder, C. J. (2008). *Nonalcoholic fatty liver disease: an overview of current insights in pathogenesis, diagnosis and treatment*. *World J Gastroenterol*, 14, 2474-2486.
- Schulze, M. B., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., and Hu, F. B. (2004). *Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women*. *JAMA*, 292, 927-934.
- Sclafani, A. and Xenakis, S. (1984). *Sucrose and polysaccharide induced obesity in the rat*. *Physiol Behav*, 32, 169-174.
- Segura, M. E., Chover Gonzalez, A. J., Partida, P. F., Freire Macias, J. M., Garcia, C. A., Ortega, A. A., Gomez, M. M., and Escobar, J. L. (2006). *[Analysis of gastric emptying dynamics in relationship to qualitative composition of intake. Comparison between normal-weight and obese subjects]*. *Rev Esp Med Nucl*, 25, 172-179.
- Sheth, P., Delos, S. N., Seth, A., LaRusso, N. F., and Rao, R. K. (2007). *Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src-, TLR4-, and LBP-dependent mechanism*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 293, G308-G318.
- Sidhu, M. and Cooke, H. J. (1995). *Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion*. *Am J Physiol*, 269, G346-G351.
- Solga, S., Alkhuraishe, A. R., Clark, J. M., Torbenson, M., Greenwald, A., Diehl, A. M., and Magnuson, T. (2004). *Dietary composition and nonalcoholic fatty liver disease*. *Dig Dis Sci*, 49, 1578-1583.
- Speakman, J. R. (2004). *Obesity: the integrated roles of environment and genetics*. *J Nutr*, 134, 2090S-2105S.
- Spiller, R. C. (2001). *Effects of serotonin on intestinal secretion and motility*. *Curr Opin Gastroenterol*, 17, 99-103.
- Spitzer, L. and Rodin, J. (1987). *Effects of fructose and glucose preloads on subsequent food intake*. *Appetite*, 8, 135-145.
- Stranges, S., Dorn, J. M., Muti, P., Freudenheim, J. L., Farinaro, E., Russell, M., Nochajski, T. H., and Trevisan, M. (2004). *Body fat distribution, relative weight, and liver enzyme levels: a population-based study*. *Hepatology*, 39, 754-763.

- Stull, M. A., Pai, V., Vomachka, A. J., Marshall, A. M., Jacob, G. A., and Horseman, N. D. (2007). *Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 104, 16708-16713.
- Swarbrick, M. M., Stanhope, K. L., Elliott, S. S., Graham, J. L., Krauss, R. M., Christiansen, M. P., Griffen, S. C., Keim, N. L., and Havel, P. J. (2008). *Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women*. Br J Nutr, 100, 947-952.
- Talley, N. J. (2001). *Serotonergic neuroenteric modulators*. Lancet, 358, 2061-2068.
- Tanikawa, K., Mimura, Y., Sakisaka, S., and Noguchi, K. (1998). *Role of hepatocytes in the clearance of lipopolysaccharide and its clinical significance*. Prog Clin Biol Res, 397, 191-198.
- Tecott, L. H., Maricq, A. V., and Julius, D. (1993). *Nervous system distribution of the serotonin 5-HT₃ receptor mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 90, 1430-1434.
- Thuy, S., Ladurner, R., Volynets, V., Wagner, S., Strahl, S., Konigsrainer, A., Maier, K. P., Bischoff, S. C., and Bergheim, I. (2008). *Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake*. J Nutr, 138, 1452-1455.
- Tosetti, C., Corinaldesi, R., Stanghellini, V., Pasquali, R., Corbelli, C., Zoccoli, G., Di, F. G., Monetti, N., and Barbara, L. (1996). *Gastric emptying of solids in morbid obesity*. Int J Obes Relat Metab Disord, 20, 200-205.
- Toshimitsu, K., Matsuura, B., Ohkubo, I., Niiya, T., Furukawa, S., Hiasa, Y., Kawamura, M., Ebihara, K., and Onji, M. (2007). *Dietary habits and nutrient intake in non-alcoholic steatohepatitis*. Nutrition, 23, 46-52.
- Trayhurn, P. and Wood, I. S. (2004). *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. Br J Nutr, 92, 347-355.
- Tsatsos, N. G. and Towle, H. C. (2006). *Glucose activation of ChREBP in hepatocytes occurs via a two-step mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 340, 449-456.
- Ursin, R. and Bjorvatn, B. (1998). *Sleep-wake and eeg effects following adenosine a1 agonism and antagonism: similarities and interactions with sleep-wake and eeg effects following a serotonin reuptake inhibitor in rats*. Sleep Res Online, 1, 119-127.
- Vashkinel', V. K., Petrov, M. N., and Oksenkrug, G. F. (1975). *[Localization of serotonin in human thrombocytes]*. Probl Gematol Pereliv Krovi, 20, 42-45.
- veaugh-Geiss, J. (1993). *Diagnosis and treatment of obsessive compulsive disorder*. Annu Rev Med, 44, 53-61.

