

Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität  
München

# **Isolierung und funktionelle Charakterisierung der enterochromaffinen Zellen im Dünndarm**

**Agnes Schäfermeyer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauf

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. M. Gratzl, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 15.03.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.05.2005 angenommen.



---

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

*Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells.*

Schäfermeyer A, Gratzl M, Rad R, Dossumbekova A, Sachs G, Prinz C.

Acta Physiol Scand (2004) 182:53-62

*Characterization of enterochromaffin cells isolated from the rat ileum*

Schäfermeyer A, Zanner R, Gratzl M, Sachs G, Prinz C. (2004)

In Cell Biology of the Chromaffin Cell (R. Borges and L. Gandía eds.) Kapitel 26,  
pp.175-185, Instituto Teófilo Hernando, Spain

---

---

# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

I	Einleitung	1
1	Die Bedeutung von Serotonin für den menschlichen Organismus	1
2	Struktur und Funktion der enterochromaffinen Zellen	5
3	Regulation der Serotoninfreisetzung aus EC Zellen	10
4	Die Rolle von Serotonin bei verschiedenen Erkrankungen	12
5	Frühere Modelle zur Untersuchung der EC Zellen	14
6	Das Modell der isolierten EC Zellen	16
7	Zielsetzung	18
II	Material und Methoden	19
1.	Isolation und Kultur von EC Zellen und BON Zellen	19
1.1	Tiere	19
1.2	Materialien	19
1.3	Isolierung der EC Zellen	23
1.4	Kultivierung der EC Zellen	24
1.5	Kultivierung der BON Zellen	25
1.6	Kultivierung auf Deckgläsern	25
1.7	Bestimmung der Lebendzellzahl	26
2.	Identifikation der EC Zellen in der DG Fraktion	26
2.1	Immunologische Nachweise	26
2.1.1	Serotoninmessung	27
2.1.2	Immunocytochemische Nachweise	28
3.	Charakterisierung der EC und BON Zellen	32
3.1.1	Stimulation der EC Zellen	32
3.1.2	Stimulation der BON Zellen	32
3.1.3	Hemmung der Serotoninfreisetzung bei BON und EC Zellen	32
3.2	Rezeptorennachweis an den EC Zellen	33
4.	Molekularbiologische Nachweise	33
4.1	RNA Isolierung	33

---

---

4.2	Reverse Transkription	34
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
4.4	Gelelektrophorese	38
4.5	Extraktion von DNA Fragmenten	39
4.6	Genexpressionanalyse mit DNA Chip	40
4.7	Quantifizierung der Genexpression mit <i>real time</i> TaqMan PCR	43
4.7.1	Hintergrund	43
4.7.2	PCR-Verlauf – kinetische Analysen	44
4.7.3	Primer und Probes für die TaqMan PCR	47
5.	Statistik	48
<b>III Ergebnisse</b>		<b>49</b>
1.	Isolation und Primärkultur von EC Zellen	49
2.	Identifizierung der EC Zellen in der DG Fraktion	49
2.1	Serotoninmessungen	49
2.2	Identifizierung der Serotonin-positiven neuroendokrinen Zellen	51
2.3	Nachweis EC Zellen spezifischer Marker mit RT-PCR	53
2.4	Untersuchung kontaminierender Zellen	54
3.	Kultivierung der EC Zellen	55
3.1	Kulturbedingungen für EC Zellen	55
3.2	Bestimmung der Überlebensrate der Zellen	55
3.3	Detektion apoptotischer Zellen mit TUNEL Färbung	56
4.	Charakterisierung der EC Zellen	58
4.1	Rezeptorennachweis an den EC Zellen	58
4.1.1	Rezeptorennachweis mit RT-PCR	58
4.1.2	Rezeptorennachweis mit Immunofärbung	60
4.2	Stimulation der EC Zellen	61
4.3	Stimulation der BON Zellen	62
4.4	Stimulation der BON Zellen mit Bitterstoffen	63
4.5	Hemmung der Serotoninfreisetzung bei BON und EC Zellen	64
5.	TaqMan PCR Analyse	66
6.	Genexpressionanalyse mit DNA Chip	67
7.	Identifikation olfaktorischer Rezeptoren auf EC Zellen	76

---

---

IV	Diskussion	78
1.	Charakterisierung isolierter EC Zellen aus dem Ileum	78
2.	Stimulation und Hemmung der Serotoninfreisetzung aus EC Zellen und BON Zellen	85
3.	Bedeutung von Chemorezeptoren auf den EC Zellen	88
4.	Weitere bisher unentdeckte Genprodukte auf den EC Zellen	95
V	Zusammenfassung	96
VI	Literaturverzeichnis	98

---

---

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
ANOVA	Statistische Varianzanalyse
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DG	Dichtegradient
cDNA	Komplementäre DNA
DTT	Dithiothreitol
EC	Enterochromaffin
ECL	Enterochromaffin-like
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FET	Fluoreszenz-Energie Transfer
FCS	Fötale Kälberserum
GABA	Gamma-aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
HB-EGF	<i>heparin-binding epidermal growth factor</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
5-HT	5-Hydroxytryptamin
IGF	<i>insulin like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
MAO	Monoaminoxidase
min	Minuten
MUC	Mucosa
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NSF	N-ethylmaleimid sensitive Faktor
PACAP	<i>pituitary adenyl cyclase activating polypeptide</i>
PAS	p-Aminosalicylsäure
PC12	Ratten Phäocytochrom-Zellen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure

---

---

rpm	<i>rotations per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SNAP	<i>soluble NSF attachment protein</i>
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TUNEL	<i>dTdt-mediated-dUTP nick end labeling</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter

---



# I. Einleitung

## 1. Die Bedeutung von Serotonin für den menschlichen Organismus

### Übersicht

Serotonin ist ein biogenes Amin, das erstmals 1948 aus Rinderblut isoliert wurde (Page, 1976; Rapport, 1997). Durch Serotonin werden bedeutende Prozesse und Körperfunktionen reguliert (Abb.1), die in folgendem Abschnitt kurz zur Übersicht dargestellt werden.

Serotonin spielt bereits während der frühen Embryonalentwicklung als morphogenetisches Signal in der Regulation von Differenzierungsprozessen eine Rolle (Hüthner und Rüter 2000). Im Zentralnervensystem befinden sich viele Zellkörper der serotonergen Neuronen in den Raphe-Kernen im Mittelhirn. Von hier aus innervieren sie mit langen und verzweigten Projektionen das gesamte Gehirn (Baumgarten und Grozdanovic 1997).

Viele zentralnervös gesteuerte Funktionen werden dem Einfluss serotonerger Mechanismen zugeschrieben. Die wichtigsten darunter sind Appetit und Schlaf, Sexualverhalten, zirkadiane Rhythmik, motorische Aktivität, Angst, Gedächtnis, Aggression, Stressverarbeitung und die Gemütslage. Weiterhin spielen sie eine Rolle in der Blutdruckregulation, bei Erbrechen und bei der Schmerzempfindung, beispielsweise bei Migräne (Somerville, 1976). Damit entfaltet das serotonerge System im Gehirn eine globale stabilisierende Wirkung auf die neuronalen Netzwerke.

Peripher hat Serotonin eine starke Wirkung auf die glatte Muskulatur, vor allem im kardiovaskulären System, im Atmungstrakt und auf den Uterus. Im Darm ist Serotonin an der Regulation von Sekretion und Motilität beteiligt. Aus Thrombozyten wird, zusammen mit anderen Cytokinen, Serotonin bei Verletzungen und im Verlauf entzündlicher Prozesse freigesetzt.

