

Aus der Anatomischen Anstalt  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl IV am Biederstein  
Vorstand: Prof. Dr. med. Manfred Gratzl

**Die enterochromaffine Zelle  
als Sensor für Duftstoffe und Gewürze  
im Gastrointestinaltrakt des Menschen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Thomas Christian Braun  
aus Augsburg

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Manfred Gratzl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Michael Meyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Klaus Mees Priv.-Doz. Dr. med. Christian Rust
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Lars Kunz
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	23.04.2009

---

# Inhalt

Abkürzungsverzeichnis .....	5
1 Einführung .....	8
1.1 Zielsetzung dieser Arbeit .....	8
1.2 Die enterochromaffine Zelle .....	8
1.2.1 Lokalisation, Struktur und Funktion .....	8
1.2.2 Enterische Serotoninwirkungen .....	10
1.3 Olfaktorische Rezeptoren .....	11
1.3.1 Genomische Organisation .....	11
1.3.2 Ligandenprofil .....	11
1.3.3 Signaltransduktion .....	12
1.3.4 Das ungelöste Problem der Nomenklatur .....	13
2 Material und Methoden .....	15
2.1 Zellkultur .....	15
2.2 Elektronenmikroskopie .....	16
2.3 Darmgewebe .....	16
2.4 Immunhistochemische Färbung .....	17
2.5 Gewinnung humaner EC-Zellen aus Gewebeschnitten .....	18
2.5.1 Immunhistochemische Färbung .....	19
2.5.2 Laser-assistierte Mikrodissektion .....	19
2.6 RNA-Isolierung .....	19
2.7 RT-PCR .....	20
2.8 Chemikalien für funktionelle Messungen .....	23
2.9 Serotonin-ELISA .....	23
2.10 Calcium-Imaging .....	24
2.11 Amperometrie .....	25
2.11.1 Prinzip der Amperometrie .....	25
2.11.2 Herstellung von Carbonfaser-Elektroden .....	26
2.11.3 Setup und Ablauf einer Messung .....	26
2.12 Statistische Analyse .....	27

---

3	Ergebnisse.....	28
3.1	Expression olfaktorischer Rezeptoren .....	28
3.1.1	OR-Expression in der BON-Zelllinie .....	28
3.1.2	OR-Expression im menschlichen Gastrointestinaltrakt .....	31
3.1.3	OR-Expression in menschlichen isolierten EC-Zellen.....	31
3.2	Duftstoff-induzierte intrazelluläre Ca <sup>2+</sup> -Transienten .....	33
3.3	Duftstoff-induzierte Serotoninfreisetzung.....	41
4	Diskussion .....	44
5	Zusammenfassung .....	48
6	Literaturverzeichnis .....	50
	Abbildungsnachweis.....	59
7	Lebenslauf.....	60
8	Eigene Veröffentlichungen .....	63
9	Danksagung.....	65

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin (= Serotonin)
ABC	avidin-biotin complex
AC	adenylyl cyclase
AM	Acetomethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
A. U.	arbitrary units
BON	Karzinoidzelllinie (frei gewählte Buchstabenfolge) [1]
bp	base pairs
CaBP	calmodulin-binding protein
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary DNA
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CNG	cyclic nucleotide-gated
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	enterochromaffin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Eugenol
EGTA	Ethylen-bis-glykol-tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	fetal calf serum
gDNA	genomic DNA
GMP	Guanosinmonophosphat
GPCR	G protein-coupled receptor

GTP	Guanosintriphosphat
HEK	human embryonic kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hOR	human olfactory receptor
HORDE	human olfactory receptor database
HSA	Homo sapiens
IBS	irritable bowel syndrome (Reizdarmsyndrom)
IgG	Immunglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
LMD	laser-assisted microdissection
LTCC	L-type calcium channel
MIE	Methylisoeugenol
mOR (MOR)	mouse olfactory receptor
OR (olfr)	olfactory (auch: odorant) receptor
ORDB	olfactory receptor database
ORK	olfactory receptor kinase
P	Pseudogen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PIP <sub>2</sub>	Inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
R	Rezeptor
RGS	regulator of G proteins
RNA	ribonucleic acid
rOR	rat olfactory receptor
rpm	rounds per minute
RT	reverse transcription
SDS	sodium dodecyl sulfate

SEM	standard error of the mean
SERT	serotonin transporter
SNAP-25	synaptosomal-associated protein of 25 kDa
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TH	Tryptophanhydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VMAT	vesicular monoamine transporter

# 1 Einführung

## 1.1 Zielsetzung dieser Arbeit

In Mundhöhle und Nase befinden sich Sensorzellen, die mit Geschmacks- und Geruchsrezeptoren ausgestattet sind und die Nahrung vor der Passage in den Gastrointestinaltrakt analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob es auch im menschlichen Gastrointestinaltrakt solche Chemosensoren zur Analyse des Chymus geben könnte.

Einen interessanten und vielversprechenden Ausgangspunkt stellten dabei die Untersuchungen von SCHÄFERMEYER et al. dar, die aufgrund einer Gen-Chip-Analyse von aus dem Rattendarm isolierten enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen) zu der überraschenden Vermutung Anlass gaben, dass EC-Zellen – die quantitativ bedeutsamsten gastrointestinalen Sensor- und enteroendokrinen Zellen – möglicherweise olfaktorische Rezeptoren exprimieren [2, 3]. Als wesentliche Zielsetzungen der vorliegenden Arbeit ergaben sich somit:

- der molekulare Nachweis der Expression von olfaktorischen Rezeptoren im menschlichen Gastrointestinaltrakt und deren zelluläre Zuordnung,
- die Untersuchung der Wirkung von Liganden dieser Rezeptoren auf die Freisetzung von Serotonin,
- die Charakterisierung der zu Grunde liegenden Signalübertragungsmechanismen.

## 1.2 Die enterochromaffine Zelle

### 1.2.1 Lokalisation, Struktur und Funktion

Die EC-Zelle ist nicht nur der häufigste enteroendokrine, sondern sogar der häufigste endokrine Zelltyp des menschlichen Körpers [4]. Bereits im Jahre 1868 beschrieb HAIDENHAIN Zellen in der Magenschleimhaut, die sich durch Chromsalze anfärben ließen; 1897 fand KULCHITSKY diese Zellen auch in den Krypten des Dünndarms. CIACCIO führte für diese Zellen 1906 den Terminus „enterochromaffine Zellen“ ein [5]. Die für die Färbereaktion verantwortliche Substanz wurde 1937 von VIALLI und ERSPAMER als „Enteramin“ bezeichnet [6]. Später wurde klar, dass es sich dabei um das biogene Amin 5-Hydroxytryptamin bzw. Serotonin handelte [7]. LEMBECK zeigte 1953, dass EC-Zellen Serotonin synthetisieren und sezernieren können [8]. 1959 demonstrierten BÜLBRING und

CREMA, dass Serotonin durch mechanische Stimulation des Darmes aus den EC-Zellen freigesetzt werden kann, was eine Erhöhung der Darmperistaltik zur Folge hat. BÜLBRING und CREMA schlossen aus ihren Experimenten, dass EC-Zellen Mechanosensoren des Darmes sind [9, 10]. Unter den funktionellen Untersuchungen dieses Zelltyps sind v. a. die Studien von RACKÉ und SCHWÖRER hervorzuheben, die zwar wichtige Erkenntnisse zur Regulation der Serotonin-Freisetzung aus EC-Zellen lieferten [11–23], jedoch das von BÜLBRING und CREMA vorgeschlagene Modell der EC-Zelle als möglicher enterischer Mechanosensor nicht wesentlich erweitern konnten.

Nach ultrastrukturellen Untersuchungen scheinen EC-Zellen keine synaptischen Verbindungen mit Nerven ihrer Umgebung einzugehen [24]. Es ist daher davon auszugehen, dass das von den EC-Zellen freigesetzte Serotonin parakrin bzw. endokrin wirkt.

Mit der Expression von Tryptophanhydroxylase (TH) und 5-HT-Decarboxylase verfügen EC-Zellen über die Schlüsselenzyme der Serotonin-Synthese. Das in den charakteristischerweise basal liegenden sekretorischen Granula gespeicherte Serotonin [25, 26] wird durch Exozytose in die Umgebung der Zelle abgegeben (**Abb. 1.1**). Mit den sekretorischen Granula der EC-Zellen ist typischerweise der Typ 1 des vesikulären Monoaminotransporters (VMAT1) assoziiert, der, getrieben von einem Protonengradienten, zum Beladen der Granula mit Serotonin dient [27].

Die EC-Zellen produzieren 90 % des Serotonins im menschlichen Körper [28].

**Abb. 1.1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer enterochromaffinen Zelle im Darmepithel des Menschen (Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ ). Charakteristisch für enterochromaffine Zellen sind u. a. ihre Flaschenform und die reichlich basal vorhandenen sekretorischen Granula (Pfeil), die Serotonin enthalten (Abb. aus [29]).



Da es bisher nicht gelungen ist, eine Primärkultur von EC-Zellen zu etablieren, und die EC-Zellen durch ihre diffuse Verteilung in der gastrointestinalen Schleimhaut schwierig zu untersuchen sind, spielen gut kultivierbare Karzinoidzelllinien eine wichtige Rolle bei der Erforschung der EC-Zellen. Mit der BON-Zelllinie, die ihren Ursprung in einer Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids hat, wurde 1984 von EVERS und TOWNSEND ein heute allgemein akzeptiertes und vielfach verwendetes EC-Zell-Modell eingeführt, durch das u. a. weitere Erkenntnisse über die Regulation der Serotonin-Freisetzung gewonnen werden konnten [30–38]. An diesem EC-Zell-Modell konnte von KIM et al. die von BÜLBRING und CREMA vorgeschlagene Funktion der EC-Zelle als Mechanosensor bestätigt werden [39]. KIM et al. stellten 2001 anhand ihrer Studien an BON-Zellen sogar ein erweitertes Modell der EC-Zelle zur Diskussion: Neben ihrer mechanischen Erregbarkeit könnten EC-Zellen auch chemosensorische Funktionen haben, da offenbar D-Glukose die Serotoninfreisetzung aus EC-Zellen erhöhte [40]. Die Hinweise auf eine mögliche Rolle der EC-Zelle als Sensor von Nahrungsstoffen im Darmlumen verdichteten sich, als FUKUMOTO et al. 2003 zeigten, dass kurzkettige Fettsäuren die Serotoninfreisetzung im Darm erhöhen [41]. Die zugrunde liegenden Mechanismen, wie EC-Zellen Zucker oder Fette im Darmlumen detektieren könnten, sind unbekannt.

### **1.2.2 Enterische Serotoninwirkungen**

Es sind noch nicht alle Angriffspunkte des Serotonins im Darm bekannt, ebensowenig sind die offenbar komplexen Serotoninwirkungen vollständig verstanden. Serotonin-Rezeptoren wurden im Darmnervensystem (5-HT<sub>1P</sub>-, 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor) und in der Darmmuskulatur (5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor) gefunden [42]. Auch eine mögliche parakrine Wirkung auf Enterozyten und Blutgefäße wird diskutiert. Als gesicherte Serotoninwirkungen gelten die Erhöhung der Darmperistaltik sowie die Beeinflussung von Sekretionsprozessen [43–45]. Durch die Stimulation extrinsischer sensorischer Neurone kann Serotonin im zentralen Nervensystem das Gefühl von Übelkeit auslösen; therapeutisch finden daher Serotonin-Antagonisten als Antiemetika Anwendung.

Eine Dysfunktion des enterischen Serotonin-Signalübertragungssystems wird als Ursache des Reizdarmsyndroms (engl. irritable bowel syndrome, IBS) diskutiert [46]. Etwa 75 % der Patienten leiden unter einer von Durchfällen geprägten Form des Reizdarmsyndroms, bei 25 % steht Obstipation im Vordergrund. Da Serotonin die Darmperistaltik erhöht, können zur Behandlung des Reizdarmsyndroms Serotonin-Antagonisten (Diarrhoe-geprägte Form) bzw. Serotonin-Agonisten

(obstipative Form) eingesetzt werden [47]. Wie von GERSHON zusammenfassend dargestellt, wird die Wirkung von Serotonin durch Aufnahme in Enterozyten über den Serotonin-Transporter (SERT) beendet [48]; diese Erkenntnis lieferte die Erklärung für die gastrointestinalen Nebenwirkungen der Antidepressiva, die SERTs hemmen [49–53].

## **1.3 Olfaktorische Rezeptoren**

### **1.3.1 Genomische Organisation**

Duftstoffe werden durch die große Familie der olfaktorischen Rezeptoren (OR) wahrgenommen [54, 55]. Das menschliche Genom enthält 339 intakte Gene für olfaktorische Rezeptoren – Mäuse z. B. besitzen rund 1000 entsprechende Gene, Fische nur rund 100. Die OR-Gene des Menschen sind in 51 verschiedenen Loci auf den verschiedenen Chromosomen verteilt; einzig die Chromosomen 8, 20 und Y enthalten keine OR-Gene. Es ist möglich, dass der Mensch viele intakte OR-Gene im Laufe der Evolution verloren hat, denn das menschliche Genom enthält neben den 339 intakten OR-Genen 297 OR-Pseudogene; diese kodieren z. B. aufgrund von vorzeitigen Stop-Codons nicht mehr für funktionsfähige Rezeptoren [56].

### **1.3.2 Ligandenprofil**

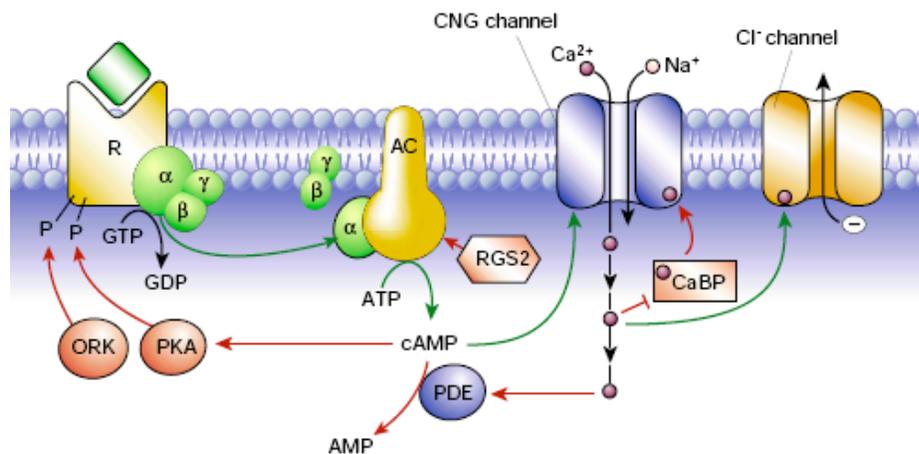
Noch nicht völlig verstanden ist die Tatsache, dass der Mensch mit nur 339 verschiedenen olfaktorischen Rezeptoren einige tausend verschiedene Gerüche wahrnehmen kann. Eine wichtige Rolle spielt das unterschiedliche Ligandenprofil der verschiedenen ORs, d. h. die Spezifität für bestimmte Duftstoffe. Durch selektive Transfektion eines bestimmten ORs in Zellen, die normalerweise keine ORs exprimieren, und nachfolgende funktionelle Studien des Antwortverhaltens auf die Applikation bestimmter Duftstoffe können OR-Ligandenprofile erstellt werden; bislang konnten nur etwa einem Prozent der ORs die entsprechenden Liganden zugeordnet werden [57–62].

Anhand von Sequenzanalysen lassen sich ORs in Subfamilien einordnen; ORs mit ähnlicher Gensequenz erkennen wahrscheinlich auch strukturell verwandte Duftstoffe [56]. Unter Berücksichtigung der Erkenntnis, dass einige Duftstoffe auf bestimmte Rezeptoren stimulierend, auf andere wiederum hemmend wirken [58, 63], bietet sich für die physiologischen Mechanismen der Geruchswahrnehmung die Modellvorstellung an, dass jeder Duftstoff ein charakteristisches

Muster von Rezeptorantworten auslöst; im Nervensystem könnte dann aus der Summe der aus den verschiedenen Rezeptoren einlaufenden Informationen die endgültige Geruchsempfindung kreiert werden [64, 65].

### 1.3.3 Signaltransduktion

ORs sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen. Im Riechepithel als klassischer Lokalisation von olfaktorischen Rezeptoren verläuft die Signaltransduktion wie folgt: Die Bindung eines passenden Liganden an einen olfaktorischen Rezeptor löst über ein G-Protein die intrazelluläre cAMP-Kaskade aus; Folge ist eine Öffnung von Ionenkanälen, deren Offenwahrscheinlichkeit durch zyklische Nukleotide gesteuert wird (sog. CNG-Kanäle). Dadurch wird die Riechzelle depolarisiert und ein Aktionspotential ausgelöst. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass neben dem olfaktorischen G-Protein  $G_{olf}$  auch andere G-Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sind (**Abb. 1.2**).



**Abb. 1.2:** Modell der Signaltransduktion im Riechepithel (grüne Pfeile: aktivierende Wirkung, rote Pfeile: hemmende Wirkung). Durch Interaktion der Geruchsstoffe mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (R) kommt es zur Stimulation der Adenylzyklase (AC); der Second messenger cAMP öffnet CNG-Kanäle, Folge ist die Depolarisation der Sinneszelle durch einen Kationen-Einstrom. Einströmendes  $Ca^{2+}$  kann die Depolarisation der Zelle durch Aktivierung eines  $Cl^-$ -Kanals verstärken, durch den  $Cl^-$  die Riechzelle (welche eine hohe intrazelluläre  $Cl^-$ -Konzentration besitzt) verlässt. Als Regulatoren spielen u. a. die Olfactory-receptor-Kinase (ORK), Proteinkinase A (PKA), RGS (regulator of G proteins) und Calmodulin-bindendes Protein (CaBP) eine Rolle (Abb. aus [66]).

Die Sinneszellen des Riechepithels sind stark polarisiert; wie typische Nervenzellen besitzen sie Dendrit, Perikaryon, Axon und Synapse (im Bulbus olfactorius). Die verschiedenen Stufen der Signalkaskade – von der Bindung des Geruchstoffes bis zur Freisetzung des Transmitters im Bulbus olfactorius – erfolgen daher in den verschiedenen Zellabschnitten; z. B. ist die Synthese von cAMP im Dendriten und die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose des Transmitters in der Synapse angesiedelt. Über die Rolle von PLC,  $\text{IP}_3$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in den Sinneszellen ist weit weniger bekannt [67–69].