- von Lengerke, T., Reitmeir, P., and John, J. (2006). *[Direct medical costs of (severe) obesity: a bottom-up assessment of over- vs. normal-weight adults in the KORA-study region (Augsburg, Germany)]*. Gesundheitswesen, 68, 110-115.
- Wade, P. R., Chen, J., Jaffe, B., Kassem, I. S., Blakely, R. D., and Gershon, M. D. (1996). *Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract*. J Neurosci, 16, 2352-2364.
- Walther, A., Peter, C., Secchi, A., Gebhard, M. M., Martin, E., and Schmidt, H. (2002). *Selective serotonin receptor antagonism and leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia*. Microvasc Res, 63, 135-138.
- Walther, A., Petri, E., Peter, C., Czabanka, M., and Martin, E. (2007). *Selective serotonin-receptor antagonism and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia*. J Surg Res, 143, 216-223.
- Wheeler, M. D. (2003). *Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease*. Alcohol Res Health, 27, 300-306.
- WHO. Obesity and overweight. -Fact sheet N°311. 2006.
- Wiegand, S. (2007). *[Gender and obesity--what does "being fat" mean to boys and girls?]*. Ther Umsch, 64, 319-324.
- Wigg, A. J., Roberts-Thomson, I. C., Dymock, R. B., McCarthy, P. J., Grose, R. H., and Cummins, A. G. (2001). *The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. Gut, 48, 206-211.
- Willett, W. C. (2002). *Dietary fat plays a major role in obesity: no*. Obes Rev, 3, 59-68.
- Willner, I. R., Waters, B., Patil, S. R., Reuben, A., Morelli, J., and Riely, C. A. (2001). *Ninety patients with nonalcoholic steatohepatitis: insulin resistance, familial tendency, and severity of disease*. Am J Gastroenterol, 96, 2957-2961.
- Wisen, O. and Hellstrom, P. M. (1995). *Gastrointestinal motility in obesity*. J Intern Med, 237, 411-418.
- Wisen, O. and Johansson, C. (1992). *Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion, and absorption following a liquid test meal*. Metabolism, 41, 390-395.
- Wolf, A. M. and Colditz, G. A. (1998). *Current estimates of the economic cost of obesity in the United States*. Obes Res, 6, 97-106.
- Wolf, H. (2000). *Preclinical and clinical pharmacology of the 5-HT₃ receptor antagonists*. Scand J Rheumatol Suppl, 113, 37-45.
- Wurtman, J. J. and Wurtman, R. J. (1977). *Fenfluramine and fluoxetine spare protein consumption while suppressing caloric intake by rats*. Science, 198, 1178-1180.

- Yadav, H., Jain, S., Prasad, G. B., and Yadav, M. (2007). *Preventive effect of diabegon, a polyherbal preparation, during progression of diabetes induced by high-fructose feeding in rats.* J Pharmacol Sci, 105, 12-21.
- Yamada, T., Inui, A., Hayashi, N., Fujimura, M., and Fujimiya, M. (2003). *Serotonin stimulates endotoxin translocation via 5-HT₃ receptors in the rat ileum.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 284, G782-G788.
- Yang, S. Q., Lin, H. Z., Lane, M. D., Clemens, M., and Diehl, A. M. (1997). *Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 2557-2562.
- Zdrojewicz, Z., Sztuka-Pietkiewicz, A., Zarzycki, A., and Karwacki, J. (1998). *[Serotonin--structure, activity and clinical significance].* Postepy Hig Med Dosw, 52, 637-654.
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z., and Oren, R. (2007). *Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study.* J Hepatol, 47, 711-717.
- Zhu, J. X., Zhu, X. Y., Owyang, C., and Li, Y. (2001). *Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat.* J Physiol, 530, 431-442.