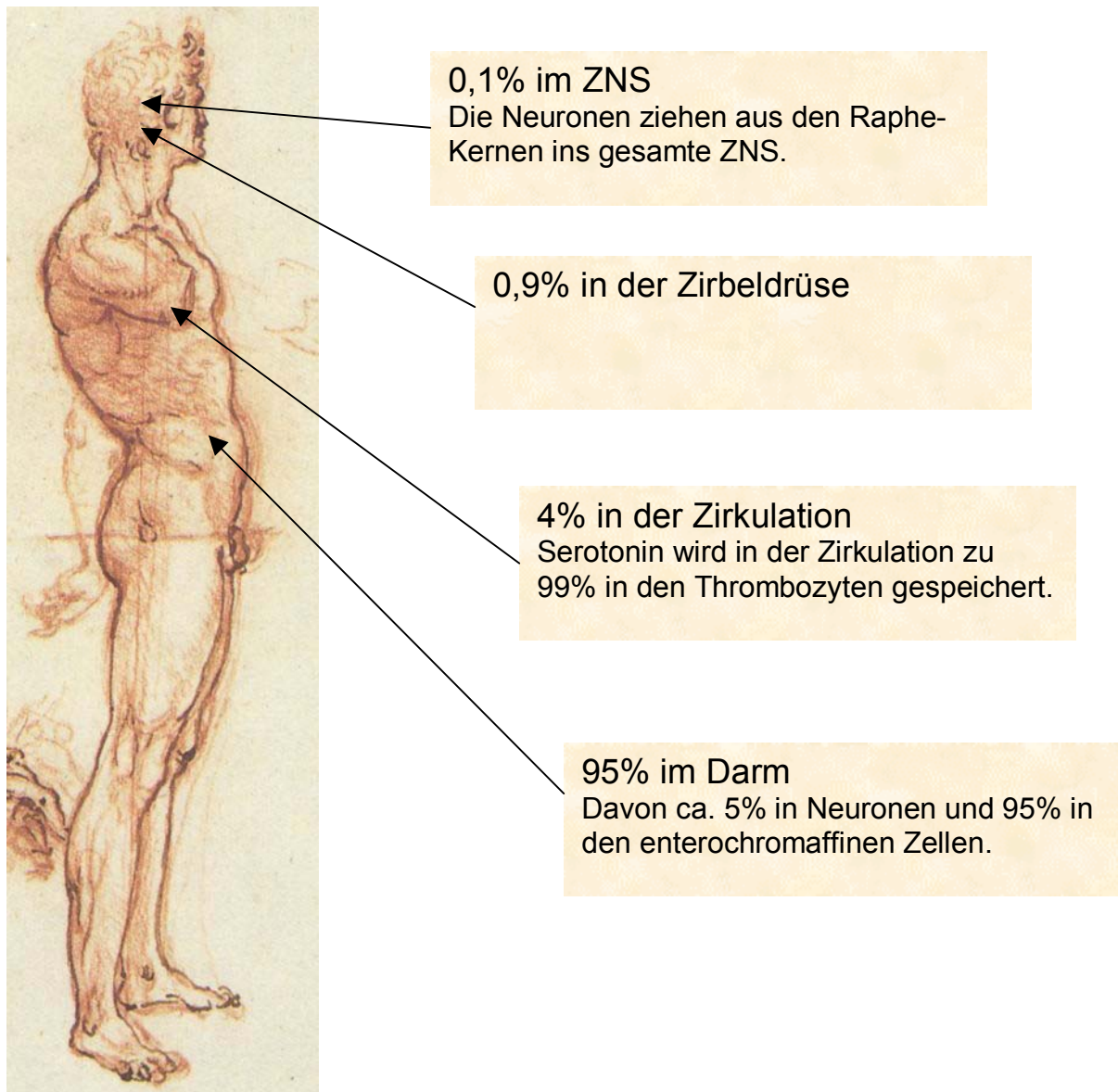


Abb. 1: Verteilung von Serotonin im menschlichen Körper

## Serotoninrezeptoren

Diese vielfältigen Wirkungen werden durch eine Reihe von Serotoninrezeptoren vermittelt, welche organ- und funktionsspezifisch im Körper verteilt sind. Zurzeit sind vierzehn Serotoninrezeptoren bekannt, welche aufgrund ihrer Gensequenz, oder intrazellulären Signalübertragung klassifiziert wurden (Hoyer et al., 1994). Manche dieser Rezeptoren haben verschiedene Subtypen und Splicevarianten. Doch selbst diese große Vielfalt an Rezeptorsubtypen ist nicht ausreichend, um das Wirkspektrum von Serotonin zu erklären. Dafür sind weitere intrazelluläre, rezeptorvermittelte biochemische Reaktionen verantwortlich (Pauwels, 2000).

Alle Rezeptoren, mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors, welcher ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, werden an die Guanin-nukleotidbindenden-Proteinen (G-Proteinen) gekoppelt und induzieren dabei sekundäre Botenstoffe, welche die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von intrazellulären Proteinen und dadurch verschiedene Zellfunktionen regulieren. Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die Klassifikation serotoninerger Rezeptoren.

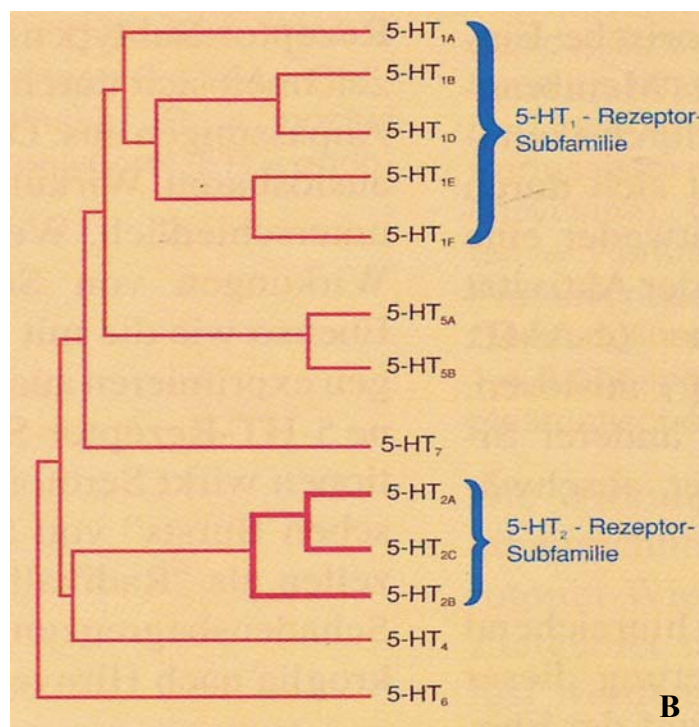
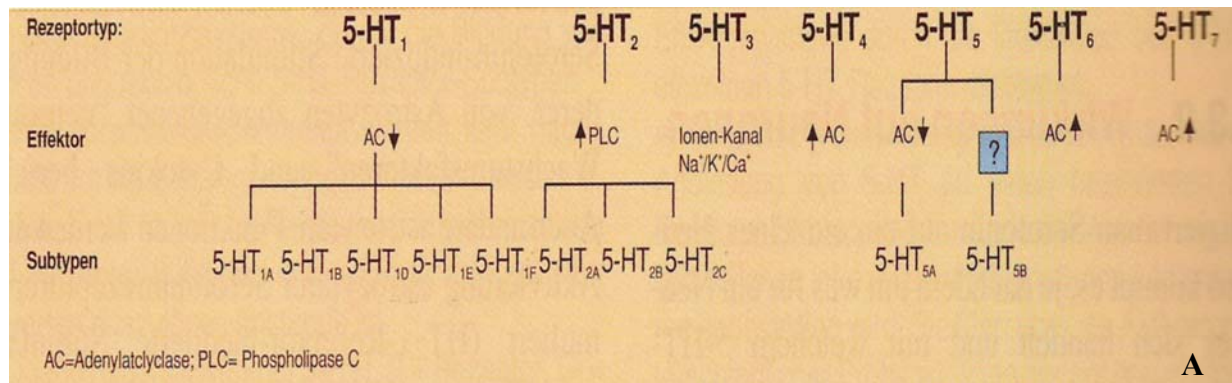