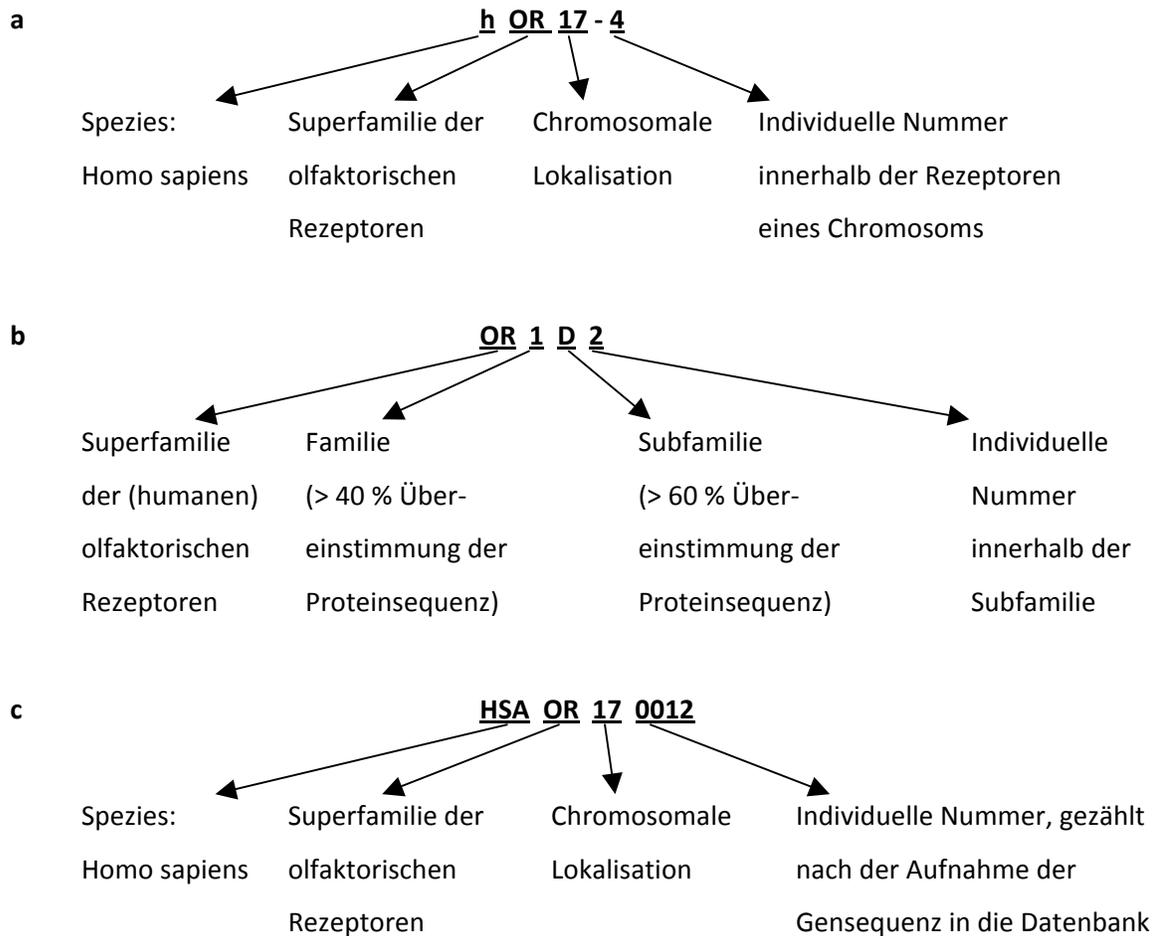
#### **1.3.4 Das ungelöste Problem der Nomenklatur**

Leider existiert bisher keine einheitliche Nomenklatur für olfaktorische Rezeptoren. Für menschliche ORs (hORs) wurden von verschiedenen Forschungsgruppen mindestens sieben verschiedene Nomenklaturen eingeführt (**Abb. 1.3**), für ORs der Maus (mORs) fünf.

So findet sich z. B. der hOR17-4 (Nomenklatur nach BUCK et al.) in der Literatur auch als OR1D2 (HORDE[Human Olfactory Receptor Database Exploratorium]-Nomenklatur des Weizman Institute of Science, Rehavot, Israel), OR17.04.03 (Nomenklatur der Senomyx Inc., La Jolla, USA), HGPCR0801 (Nomenklatur des EBI [European Bioinformatics Institute]/Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK), ORL521 (Nomenklatur der ORDB [Olfactory Receptor Database] der Yale University, USA) sowie HsOR17.1.2 (Nomenklatur nach NEI et al.). Die ORDB der Yale University ist bemüht, die Synonyme der bekannten humanen olfaktorischen Rezeptoren unter einem „Consensus Label“ aufzuführen (in diesem Beispiel HSAOR170012).

Auch synonyme mORs verschiedener Nomenklaturen werden zusammengestellt und ggf. unter einem gemeinsamen „Consensus Label“ von der ORDB aufgelistet; so findet man etwa den von OKA et al. beschriebenen mOR für Eugenol (nach seinem Liganden auch „mOR-EG“ genannt) als MOR174-9 (Nomenklatur FIRESTEIN et al.), W3Y5M-1283612-1282671 (Nomenklatur nach TRASK et al.) und ORL828 (Nomenklatur nach ORDB); ein „Consensus Label“ existiert für diesen mOR noch nicht.

In dieser Arbeit sind die Rezeptoren OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210 von Bedeutung, deren Ligandenprofil bereits bekannt ist [58–60, 62].



**Abb. 1.3:** Auswahl systematischer Nomenklaturen für olfaktorische Rezeptoren des Menschen (hORs): Nomenklatur nach Buck et al. **(a)**, HORDE-Nomenklatur **(b)** und ORDB-Consensus-Label **(c)**. OR-Pseudogene werden i. d. R. durch ein „P“ hinter ihrem Namen gekennzeichnet.

## 2 Material und Methoden

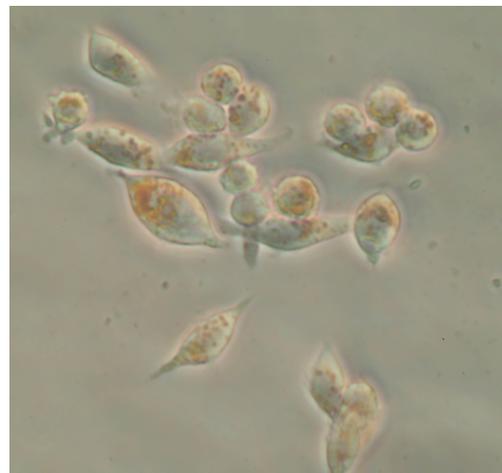
Einige der im Folgenden beschriebenen Methoden wurden von *Frau Dr. rer. nat. Petra Volland*, Arbeitsgruppe *Prof. Dr. med. Christian Prinz*, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, durchgeführt. Dabei handelt es sich um die unter 2.6, 2.7, 2.9 und 2.12 beschriebenen Methoden. Der Verfasser hatte hierbei lediglich eine beratende Funktion. Die Recherche in den Gendatenbanken zur Vorbereitung der RT-PCR (Abschnitt 2.7) wurde gemeinsam durchgeführt. Alle übrigen, unter 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.8, 2.10 und 2.11 beschriebenen Methoden wurden selbstständig vom Verfasser durchgeführt.

### 2.1 Zellkultur

Die Karzinoidzelllinie BON wurde freundlicherweise von *Herrn Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein*, Medizinische Universitätsklinik Ulm, zur Verfügung gestellt.

Zur Kultivierung der BON-Zellen (**Abb. 2.1**) wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) versetztes DMEM/F12-Zellkulturmedium verwendet (beide Produkte von PAA Laboratories, Pasching, Österreich); die Kultur erfolgte in Zellkulturflaschen bei 37 °C in einer 5 %-igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Das rasche Wachstum der Zellen erforderte ein zweimaliges Splitten pro Woche: Dazu wurden die Zellen mittels einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Kulturflaschen abgelöst, anschließend erfolgten Zentrifugation, Resuspension der Zellen in Kulturmedium sowie das erneute Einbringen in Zellkulturflaschen. Ein Teil der BON-Zellen wurde auf sterilisierte Glasplättchen (Durchmesser 12 mm) ausgesät, welche nach 1–2 Tagen in Kultur für funktionelle Messungen verwendet wurden.

**Abb. 2.1:** *Typischer morphologischer Aspekt kultivierter BON-Zellen mit runden und spindelförmigen Zellen (Färbung mit Neutralrot).*



## 2.2 Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Darstellung wurden abzentrifugierte BON-Zellen in Epon eingebettet. Dazu wurden die Zellen eine Stunde in eiskaltes Fixans (2,5 % Glutaraldehyd in einem Natrium-Cacodylat-Puffer, pH 6,3) gegeben; nach Waschen in PBS folgten folgende Inkubationsschritte: 1 % Osmium 1 Stunde, nach erneutem Waschen in PBS 50, 70, 80, 95 und 100 % Ethanol je 10 Minuten, 50 % Epon (in Ethanol) 10 Minuten, 70 % Epon (in Ethanol) 20 Minuten, 100 % Epon zweimal 20 Minuten sowie über Nacht, anschließend Polymerisation bei 60 °C für 16–24 Stunden. Aus der ausgehärteten Epon-Scheibe wurden kleine Blöckchen (ca. 2 x 2 mm) herausgesägt; aus den Blöckchen wurden Ultradünnschnitte (50–70 nm) gewonnen, welche mit Uranylacetat (2 %) und Blei-Citrat (2,7 %) kontrastiert und auf Kupfernetze aufgezogen wurden. Die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der Zellen erfolgte mit einem Zeiss EM10 (Zeiss, Göttingen).

## 2.3 Darmgewebe

Rattendarm für immunhistochemische Färbungen und molekularbiologische Nachweise wurde aus erwachsenen männlichen und weiblichen Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Sprague-Dawley gewonnen (Tierstall der Technischen Universität München, Standort Biederstein). Nach Tötung der Tiere wurde die Bauchhöhle durch einen medianen Längsschnitt eröffnet und 1–2 cm lange Dünndarmabschnitte herauspräpariert. Anschließend erfolgte eine Fixierung des Gewebes in 4 % Paraformaldehyd für mindestens 24 Stunden.

Menschliche, bereits in Paraffin eingebettete Dünndarmbiopsate sowie Ileumresektate wurden freundlicherweise von *Herrn Prof. Dr. med. Christian Prinz*, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt; das Gewebe wurde im Rahmen von Endoskopien und Operationen mit Einverständnis der Patienten gewonnen.

## 2.4 Immunhistochemische Färbung

Im Rahmen dieses Projekts wurden immunhistochemische Färbungen verschiedener Antigene (**Tab. 2.1**) durchgeführt, um einen geeigneten immunhistochemischen Marker für die EC-Zell-Gewinnung mittels Laser-Mikrodissektion zu finden. Für Vorversuche wurde Rattengewebe benutzt (vgl. 2.3).

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde 4 µm dick geschnitten und auf Glasobjektträger aufgebracht, anschließend bei 37 °C für einige Stunden getrocknet. Die Entparaffinierung der Schnitte erfolgte durch ein 20-minütiges Küvettenbad in Xylol und in einer absteigenden Alkoholreihe: 10 Minuten in 100 % Isopropanol sowie je 5 Minuten in 90, 80 und 70 % Isopropanol. Mit einem PAP-Pen (Daido Sangyo, Tokio, Japan) wurden die Einzelschnitte eines Objektträgers separiert. Nach Waschen mit PBS (dreimal je 5 Minuten) wurden die Schnitte mit 0,7 % Methanol und 6,4 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase des Gewebes zu blockieren. Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Kochen der Schnitte in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0) für jeweils 15 Minuten bei 800 und 400 W in einer Mikrowelle; nach dem Abkühlen wurde erneut mit PBS gewaschen (dreimal je 5 Minuten). Nach 30-minütigem Blocken (bei Raumtemperatur) mit 5 % Ziegen-Normalserum (Dianova, Hamburg) und anschließendem Waschen in PBS (dreimal je 5 Minuten) wurde der Erstantikörper (**Tab. 2.1**) aufgetragen; die Schnitte wurden daraufhin bei 4 °C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit PBS gewaschen (dreimal je 5 Minuten) und anschließend mit einem biotinylierten Zweitantikörper (**Tab. 2.1**) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach erneutem Waschen mit PBS (dreimal je 5 Minuten) wurden die Schnitte 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Avidin-Biotin-Complex-Method-Kit (ABC-Kit, Vector, Burlingame, USA) inkubiert. Nach Waschen in PBS (dreimal je 5 Minuten) und Tris-Puffer/HCl (50 mM, pH 7,6, einmal 5 Minuten) wurden 0,09 % DAB und 0,03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-Puffer/HCl als Chromogen aufgetragen. Durch Abwaschen mit destilliertem Wasser wurde die Farbreaktion gestoppt, anschließend wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 80 und 90 % Isopropanol einige Sekunden, 100 % Isopropanol 10 Minuten) entwässert sowie durch ein Xylolbad (10 Minuten) für das Eindecken vorbereitet.

Als Negativkontrolle wurde auf den entsprechenden Schnitten der Erstantikörper durch PBS ersetzt.

Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
<b>Erstantikörper*</b>			
Serotonin (5-HT)	Kaninchen	1 : 1000**	Chemicon, Temecula, USA
Vesikulärer Monoaminotransporter 1 (VMAT1), Mensch	Kaninchen	1 : 500**	Biotrend, Köln
Vesikulärer Monoaminotransporter 1 (VMAT1), Ratte	Kaninchen	1 : 500**	Biotrend, Köln
5-HT <sub>3</sub> -Rezeptor (5-HT <sub>3</sub> -R)	Kaninchen	1 : 50**	Calbiochem, Bad Soden
5-HT <sub>4</sub> -Rezeptor (5-HT <sub>4</sub> -R)	Kaninchen	1 : 1000**	Acris, Hiddenhausen
Tryptophanhydroxylase (TH)	Kaninchen	1 : 2000***	Calbiochem, Bad Soden
SNAP-25	Kaninchen	1 : 500**	Sternberger, Lutherville, USA
Serotonin-Transporter (SERT)	Kaninchen	1 : 500**	Alpha Diagnostics, San Antonio, USA
<b>Zweitantikörper</b>			
Kaninchen-IgG	Ziege	1 : 500**	Dianova, Hamburg
* gegen Antigene aus Ratte und Mensch, soweit nicht anders angegeben, ** in 5 % Ziegen-Normalserum, *** in PBS.			

**Tab. 2.1:** Übersicht der in der Immunhistochemie verwendeten Erst- und Zweitantikörper.

## 2.5 Gewinnung humaner EC-Zellen aus Gewebeschnitten

Um EC-Zell-RNA des Menschen und der Ratte aus Gewebeschnitten für eine RT-PCR zu isolieren, wurden EC-Zellen mit VMAT1 als immunhistochemischem Marker identifiziert und anschließend durch Laser-assistierte Mikrodisektion (LMD) [70] isoliert.

BON-Zellen konnten hingegen nach einfacher Abzentrifugation zur RNA-Gewinnung verwendet werden.

### **2.5.1 Immunhistochemische Färbung**

Die für die Mikrodisektion vorgesehenen Schnitte wurden nicht direkt auf herkömmliche, sondern auf mit einer 1,35  $\mu\text{m}$  dünnen Polyethylen-Naphtalen-Membran bespannte Glasobjektträger (PALM, Bernried) aufgebracht. Die immunhistochemische Färbung mit einem VMAT1-Antikörper erfolgte im Wesentlichen wie in 2.4 beschrieben; um die RNA-Degradation im Verlauf des Färbeprozesses zu minimieren, wurden folgende Modifikationen angewandt:

- Als Basis aller Lösungen (z. B. Alkoholreihe, PBS) wurde statt destillierten Wassers RNase-freies DEPC-Wasser benutzt.
- Anstelle der Antigen-Demaskierung durch Kochen in Citrat-Puffer wurde das Gewebe mit 0,1 % Triton X (BioRad, München) für 5 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert.
- Den Normalserum- und Antikörperverdünnungen wurde (pro ml Lösung) 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (Promega, Madison, USA) zugesetzt.

### **2.5.2 Laser-assistierte Mikrodisektion**

Die immunhistochemisch angefärbten EC-Zellen wurden mit einem Laser-Mikrodisektionssystem (PALM, Bernried) zunächst vom übrigen Gewebe separiert; anschließend wurde die Energie des Lasers um etwa 40 % erhöht, um die Zellen mit einem einzelnen Impuls vom Objektträger direkt in die Verschlusskappe eines 0,5 ml-Eppendorf-Gefäßes zu katapultieren. Die Verschlusskappe wurde vor der Mikrodisektion mit 50  $\mu\text{l}$  eines Lysepuffers (10 mM Tris-Puffer/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,0; 2 % SDS, pH 7,3; 500  $\mu\text{g}$  Proteinase K) gefüllt; nach der Isolierung von insgesamt etwa 50–80 Schnitten von angefärbten Zellen wurde das Eppendorf-Gefäß mit zusätzlichen 150  $\mu\text{l}$  des Puffers aufgefüllt. Das gewonnene Material wurde anschließend aus der Verschlusskappe in das Eppendorf-Gefäß zentrifugiert und bei 56 °C für 16 Stunden inkubiert.

## **2.6 RNA-Isolierung**

Die Isolierung von RNA aus BON-Zellen und humanen Dünndarmbiopsaten (schockgefroren in flüssigem Stickstoff) erfolgte mit dem TriFast Gold Reagent (Peqlab, Erlangen) nach dem Protokoll des Herstellers.

RNA aus humanen Ileum-Paraffinschnitten (Entparaffinierung mit Xylol) und mikrodisssektierten humanen EC-Zellen wurde mittels klassischer Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Fällung gewonnen:

- Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,0) zur verdauten Probe im Lysepuffer (s. 2.5.2),
- Zugabe von 200 µl Phenol,
- Zugabe von 100 µl Chloroform,
- Mischen,
- 6 min Zentrifugation mit Tischzentrifuge (max. Geschwindigkeit),
- Überführung des wässrigen Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß,
- Zugabe von 2 µl Glykogen (10 mg/ml),
- Zugabe von 220 µl Isopropanol,
- Inkubation bei –20 °C für mindestens 45 min,
- Zentrifugation (14.000 rpm) für 30 min bei 4 °C
- Verwerfen des Überstands,
- Zugabe von 300 µl Ethanol (70 %) zum Pellet,
- 15 min Zentrifugation (14.000 rpm) für 20 min bei 4 °C,
- Verwerfen des Überstands,
- 5–10 min Lufttrocknung des Pellets,
- Resuspension des Pellets in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O.