Danksagung

Ich danke herzlichst Herrn Prof. Dr. Stephan C. Bischoff für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen, die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und für die bestmögliche Förderung meiner fachlichen Weiterentwicklung. Seine Unterstützung, sowohl fachlich als auch redaktionell, verhalf mir maßgeblich bei der Erstellung diverser Publikationen. Zudem gab er mir die Möglichkeit auf verschiedenen nationalen als auch internationalen Kongressen meine Daten zu präsentieren.

Ebenso danke ich Frau Dr. Ina Bergheim, die mich über die Durchführung der Arbeit bis hin zur Korrektur betreute. Ihre Tür stand immer für mich offen, so dass sie mich während der gesamten Zeit durch ihr Wissen mit Anregungen und Lösungsvorschlägen unterstützte.

Des Weiteren möchte ich Herr Prof. Dr. Heinz Breer für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit danken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Ernährungsmedizin für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Insbesondere möchte ich mich bei Astrid Spruss, Sabine Wagnerberger, Giridhar Kanuri und Valentina Volynets bedanken, die jeder Zeit bereit waren, mit mir die neusten Ergebnisse in wertvollen Gesprächen und Diskussion zu erläutern. Die Zeit der Laborarbeit und die vielen lustigen Gespräche werde ich vermissen.

Ebenso danke ich der Leitung der zentralen Versuchstierhaltung der Universität Hohenheim Frau Dr. Sibylle Ott und ihren Mitarbeitern Frau Dr. Jutta Mönchenberg sowie Ralf Kaps und Sarah Maulhardt für die sehr nette Einführung in den Tierstall und für die stetige Hilfsbereitschaft.

Von ganzem Herzen möchte ich auch meinem Mann Thomas und meinen Eltern, Helga und Reinhold Weber danken, die mich während dieser Doktorarbeit begleitet und immer bedingungslos unterstützt haben.

Curriculum Vitae

Name: Synia Haub
 Geburtsdatum: 21. Oktober, 1980
 Geburtsort: Darmstadt, Hessen
 Familienstand: verheiratet (geb. Weber)

Tätigkeit

03/2010 – heute Technische Angestellte, Universitätsklinikum Tübingen,
 Hautklinik, AG Biedermann

Ausbildung

06/2006 – 06/2009 Doktorarbeit, Institut für Ernährungsmedizin (180a),
 Universität Hohenheim
 Leitung: Prof. Dr. S.C. Bischoff
 Thema: Untersuchungen zur der Rolle des intestinalen
 serotonergen Systems in der Entstehung von Adipositas
 und der nahrungsinduzierten nicht-alkoholbedingten
 Fettlebererkrankung im Mausmodell.

06/2005-02/2006 Diplomarbeit, Fachbereich Entwicklungsbiologie und
 Neurogenetik, Technische Universität Darmstadt
 Leitung: Prof. Dr. P. Layer
 Thema: Die Kultivierung von retinalen Gerbil Zellen
 auf verschiedenen Trägermaterialien.

2000-2006 Studium der Biologie an der Technischen Universität
 Darmstadt
 Hauptfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie
 Mikrobiologie
 Tierphysiologie

1997-2000 Allgemeine Hochschulreife, Oberstufengymnasium:
 Bachgaugymnasium in Babenhausen, Hessen

Publikationen

1. Bergheim I, **Weber S**, Vos M, Krämer S, Volynets V, Kaserouni S, McClain CJ, Bischoff SC. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol.* 2008 Jun;48(6):983-92.
2. Kanuri G, **Weber S**, Volynets V, Spruss A, Bischoff SC, Bergheim I. Cinnamon Extract Protects against Acute Alcohol-Induced Liver Steatosis in Mice. *J Nutr.* 2009 Mar;139(3):482-7.

3. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, **Haub S**, Bischoff S C, Bergheim I. Toll-like Receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepato*. 2009 Oct;50(4):1094-104.
4. **Weber S**, Volynets V, Kanuri G, Bergheim I, Bischoff SC. Treatment with the 5-HT3 antagonist tropisetron modulates glucose-induced obesity in mice. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Dec;33(12):1339-47.
5. **Haub S**, Kanuri G, Volynets V, Brune T, Bischoff SC, Bergheim I. Serotonin reuptake transporter (SERT) plays a critical role in the onset of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010 Mar;298(3):G335-44. Epub 2009 Aug 27.
6. **Haub S**, Ritze Y, Bergheim I, Pabst O, Gershon MD, Bischoff SC. Enhancement of intestinal inflammation in mice lacking interleukin 10 by deletion of the serotonin reuptake transporter (SERT). *Neurogastroenterol Motil*. 2010 Mar 8.

Manuskripte

1. Critical role of the intestinal serotonin receptor 3 (5-HT3R) in the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mice (in Vorbereitung)
2. Role of the intestinal serotonergic system in the development of high-fat diet-induced obesity and inceptive non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice (In Vorbereitung)

Förderung

- Landesforschungsschwerpunkt Baden Württemberg, Titel „Immunologische und neurologische Steuerungsprozesse im Gastrointestinaltrakt“, Teilprojekt 3 (2005-2007), Beteiligung
- Institute DANONE Projektförderung (2007), Generalthema „Regulation der Nahrungsaufnahme“, Mit Antragstellerin
- Zentrum für Ernährungsmedizin (ZEM) Projektförderung (2008-2009), Titel „Der Einfluss von gesättigten, einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren auf das enterische Nervensystem“, Mit Antragstellerin
- Reisestipendium von der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität für das Joint International Meeting for Neurogastroenterology & Motility in Luzern im November 2008
- Reisestipendium der EASL für die Reise nach Kopenhagen zur EASL 2009
- Reisestipendium von der GlaxoSmithKline Stiftung für die Reise nach Chicago zur DDW 2009

Tagungsbeiträge

- 2007, 2008 und 2009 Präsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurogastroenterologie und Motilität in Hohenkammer
- 2007 Posterpräsentation bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) in Innsbruck
- 2007 Posterpräsentation bei der 62. Jahrestagung der DGVS in Bochum

- 2008 Posterpräsentation bei der ZEM-Tagung im Rahmen des geförderten Projektes in Stuttgart
- 2008 Posterpräsentation bei dem Joint International Meeting für Neurogastroenterology & Motility in Luzern
- 2009 im April Posterpräsentation bei der EASL in Kopenhagen
- 2009 im Mai/Juni Posterpräsentation bei der DDW in Chicago

Praktische Tätigkeiten

2001 - Werksstudent bei der Firma Merck, Darmstadt, Hessen

2004 - Betreuung eines Praktikums im Fachbereich Entwicklungsbiologie and der TU Darmstadt

2004-2005 - Praktikum im Franklin Park Zoo, Boston, MA, USA, Abteilung Childrens Zoo im Bereich Tierpflege (1 Urlaubssemester)

Labor- und Methodenkenntnisse

Molekularbiologischen Methoden

realtime RT-PCR
 Primer-Design
 Proteinisolation
 Western-Blot
 ELISA
 FACS
 Proliferationsassay
 Hexoassay
 Immunhistochemische Färbungen
 Mikroskopische Auswertung

Zellkulturtechniken

Versuche mit Gerbil Primärzellen der Retina
 Humane Caco2 (Permeabilitätsuntersuchungen) und Bon Zellen
 T-Zellkultur und Mastzellkultur aus der Maus (Restimulation und Stimulationsversuche)
 Migrationsassay

Tierexperimentelles Arbeiten

Beantragung und Durchführung von Tierfütterungen (Langzeit- als auch Akut-Versuche)
 Gewebeentnahme (Leber, Darm, Fettgewebe, Blut, Tumore)
 Rekonstitution von Mäusen mit Mastzellen
 Tumorinjektion mit B16-Ova Zellen
 Genotypisierung von Knockout Mäusen
 Betreuung von mehreren Mauslinien
 Labortierkurs B nach GV-SOLAS

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Universität Hohenheim zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Rolle des intestinalen serotonergen Systems in der Entstehung von Adipositas und der nahrungsinduzierten nicht-alkoholbedingten Fettlebererkrankung im Mausmodell“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen angegeben habe.

Stuttgart, im Mai 2011

(Synia Haub)