Abb.2: Klassifikation der 5-HT Rezeptoren. Üblicherweise erfolgt die Klassifikation der verschiedenen Serotonin Rezeptoren nach pharmakologischen, strukturellen und funktionellen Kriterien. Diese ursprüngliche Einteilung wurde durch eine funktionell orientierte Klassifikation ersetzt, bei der die *second messenger* Systeme als Kriterium verwendet werden (a). Nach stukturellen Gesichtspunkten lassen sich die verschiedenen Subtypen aufgrund Sequenzhomologien in ein Dendrogramm der Serotonin Rezeptor Familie einordnen (b). AC = Adenylatcyclase; PLC = Phospholipase C (Nach Hüther und Rüther 2000)

Serotonin wird aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan in den enterochromaffinen Zellen, in den Pinealozyten und in den serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne synthetisiert.

Bei der Biosynthese wird Tryptophan zuerst durch das Enzym Tryptophanhydroxylase an dem Indolring in 5-Stellung hydroxyliert. Dieser Reaktionsschritt bestimmt die Produktionsrate an gebildetem Serotonin, verbraucht Sauerstoff und benötigt weitere Cofaktoren, wie Eisen-II-Ionen und Tetrahydrobiopterin. Hydroxytryptophan wird anschließend decarboxyliert, wodurch Serotonin entsteht (Abb.3).

Der zweite Schritt der Serotoninsynthese wird durch die aromatische L-Aminosäure Decarboxylase katalysiert, die auch in Katecholamin-synthetisierenden Zellen vorkommt, und in serotoninproduzierenden Zellen im Überschuss vorhanden ist. Etwa 2% der aufgenommenen Tryptophanmenge werden täglich in Serotonin umgesetzt, welches dann eine Halbwertszeit von etwa 12h hat.

Das ins Blut freigesetzte Serotonin wird zu 99% von den Thrombozyten aufgenommen, was für die Funktion der Thrombozyten notwendig ist, da sie selbst kein Serotonin synthetisieren können (Pletscher, 1968).

Extrazelluläres Serotonin wird durch Serotonintransporter (SERT; Blakely et al., 1994; Wade et al., 1996; Chen et al., 1998) in die Zellen aufgenommen. Intrazellulär transportiert Serotonin der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT; Liu et al., 1992; Weihe und Eiden, 2000) in Speichervesikeln (Abb.3).

Freies Serotonin wird intrazellulär rasch durch Monoaminoxidasen (MAO) vorwiegend im Darm, in der Leber oder in der Lunge desaminiert. Monoaminoxidasen sind an die äußere Membran der Mitochondrien gebunden. Von den beiden Subtypen MAO-A und MAO-B hat ersterer eine erhöhte Affinität zu Serotonin.

Der gebildete hochreaktive Hydroxyindolacetaldehyd wird dann durch Aldehyddehydrogenasen zu Hydroxyindolessigsäure oder durch Aldehydreductase in Hydroxytryptophol abgebaut und mit dem Harn ausgeschieden.

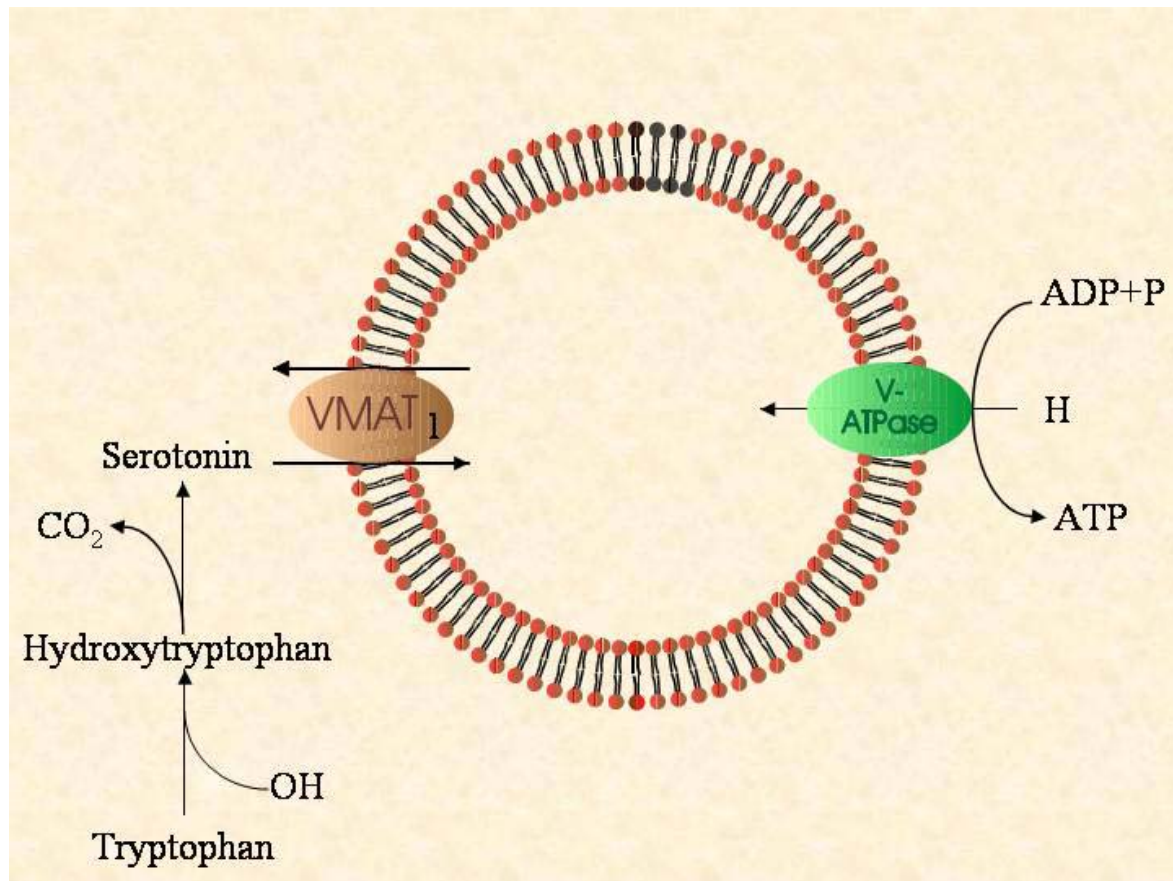


Abb.3: Synthese von Serotonin. Serotonin wird durch VMAT1 in Vesikel transportiert und dort bis zur Freisetzung gespeichert.

## 2. Struktur und Funktion der enterochromaffinen Zellen

Enterochromaffine (EC) Zellen sind serotoninhaltige, enteroendokrine Zellen im gastrointestinalen Trakt. In diesen Zellen wird mehr als 90% des gesamten Serotoningehaltes des Körpers synthetisiert, gespeichert und freigesetzt (Erspamer, 1966).