## 2.7 RT-PCR

Die isolierte RNA wurde nach Verdau mit DNase I (Amplification Grade, Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Protokoll des Herstellers durch reverse Transkription zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reagenzien wurden in den in **Tab. 2.2** gezeigten Mengen eingesetzt. In einem Eppendorf-Gefäß (0,2 ml) wurden folgende Reaktionsschritte im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler 5330, Eppendorf, Köln) durchgeführt: 25 °C 10 Minuten, 48 °C 30 Minuten, 95 °C 5 Minuten. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei –20 °C eingefroren. Genomische (g)DNA zu Kontrollzwecken wurde mit dem QiaAmp Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen.

Bestandteil	Volumen [ $\mu$ l]
RNA	10
Puffer 5 x (First Strand)	4
RNase-Inhibitor (RNase OUT)	1
Random-Hexamere (250 ng/ml)	2
dNTPs (10 mM)	1
Reverse Transkriptase (Superscript II)	2,0
DTT (0,1 M)	2

**Tab. 2.2:** Reaktionsansatz zur reversen Transkription (Reagenzien von Invitrogen, Karlsruhe).

Die PCR wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: 94 °C 5 Minuten, 35–40 Zyklen à 30 Sekunden bei 94°C sowie 90 Sekunden bei der Anlagerungstemperatur der jeweils benutzten Primer (**Tab. 2.3**), 1 Minute bei 72 °C, 10 min bei 72 °C.

Nested-PCRs wurde bei gleichem PCR-Profil und gleicher Zyklenzahl durchgeführt. Wir wählten Primer zur Amplifikation kleiner Produkte, da RNA aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe oft nur in Fragmenten mit einer Länge kleiner 300 Basen vorliegt [71].

Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte in einem horizontalen Gelelektrophoresesystem (Bio-Rad, München). Die PCR-Produkte und der Längenstandard (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas, Ontario, Canada) wurden mit 7  $\mu$ l Probenpuffer (**Tab. 2.4**) vermischt und anschließend in die Taschen eines Gels eingebracht, welches durch Aufkochen von 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (**Tab. 2.5**) hergestellt worden war und Ethidiumbromid (5  $\mu$ g/ml Gellösung) enthielt. Die eingebrachten Proben wurden bei 83 V 50 Minuten laufen gelassen. Mittels Anregung des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wurden die Proben visualisiert; die Gele wurden fotografiert. Die Produktgrößen wurden mit Hilfe des Längenstandards ermittelt.

**Tab. 2.3 (S. 22):** Sequenzen, Produktgrößen und Anlagerungstemperaturen der verwendeten Primer (5: Inosin; P: Produkt [bp]; AT: Anlagerungstemperatur [°C]). „ConOR“ bezeichnet degenerierte Primer für konservierte Sequenzen olfaktorischer Rezeptoren [72]: Es handelt sich hierbei um ein Gemisch von Oligonukleotiden prinzipiell gleicher Sequenz, welche jedoch an verschiedenen (den „degenerierten“) Positionen unterschiedliche Basen aufweisen.

Primer	Sequenz 5'–3'	P	AT
OR73 P1 (sense)	TGC TTT AAA GTT ATG TTT TCA	430	51.4
OR73 P1 (antisense)	CAG TAT CTC GGT GAC TGT AT		
OR73 P2 (sense)	GTG GGC GCC GCA AAG	116	55.0
OR73 P2 (antisense)	TGT GTG CCT GGA GTT TTT GG		
OR73 P3 (sense)	GCA AAG CCT TCT CCA CCT GT	83	52.4
OR73 P3 (antisense)	GGG CAC ACA GTA AAG GAA GA		
h17-7/11 P1 (sense)	TGT CCT AGC CAT TTG CTC TGA TGT T	625	52.8
h17-7/11 P1 (antisense)	TGT ACC ATA ATA CAA AGA GAC		
h17-7/11 P2 (sense)	CTT GGG CAG CAA ATC CAT CT	101	55.0
h17-7/11 P2 (antisense)	ATG CCA TTG CAG CCA AAA TAT		
h17-7/11 P2 (sense)	TCT CTT TTG GGG GAT GCC TAA C	154	52.7
h17-7/11 P3 (antisense)	CAG ATA CAA GAC CGT GGA CTC A		
h17-7/11 P4 (sense)	ATT TCA TGA TAG CCT TGG GTA AC	93	50.9
h17-7/11 P4 (antisense)	TGT AGT GAA GTG GGT GGC TGA TGG		
OR1G1 P1 (sense)	GAT CAT GAA TGC CCT CCA CTC	488	55.7
OR1G1 P1 (antisense)	AAT GAA TTT TCC GAA CCC AGA T		
OR1G1 P2 (sense)	CCT TCT GCG CAA ACC ATG A	121	55.0
OR1G1 P2 (antisense)	CCT GTG AGA CCC CCA GTG AT		
OR1G1 P3 (sense)	CAT GAG ATC CCA CAC TTC TT	87	50.2
OR1G1 P3 (antisense)	GAA GAT CAC CAG CTC ATT GG		
OR1G1 P4 (sense)	TTT GCC TGA TTA TCT CTT ACA CGA	155	53.5
OR1G1 P4 (antisense)	GGG AGA ACT GAA ATC AAC ACA AAA		
OR1G1 P5 (sense)	AAC GTT TTC TCG ACC ATC CT	110	51.4
OR1G1 P5 (antisense)	AAA GAA GTC CCA AAG AAG AGA		
h17-210 P1 (sense)	CCA TCC ATC CCC TTT GCG GA	348	58.0
h17-210 P1 (antisense)	GAT GAG CCC GCC CAT GAA AA		
h17-210 P2 (sense)	CTT TCC TCT GCA CTA CAC CAC TAT CA	111	55.0
h17-210 P2 (antisense)	GCC ATA AGC AAG GTG TGC AA		
h17-210 P3 (sense)	ACA CCA CTA TCA TGA GCC CCA	75	53.0
h17-210 P3 (antisense)	TGG CAT GGG CAG TGG TCA AC		
conOR (sense)	TGG C5T A(CT)G A(CT)(AC) G5T (AT)(CT)G T5G C	525	55.0
conOR (antisense)	(AG)AA 5GG (AG)TT (AGCT)AG CAT (AGCT)GG		
VMAT1 P1 (sense)	CAC CGT GGC TGT TGA AGA AA	151	55.0
VMAT1 P1 (antisense)	CCG GGT AAT CTC TTC CTC CAA		
VMAT1 P2 (sense)	AGC GTA CCT AGT GGA ATA GCA	102	51.7
VMAT1 P2 (antisense)	GCC TTG CAA GCA GTT GTT TT		
β-actin (sense)	GCT GGC CGG GAC CTG ACT GAC TA	154	59.9
β-actin (antisense)	AAG CAG CCG TGG CCA TCT CTT G		

Die Sequenzierung (nach Subklonierung der Amplicons nach den Angaben des Herstellers in pCR4-TOPO, Fa. Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte durch die Fa. GATC (Konstanz).

Bestandteil	Anteil [%]
Ficoll 400	25
EDTA (50 mM)	74,4
Bromphenolblau	0,25
Xylencyanol	0,25

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung des Probenpuffers für die Gelelektrophorese.

Bestandteil	Menge
Tris	4,84 g
Eisessig	1,142 ml
EDTA (pH 8,0; Stock 0,5 M)	2 ml
H <sub>2</sub> O	1000 ml

**Tab. 2.5:** Zusammensetzung des TAE-Puffers zur Gelherstellung.

## 2.8 Chemikalien für funktionelle Messungen

Bourgeonal und Helional wurden freundlicherweise von *Herrn Charles Sell* (Quest International, Ashford, United Kingdom) zur Verfügung gestellt. Alle anderen Substanzen wurden über Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, mit Ausnahme von Thapsigargin (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Die Substanzen wurden in den jeweils bei den Experimenten eingesetzten Medien gelöst, wobei eine Volumenkonzentration der Lösemittel Ethanol oder DMSO von jeweils 2 % nicht überschritten wurde.

## 2.9 Serotonin-ELISA

Etwa  $5 \times 10^5$  BON-Zellen (pro Well) wurden auf 6-Well-Platten ausgesät und für 48 Stunden kultiviert (vgl. 2.1). Nach dem Austausch des Zellkulturmediums mit DMEM/Ham's F12 (ohne Zusatz von fetalem Kälberserum) und Inkubation für 3 Stunden wurde pro Well 1 ml DMEM/Ham's

F12 hinzugefügt, welcher mögliche Stimulatoren oder Inhibitoren der Serotonin-Freisetzung in verschiedenen Konzentrationen enthielt. I. d. R. wurde anschließend 15 Minuten lang inkubiert; nur bei den Experimenten mit Eugenol/Methylisoeugenol erfolgten zuerst 4 Minuten Inkubation mit oder ohne Methylisoeugenol, anschließend weitere 11 Minuten mit 250  $\mu\text{M}$  Eugenol, Methylisoeugenol oder einem äquimolaren Gemisch beider Substanzen.

Die Serotonin-Konzentration im Zellkulturüberstand der verschiedenen Ansätze wurde mit einem Serotonin-ELISA-Kit (Immunotech/Beckmann Coulter, Krefeld, Sensitivität 0,5 nM; Messung mit Multiscan Plate Reader von Thermo Lab Systems, Franklin, USA, bei 405 nm) bestimmt.

## 2.10 Calcium-Imaging

Intrazelluläre Calcium-Konzentrationen in BON-Zellen wurden mit Hilfe des fluoreszierenden Calcium-bindenden Farbstoffs Fluo-4 gemessen.

1–2 Tage vor der Messung auf Glasplättchen ausgesäte BON-Zellen wurden in DMEM/F-12-Zellkulturmedium (10 % FCS; PAA Laboratories, Pasching, Österreich), dem 4  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zugesetzt worden waren, für 20–30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Glasplättchen wurden in einer Messkammer (Volumen 6 ml) platziert, welche auf dem Trägertisch eines Mikroskops (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar) angebracht wurde. Während einer Messung wurde die Messkammer kontinuierlich mit einem Medium perfundiert, welches (in mM) 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Glukose und 10 HEPES (pH 7,4) enthielt; für Messungen in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium wurde das CaCl<sub>2</sub> durch 1 mM EGTA ersetzt und der pH mit NaOH auf 7,4 nachgestellt.

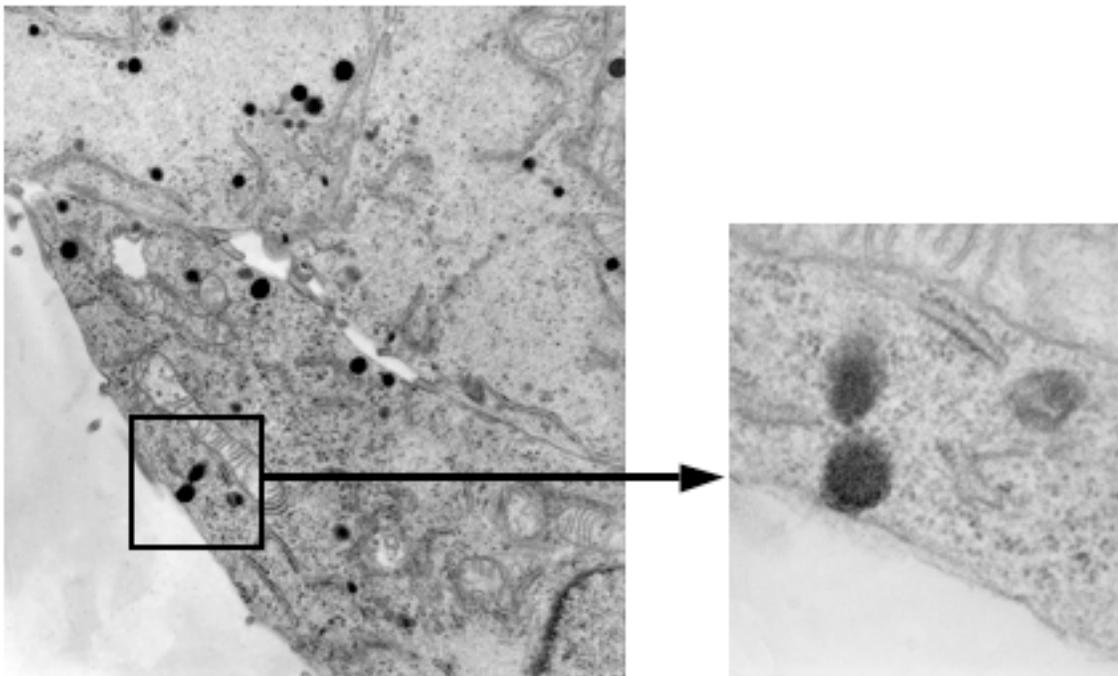
Mit einem luftgekühlten Argon-Laser-System (Uniphase, San Jose, USA) wurden die Zellen bei 488 nm angeregt; die Fluoreszenz wurde alle zwei Sekunden bei 500–540 nm mit einem Scanner-System (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Wetzlar) detektiert. Unter zehnfacher optischer Vergrößerung und einem digitalen Zoomfaktor von 1,0–1,8 enthielt ein einzelnes Gesichtsfeld ungefähr 150 Zellen.

Die Fluoreszenzsignale wurden mit der Leica Confocal Software v.2.6.1 (Leica Microsystems, Wetzlar) ausgewertet, indem die Fluoreszenzintensitäten über den gesamten Arealen einzelner Zellen zeitlich integriert wurden.

## 2.11 Amperometrie

### 2.11.1 Prinzip der Amperometrie

Die Amperometrie (auch: Voltametrie) ist ein elektrophysiologisches Messverfahren, mit dem Exozytosen detektiert werden können [73, 74]. Dabei macht man sich zunutze, dass alle oxidierbaren Moleküle – also auch bestimmte Transmitter wie etwa Noradrenalin, Histamin und Serotonin – ein bestimmtes Redoxpotential besitzen, bei dem eine Oxidation der Moleküle erfolgt. Exozytosen eines Transmitters (**Abb. 2.2**) können amperometrisch detektiert werden, indem man eine Elektrode nahe an die Zelloberfläche bringt und an der Elektrode eine Spannung anlegt, die etwas über dem Redoxpotential des zu untersuchenden Transmitters liegt. Erreichen freigesetzte Transmittermoleküle die Elektrode, werden sie oxidiert, geben also Elektronen ab; dadurch entsteht ein messbarer Strom (im pA-Bereich).



**Abb. 2.2:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer BON-Zelle mit diffuser Verteilung der serotoninhaltigen sekretorischen Granula. Im umrahmten Abschnitt und seiner Vergrößerung (rechts) ist eine beginnende Exozytose zu erkennen. Auf diese Weise freigesetztes Serotonin kann durch Amperometrie mit direkt auf der Zelloberfläche platzierten Carbonfaser-Elektroden detektiert werden.

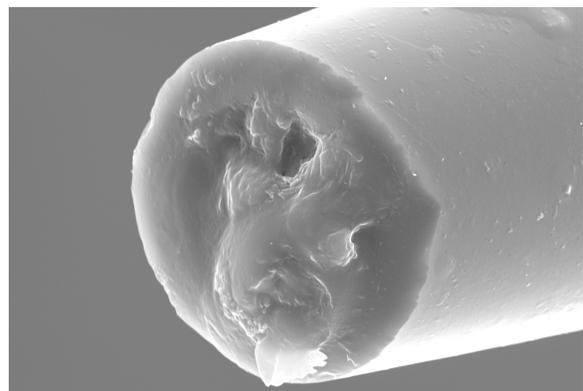
Bei einer Freisetzung des Transmitters in Quanten, also bei exozytotischer Freisetzung des in intrazellulären Granula gespeicherten Transmitters, entsteht ein charakteristischer Stromverlauf an der Elektrode, ein sog. exozytotischer Spike.

### 2.11.2 Herstellung von Carbonfaser-Elektroden

Glaskapillaren (Innendurchmesser 0,86 mm) wurden mit einer Carbonfaser (Durchmesser etwa 8–10  $\mu\text{m}$ ) beschickt; mittels eines Elektrodenpullers (DMZ Universal Puller, Zeitz, Augsburg) wurde ein Ende der Glasfaserkapillare so ausgezogen, dass eine Spitze mit einem Innendurchmesser von etwa 10  $\mu\text{m}$  entstand und das Glas in diesem Bereich so weit wie möglich auf die im Inneren liegende Carbonfaser aufschmolz. Die so erhaltene Elektrodenspitze wurde zusätzlich mit einem flüssigen Epoxidharz (Durcopan, Sigma-Aldrich, Seelze) versiegelt, um bei der späteren Messung einen Stromfluss zwischen Carbonfaser und Glas zu verhindern. Nach dem Aushärten des Harzes bei 80 °C für etwa 3 Stunden sowie anschließend bei Raumtemperatur über Nacht wurden die Elektrodenspitzen mittels eines Schleifgeräts (Narishige, Tokio, Japan) im 45°-Winkel abgeschliffen (**Abb. 2.3**).

Vor der Messung wurde die Elektrode mit Kaliumchlorid-Lösung (10 mM) gefüllt, um einen Stromkreis zwischen Carbonfaser und Messverstärker herzustellen.

**Abb. 2.3:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Carbonfaser-Elektrode für amperometrische Messungen.



### 2.11.3 Setup und Ablauf einer Messung

Durch die Verwendung eines vibrationsgedämpften Tisches (VH-3848-OPT-8, Newport, Darmstadt) und eines FARADAYschen Käfigs für die amperometrische Messstation sowie durch eine sorgfältige

---

Erdung aller Komponenten wurde das Auftreten von störenden Einflüssen und Messartefakten reduziert.

Zwei Tage vor der Messung auf Glasplättchen kultivierte BON-Zellen wurden in einer Messkammer (Volumen 3 ml) eingebracht, die sich auf dem Trägertisch eines aufrechten Mikroskops (Zeiss Axioskop 2 FS plus, Zeiss, Göttingen) befand. Das Medium der Messkammer enthielt (in mM) 140 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 Glukose und 10 HEPES (pH 7,4); für Messungen in Ca<sup>2+</sup>-freiem Medium wurde das CaCl<sub>2</sub> durch 1 mM EGTA ersetzt und der pH mit NaOH auf 7,4 nachgestellt. Unter visueller Kontrolle bei 63-facher Vergrößerung (Objektiv Acroplan, Zeiss, Göttingen) wurde die Spitze der Carbonfaser-Elektrode mittels eines Mikromanipulators (Eppendorf, Köln) so nahe wie möglich an die Membran einer Zelle gebracht. Die in der Halterung eines Vorverstärkers platzierte Carbonfaser wurde zur Serotonin-Messung mit einer Spannung von 850 mV belegt und mit einem EPC-9 Patch-clamp-Verstärker (HEKA, Lambrecht) verbunden. Zur Stimulation der Zellen verwendete Lösungen wurden mittels eines Pumpensystems (ValveLink 8, AutoMate Scientific, San Francisco, USA) appliziert.