Die enteroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltraktes stellen das größte endokrine Organ im Körper dar (Rehfeld, 1998). Die meisten enteroendokrinen Zellen synthetisieren Peptidhormone, eine kleinere Gruppe von enteroendokrinen Zellen synthetisiert biogene Amine wie Histamin oder Serotonin. Die Produkte der enteroendokrinen Zellen kommen auch im zentralen Nervensystem vor, wo diese

von Neuronen synthetisiert und als Neurotransmitter verwendet werden. Obwohl es zurzeit kontrovers diskutiert wird, ob die enteroendokrinen Zellen neuroektodermalen oder endodermalen Ursprungs sind (Skipper und Lewis, 2000; Lee et al., 2002), zeigen diese Zellen eine sehr große strukturelle Verwandtschaft zu Neuronen. Sie sind polarisiert und benützen denselben Exocytoseapparat.

Wie bereits erwähnt, wird im Darm etwa 95% des gesamten Serotonins im Körper produziert. Davon werden ca. 5 % in Neuronen des enterischen Nervensystems und 95% in den EC Zellen synthetisiert, gespeichert und freigesetzt (Spiller, 2001). EC Zellen gehören zu der Gruppe der chromaffinen Zellen. Die chromaffinen Zellen wurden bereits 1870 von Heidenhain als gastrointestinale Epithelzellen entdeckt, deren Sekretgranula sich mit Chromsalzen anfärben lassen. 1914 stellte Ciaccio fest, dass diese Zellen auch mit Silbersalzen angefärbt werden können. Ein halbes Jahrhundert später wurde gefunden, dass diese Zellen Serotonin produzieren, wodurch sie im Gastrointestinaltrakt eine Sonderstellung unter den enteroendokrinen Zellen einnehmen.

Die enterochromaffinen Zellen sind in dem Epithel des gesamten Gastrointestinaltrakt vorhanden. Im Dünndarm besteht die Schleimhaut aus einem einschichtigen hochprismatischen Epithel, welche Enterozyten, Becherzellen, Paneth Zellen und etwa 20 unterschiedliche endokrinen Zellen enthält. Die aufgefaltete Mucosa besteht aus Zotten und Krypten, wobei die enterochromaffinen Zellen sich hauptsächlich in den Krypten befinden, eingestreut zwischen den Enterozyten. An das Epithel grenzt die *Lamina propria mucosae*, die aus lockerer Bindegewebe besteht. In den Lücken der Bindegewebe gibt es Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und vereinzelt Mastzellen. Von hier ziehen die Zottenkapillaren sich bis zu der Zottenspitze, welche die Resorption gewährleisten. Es gibt hier auch zahlreiche glatte Muskelzellen, welche die *Lamina muscularis mucosae* bilden. Dadurch können sich die Zotten rhythmisch verkürzen. In dieser Schicht ist die erste Schicht aus Neuronen zu finden, der *Plexus submucosus*. Nach außen folgt der Submucosa eine Ring- und eine Längsmuskelschicht. Zwischen den beiden Muskelschichten befindet sich die nächste Neuronenschicht, der *Plexus myentericus*. Weiter außerhalb folgt dann der *Plexus subserosus*, der sich direkt unter dem Bauchfellüberzug befindet. Diese Neuronenverbände, welche miteinander in enger



Verbindung stehen, bilden somit das autonome Darmnervensystem. Zentrale Einflüsse erreichen das Darmnervensystem durch sympathische und parasympatische Nervenfasern, hauptsächlich durch den Vagusnerv. Die Verteilung von Serotoninrezeptoren im Darm und in EC Zellen werden in der Abb. 4 dargestellt. Außerdem ist die Lokalisation der wichtigsten Neurotransmitter angegeben.

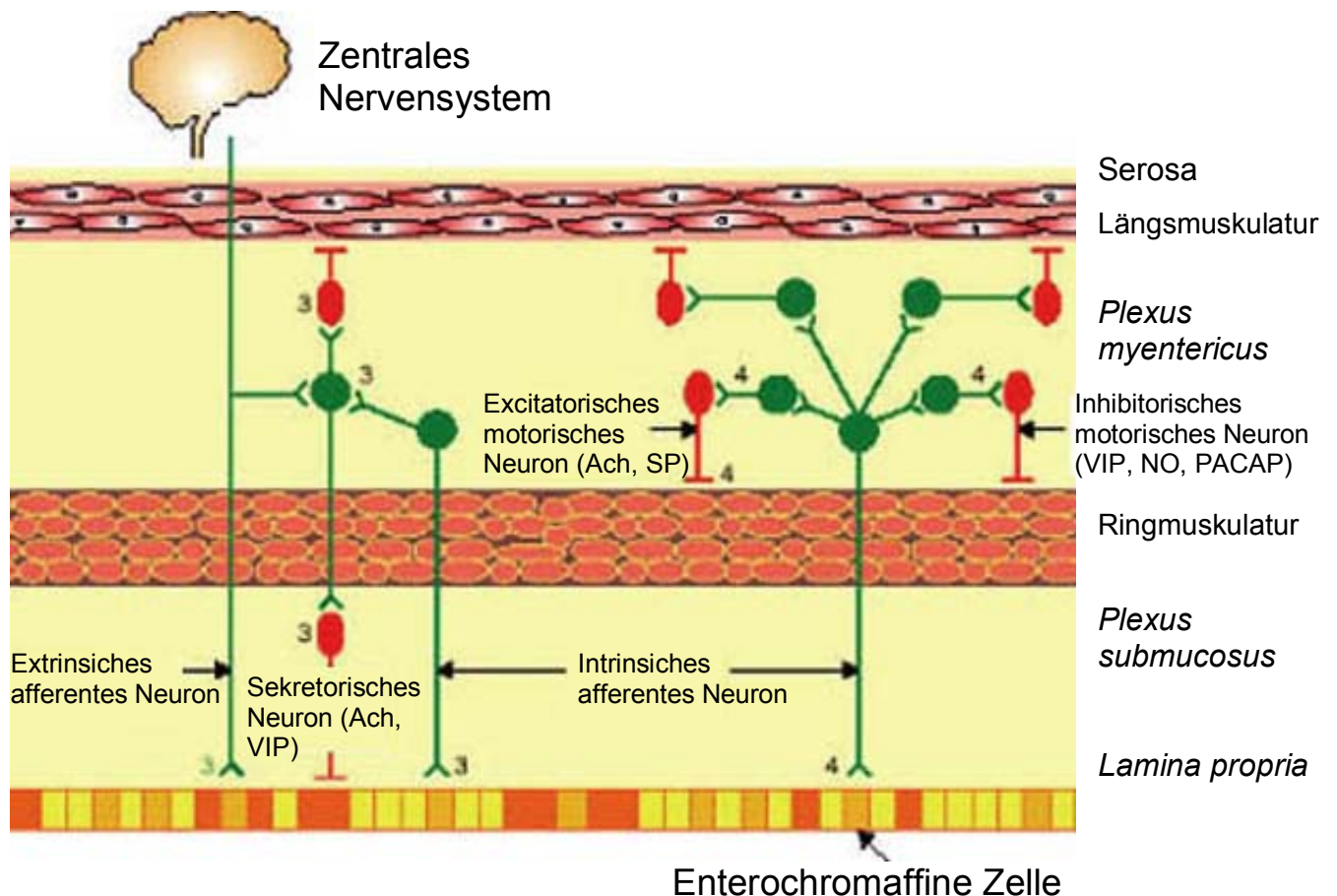


Abb. 4.: Modell von serotonergen Verschaltung im enterischen Nervensystem. (3)= 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor; (4)= 5-HT<sub>4</sub> Rezeptor. Ach= Acetylcholin; VIP= vasoaktive intestinale Peptid; SP= Substanz P; NO= Stickstoffmonoxid; PACAP *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*. (nach Talley, 2001<sup>1</sup>)

## Struktur und Zellbiologie

EC Zellen haben einen Durchmesser von ca. 10µm. Sie haben einen großen Zellkern und enthalten wenige Organellen, wie endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Lysosomen, besitzen aber viele Sekretgranula, in denen Serotonin gespeichert

wird. EC Zellen haben im Gewebe eine polarisierte Struktur (Abb.5). Die apikale, zum Darmlumen zugewandte Membran ist mit Mikrovilli bedeckt, Die Microvilli reagieren auf die intraluminale Druckveränderungen ähnlich den Mechanosensoren im Innenohr (Fujimiya et al., 1997). An der basolateralen Seite der Zelle wird Serotonin in elektronendichten Granula gespeichert. Diese Vesikel zeigen im elektronenmikroskopischen Bild zwischen ihrer Membran und ihrem dichteren Inhalt einen hellen Hof (Portela - Gomes et al., 1984; Dey und Hoffpauir, 1984). Die basale, zu den Kapillaren gewandte Lokalisation der Vesikel zeigt, dass Serotonin hauptsächlich an der basolateralen Seite abgegeben wird (Racke und Schwörer, 1991; Reimann et al., 1993).

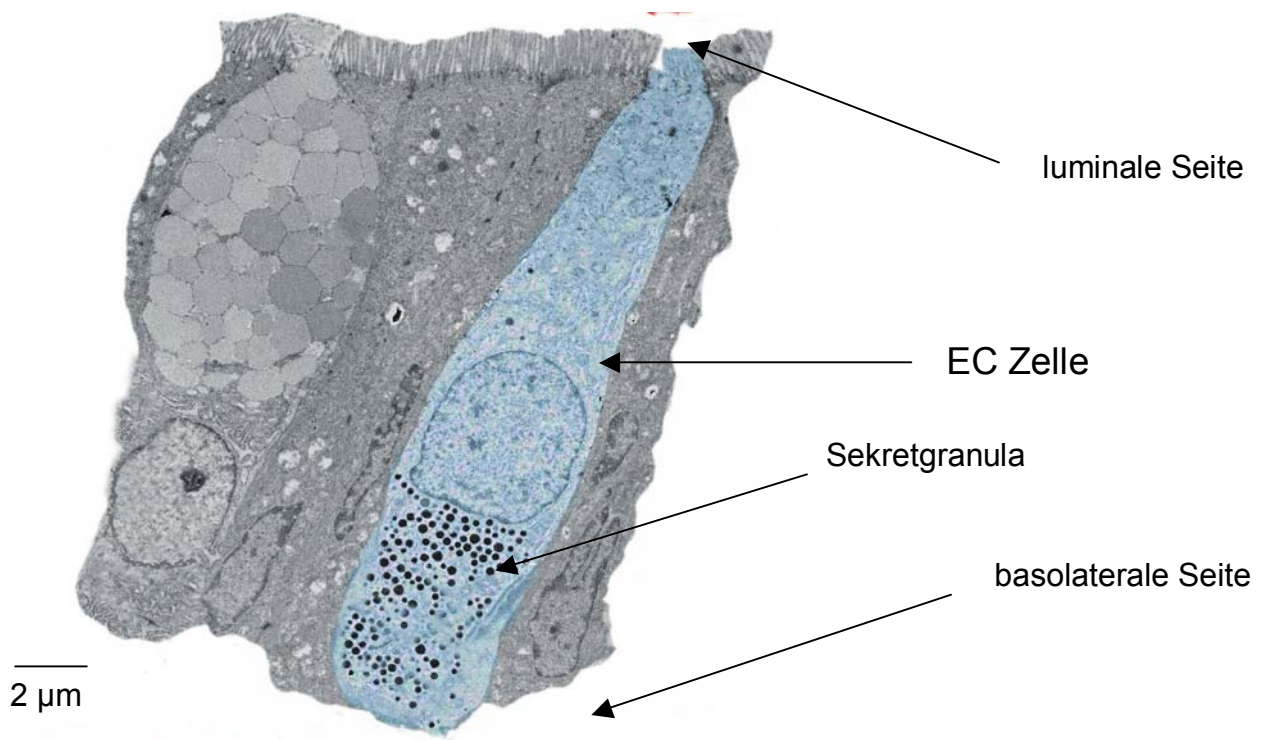


Abb. 5.: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer enterochromaffinen Zelle im menschlichen Ileum. Links befindet sich eine Becherzelle rechts (blau) eine EC Zelle. Sie wird von Enterozyten flankiert. Auf der luminalen Seite sind zahlreiche Villi zu sehen; die sekretorische Vesikel, als elektronendichte Granula erkennbar, befinden sich an der basolateralen Seite der Zelle. Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Gratzl, Anatomisches Institut der LMU München.

Die EC Zellen können Serotonin aus der Umgebung aufnehmen oder selber aus Tryptophan synthetisieren. Sie besitzen die zur Biosynthese benötigten Enzyme wie Tryptophanhydroxylase und das 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase (Racke et al.,



1996). Serotonin wird in diesen Zellen durch den vesikulären Monoamintransporter Typ 1 (VMAT1) in die sekretorischen Vesikel transportiert, in denen sie bis zur Freisetzung durch Exocytose gespeichert werden (Peter et al., 1995). Außer Serotonin werden bei Subpopulationen von EC Zellen auch Peptide wie Substanz P, Motilin, Enkephalin (Heitz et al., 1976; Polak et al., 1975; Alumets et al., 1977) oder Guanylin gespeichert (Cetin et al., 1994).

### **Effekte von Serotonin auf den Darm**

Durch Serotonin wird im Darm die Sekretion von Wasser und Elektrolyten (Sidhu und Cooke, 1995; Cooke et al., 1997) und die Darmmotilität reguliert (Grider et al., 1996; Wade et al., 1996). Der Einfluss auf die Sekretion erfolgt direkt oder indirekt. Serotonin wirkt einerseits auf die Enterozyten, andererseits über enterischen Nerven. Auf enterischen Neuronen sind die Rezeptortypen 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub> und zum kleineren Teil 5-HT<sub>1P</sub> 5-HT<sub>2</sub> Rezeptoren nachgewiesen worden (Gershon, 1999; Spiller, 2001; Talley, 2001).

Die unterschiedlichen Rollen von Serotoninrezeptoren auf enterischen Neuronen oder auf Enterozyten sind noch nicht vollständig erforscht. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass eine sekretorische Wirkung hauptsächlich durch 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren hervorgerufen wird, dagegen sollen die 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren eine inhibitorische Wirkung vermitteln.

Auf Enterozyten wurden die 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren nachgewiesen (Siriwardena et al., 1993; Fiorica-Howells et al., 2002). Enterozyten antworten mit Chloridsekretion auf die direkte Stimulation mit Serotonin (Hardcastle et al., 1981).

5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren wurden auf Enterozyten im menschlichen Colon nachgewiesen (Borman und Burleigh, 1996).