Die Aufzeichnung der bei 250 Hz gefilterten Messdaten erfolgte über die Software Pulse v.8.7.6 (HEKA, Lambrecht). Zur Auswertung wurde ein Makro-basiertes Programm [75, 76] für die Software IGOR Pro v.4.01 (Wavemetrics, Portland, USA) verwendet.

## **2.12 Statistische Analyse**

Die Ergebnisse der Immunoassays werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Die Daten wurden mit dem Student-Newman-Keuls-Test analysiert.

## 3 Ergebnisse

Ein Teil der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse beruht auf Methoden und Experimenten, die in Zusammenarbeit mit *Frau Dr. rer. nat. Petra Voland*, Arbeitsgruppe *Prof. Dr. med. Christian Prinz*, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, durchgeführt wurden. Hierbei handelt es sich um die Analyse der RNA, des Serotonins und die statistische Auswertung (vgl. Anmerkung zu Anfang des Abschnitts 2). Von Frau Dr. Voland wurden zur Darstellung ihrer Ergebnisse die Abb. 3.1, 3.2, 3.3 Teilabb. e, 3.5 Teilabb. c und 3.7 angefertigt. Die betreffenden Legendentexte wurden gemeinsam mit dem Verfasser erarbeitet. Alle übrigen Legendentexte, Abbildungen des Ergebnisteils sowie der Text dieses Abschnitts wurden selbstständig vom Verfasser erstellt.

### 3.1 Expression olfaktorischer Rezeptoren

Um herauszufinden, ob olfaktorische Rezeptoren (ORs) in EC-Zellen der menschlichen Darmschleimhaut exprimiert werden, wurden RT-PCR-Experimente mit RNA aus humanen Darmbiopsaten, Paraffinschnitten von Ileumresektaten, mikrodisektierten EC-Zellen und der sich von EC-Zellen ableitenden BON-Zelllinie durchgeführt.

#### 3.1.1 OR-Expression in der BON-Zelllinie

Zunächst wurden Primer zur Identifikation von konservierten Regionen von ORs verschiedener Spezies eingesetzt [72]. In BON-Zellen ergaben sich PCR-Produkte der erwarteten Größe von 525 bp als Hinweis auf eine Expression olfaktorischer Rezeptoren (**Abb. 3.1 a**).

Um die zugrunde liegenden humanen ORs zu identifizieren und zu unterscheiden, wurden RT-PCR-Experimente mit spezifischen Primern für individuelle ORs durchgeführt. Diese ergaben eine Expression der OR-Gene für OR73, hOR17-7/11, OR1G1 (alias hOR17-209, vgl. [57]) und hOR17-210 in BON-Zellen (**Abb. 3.1 b**). Die erzielten, relativ schwachen Signale konnten durch eine Nested-PCR unter Einsatz des Amplicons der PCR in Abb. 3.1 b als Template spezifisch amplifiziert werden (**Abb. 3.1 c**).

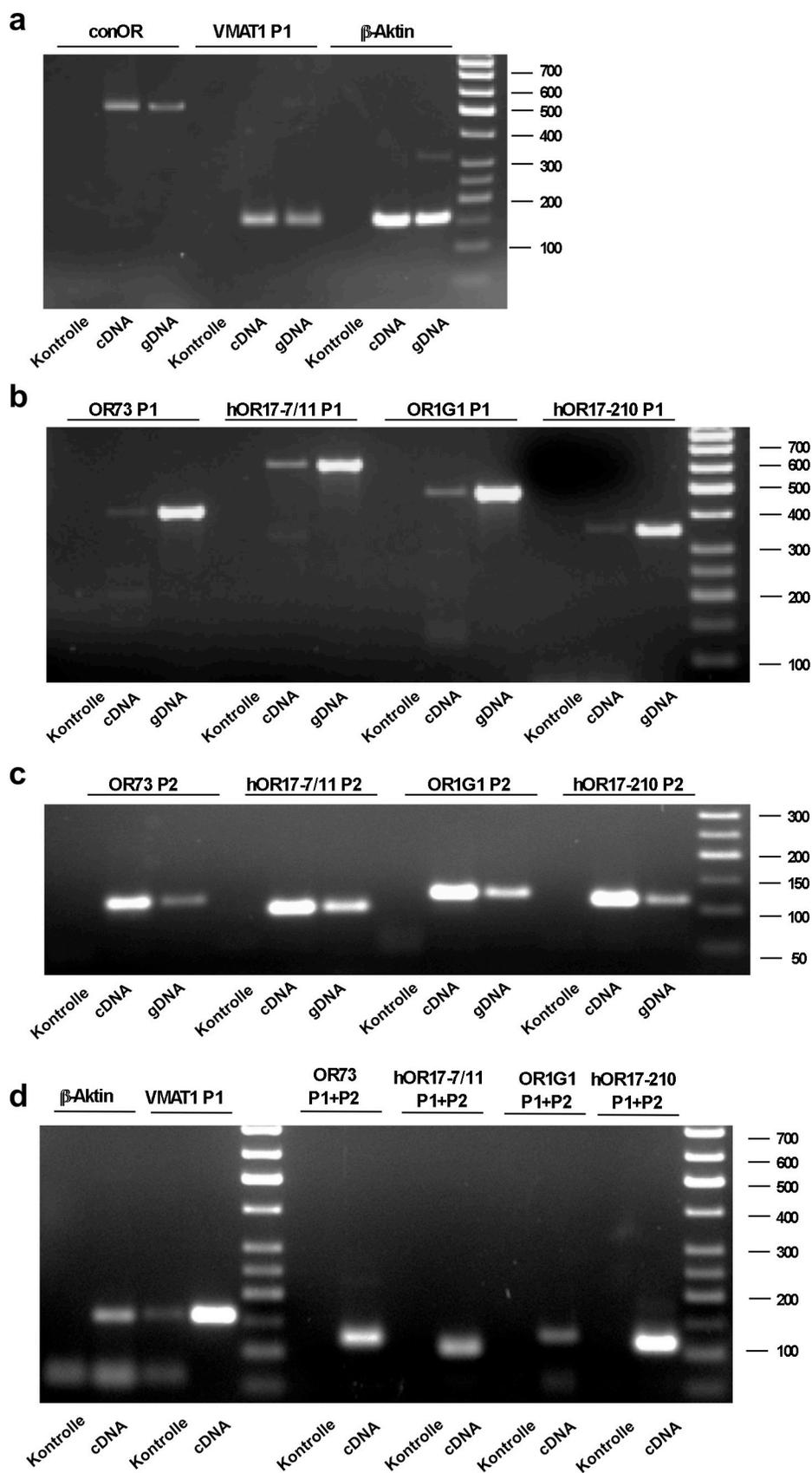
**Abb. 3.1 (S. 30):** Expression olfaktorischer Rezeptoren in der BON-Zelllinie und in Biopsaten des menschlichen Dünndarms. Genomische (g)DNA der intronlosen OR-Gene wurde durch Behandlung der RNA-Proben mit DNase I entfernt (Kontrollen: DNase-I-verdaute RNA als Template). Nach der Herstellung von komplementärer (c)DNA wurde eine PCR mit den Primern der Tab. 2.3 durchgeführt. gDNA aus BON-Zellen diente als Positivkontrolle. Die Expression des EC-Zellmarkers VMAT1 und von  $\beta$ -Aktin wurde mit Primern zur Amplifikation von Exon-Sequenzen dieser Gene analysiert. Der Intensitätsunterschied zwischen cDNA und gDNA in den gezeigten Experimenten erklärt sich dadurch, dass mit gleicher Zyklenzahl gearbeitet wurde, um keine zusätzliche Variable zu erzeugen. In der eingesetzten gDNA waren mehr Kopien der olfaktorischen Rezeptoren vorhanden als in der cDNA, da für die Isolierung der gDNA mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung stand und die Isolierung nicht so aufwendig war. Die Konzentration der Proben wurde vor der PCR nicht bestimmt, da von der cDNA nur sehr begrenztes Material zur Verfügung stand; ansonsten hätte man die eingesetzten DNA-Mengen anpassen können, um eine vergleichbare Intensität der Banden zu erzielen. Letztlich war das Ziel der Experimente jedoch nur die qualitative Aussage, ob olfaktorische Rezeptoren in den untersuchten Proben vorhanden waren oder nicht.

**a:** Die Verwendung von Primern zur Detektion konservierter OR-Sequenzen (conOR) zeigt die Expression olfaktorischer Rezeptoren in BON-Zellen.

**b:** Der Einsatz spezifischer Primer zeigt die Expression von vier ORs (OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210) in BON-Zellen. Die zusätzlichen Spuren neben den Hauptprodukten traten bei den Versuchen nicht regelhaft in dieser Konstellation auf und sind daher als unspezifisch zu bewerten.

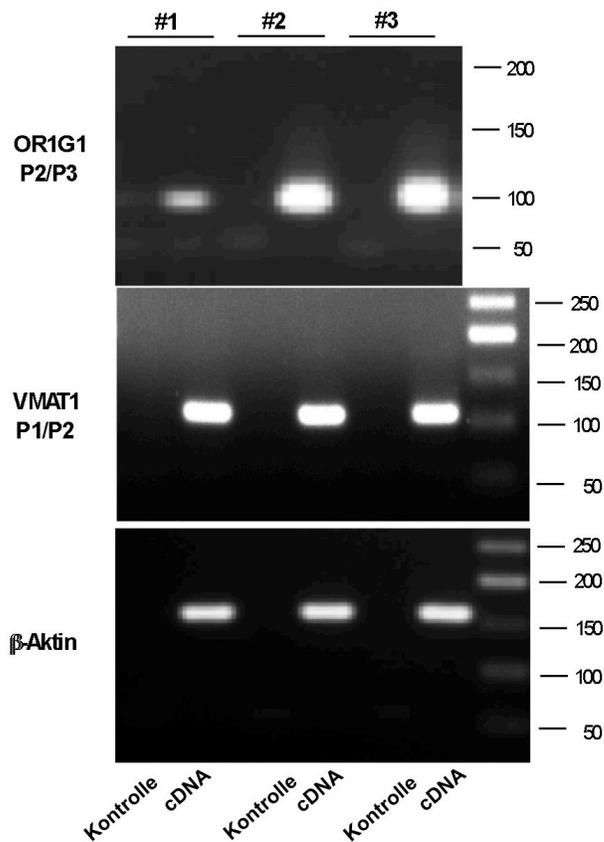
**c:** Bestätigung der OR-Expression in BON-Zellen durch Nested-PCR (Amplifikation des PCR-Produkts bei Einsatz des Amplicons der PCR in Teilabb. b).

**d:** Expression olfaktorischer Rezeptoren in humanen Dünndarmbiopsaten. Die Rezeptoren OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210 wurden durch Nested-PCR mit den Primern der Tab. 2.3 detektiert. Parallel wurde die Expression von VMAT1 und  $\beta$ -Aktin analysiert. Im gezeigten Experiment war der Verdau der gDNA bei der Negativkontrolle zu VMAT1 nicht ganz vollständig, so dass hier ein Rest gDNA amplifiziert wurde.



### 3.1.2 OR-Expression im menschlichen Gastrointestinaltrakt

Anschließend wurde die OR-Expression im menschlichen Gastrointestinaltrakt untersucht. Zu diesem Zweck wurden RT-PCR-Experimente mit Schleimhautbiopsaten des menschlichen Dünndarms durchgeführt. Das starke Signal für den spezifischen EC-Zell-Marker VMAT1 [27] bewies das Vorhandensein von EC-Zellen in den Biopsaten. Zusätzlich wurden bei der Nested-PCR in den Dünndarmbiopsaten die gleichen ORs wie in den BON-Zellen gefunden: OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210 (**Abb. 3.1 d**).



**Abb. 3.2:** Expression olfaktorischer Rezeptoren in menschlichen Ileumresektaten. Das Vorhandensein von ORs in Paraffinschnitten wurde mittels Primern für OR1G1 untersucht. Die Signale der Nested-PCR stammen von drei unterschiedlichen Proben (#1, #2, #3). Die Expression von VMAT1 (Nested-PCR) und  $\beta$ -Aktin wurde in denselben Proben untersucht.

### 3.1.3 OR-Expression in menschlichen isolierten EC-Zellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch in Paraffin-eingebettetem menschlichen Darmgewebe ORs durch RT-PCR nachgewiesen werden können, da dieses Material zur späteren Gewinnung von isolierten EC-Zellen mittels Laser-assistierter Mikrodisektion dienen sollte. Für dieses Experimente wurde OR1G1 ausgewählt, der olfaktorische Rezeptor mit dem breitesten Ligandenspektrum [59]. Die Expression von OR1G1 konnte (neben der erwarteten Expression von VMAT1) in drei Gewebeschnitten verschiedener Individuen mittels Nested-PCR gezeigt werden (**Abb. 3.2**).

Vor der Laser-assistierten Mikrodisektion wurden die EC-Zellen im Gewebeschnitt durch ihre Immunoreaktivität für VMAT1 identifiziert und anschließend ausgeschnitten (**Abb. 3.3 a–d**). In den gesammelten EC-Zellen konnte mittels RT-PCR die Expression der vier ORs gezeigt werden, die auch schon in Biopsaten, Dünndarmschnitten und BON-Zellen zu finden waren (**Abb. 3.3. e**).

Aus den EC-Zellen konnte durch das limitierte Ausgangsmaterial und die aufwendige Vorbehandlung und Isolierung nur wenig cDNA gewonnen werden, so dass eine relativ hohe Zyklenzahl von 35–40 notwendig war, um die olfaktorischen Rezeptoren nachzuweisen.

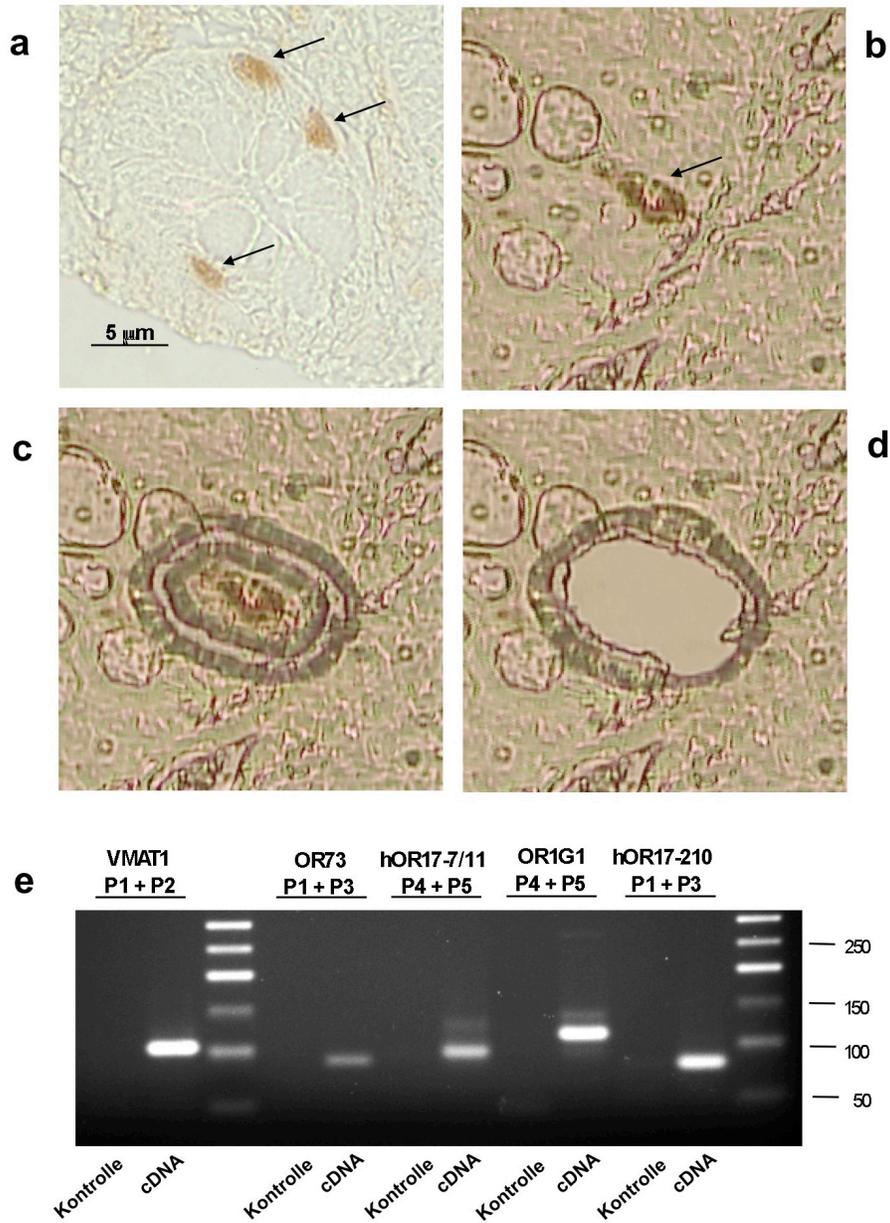
**Abb. 3.3 (S. 33):** Mikrodisektion und Expression olfaktorischer Rezeptoren in humanen EC-Zellen. EC-Zellen wurden in den Dünndarm-Paraffinschnitten anhand des immunhistochemischen Nachweises von VMAT1 identifiziert.

**a:** Drei EC-Zellen (Pfeile) in einer Krypte des menschlichen Dünndarms (Immunhistochemie mit VMAT1-Antikörper) auf einem konventionellen Glasobjektträger, der eine deutlich bessere Abbildungsqualität ermöglicht als die für die eigentliche Isolierung verwendeten Polyethylen-Naphtalen-Membranen. Angefärbt sind die basalen Zellabschnitte, die überwiegende Lokalisation der serotoninhaltigen Granula (vgl. Abb. 1.1).

**b:** Vor der Mikrodisektion wurde das Gewebe auf eine Polyethylen-Naphtalen-Membran aufgebracht und immunhistochemisch gefärbt (Vergrößerung 400 x).