Wie bei der Sekretion kann Serotonin auf die Darmmotilität erregend oder hemmend wirken, über eine direkte Wirkung auf Muskelzellen oder über Sensorische-, Inter- und Motoneuronen. Die daran beteiligten Serotoninrezeptoren sind in den untersuchten Spezies unterschiedlich exprimiert. Auf sensorischen Neuronen wurden 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren gefunden; auf Interneuronen und Motoneuronen überwiegen die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren (Briejer und Schuurkes, 1996). Die sensorischen Neuronen vermitteln ihre Wirkung durch Acetylcholin und das vasoaktive intestinale Peptid,

VIP. Die beteiligten Interneurone scheinen Serotonin und Acetylcholin als Transmitter zu verwenden, und schließlich bei den Motoneuronen spielen viele Transmitter eine Rolle; darunter sollen Acetylcholin und Substanz P eine eher stimulatorische, VIP, PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) und Stickstoffmonoxid eine eher inhibitorische Wirkung haben (Spiller, 2001). Direkt an den Muskeln scheint die Motilität vor allem durch die 5-HT<sub>2A</sub> Rezeptoren stimuliert zu werden (Prins et al., 1997), während durch die 5-HT<sub>4</sub> und 5-HT<sub>7</sub> Rezeptoren Muskelrelaxation beobachtet wurde (Tam et al., 1995, Prins et al., 1999).

Es scheint also, dass die Rolle von Serotonin bei der Regulation der gastrointestinalen Motilität und Sekretion durch viele unterschiedliche Rezeptoren an verschiedenen Zelltypen zustande kommt. Diese Rezeptoren stellenein kompliziertes Netzwerk dar. Die Bedeutung von unterschiedlichen Serotoninrezeptoren variiert weiterhin zwischen den untersuchten Spezies und auch in den unterschiedlichen Regionen der Gastrointestinaltrakt, wodurch eine detaillierte Aussage über den Wirkungsweg von Serotonin erschwert wird.

### 3. Regulation der Serotoninfreisetzung aus EC Zellen

Die ersten Experimente an EC Zellen wurden am isolierten perfundierten Darmabschnitten durchgeführt. Dabei wurden Ileumabschnitte aus Meerschweinchen isoliert und arteriell perfundiert. Durch diesen Zugang wurden unterschiedliche Substanzen appliziert und aus der Portalvene die sezernierten Hormone bestimmt. Aus diesen Experimenten ging erstens hervor, dass die Freisetzung von Serotonin aus EC Zellen einer adrenergen Kontrolle unterliegt. Isoprenalin (ein adrenalinähnliches Betasympathomimetikum, 0.1 µM) stimuliert die Sekretion von 5-HT and 5-HIAA um 75%. Dieser Effekt wurde mit Propranolol (Betarezeptorenblocker, 0.1 µM) aufgehoben (Racke et al., 1988). Dagegen reduzierte Clonidin (Alphasympathomimetikum, besonders wirksam an alpha 2 Rezeptoren, 1 µM), die Serotoninfreisetzung um 45%. Dieser Effekt konnte durch

den selektiven alpha 1 Rezeptor Antagonist, Prazosin (0.1  $\mu\text{M}$ ), nicht aufgehoben werden. Dies sprach für eine Wirkung über alpha 2 Rezeptoren.

In einer zweiten Arbeit wurde gezeigt, dass GABA regulatorisch in die Sekretion von Serotonin aus EC Zellen eingreift (Schwörer et al., 1989). Sie entdeckten, dass Bicuculline (GABA-A Rezeptorantagonist) dosisabhängig die Freisetzung von Serotonin herabgesetzt (1  $\mu\text{M}$ ) oder erhöht (10, 50  $\mu\text{M}$ ), und dass Baclofen (Struktur analogon mit GABA) die Freisetzung von Serotonin hemmt. Insgesamt wurde GABA in dieser Arbeit ein hemmender Effekt auf die Serotoninfreisetzung aus EC Zellen zugeschrieben.

Durch eine ähnliche Technik wurde die Vagusaktivität bei Ratten nach Serotinausschüttung untersucht. Der Vagusnerv vermittelt Informationen aus der Darmmucosa zum Hirnstamm. Viele dieser afferenten Fasern zeigen nach luminaler Reizung eine elektrische Aktivität. Als mögliches Mediator zwischen Vagusafferenzen und den intestinalen Stimuli wurden die EC-Zellen in Erwägung gezogen. In diesen Versuchen wurde ein Abschnitt zwischen Duodenum und proximalen Jejunum isoliert und die Vaguspotentiale am *Ganglion inferius nervi vagi* aufgezeichnet. Verschiedene luminale Stimuli, wie hyperosmolare Saline, Maltose, Glucose haben neurale Antworten in dem Ganglion hervorgerufen. Auch intraluminale Transfusion von Serotonin rief dosisabhängige Antworten in den gleichen Neuronen hervor, welche auch durch andere luminale Reize simuliert wurden. Diese Antworten konnten durch Vagotomie oder durch die Applikation von Granisetron (5-HT<sub>3</sub> Rezeptorantagonist) aufgehoben werden. Dieser Serotonineffekt wurde nicht von serotonergen Neuronen ausgelöst, da nach der Zerstörung von diesen Neuronen mit 5,7-DHT (ein spezifisches Neurotoxin) die Vaguswirkung von Serotonin weiterhin zu beobachten war (Zhu et al., 2001).

Außerhalb des Darmes ist auch eine Wirkung von Serotonin auf die Pankreassekretion beobachtet worden (Li et al., 2001). Die Sekretion von Verdauungsenzymen aus dem Pankreas wird durch CCK (Cholecystokinin) stimuliert. Auf der Suche nach weiteren Stimuli wurde die Rolle von Serotonin aus den EC-Zellen untersucht. Man isolierte, wie im obigen Experiment, den gleichen Darmschnitt bei Ratten und die gemeinsame Mündung von *Ductus pancreaticus* und *Ductus choledochus*, um Pankreassaft zu sammeln. Die Experimente zeigten,

dass die luminale Perfusion mit Maltose oder hypertone Saline die Freisetzung von Serotonin im Darm erhöhte. Weiterhin wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass intraduodenale Applikation von Serotonin dosisabhängig die pankreatische Sekretion stimulierte. Dieser Serotonineffekt wurde durch eine Stimulation von afferenten vagalen Nervenendigungen, durch 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren, erklärt.

#### 4. Die Rolle von Serotonin bei verschiedenen Erkrankungen

Die Serotoninfreisetzung ist an vielen pathologischen Zuständen beteiligt. Bei der Chemotherapie reagieren Patienten oft mit Erbrechen auf die Gabe von Zytostatika (Viner et al., 1990; Schwörer et al., 1991). Um die Ursache dieser Wirkung zu erklären, wurden tierexperimentelle Untersuchungen unternommen. Diese ergaben, dass nach der Verabreichung von Zytostatika (Cisplatin, Carboplatin, Cyclophosphamid) vermehrt Serotonin aus dem Darm freigesetzt wird. Diese Serotoninfreisetzung führt zu einer Stimulation von vagalen Afferenzen und schließlich zu einer Stimulation der *Area postrema* und im *Nucleus solitarius* im Gehirn. In diesen Regionen gibt es zahlreiche Serotoninrezeptoren (Waeber et al., 1989), weiterhin befindet sich hier auch das Brechzentrum. Untersuchungen bei Patienten ergaben eine erhöhte Ausscheidung des Serotoninmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure. Dies sprach für eine erhöhte Serotoninfreisetzung nach Zytostatikagabe (Barnes et al., 1990; Cubbedu et al., 1992). Um das Erbrechen zu unterdrücken, wurden 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten entwickelt. Die drei Substanzen Tropisetron, Granisetron und Ondansetron weisen eine sehr hohe, selektive Affinität für die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren auf. Sie sind den konventionellen Antiemetika sowohl in der Wirksamkeit als auch in der Verträglichkeit überlegen. Der heute am meisten eingesetzte 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Antagonist ist Ondansetron mit dem Handelsnamen Zofran.

Ein weiteres Gebiet, auf dem Serotonin eine Mediatorrolle spielt, sind Durchfallerkrankungen. Durchfallerkrankungen können einerseits durch erhöhte intestinale Sekretion, hervorgerufen durch Enterotoxine aus *E.coli* oder *Vibrio*

*cholerae* (Peterson et al., 1993; Hansen und Skadhauge, 1995) oder durch eine verminderte intestinale Absorption zustande kommen, wie bei Salmonellen oder Shigella Infektionen. Bei beiden Typen von Durchfällen kann Serotonin erhöht freigesetzt werden, wodurch neuronale Reflexe im enterischen Nervensystem ausgelöst werden (Farthing, 2002). Die Rolle von Serotonin liegt nahe, da die Sekretionsantwort auf Salmonellen oder auf Choleratoxin durch die Gabe von 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten vermindert wird (Grondahl et al., 1998; Turvill und Farthing, 1997). Dies spielt allerdings in der klinischen Medizin keine Rolle.

Störungen in der Serotoninfreisetzung aus der EC Zelle spielen auch eine Rolle beim Reizdarmsyndrom. Das Reizdarmsyndrom stellt eine heterogene Gruppe von funktionellen Darmerkrankungen dar, bei denen chronische abdominelle Schmerzen mit Veränderungen des Stuhlgangs und Meteorismus einhergehen (Hollerbach et al., 2001). Diese Krankheit ist je nach Studie bei 3-22% der Bevölkerung verbreitet (Talley und Spiller, 2002).

Hier scheint das serotonerge System im Darm auch eine entscheidende Rolle zu spielen, und zwar nicht nur bei der Veränderung der Darmperistaltik, sondern auch beim Schmerzempfinden. Bei dem Reizdarmsyndrom können zwei Formen unterschieden werden, die erste ist von wiederholten Durchfällen, die zweite eher von Verstopfungen begleitet. Ersteres wurde erfolgreich mit dem 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten Alosetron (Lotronex) behandelt (Humphrey et al., 1999; Camilleri et al., 2000). Allerdings wurde dieses Medikament neun Monate nach dessen Zulassung wegen der Nebenwirkungen, Verstopfung und ischämische Kolitis, wieder vom Markt genommen. Eine Überdosierung mit diesem Medikament führte bei jungen Frauen zu tödlichen Komplikationen. Die zweite Form wird mit dem 5-HT<sub>4</sub> Rezeptor Agonisten Tegaserod (Zelnorm) behandelt.

Bei den meisten der oben genannten Erkrankungen werden 5-HT<sub>3</sub> oder 5-HT<sub>4</sub> Rezeptor Antagonisten verabreicht, um die unerwünschten Wirkungen von Serotonin zu hemmen (Viner et al., 1990; Talley, 2001<sup>2</sup>). Diese Medikamente sind aber in ihren Spezifität und Wirkdauer eingeschränkt und können auch ins Zentralnervensystem gelangen. Dies ist mit weiteren Nebenwirkungen verbunden (Schinkel et al., 1996). Ein besseres Verständnis der Regulation der EC Zellen Funktion könnte zur Entwicklung von neuen spezifischeren Medikamenten beitragen.

Aus EC Zellen können sich neuroendokrinen Tumoren- die Karzinoide bilden. Der Begriff „Karzinoid“ stammt von 1907 von Oberndorfer. Karzinoide zeigen typische Silberaffinität und besitzen histochemisch nachweisbare Eigenschaften zwischen benigner Neoplasie und Karzinom.

Karzinoide im engeren Sinne stellen die Tumore der EC und ECL Zellen des Gastrointestinaltraktes dar. Diese Tumoren sind relativ selten und betreffen weniger als 2% Malignome des Gastrointestinaltraktes. Sie machen aber die meisten endokrinen Erkrankungen in diesem Bereich aus. Die häufigste Lokalisation des klassischen Karzinoids ist die Appendix, gefolgt von Rektum, Ileum und Magen. Die übrigen neuroendokrinen Tumoren befinden sich am häufigsten im Pankreas.

Die ursprünglich beschriebene Symptome einer Karzinoids, wie gastrointestinale Hypermotilität mit Diarrhö, Flush durch Gefäßerweiterung (Erythem im Gesicht, am Nacken und an den oberen Rumpfpartigen), zusammen mit asthmaähnlichen Bronchialobstruktionen, ist auf die erhöhte Serotoninproduktion im Karzinoid zurückzuführen. Inzwischen wurden aber viele weitere neuroendokrine Hormone in Tumorzellen nachgewiesen, wie Gastrin, Insulin, Glucagon, Somatostatin.

Karzinoide haben ein geringes Wachstum, die Symptomatik wird im Wesentlichen durch die sezernierten Hormone der endokrin aktiven Tumoren verursacht. Daher ist bei der Therapie eine Hemmung der Wirkung von Serotonin wichtig, oder wenn möglich die Produktion des Hormons einzuschränken.

Karzinoide, die nicht sezernieren, werden klinisch häufig erst durch ein infiltrierendes oder lumeneinengendes Wachstum, oder durch eine Hormonaktivität nach Lebermetastasierung auffällig.

## 5. Frühere Modelle zur Untersuchung der EC Zellen

Die Mechanismen, welche die Freisetzung von Serotonin aus der EC Zelle regulieren, sind noch nicht vollständig erforscht. Frühere Studien untersuchten diese Zellen im Gewebeverband als Mucosa-Streifen oder in isolierten Krypten. Weiterhin existiert eine humane serotoninproduzierende Karzinoidzelle.

Die Mucosastreifen wurden aus Meerschweinchen, Kaninchen, Hunde oder Schweinegewebe hergestellt und *in vitro* mit verschiedenen Agentien inkubiert. Anschließend wurde die Serotoninfreisetzung aus der Inkubationslösung mit HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) bestimmt (Schwörer et al., 1987; Racke et al., 1996). Aus diesen Experimenten wurde die Präsenz zahlreicher Rezeptoren postuliert, durch welche die Serotoninfreisetzung stimuliert oder gehemmt werden kann. Aus diesen Untersuchungen ging hervor, dass Acetylcholin eine stimulatorische Wirkung durch muscarinische M3 Rezeptoren und bei manchen Spezies auch durch nikotinische Rezeptoren vermittelt. Unter den adrenergen Rezeptoren stimulierte der  $\beta$  adrenerge Rezeptor die Serotoninfreisetzung und die  $\alpha 2$  adrenergen Rezeptoren wirkten eher inhibitorisch. Eine Hemmung der Serotoninfreisetzung wurde durch die Rezeptoren GABA-A, GABA-B, die Purinozeptoren Adenosin A2 und P2y, Histamin H3, und Somatostatin Rezeptoren beobachtet. Weiterhin wurden in diesen Experimenten stimulierende 5-HT3 Rezeptoren und hemmende 5-HT4 Autorezeptoren festgestellt.

Aus diesen Experimenten sind eine Reihe von Wirkungen bekannt. Es ist aber nicht gesichert ob die stimulierende oder hemmende Wirkung der entsprechenden Rezeptoren tatsächlich direkt aus EC Zellen kommt oder aber aus der umgebenden Gewebe wie enterische Neuronen oder Blutgefäße.