**c, d:** VMAT1-positive Zellen (Pfeil) wurden mittels Laser-Mikrodisektion isoliert und gesammelt. Anschließend wurde RNA aus den gesammelten EC-Zellen gewonnen und – nach Behandlung mit DNase I – cDNA hergestellt.

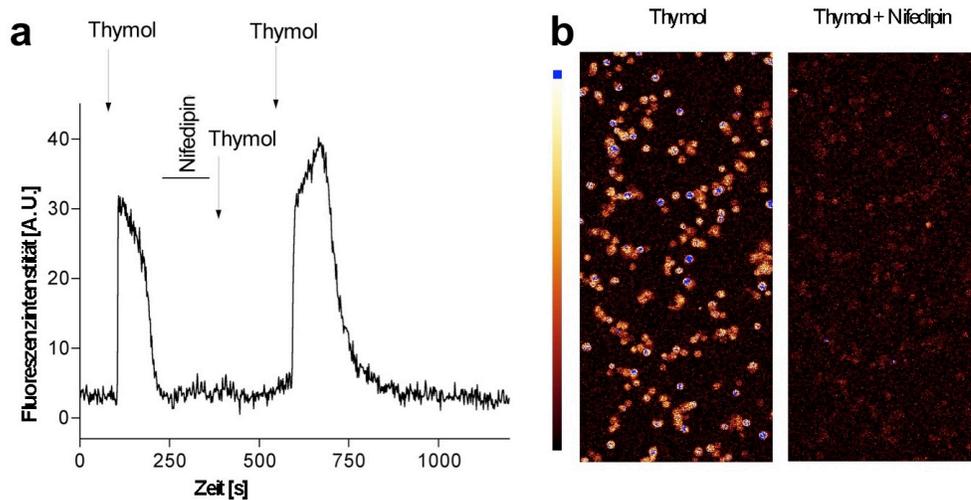
**e:** Die Nested-PCR mit den Primern der Tab. 2.3 erlaubte die Identifikation der olfaktorischen Rezeptoren OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210.



### 3.2 Duftstoff-induzierte intrazelluläre $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten

Die Ligandenprofile von zwei der identifizierten ORs, nämlich OR1G1 und hOR17-210, wurden kürzlich bestimmt [57, 59]. Das Profil von OR73 und hOR17-7/11 ist noch unbekannt, jedoch sind die wahrscheinlich ähnlichen Profile der murinen orthologen Rezeptoren OR174-9 und Olfr43 bekannt [58, 60]; OR174-9 der Maus entspricht dem menschlichen OR73, und Olfr43 der Maus

entspricht hOR17-7/11 (vgl. Shepherd Lab, Yale University, USA, Olfactory Receptor Database [http://senselab.med.yale.edu/senselab/ORDB] und Weizmann Institute of Science, Rehavot, Israel, Human Olfactory Receptor Data Exploratorium [http://bioportal.weizmann.ac.il/HORDE]). Ausgewählte Liganden der in EC-Zellen identifizierten olfaktorischen Rezeptoren wurden zur Stimulation von BON-Zellen verwendet. Die BON-Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines pankreatischen Karzinoidtumors gewonnen und ist ein gut etabliertes EC-Zell-Modell in vitro [30–32, 39, 40].



**Abb. 3.4:** Effekt von Thymol auf die intrazellulären Konzentrationen von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in BON-Zellen.

**a:** Stimulation der BON-Zellen mit dem Duftstoff Thymol ( $100 \mu\text{M}$ ,  $t = 80 \text{ s}$ ) rief eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hervor. Zugabe von Nifedipin ( $8 \mu\text{M}$ ) hemmte reversibel den Thymoleffekt: Die Perfusion der Messkammer wurde für 90 s unterbrochen, um eine Bindung des Nifedipins zu erlauben. Die anschließende Applikation von Thymol bei  $t = 380 \text{ s}$  nach vorheriger Wiederaufnahme der Perfusion führte zu keinem erkennbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten. Nach Auswaschen des Nifedipins war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient auf Stimulation mit Thymol ( $t = 550 \text{ s}$ ) wieder unverändert stark ableitbar.

**b:** Ausschnitte aus dem Gesichtsfeld der Calcium-Imaging-Messung, für die Teilabb. a einen repräsentativen Trace einer einzelnen Zelle zeigt: Hierbei wird ersichtlich, dass praktisch alle Zellen auf Applikation des Duftstoffs reagieren (linker Ausschnitt bei  $t = 100 \text{ s}$ ) bzw. durch Nifedipin gehemmt werden (rechter Ausschnitt bei  $t = 400 \text{ s}$ ). Der Farbbalken (links oben) zeigt die für die Darstellung der Fluoreszenzintensität gewählten Falschfarben (schwarz/dunkelrot: niedrig; gelb/weiß: hoch).

Zahlreiche Duftstoffe, die der Mensch wahrnehmen kann, sind Derivate des Phenols (**Tab. 3.1**). So ist etwa Thymol Ligand von OR1G1 [59]. Thymol ist der quantitativ bedeutsamste Duftstoff im Thymian, welcher seit Jahrhunderten zum Würzen von Speisen eingesetzt wird. Thymol rief starke  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in BON-Zellen hervor. Dieser Effekt ließ sich nur in Anwesenheit von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  beobachten; im  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Medium traten keine Thymol-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten auf. Durch Zugabe von 8  $\mu\text{M}$  Nifedipin, einem (in dieser Konzentration spezifischen) Hemmstoff der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ (LTCC), konnte der Thymol-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transient ebenfalls reversibel unterdrückt werden (**Abb. 3.4**). In diesem Zusammenhang bedarf die Tatsache der Erwähnung, dass über die funktionelle Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ sowohl in EC- als auch in BON-Zellen bereits berichtet wurde [77, 78].

Weitere Phenolderivate wurden auf eine potentielle Stimulation der BON-Zellen getestet (Phenol selbst induzierte keine  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale, s. **Tab. 3.1**):

Methylsalicylat, dessen Rezeptor noch unbekannt ist, konnte ebenfalls  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten hervorrufen (**Tab. 3.1**).

Eugenol ist Ligand des OR73 [58, 64]. Sowohl Eugenol als auch sein Isomer Isoeugenol erzeugten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in BON-Zellen; die bei allen in dieser Studie verwendeten Duftstoffen beobachtete Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten von der Duftstoffkonzentration ist beispielhaft an Eugenol gezeigt (**Abb. 3.5 a**).

Methylisoeugenol, ein bekannter Antagonist am OR73 [58, 63], rief selbst keinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten hervor, konnte jedoch den Effekt von Eugenol reversibel und vollständig unterdrücken (**Abb. 3.5 b**).

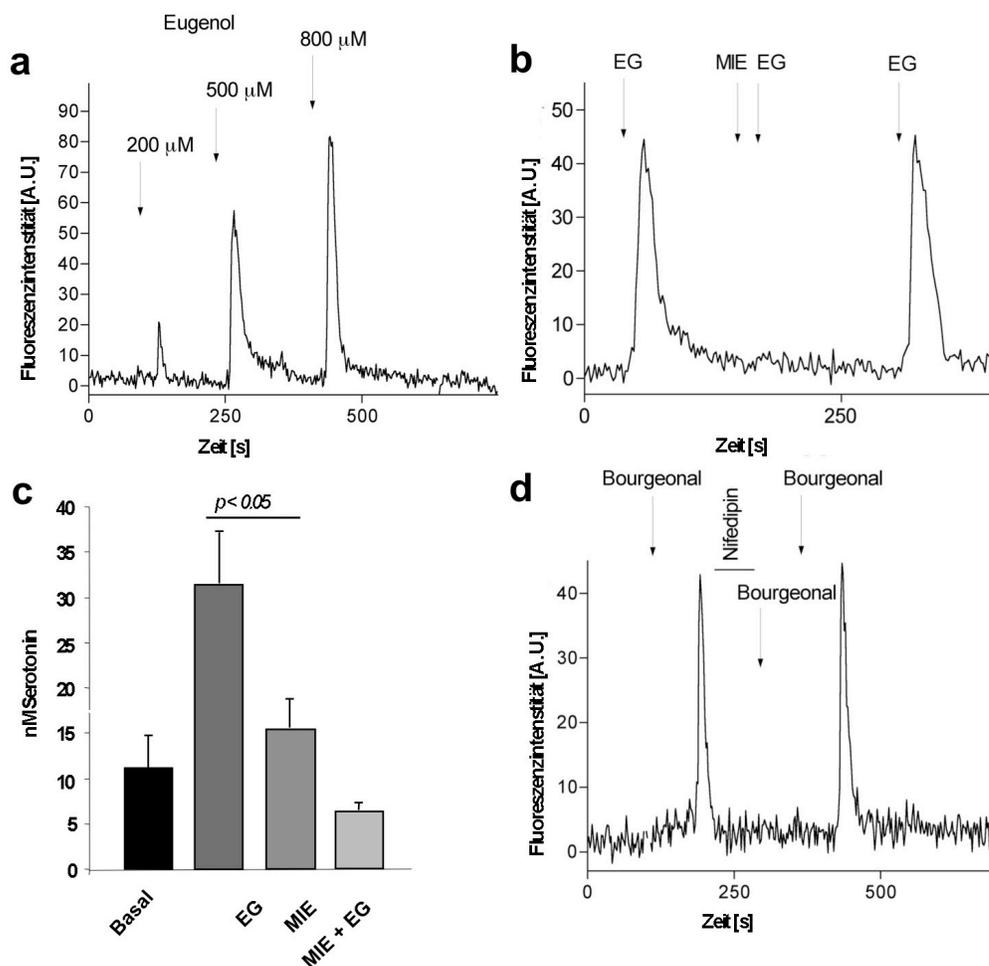
Auch durch Verwendung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -freien extrazellulären Messmediums sowie durch Zugabe von 8  $\mu\text{M}$  Nifedipin konnte der Eugenoleffekt (wie auch die Effekte von Thymol, Methylsalicylat und Isoeugenol) vollständig blockiert werden. Es lässt sich somit folgern, dass Thymol und Eugenol über spezifische Bindung an ihre Rezeptoren (OR1G1 bzw. OR73) einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ triggern und somit  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten in den Zellen erzeugen.

Geraniol, Bourgeonal und Helional sind Liganden von hOR17-7/11 [60]. Geraniol, ein Isoprenoidalkohol, bindet zusätzlich auch an OR1G1 [59]. Auch mit Geraniol ließen sich  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten erzeugen (**Tab. 3.1**).

Ebenso stellten sich  $\beta$ -Ionon, Isoamylacetat und Acetophenon – alle Liganden des olfaktorischen Breitspektrum-Rezeptors OR1G1 [59] – als effektive BON-Zell-Stimulatoren heraus (**Tab. 3.1**).

Dieses Ligandenprofil unterstreicht die Expression von OR1G1, während die Wirkung des Geraniols sowohl auf die Expression von hOR17-7/11 und OR1G1 zurückgeführt werden kann; sich teilweise überlappende Ligandenspektren sind bekanntermaßen wichtige Eigenschaften der olfaktorischen Rezeptoren und erlauben die kombinatorische Duftstoffwahrnehmung [64].

Auch Bourgeonal ist Ligand zweier verschiedener ORs, nämlich von hOR17-7/11 und hOR17-4 [60, 61]. Bourgeonal rief intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten hervor; dieser Effekt konnte durch Entfernung des extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  sowie durch Zugabe von Nifedipin unterdrückt werden (**Abb. 3.5 d**).



**Abb. 3.5:** Effekt verschiedener Duftstoffe auf intrazelluläre Konzentrationen freien  $\text{Ca}^{2+}$  und auf die Serotoninfreisetzung durch BON-Zellen.

**a:** Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration korreliert mit der Konzentration des Duftstoffs Eugenol (Applikation bei  $t = 90, 230$  und  $410$  s).

**b:** *Methylisoeugenol (MIE, 500  $\mu$ M) hat selbst keinen Effekt, hemmt jedoch vollständig und reversibel den Eugenoleffekt (EG); Applikation von Eugenol bei  $t = 40, 170$  und  $300$  s, MIE bei  $t = 150$  s mit kurzzeitiger Unterbrechung der Perfusion der Messkammer für  $20$  s bis zur Zugabe von Eugenol.*

**c:** *Eugenol, jedoch nicht Methylisoeugenol, ruft eine Serotoninfreisetzung hervor; die durch Eugenol induzierte Serotoninfreisetzung wird durch Methylisoeugenol gehemmt ( $n = 9$ ,  $p$ -Werte entsprechend dem Student-Newman-Keuls-Test).*

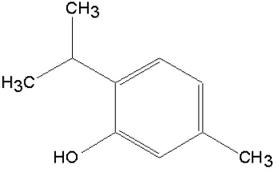
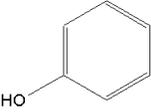
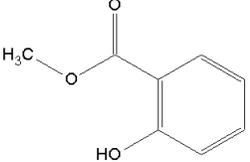
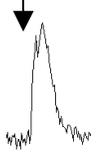
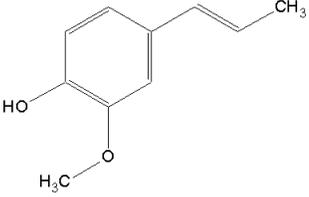
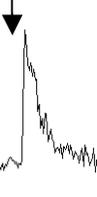
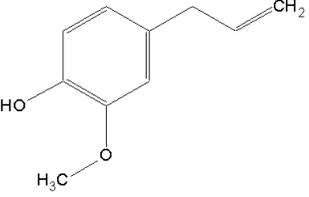
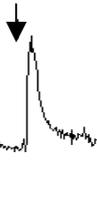
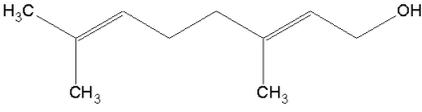
**d:** *Der Effekt des Duftstoffs Bourgeonal auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration lässt sich reversibel durch Zugabe von Nifedipin ( $8 \mu$ M) hemmen. Zugabe von Bourgeonal bei  $t = 110, 290$  und  $360$  s; nach der Zugabe von Nifedipin bei  $t = 210$  s wurde für  $90$  s die Perfusion der Messkammer unterbrochen, um eine Bindung des Nifedipins zu ermöglichen.*

Helional, Ligand von hOR17-7/11 [60] und hOR17-40 [62], war ebenfalls im BON-Zellmodell wirksam (**Tab. 3.1**).

Da weder eine Expression von hOR17-4 noch von hOR17-40 in der RT-PCR gefunden wurde, lässt sich schlussfolgern, dass Bourgeonal und Helional an den in dieser Arbeit identifizierten hOR17-7/11 binden.

Basierend auf den Ergebnissen der OR-Expressionsstudien und der durch die funktionellen Messungen bestätigten teilweise überlappenden Ligandenprofile lässt sich zusammenfassend feststellen, dass mindestens vier olfaktorische Rezeptoren funktionell in EC-Zellen exprimiert werden. Die Ergebnisse der funktionellen Analysen zeigen weiterhin, dass ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom über  $Ca^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ essentiell für die Generierung von Duftstoff-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten ist.

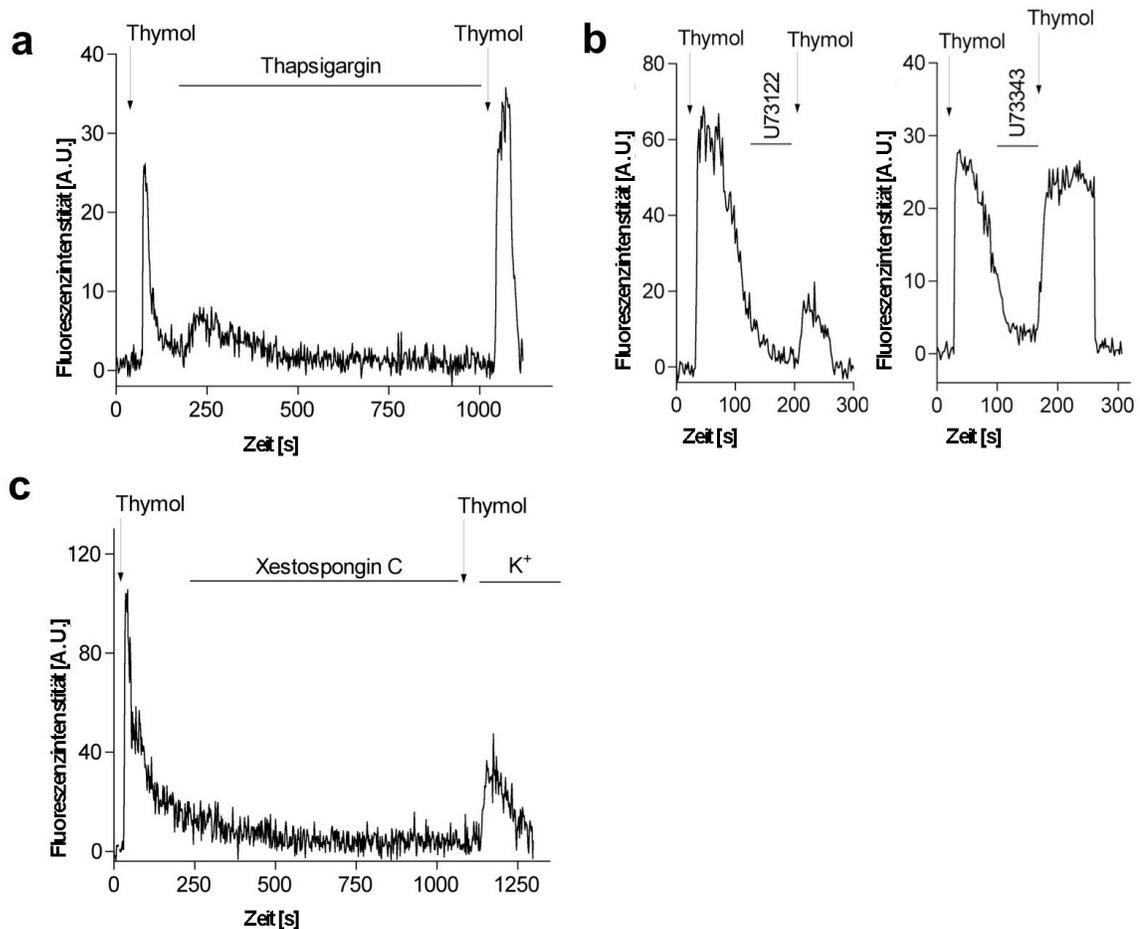
Intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Speicher scheinen bei diesem Vorgang nicht von Bedeutung zu sein, da die Effekte der Duftstoffe nicht durch Thapsigargin beeinflussbar waren. **Abb. 3.6 a** zeigt einen durch Thymol bewirkten deutlichen  $Ca^{2+}$ -Transienten auch nach Entleerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Speicher mit Thapsigargin. Jedoch konnte der Thymoleffekt sowohl durch den spezifischen Hemmstoff der Phospholipase C (PLC), U73122, als auch durch den Inositol-1,4,5-triphosphat( $IP_3$ )-Rezeptor-Blocker Xestospongine C [79, 80] deutlich vermindert werden (**Abb. 3.6 b, c**). Diese Experimente lassen eine Rolle der Phospholipase C und von  $IP_3$ -Rezeptoren vermuten.

Duftstoff	Natürliches Vorkommen Verwendung	Chemische Struktur	Ca <sup>2+</sup> -Signal	Rezeptor
<b>Alkohole</b>				
Thymol	Thymian, Oregano Gewürz, Konservierung			OR1G1
Phenol	Steinkohleteer, organ. Abfall Chemikalien- synthese, Desinfektion			unbekannt
Methylsalicylat	Wachsblumen, Vanille, Ylang-Ylang Parfüm, Gewürz			unbekannt
Isoeugenol	Ylang-Ylang, Muskatnuss Parfüm, Gewürz			OR73
Eugenol	Basilikum, Nelken, Lorbeer Parfüm, Gewürz, Desinfektion			OR73
Geraniol	Geranien, Weintrauben, Rosen Parfüm			hOR17-7/11, OR1G1

Aldehyde				
Bourgeonal	Maiglöckchen <i>Parfüm</i>			hOR17-4, hOR17-7/11
Helional	Braune Algen <i>Parfüm</i>			hOR17-40, hOR17-7/11
Ketone				
Acetophenon	Labdanum, Himbeeren <i>Nahrungszusatz</i>			hOR17-210, OR1G1
$\beta$ -Ionon	Rosen, Tomaten, Weintrauben <i>Nahrungszusatz,</i> <i>Parfüm</i>			OR1G1
Ester				
Isoamylacetat	Bananen, Birnen, Äpfel <i>Nahrungszusatz</i>			OR1G1

**Tab. 3.1 (S. 38, 39):** Überblick über in dieser Arbeit eingesetzten Duftstoffe und identifizierte humane olfaktorische Rezeptoren. Die Traces zeigen die Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Applikation des jeweiligen Duftstoffs (100  $\mu\text{M}$ , Pfeile), um (an dieser Stelle qualitativ) zu verdeutlichen, welche Duftstoffe wirksam waren. Bei allen wirksamen Duftstoffen war eine Konzentrationsabhängigkeit der induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten zu beobachten (beispielhaft gezeigt in Abb. 3.5 a). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale konnten durch Verwendung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -freien extrazellulären

Mediums und durch Zugabe von  $8 \mu\text{M}$  Nifedipin unterdrückt werden (beispielhaft demonstriert in Abb. 3.4 a und 3.5 d). Phenol blieb selbst bei Konzentrationen von  $10 \text{ mM}$  ohne Effekt.



**Abb. 3.6:** Effekte von Thapsigargin, einem PLC-Inhibitor und einem  $\text{IP}_3$ -Rezeptorblocker auf Thymol-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten.

**a:** BON-Zellen reagieren immer noch auf den Duftstoff Thymol (jeweils  $100 \mu\text{M}$ ), nachdem die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin entleert wurden. Hierbei wurde eine Stimulationsdauer mit Thapsigargin von  $800 \text{ s}$  abgewartet, bis die Zunahme der Fluoreszenzintensität der Zellen nach Zugabe der Substanz wieder völlig abgeklungen war. Die Stimulation mit Thymol erfolgte bei  $t = 40$  bzw.  $1000 \text{ s}$  (unmittelbar nach Wiederaufnahme der Perfusion).

**b:** Der PLC-Inhibitor U73122 ( $10 \mu\text{M}$ ) reduziert das Thymolsignal (jeweils  $100 \mu\text{M}$ ) deutlich, während das inaktive Analogon U73343 ( $10 \mu\text{M}$ ) keinen Effekt hat. Nach Zugabe beider Substanzen wurde für  $75 \text{ s}$  die Perfusion der Messkammer unterbrochen, kürzere Bindungszeiten waren bei U73122 ohne Effekt.

*c*: Xestospongine C, ein Antagonist des  $IP_3R$ , kann den Thymol-induzierten  $Ca^{2+}$ -Transienten vollständig blocken. Nach Applikation von  $100 \mu M$  Thymol bei  $t = 20 s$  wurde bei  $t = 240 s$   $1 \mu M$  Xestospongine C zugegeben und die Perfusion der Messkammer gestoppt. Die lange angewandte Inkubationszeit von 13 Minuten orientierte sich dabei an den von anderen Autoren verwendeten Zeiten [69, 79, 80]. Nach Wiederaufnahme der Perfusion wurden bei  $t = 1080 s$  erneut  $100 \mu M$  Thymol zugegeben. Die Zellen reagieren noch auf Depolarisation, indem statt Perfusionslösung kaliumreiches Medium in die Messkammer eingeleitet wurde ( $56 mM K^+$ ).

### 3.3 Duftstoff-induzierte Serotoninfreisetzung

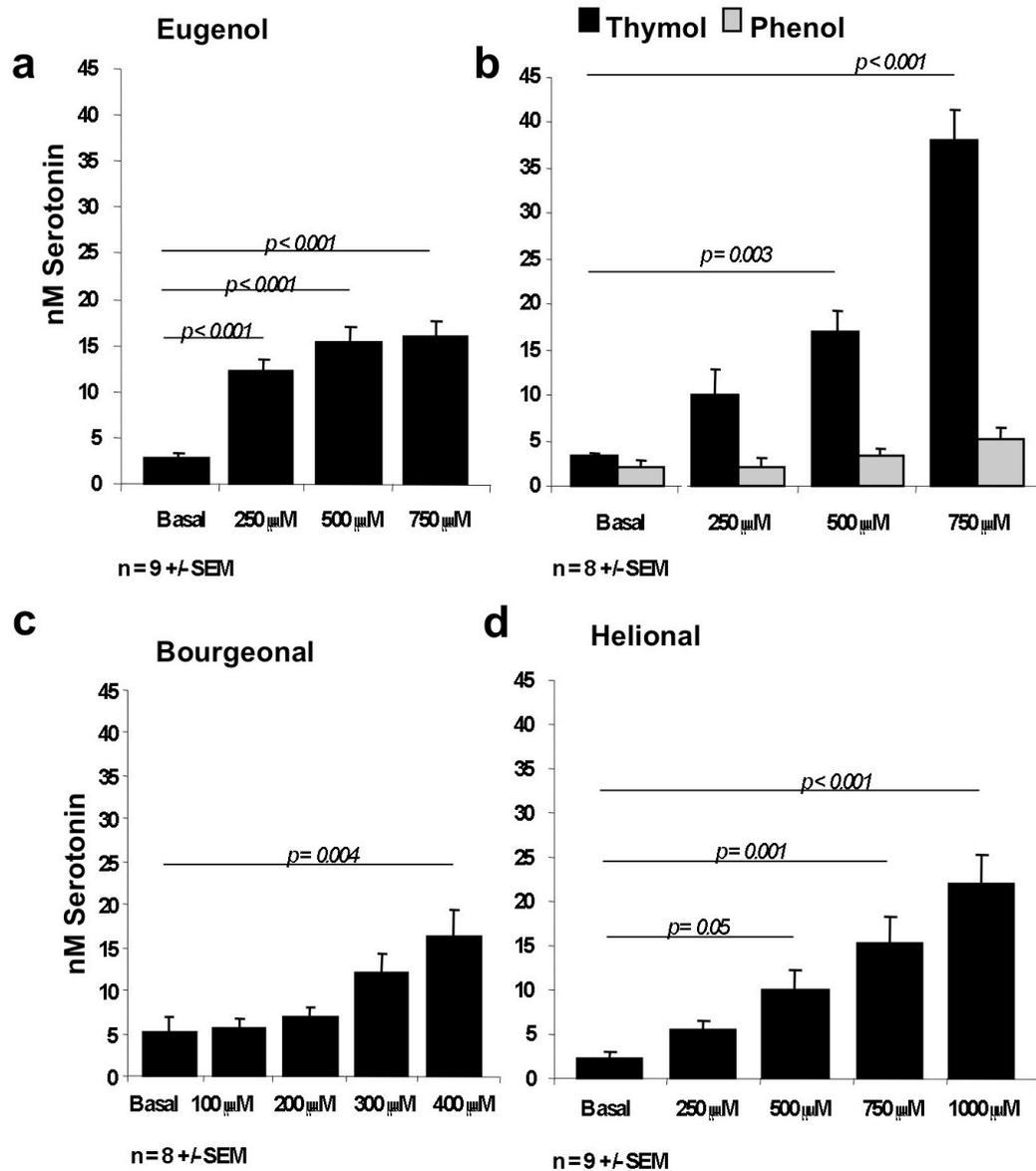
Dass ein Anstieg der intrazellulären Konzentration von freiem  $Ca^{2+}$  in sekretorischen Zellen zur Exozytose führt, ist eine allgemein anerkannte Tatsache. Daher wurde in Ergänzung und Fortführung der bereits beschriebenen Experimente die Serotoninfreisetzung aus BON-Zellen nach Stimulation mit bestimmten OR-Liganden gemessen.

In der Tat waren die Liganden, die  $Ca^{2+}$ -Transienten in BON-Zellen hervorgerufen hatten, auch potente Stimulatoren der Serotoninfreisetzung. **Abb. 3.7** zeigt die konzentrationsabhängige Serotoninfreisetzung nach Applikation von Eugenol (**a**), Thymol (**b**), Bourgeonal (**c**) und Helional (**d**). Phenol setzte kein Serotonin frei (graue Balken in Teilabb. **b**).

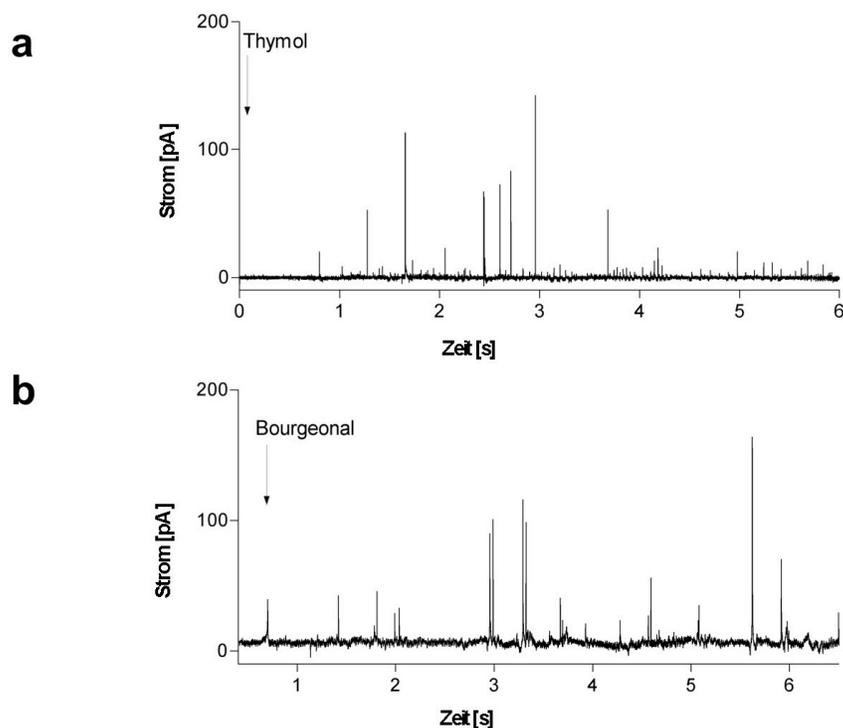
Methylisoeugenol, das die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration selbst nicht beeinflusste (**Abb. 3.5 b**), blockte die Eugenol-induzierte Serotonin-Freisetzung (**Abb. 3.5 c**).

Ein direkter Nachweis der Serotoninfreisetzung durch Exozytose konnte durch amperometrische Messung der gequantelten Serotoninfreisetzung von Einzelzellen erbracht werden. Nach Zugabe von OR-Liganden wie Thymol und Bourgeonal zeigten sich Serotonin-Exozytosen in Form der typischen Spikes (**Abb. 3.8**).

Diese Experimente machen deutlich, dass die etablierten Liganden identifizierter ORs nicht nur intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Transienten hervorrufen, sondern auch die Serotoninfreisetzung per Exozytose bewirken.



**Abb. 3.7:** Duftstoffe bewirken eine Serotoninfreisetzung aus BON-Zellen. BON-Zellen wurden für 15 Minuten in serumfreiem Medium mit den verschiedenen Duftstoffen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Serotoninfreisetzung im Überstand wurde mittels Serotonin-ELISA bestimmt. Eine konzentrationsabhängige Serotoninfreisetzung bewirkten Eugenol (a), Thymol (b), Bourgeonal (c) und Helional (d), jedoch nicht Phenol (graue Balken in b). Das als Lösemittel verwendete Ethanol bewirkte in den entsprechenden Endkonzentrationen (0,25–1,0 %) eine maximale Serotoninfreisetzung von  $1,58 \pm 1,32$  nM, war also ohne signifikanten Effekt auf die Serotoninfreisetzung aus den Zellen (nicht gezeigt). P-Werte entsprechend dem Student-Newman-Keuls-Test.



**Abb. 3.8:** Amperometrische Detektion von Exozytosen aus BON-Zellen nach Zugabe von Thymol **(a)** und Bourgeonal **(b)**. Thymol und Bourgeonal (jeweils 100  $\mu$ M) bewirken beide eine gequantelte Serotoninfreisetzung (Messung bei 850 mV). Spikes entsprechen einzelnen Exozytoseereignissen. Die Messapparatur mit ihrer hohen Verstärkung ist höchst anfällig für mechanische Artefakte; bei den Messungen kam es fast regelmäßig direkt bei Starten der Applikation von Substanzen zu einem Signal wie in Teilabb. b, das sich bei der Auswertung der Messungen (siehe Abschnitt 2.11.3) von seiner Kinetik her jedoch eindeutig nicht als typischer „Spike“ (Exozytose) darstellte. Somit treten die Spikes für Thymol und Bourgeonal in etwa mit derselben Latenz von ca. einer Sekunde auf.

## 4 Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Duftstoffe waren schon hunderte Jahre vor Christi Geburt in China und Südostasien als Gewürze in Gebrauch. Auch in Europa wird Thymian seit Jahrhunderten als Gewürz und in der traditionellen Medizin – unter anderem bei Atemwegsinfekten – eingesetzt. Seine antimikrobiellen Eigenschaften sind hauptsächlich auf den Bestandteil Thymol zurückzuführen. Ein weiterer bekannter Duftstoff mit antiseptischen Eigenschaften ist das Eugenol, Hauptbestandteil (90 %) von Nelken- und Muskatnussöl [81]. Bis zum 18. Jahrhundert wurden Nelken und Muskat nur in den Molukken (daher auch Gewürzinseln genannt) angebaut, später auch in vielen Gegenden ähnlichen Klimas, was, gemeinsam mit der Weiterentwicklung des Warenverkehrs, zu ihrer weiten Verbreitung beitrug. Jedoch sind Eugenol und andere Duftstoffe nicht nur Bestandteil von Gewürzen, sondern auch in den meisten Kosmetika, Parfüms, Waschmitteln, Deodorants, Zigaretten usw. enthalten. Diese Beispiele zeigen, dass wir Duftstoffen – die seit der Mitte des 20. Jahrhunderts hauptsächlich synthetisch und in großen Mengen hergestellt werden – ständig und in z. T. nicht unerheblichem Umfang ausgesetzt sind. Diese Exposition ruft nicht nur Allergien hervor [82], sondern könnte auch die Funktion von Spermien [61, 83] und des Darms beeinflussen: In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Duftstoffe mit olfaktorischen Rezeptoren interagieren, welche von humanen EC-Zellen im Dünndarm – die über Serotonin intestinale Elementarfunktionen steuern – exprimiert werden. Dass Duftstoffe Einfluss auf die Darmtätigkeit nehmen, wird in der europäischen Medizin auf empirischer Basis schon lange postuliert. Der Arzt und Pharmakologe PEDANIOS DIOSKURIDES (1. Jhd. n. Chr.) empfiehlt Thymianwein als „gutes Mittel gegen schlechte Verdauung, Appetitlosigkeit, Dysenterie“ [84]; als weiteres Beispiel sei der deutsche Arzt und Botaniker LEONHART FUCHS (1501–1566) zitiert, der in seinem einflussreichen „Kreüterbuch“ über den Thymian (sich auf GALEN berufend) zu berichten weiß: „Thymus [. . .] viscera potus expurgat“ [85].

Aus früheren Untersuchungen wurde abgeleitet, dass die EC-Zellen als Sensorzellen auf mechanische Stimuli oder Nahrungsbestandteile wie Glukose oder Fettsäuren mit der Sekretion von Serotonin antworten [9, 10, 39–42]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass zusätzlich auch Duftstoffe zur Freisetzung von Serotonin führen, welches den sensorischen Teil des enterischen Nervensystems [86, 87] und, über Inter- und Motoneurone, Darmmotilität und Chloridsekretion der Enterozyten stimuliert [42, 43, 45]. Störungen in diesen Signalübertragungswegen können entweder zu Obstipation oder Diarrhoe führen.

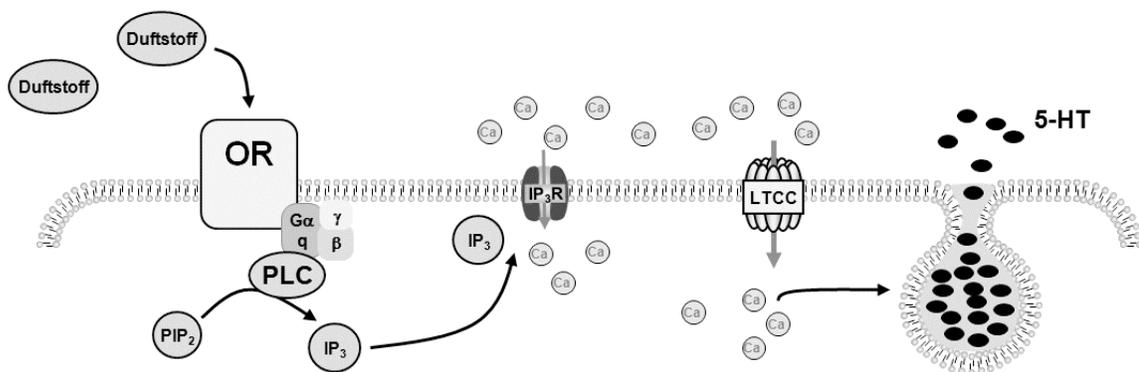
Die in dieser Arbeit für funktionelle Messungen verwendeten Duftstoffkonzentrationen liegen höher als die Konzentrationen, die – in flüchtigem Zustand appliziert – zur Stimulation von mit einzelnen ORs transfizierten HEK-Zellen eingesetzt wurden [59], sind jedoch den wässrigen Lösungen ähnlich, die zur Stimulation olfaktorischer Neurone eingesetzt wurden (z. B. [58, 64]). Alle hier verwendeten Duftstoffe riefen bereits bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  deutliche Antworten hervor (vgl. z. B. Tab. 3.1). Dies entspricht der 100-fachen halbmaximalen Konzentration, in der Thymol die Darmmotilität beeinflussen soll [88]; bei der hier zitierten Studie wurde thymolhaltiges ätherisches Öl aus Pflanzen gewonnen und dessen Wirksamkeit auf das Jejunum von Kaninchen untersucht. Die hier wirksamen Konzentrationen können sicherlich kaum direkt auf die Calcium-Imaging-Experimente mit menschlichen BON-Zellen übertragen werden, zumal bei den Calcium-Imaging-Experimenten nie genau vorhersagbar sein dürfte, welche Fraktion der Pippettenkonzentration der verwendeten Duftstoffe bei den Zellen ankommt, da sich ein gewisser Verdünnungseffekt durch das Medium in der Messkammer nie umgehen lässt.

Thymol wird beim Menschen rasch metabolisiert (glucuronidiert und sulfatiert) [89], woraus man schließen kann, dass es auch rasch aufgenommen wird und wahrscheinlich im oberen Gastrointestinaltrakt wirkt. Leider liegen keine Studien zur Konzentration von Duftstoffen im Gastrointestinaltrakt nach oraler Aufnahme vor; Eugenol und andere Terpene könnten möglicherweise auch durch perkutane Absorption und Inhalation in den Körper gelangen und schließlich die EC-Zellen erreichen [90, 91].

Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Bindung von Duftstoffen an die in EC-Zellen identifizierten olfaktorischen Rezeptoren OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210 beruht auf einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär und nicht auf aus intrazellulären Speichern freigesetztem  $\text{Ca}^{2+}$ . Wichtige Komponenten in diesem Signalübertragungsweg, wie die funktionellen Untersuchungen mit Thapsigargin, U73122 und Xestospongine C zeigen, sind offenbar Phospholipase C, der  $\text{IP}_3$ -Rezeptor und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ; alle genannten Komponenten des Signalweges können durch pharmakologische Inhibitoren gezielt inhibiert werden. Die Beteiligung von Phospholipase C,  $\text{IP}_3$ -Rezeptor und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ in der olfaktorischen Signaltransduktion wurde auch in olfaktorischen Neuronen gezeigt (vgl. [68, 69]). Anzumerken bleibt, dass aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Zellstruktur in der „kompakten“ EC-Zelle die Komponenten der Signalübertragung wie Rezeptoren, Second messenger und Transmitterstoffe in engerer räumlicher Beziehung lokalisiert sind als in den mit langen

Zellfortsätzen ausgestatteten Riechensensoren, z. B. finden sich in letzteren die Rezeptoren im Zellkörper, die Transmittervesikel weit entfernt im Axonende (vgl. 1.3.3, [67]).

Ein auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierendes Modell der olfaktorischen Signalübertragung in EC-Zellen zeigt zusammenfassend **Abb. 4.1**: Nach Bindung eines Duftstoffs an einen passenden olfaktorischen Rezeptor auf der Plasmamembran wird über Aktivierung der Phospholipase C  $IP_3$  gebildet;  $IP_3$  aktiviert  $IP_3$ -Rezeptoren. Aufgrund der Wirkung des  $IP_3$ -Rezeptor-Blockers Xestospongin C und der Auslösung von  $Ca^{2+}$ -Signalen auch nach der Entleerung intrazellulärer  $Ca^{2+}$ -Speicher durch Thapsigargin wird eine Lokalisation der  $IP_3$ -Rezeptoren in der Plasmamembran postuliert [92]. Der über die  $IP_3$ -Rezeptoren vermittelte  $Ca^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum könnte der Trigger zur Aktivierung der L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (LTCC) sein. Ob hierbei jedoch weitere Schritte in der Signalübertragung zwischengeschaltet sind, bleibt in zukünftigen Untersuchungen zu klären. Ergebnis der intrazellulären Signalübertragung ist in jedem Fall ein Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration, der zur exozytotischen Freisetzung von Serotonin aus der EC-Zelle führt.



**Abb. 4.1:** Auf den Ergebnissen dieser Arbeit basierendes Modell der olfaktorischen Signalübertragung in enterochromaffinen Zellen (Einzelheiten siehe Text).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten erste Hinweise auf neue Wege in der pharmakologischen Beeinflussung intestinaler Störungen mit pathophysiologischem Stellenwert der EC-Zellen geben. Eine häufige solche Störung mit Dysfunktion der enterischen Serotonin-Signalübertragung ist das Reizdarmsyndrom, das mit Schmerzen, Diarrhoe und Obstipation einhergeht. Klinische Studien haben gezeigt, dass der Effekt des von EC-Zellen sezernierten

Serotonins auf Rezeptorebene modifiziert werden kann: Während der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonist Tegaserod zur Behandlung des Reizdarmsyndroms mit vorherrschender Obstipationskomponente eingesetzt wird, dient der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonist Alosteron zur Diarrhoebekämpfung [53, 93]. Nach der Freisetzung aus den EC-Zellen wird das Serotoninsignal durch Aufnahme mittels SERTs in benachbarte Enterozyten noch in der Darmschleimhaut terminiert [48]. Inhibitoren plasmalemmaler Serotonintransporter wie z. B. trizyklische Antidepressiva beeinflussen auch die Darmmotilität [50]. Neue Ansätze zur Therapie des Reizdarmsyndroms könnten auch Pharmaka umfassen, die die Speicherung und Freisetzung von Serotonin durch EC-Zellen beeinflussen. In diesem Zusammenhang sollte der Hinweis nicht fehlen, dass bereits in einer der ersten Studien über die EC-Zellfunktion die Serotoninspeicherung durch Reserpin mit dem Angriffspunkt des vesikulären Serotonintransports durch VMAT1 in EC-Zellen blockiert wurde [9]. Die neuesten Forschungsergebnisse stützen das Konzept vom Diarrhoe- und obstipationsgeprägten Reizdarmsyndrom als Störung in der Freisetzung bzw. Aufnahme von Serotonin durch EC-Zellen bzw. Enterozyten der Darmschleimhaut [94].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern nicht nur eine physiologische Erklärung für die Wirkung von Gewürzen auf den Magen-Darm-Trakt, sondern zeigen auch die Möglichkeit auf, dass olfaktorische Rezeptoren der intestinalen EC-Zelle als relativ gut zugängliche Ziele zur pharmakologischen Therapie z. B. des Reizdarmsyndroms, von Erbrechen und Diarrhoe im Rahmen antineoplastischer Therapie und anderer gastrointestinaler Störungen sein könnten. Zwar ist derzeit nur das Ligandenprofil eines halben Dutzends der 339 menschlichen ORs bekannt [57–62, 64], jedoch werden viele weitere Liganden und Antagonisten in Kürze identifiziert werden, da auf diesem Forschungsgebiet gerade große Fortschritte gemacht werden. Sie könnten als wertvolle Werkzeuge zur Beeinflussung der EC-Zellfunktion und somit als potente Pharmaka zur Behandlung gastrointestinaler Funktionsstörungen dienen.

## 5 Zusammenfassung

### Hintergrund und Ziele der Arbeit

Die Freisetzung von Serotonin aus enterochromaffinen (EC-)Zellen der Darmschleimhaut ist das Schlüsselereignis bei der Regulation der enterischen Motilität und Sekretion. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob nasale olfaktorische Rezeptoren auch in EC-Zellen der menschlichen Darmschleimhaut exprimiert werden, und ob deren Liganden – Duftstoffe und Gewürze – hier eine Serotoninfreisetzung bewirken können.

### Methoden

Die Expression der olfaktorischen Rezeptoren wurde durch RT-PCR in mittels Laser-assistierter Mikrodissektion gewonnenen humanen EC-Zellen, in humanen Dünndarmbiopsaten sowie in einer von humanen EC-Zellen abstammenden Karzinoidzelllinie (BON) analysiert. Die Aktivierung von EC-Zellen durch Duftstoffe wurde durch digitales Fluoreszenz-Imaging mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Farbstoff Fluo-4 untersucht. Die Serotoninfreisetzung wurde im Zellkulturüberstand durch Serotonin-ELISA sowie mittels Amperometrie unter Verwendung von direkt auf Einzelzellen platzierten Carbonfaser-Mikroelektroden gemessen.

### Ergebnisse

Es wurden vier olfaktorische Rezeptoren (OR73, hOR17-7/11, OR1G1 und hOR17-210) in mikrodisssektierten humanen EC-Zellen, Dünndarmbiopsaten und der Karzinoidzelllinie (BON) exprimiert gefunden. Die hierauf durchgeführten funktionellen Untersuchungen ergaben, dass die Liganden der identifizierten olfaktorischen Rezeptoren einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, eine Anhebung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels und eine nachfolgende Serotoninfreisetzung aus den Zellen bewirken.

### Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass Duftstoffe und Gewürze im luminalen Kompartiment des menschlichen Gastrointestinaltrakts über die Stimulation von olfaktorischen Rezeptoren auch in vivo eine Serotoninfreisetzung aus EC-Zellen bewirken könnten. Da Serotonin als wichtigster Regulator von Darmmotilität und -sekretion fungiert und

pathophysiologisch eine wesentliche Rolle u. a. bei Erbrechen, Diarrhoe und dem Reizdarmsyndrom spielt, könnten die in dieser Arbeit erstmals beschriebenen intestinalen olfaktorischen Rezeptoren mögliche neue Ziele in der Pharmakotherapie von Erkrankungen und Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Persönliche Mitteilung v. Prof. Dr. C. M. TOWNSEND, Galveston, USA, Email v. 05.08.2005.
2. SCHÄFERMEYER, A., ZANNER, R., GRATZL, M., SACHS, G., PRINZ, C. Characterization of enterochromaffin cells isolated from the rat ileum. In: BORGES, R. Cell biology of the chromaffin cell. La Laguna und Madrid 2004.
3. SCHÄFERMEYER, A., GRATZL, M., RAD, R., DOSSUMBEKOVA, A., SACHS, G., PRINZ, C. Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells. *Acta Physiol Scand* 2004;182:53-62.
4. GRUBE, D. The endocrine cells of the gastrointestinal epithelium and the metabolism of biogenic amines in the gastrointestinal tract. *Prog Histochem Cytochem* 1976;8:1-128.
5. MODLIN, I. M., SHAPIRO, M. D., KIDD, M. Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. *Hum Pathol* 2004;35:1440-1451.
6. VIALLI M., ERSPAMER, V. Ricerche sul secreto delle cellule enterochromaffini. Nota I-VI, IX. *Boll Soc Med Chir* 1937.
7. ERSPAMER, V., ASERO, B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 1952;169:800-801.
8. LEMBECK, F., HELD, H. Serotonin release from isolated granules of enterochromaffin cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1966;253:409-420.
9. BÜLBRING, E., CREMA, A. The action of 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxytryptophan and reserpine on intestinal peristalsis in anaesthetized guinea-pigs. *J Physiol* 1959;146:29-53.
10. BÜLBRING, E., CREMA, A. The release of 5-hydroxytryptamine in relation to pressure exerted on the intestinal mucosa. *J Physiol* 1959;146:18-28.

11. BEUBLER, E., KOLLAR, G., SARIA, A., BUKHAVE, K., RASK-MADSEN, J. Involvement of 5-hydroxytryptamine, prostaglandin E<sub>2</sub>, and cyclic adenosine monophosphate in cholera toxin-induced fluid secretion in the small intestine of the rat in vivo. *Gastroenterology* 1989;96:368-376.
12. RACKÉ, K., REIMANN, A., SCHWÖRER, H., KILBINGER, H. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behav Brain Res* 1996;73:83-87.
13. RACKÉ, K., SCHWÖRER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. *Pharmacol Res* 1991;23:13-25.
14. RACKÉ, K., SCHWÖRER, H. Nicotinic and muscarinic modulation of 5-hydroxytryptamine (5-HT) release from porcine and canine small intestine. *Clin Investig* 1992;70:190-200.
15. RACKÉ, K., SCHWÖRER, H. Characterization of the role of calcium and sodium channels in the stimulus secretion coupling of 5-hydroxytryptamine release from porcine enterochromaffin cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993;347:1-8.
16. RACKÉ, K., SCHWÖRER, H., AGOSTON, D. V., KILBINGER, H. Evidence that neuronally released vasoactive intestinal polypeptide inhibits the release of serotonin from enterochromaffin cells of the guinea pig small intestine. *Acta Endocrinol* 1991;124:203-207.
17. RACKÉ, K., SCHWÖRER, H., KILBINGER, H. Adrenergic modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the vascularly perfused ileum of the guinea-pig. *Br J Pharmacol* 1988;95:923-931.
18. SCHWÖRER, H., RACKÉ, K., KILBINGER, H. GABA receptors are involved in the modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the vascularly perfused small intestine of the guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 1989;165:29-37.
19. SCHWÖRER, H., RACKÉ, K., KILBINGER, H. Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the release of serotonin from the in vitro vascularly perfused small intestine of guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;339:540-545.

20. SCHWÖRER, H., RACKÉ, K., KILBINGER, H. Characterization of the muscarine receptors involved in the modulation of serotonin release from the vascularly perfused small intestine of guinea pig. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;339:263-267.
21. SCHWÖRER, H., RACKÉ, K., KILBINGER, H. Cisplatin increases the release of 5-hydroxytryptamine (5-HT) from the isolated vascularly perfused small intestine of the guinea-pig: involvement of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1991;344:143-149.
22. SCHWÖRER, H., RAMADORI, G. Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;357:548-552.
23. SCHWÖRER, H., REIMANN, A., RAMADORI, G., RACKÉ, K. Characterization of histamine H<sub>3</sub> receptors inhibiting 5-HT release from porcine enterochromaffin cells: further evidence for H<sub>3</sub> receptor heterogeneity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994;350:375-379.
24. WADE, P. R., WESTFALL, J. A. Ultrastructure of enterochromaffin cells and associated neural and vascular elements in the mouse duodenum. *Cell Tissue Res* 1985;241:557-563.
25. NILSSON, O., AHLMAN, H., GEFFARD, M., DAHLSTROM, A., ERICSON, L. E. Bipolarity of duodenal enterochromaffin cells in the rat. *Cell Tissue Res* 1987;248:49-54.
26. NILSSON, O., ERICSON, L. E., DAHLSTROM, A., EKHOLM, R., STEINBUSCH, H. W., AHLMAN, H. Subcellular localization of serotonin immunoreactivity in rat enterochromaffin cells. *Histochemistry* 1985;82:351-355.
27. PETER, D., LIU, Y., STERNINI, C., DE GIORGIO, R., BRECHA, N., EDWARDS, R. H. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 1995;15:6179-6188.
28. ERSPAMER, V. Occurrence of indolealkylamines in nature. In: EICHLER, O., FARAH, A. *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. Berlin 1966.
29. JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J., KELLEY, R. O. *Histologie*. Hrsg. v. M. GRATZL. Berlin, Heidelberg und New York 2004.

30. EVERS, B. M., ISHIZUKA, J., TOWNSEND, C. M., JR., THOMPSON, J. C. The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 1994;733:393-406.
31. PAREKH, D., ISHIZUKA, J., TOWNSEND, C. M., JR., HABER, B., BEAUCHAMP, R. D., KARP, G., KIM, S. W., RAJARAMAN, S., GREELEY, G., JR., THOMPSON, J. C. Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* 1994;9:83-90.
32. TRAN, V. S., MARION-AUDIBERT, A. M., KARATEKIN, E., HUET, S., CRIBIER, S., GUILLAUMIE, K., CHAPUIS, C., DESNOS, C., DARCHEN, F., HENRY, J. P. Serotonin secretion by human carcinoid BON cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1014:179-188.
33. CHRISTOFI, F. L., KIM, M., WUNDERLICH, J. E., XUE, J., SUNTRES, Z., CARDOUNEL, A., JAVED, N. H., YU, J. G., GRANTS, I., COOKE, H. J. Endogenous adenosine differentially modulates 5-hydroxytryptamine release from a human enterochromaffin cell model. *Gastroenterology* 2004;127:188-202.
34. CUBEDDU, L. X., BONISCH, H., GOTHERT, M., MOLDERINGS, G., RACKE, K., RAMADORI, G., MILLER, K. J., SCHWORER, H. Effects of metformin on intestinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) release and on 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361:85-91.
35. ISHIZUKA, J., HSIEH, A. C., TOWNSEND, C. M., JR., THOMPSON, J. C. Effect of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist (ondansetron) on functioning human pancreatic carcinoid cells. *Surg Oncol* 1993;2:221-225.
36. JOHN, M., WIEDENMANN, B., KRUIHOFFER, M., ADERMANN, K., ANKORINA-STARK, I., SCHLATTER, E., AHNERT-HILGER, G., FORSSMANN, W. G., KUHN, M. Guanylin stimulates regulated secretion from human neuroendocrine pancreatic cells. *Gastroenterology* 1998;114:791-797.
37. LAWRENCE, J. P., ISHIZUKA, J., HABER, B., TOWNSEND, C. M., JR., THOMPSON, J. C. The effect of somatostatin on 5-hydroxytryptamine release from a carcinoid tumor. *Surgery* 1990;108:1131-1135.
38. LEMMER, K., AHNERT-HILGER, G., HOPFNER, M., HOEGERLE, S., FAISS, S., GRABOWSKI, P., JOCKERS-SCHERUBL, M., RIECKEN, E. O., ZEITZ, M., SCHERUBL, H. Expression of dopamine receptors and transporter in neuroendocrine gastrointestinal tumor cells. *Life Sci* 2002;71:667-678.
-

39. KIM, M., JAVED, N. H., YU, J. G., CHRISTOFI, F., COOKE, H. J. Mechanical stimulation activates  $G\alpha_q$  signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J Clin Invest* 2001;108:1051-1059.
40. KIM, M., COOKE, H. J., JAVED, N. H., CAREY, H. V., CHRISTOFI, F., RAYBOULD, H. E. D-glucose releases 5-hydroxytryptamine from human BON cells as a model of enterochromaffin cells. *Gastroenterology* 2001;121:1400-1406.
41. FUKUMOTO, S., TATEWAKI, M., YAMADA, T., FUJIMIYA, M., MANTYH, C., VOSS, M., EUBANKS, S., HARRIS, M., PAPPAS, T. N., TAKAHASHI, T. Short-chain fatty acids stimulate colonic transit via intraluminal 5-HT release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;284:R1269-1276.
42. GERSHON, M. D. Plasticity in serotonin control mechanisms in the gut. *Curr Opin Pharmacol* 2003;3:600-607.
43. GERSHON, M. D. Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13 Suppl 2:15-30.
44. BUDHOO, M. R., HARRIS, R. P., KELLUM, J. M. The role of the 5-HT<sub>4</sub> receptor in Cl<sup>-</sup> secretion in human jejunal mucosa. *Eur J Pharmacol* 1996;314:109-114.
45. KELLUM, J. M., ALBUQUERQUE, F. C., STONER, M. C., HARRIS, R. P. Stroking human jejunal mucosa induces 5-HT release and Cl<sup>-</sup> secretion via afferent neurons and 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Am J Physiol* 1999;277:G515-520.
46. COATES, M. D., MAHONEY, C. R., LINDEN, D. R., SAMPSON, J. E., CHEN, J., BLASZYK, H., CROWELL, M. D., SHARKEY, K. A., GERSHON, M. D., MAWE, G. M., MOSES, P. L. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004;126:1657-1664.
47. FRIED, M., BEGLINGER, C., BOBALJ, N. G., MINOR, N., COELLO, N., MICHETTI, P. Tegaserod is safe, well tolerated and effective in the treatment of patients with non-diarrhoea irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:421-427.

48. GERSHON, M. D. Serotonin receptors and transporters – roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl 7:3-14.
49. CASTLE, M. Z., SILK, D. B., LIBBY, G. W. The rationale for antidepressant therapy in functional gastrointestinal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:969-979.
50. GORARD, D. A., LIBBY, G. W., FARTHING, M. J. Effect of a tricyclic antidepressant on small intestinal motility in health and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1995;40:86-95.
51. GORARD, D. A., LIBBY, G. W., FARTHING, M. J. Influence of antidepressants on whole gut and oro-caecal transit times in health and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8:159-166.
52. GORARD, D. A., LIBBY, G. W., FARTHING, M. J. Treating functional gastrointestinal disorders with antidepressants. *Am J Med* 2000;108:756.
53. MERTZ, H. Psychotherapeutics and serotonin agonists and antagonists. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:S247-250.
54. BUCK, L. B. A novel multigene family may encode odorant receptors. *Soc Gen Physiol Ser* 1992;47:39-51.
55. BUCK, L. B. The olfactory multigene family. *Curr Opin Neurobiol* 1992;2:282-288.
56. MALNIC, B., GODFREY, P. A., BUCK, L. B. The human olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:2584-2589.
57. MATARAZZO, V., CLOT-FAYBESSE, O., MARCET, B., GUIRAUDIE-CAPRAZ, G., ATANASOVA, B., DEVAUCHELLE, G., CERUTTI, M., ETIEVANT, P., RONIN, C. Functional characterization of two human olfactory receptors expressed in the baculovirus Sf9 insect cell system. *Chem Senses* 2005;30:195-207.
58. OKA, Y., OMURA, M., KATAOKA, H., TOUHARA, K. Olfactory receptor antagonism between odorants. *Embo J* 2004;23:120-126.
-

59. SANZ, G., SCHLEGEL, C., PERNOLLET, J. C., BRIAND, L. Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. *Chem Senses* 2005;30:69-80.
60. SHIROKOVA, E., SCHMIEDEBERG, K., BEDNER, P., NIESSEN, H., WILLECKE, K., RAGUSE, J. D., MEYERHOF, W., KRAUTWURST, D. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem* 2005;280:11807-11815.
61. SPEHR, M., GISSELMANN, G., POPLAWSKI, A., RIFFELL, J. A., WETZEL, C. H., ZIMMER, R. K., HATT, H. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 2003;299:2054-2058.
62. WETZEL, C. H., OLES, M., WELLERDIECK, C., KUCZKOWIAK, M., GISSELMANN, G., HATT, H. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci* 1999;19:7426-7433.
63. OKA, Y., NAKAMURA, A., WATANABE, H., TOUHARA, K. An odorant derivative as an antagonist for an olfactory receptor. *Chem Senses* 2004;29:815-822.
64. KAJIYA, K., INAKI, K., TANAKA, M., HAGA, T., KATAOKA, H., TOUHARA, K. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci* 2001;21:6018-6025.
65. MALNIC, B., HIRONO, J., SATO, T., BUCK, L. B. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 1999;96:713-723.
66. FIRESTEIN, S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 2001;413:211-218.
67. ELSAESSER, R., PAYSAN, J. Morituri te salutant? Olfactory signal transduction and the role of phosphoinositides. *J Neurocytol* 2005;34:97-116.
68. GAUTAM, S. H., OTSUGURO, K., ITO, S., SAITO, T., HABARA, Y. Intensity of odorant stimulation affects mode of  $Ca^{2+}$  dynamics in rat olfactory receptor neurons. *Neurosci Res* 2006;55:410-420.

69. LIU, G., BADEAU, R. M., TANIMURA, A., TALAMO, B. R. Odorant receptors directly activate phospholipase C/inositol-1,4,5-trisphosphate coupled to calcium influx in *Odora* cells. *J Neurochem* 2006;96:1591-1605.
70. FRUNGIERI, M. B., WEIDINGER, S., MEINEKE, V., KOHN, F. M., MAYERHOFER, A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR<sub>2</sub>, COX<sub>2</sub>, prostaglandins, and PPAR<sub>γ</sub> : Possible relevance to human fibrotic disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15072-15077.
71. CRONIN, M., PHO, M., DUTTA, D., STEPHANS, J. C., SHAK, S., KIEFER, M. C., ESTEBAN, J. M., BAKER, J. B. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol* 2004;164:35-42.
72. VANDERHAEGHEN, P., SCHURMANS, S., VASSART, G., PARMENTIER, M. Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics* 1997;39:239-246.
73. CAHILL, P. S., WALKER, Q. D., FINNEGAN, J. M., MICKELSON, G. E., TRAVIS, E. R., WIGHTMAN, R. M. Microelectrodes for the measurement of catecholamines in biological systems. *Anal Chem* 1996;68:3180-3186.
74. KAWAGOE, K. T., ZIMMERMAN, J. B., WIGHTMAN, R. M. Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* 1993;48:225-240.
75. SEGURA, F., BRIOSO, M. A., GOMEZ, J. F., MACHADO, J. D., BORGES, R. Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J Neurosci Methods* 2000;103:151-156.
76. GOMEZ, J. F., BRIOSO, M. A., MACHADO, J. D., SANCHEZ, J. L., BORGES, R. New approaches for analysis of amperometrical recordings. *Ann N Y Acad Sci* 2002;971:647-654.
77. GLASSMEIER, G., STRUBING, C., RIECKEN, E. O., BUHR, H., NEUHAUS, P., AHNERT-HILGER, G., WIEDENMANN, B., SCHERUBL, H. Electrophysiological properties of human carcinoid cells of the gut. *Gastroenterology* 1997;113:90-100.

78. LOMAX, R. B., GALLEGRO, S., NOVALBOS, J., GARCIA, A. G., WARHURST, G. L-Type calcium channels in enterochromaffin cells from guinea pig and human duodenal crypts: an in situ study. *Gastroenterology* 1999;117:1363-1369.
79. GAFNI, J., MUNSCH, J. A., LAM, T. H., CATLIN, M. C., COSTA, L. G., MOLINSKI, T. F., PESSAH, I. N. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 1997;19:723-733.
80. TA, T. A., FENG, W., MOLINSKI, T. F., PESSAH, I. N. Hydroxylated xestospongins block inositol-1,4,5-trisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  release and sensitize  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release mediated by ryanodine receptors. *Mol Pharmacol* 2006;69:532-538.
81. DORMAN, H. J. D., FIGUEIREDO, AC, BARROSO, JG, DEANS, SG. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. *Flavour Fragr J* 2000;15:12-16.
82. JOHANSEN, J. D. Fragrance contact allergy: a clinical review. *Am J Clin Dermatol* 2003;4:789-798.
83. SPEHR, M., HATT, H. hOR17-4 as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 2004;17:165-171.
84. DIOSKURIDES, P. Des Pedanios Dioskurides aus Anazarbos Arzneimittellehre in fünf Büchern, übersetzt und mit Erklärungen versehen von J. BERENDES. Stuttgart 1902; S. 499.
85. FUCHS, L. De historia stirpium. Basel 1542; S. 826.
86. CHEN, J. J., LI, Z., PAN, H., MURPHY, D. L., TAMIR, H., KOESELL, H., GERSHON, M. D. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 2001;21:6348-6361.
87. SIDHU, M., COOKE, H. J. Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 1995;269:G346-351.
88. ASTUDILLO, A., HONG, E., BYE, R., NAVARRETE, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytother Res* 2004;18:102-106.
-

89. TAKADA, M., AGATA, I., SAKAMOTO, M., YAGI, N., HAYASHI, N. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *J Toxicol Sci* 1979;4:341-350.
90. FALK-FILIPSSON, A., LOF, A., HAGBERG, M., HJELM, E. W., WANG, Z. d-limonene exposure to humans by inhalation: uptake, distribution, elimination, and effects on the pulmonary function. *J Toxicol Environ Health* 1993;38:77-88.
91. ZHAO, K., SINGH, J. Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: eugenol, D-limonene and menthone. *J Control Release* 1998;55:253-260.
92. KANKI, H., KINOSHITA, M., AKAIKE, A., SATOH, M., MORI, Y., KANEKO, S. Activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for the opening of mouse TRP5 channels. *Mol Pharmacol* 2001;60:989-998.
93. FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* 2003;111:931-943.
94. ATKINSON, W., LOCKHART, S., WHORWELL, P. J., KEEVIL, B., HOUGHTON, L. A. Altered 5-hydroxytryptamine signaling in patients with constipation- and diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2006;130:34-43.

### **Abbildungsnachweis**

Der Abdruck der Abbildungen 1.1 und 1.2 erfolgt mit freundlicher Genehmigung der jeweiligen Urheberrechts- bzw. Copyright-Inhaber:

Abb. 1.1: Prof. Dr. med. Manfred GRATZL, München

Abb. 1.2: Nature Publishing Group, Washington, D. C. (USA)

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Thomas Christian Braun

Geburtsdatum und -ort: 11.11.1981, Augsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

### Schulbildung

---

09/1988–07/1992 Friedrich-Ebert-Grundschule, Augsburg

09/1992–06/2001 Gymnasium bei St. Anna, Augsburg, Europäischer Zweig

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife,  
Durchschnittsnote 1,0

### Hochschulbildung

---

10/2001–04/2002 Aufnahme des Studiums der Zahnheilkunde  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

04/2002 Wechsel zum Studium der Humanmedizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

03/2004 Ärztliche Vorprüfung, Durchschnittsnote 2,0

04-05/2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,  
Durchschnittsnote 1,0

**Famulaturen**

---

03/2005, 03–04/2006, 10/2006	3. Medizinische Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Diabetologie (Direktor: Prof. Dr. med. E. Standl), Städtisches Krankenhaus München-Schwabing
09/2006	Praxis für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde Prof. Dr. med. G. Grevers und Dr. med. M. Stock, Starnberg

**Praktisches Jahr**

---

02–06/2007	Klinik für Neurochirurgie (Direktor: Dr. med. D. Sackerer), Klinik für Unfallchirurgie, Orthopädie und Zentrale Notaufnahme (Direktor: Dr. med. E. F. J. Höcherl), Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. H. Waldner), Städtisches Krankenhaus München-Schwabing
06–10/2007	Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. W. Doering), Städtisches Krankenhaus München-Schwabing
10/2007–01/2008	Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

**Promotion**

---

seit 08/2004	Doktorand bei Prof. Dr. med. M. Gratzl (Vorstand des Anatomischen Instituts am Biederstein der Ludwig-Maximilians-Universität München)
--------------	--

## Förderung und Auszeichnungen

---

11/2000	2. Preis im Landeswettbewerb Alte Sprachen der Elisabeth-J.-Saal-Stiftung
06/2001	Förderpreisträger der Societas Annensis e. V.
07/2001	1. Preis im Literaturwettbewerb des Archivs für Literatur aus Schwaben der Universität Augsburg
10/2001–12/2007	Stipendiat des Freistaats Bayern nach dem Bayerischen Begabtenförderungsgesetz
08/2004–08/2005	Förderung der Promotion durch die Deutsche Forschungs- gemeinschaft als Mitglied des Graduiertenkollegs „Biology of Human Diseases“
11/2007	Auszeichnung der im Rahmen der Promotion entstandenen Originalarbeit mit dem Sebastian-Kneipp-Forschungspreis 2007

## Berufstätigkeit

---

seit 06/2008	Wissenschaftlicher Assistent an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians- Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)
--------------	---

## 8 Eigene Veröffentlichungen

### Originalarbeiten

---

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. Enterochromaffin cells, sensors for spices and odorants. *Gastroenterology* 2007;132(5):1890-1901.

VOLAND, P., BESIG, S., RAD, R., BRAUN, T., BAUR, D. M., PERREN, A., LANGER, R., HÖFLER, H., PRINZ, C. Correlation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase expression in ileal carcinoids, lymph nodes and liver metastasis with prognosis and survival. *Neuroendocrinology* 2009;89(1):66-78.

### Kongressbeiträge

---

VOLAND, P., BESIG, S., RAD, R., SCHMID, R. M., BRAUN, T., GRATZL, M., PRINZ, C. Expression von Matrix-metalloproteinasen (MMPs), TIMPs und  $\beta$ -Integrinen in EC-Zell-Karzinoiden des Gastrointestinaltrakts. 61. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, Hannover, 13.–16. September 2006.

Abstract erschienen in: *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2006;44(08).

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. Expression of functional olfactory receptors in the human gastrointestinal tract. Keystone-Symposium „Chemical Senses: From Genes to Perception“, Snowbird, Utah (USA), 21.–25. Januar 2007.

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. Olfactory receptors on human intestinal enterochromaffin (EC) cells function as sensors for spices and odorants. Digestive Disease Week 2007, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), American Gastroenterological Association (AGA), American Society for Gastrointestinal Endoscopy (ASGE), Society for Surgery of the Alimentary Tract (SSAT), Washington, D. C. (USA), 19.–24. Mai 2007.

GRATZL, M., BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C. Enterochromaffin cells of the human gut, sensors for luminal substances. 18. Kongress der Bulgarischen Anatomischen Gesellschaft, Stara Zagora, Bulgarien, 01.–03. Juni 2007.

Abstract erschienen in: *Trakia Journal of Sciences* 2007;5(1).

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. Odorant sensing by human enterochromaffin cells. 14<sup>th</sup> International Symposium on Chromaffin Cell Biology, Sestri Levante, Italien, 11.–15. Oktober 2007.

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. Serotonin release and signaling in enterochromaffin cells of the human gastrointestinal tract. Keystone-Symposium „Neuronal Mechanisms Controlling Food Intake, Glucose Metabolism and Body Weight“, Banff, Alberta (Kanada), 19.–24. Februar 2008.

BRAUN, T., VOLAND, P., KUNZ, L., PRINZ, C., GRATZL, M. „Die Nase im Darm“: Olfaktorische Rezeptoren im menschlichen Magen-Darm-Trakt. Novembertagung der Arbeitsgemeinschaft Olfaktologie und Gustologie der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Mannheim, 28.–29. November 2008.

### **Bücher und Buchbeiträge**

---

BRAUN, T., WEBER, F. Lernkarten Physiologie. München 2005.

Braun, T., Röhler gen. Riemer, A., Weber, F. Kurzlehrbuch Physiologie. München 2006.

BRAUN, T., RÖHLER GEN. RIEMER, A., WEBER, F. Prüfungstraining Physiologie. München 2006.

BRAUN, T., WEBER, F. Anatomie. In: BUCHTA, M., SÖNNICHSEN D. (Hrsg.). Das Physikum. München 2009.

## 9 Danksagung

Mein aufrichtigster Dank gilt *Herrn Prof. Dr. med. Manfred Gratzl* für die engagierte Betreuung dieser Dissertation. Durch seine stete Bereitschaft zur Diskussion der Materie, das richtige Maß an Unterstützung und Freiraum und nicht zuletzt durch seine eigene Begeisterung an unserem Forschungsprojekt war die Anfertigung dieser Arbeit für mich lehrreich und spannend zugleich.

*Frau Dr. rer. nat. Karen Schmidt-Bäse* hat durch das von ihr betreute Graduiertenkolleg „Biology of Human Diseases“ meine Arbeit durch viele interessante Veranstaltungen, Begegnungen und Diskussionen bereichert.

Der Forschungsgruppe *Prof. Dr. med. Christian Prinz*, Klinikum rechts der Isar, München, danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit bei diesem Projekt. Besonders *Frau Dr. rer. nat. Petra Volland* hat durch ihre sorgfältige und geduldige Durchführung der in manchem Falle sehr schwierigen molekularbiologischen Untersuchungen entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

*Herr Prof. Dr. med. Artur Mayerhofer* und *Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Lars Kunz* waren kompetente Ansprechpartner in allen Fragen, letzterer besonders bei der praktischen Durchführung meiner Experimente.

*Herrn cand. med. Sebastian Reindl* danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere für seine Mitwirkung bei der gemeinsamen Etablierung der Amperometrie.

*Frau Astrid Tiefenbacher*, *Frau Gabriele Terfloth* und *Frau Marlies Rauchfuß* haben mir durch ihre exzellente technische Unterstützung den Laboralltag erleichtert.

*Frau Dr. med. vet. Ingrid Weichenmeier*, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, danke ich für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Carbonfaser-Elektrode.

Auch allen übrigen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts danke ich für die stets angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Widmen möchte ich diese Dissertation meinem verstorbenen Vater *Dr. med. dent. Richard Braun*.