Andere Autoren untersuchten isolierte Krypten aus dem Meerschweinchen und aus humanen Magenbiopsien. In diesen Experimenten wurde das Duodenum isoliert und durch enzymatischen Verdau Krypten isoliert (Lomax et al., 1999). Anschließend wurden in den Krypten intrazelluläre Calcium Messungen durchgeführt und die Serotoninfreisetzung aus den Meerschweinchenkrypten bestimmt. Diese Untersuchungen zeigten, dass die EC Zellen elektrisch erregbar sind. Weiterhin

wurden spannungsabhängigen Calciumkanälen nachgewiesen, die an der Regulation der Serotoninfreisetzung aus der EC Zelle beteiligt sind.

Die Untersuchungen an Krypten stellen im Vergleich zu den Experimenten an den Mucosastreifen eine Vereinfachung dar, da diese Präparationen keine Blutgefäße oder Neuronen enthalten. Es ist jedoch unklar, ob die beobachteten Effekte direkt durch die EC Zelle oder indirekt durch die umgebenden Zellen ausgelöst wurden.

Ein weiteres Modell von enterochromaffinen Zellen ist die Karzinoidzelllinie BON. Die BON Zellen wurden erstmals 1986 aus der Lymphknotenmetastase eines Pancreaskarzinoids eines 28 Jahre alten Mannes isoliert (Evers et al., 1994). Das unter sterilen Bedingungen gewonnene Lymphknotenstück wurde in Salzlösung gewaschen, zerkleinert und in DMEM-F12 Medium mit 10% FCS inkubiert. Im Laufe der weiteren Kultivierung wurden dann die Fibroblasten entfernt und die Zellen an *in vitro* Bedingungen adaptiert. Diese Zellen wachsen in gewöhnlichen Zellkulturflaschen ohne spezielle Beschichtung, zeigen keine Kontaktinhibition und haben eine Verdopplungsrate von ca. 60 Stunden.

Die Kultur von Zellen zeigt ein relativ heterogenes Erscheinungsbild mit wenigen großen runden Zellen und vielen kleineren Zellen, welche dendritische Fortsätze besitzen. BON Zellen synthetisieren neben Serotonin auch Neurotensin, Pankreastatin und Chromogranin A. Dagegen konnten in diesen Zellen kein Gastrin, Somatostatin, Glucagon, Insulin, pankreatische Polypeptid, Substanz P oder VIP nachgewiesen werden.

BON Zellen besitzen auch die vesikuläre Monoamintransporter VMAT1 und VMAT2, wobei die Expression von VMAT 1 überwiegt (Höltje et al., 2000). Weiterhin ist bekannt, dass BON Zellen Dopamin- (Lemmer et al., 2002), Serotonin-, muscarinische Acetylcholin-,  $\beta$ -adrenergen-, Somatostatin- und Gastrin Rezeptoren exprimieren (Evers et al., 1994) und nach mechanischer Stimulation vermehrt Serotonin freisetzen (Kim et al., 2001). In BON Zellen wird durch Acetylcholin auf dem muscarinischen Weg die Freisetzung von Serotonin, Pankreastatin und Neurotensin stimuliert (Evers et al., 1994).



## 6. Das Modell der isolierten EC Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde angestrebt, die EC Zellen aus dem Dünndarm zu isolieren und hochgradig aufzureinigen, um Untersuchungen mit einer möglichst reinen EC Zellpopulation durchführen zu können.

Das Modell von isolierten Zellen hat viele Vorteile. *In vivo* unterliegen die Zellen vielen endogenen Einflüssen, wie neuronal, parakrin und endokrin freigesetzten Stimuli. Endokrine Transmitter werden aus hormonproduzierenden Zellen in die systemische Zirkulation freigesetzt und durch diese zu einem Zielorgan transportiert, dessen Funktion sie beeinflussen. Parakrine Signale sind Transmittersubstanzen, welche aus einer endokrinen Zelle freigesetzt werden und eine Wirkung auf die benachbarten Zellen ausüben. Neuronale Signale werden an Nervenendigungen freigesetzt und gelangen über Diffusion an ihre Zielzellen. Alle diese Stimuli üben bereits im Ruhezustand einen tonischen Effekt aus, so dass der eigentliche unstimulierte Zustand *in vivo* nie wirklich hergestellt werden kann. In hochreinen isolierten Zellen kann man aber Interaktionen von Testsubstanzen mit neuronalen und endokrinen Regulationsmechanismen ausschließen. Bislang liegen keine Arbeiten über die erfolgreichen Aufreinigung der EC Zellen vor. In unserem Labor wurden erfolgreich die Enterochromaffin-like (ECL) Zellen aus der Magenschleimhaut isoliert und über 90% angereichert (Prinz et al., 1993; Prinz et al., 1994). Die ECL Zellen sind histaminproduzierende endokrine Zellen, welche eine zentrale Rolle in der Regulation der Säuresekretion spielen (Sachs et al., 1997). Auch die ECL Zellen gehören zu der Gruppe der chromaffinen Zellen, daher sind sie morphologisch den EC Zellen sehr ähnlich. Die ECL Zellen wurden durch enzymatischen Verdau, Elutriation und Nycodenz Dichtegradient Zentrifugation isoliert und bis zu 98% angereichert. Ältere Verfahren basierten auf Percoll Gradienten, die nur eine 3-5 fache Anreicherung von diesem Zelltyp erreichten und die Funktion der Zellen beeinträchtigten.

In dieser Arbeit wurde angestrebt in Analogie zur Gewinnung der ECL Zellen des Magens die EC Zellen aus dem terminalen Ileum zu isolieren. Das terminale Ileum wurde für die Isolierung gewählt, da in diesem Abschnitt zumindest beim Menschen relativ wenig andere endokrine Zellen vorhanden sind (Sjölund et al., 1983). Für die

Isolierung wurden weibliche Ratten im Alter von 6 Wochen und einem Körpergewicht von 180-200g verwendet. Die EC Zellen wurden mit der kombinierten Methode von enzymatischen Verdau, Elutriation und Zentrifugation im Dichtegradienten isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden mit verschiedenen Agentien inkubiert und die Serotoninfreisetzung bestimmt. Die entsprechenden Rezeptoren wurden mit RT-PCR und immunocytochemischen Methoden nachgewiesen. Um die Ergebnisse aus der EC Zellen Präparation mit einem anderen Modell von enterochromaffinen Zellen zu verifizieren, wurden die gleichen Stimulationsexperimente auch bei der Karzinoid Zelllinie BON durchgeführt.

## 7. Zielsetzung

Ziel meiner Arbeit war enterochromaffine Zellen aus dem Ileum der Ratte zu isolieren und eine *in vitro* Kultur von diesem Zelltyp zu etablieren. Um die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation zu überprüfen, wurde der Serotoninhalt der Zellen analysiert und Immunfärbungen durchgeführt. Weiterhin sollten Faktoren bestimmt werden, welche die Serotoninfreisetzung aus diesen Zellen stimulieren oder hemmen. Schließlich, wurden, um einen Überblick über die Funktion der EC Zellen zu bekommen, Genchip Analysen durchgeführt. Mit dieser Methode ist es möglich die Expression von vielen Genen zu untersuchen und diesem Zelltyp zu zuordnen. Dieser Arbeit konzentriert sich dabei auf die Expressionsmuster bestimmter Rezeptoren, welche bisher noch nicht mit EC Zellen in Verbindung gebracht worden sind. Mit Hilfe der quantitative *real-time* TaqMan PCR Analyse sollten Ergebnisse aus der Genchip Analyse überprüft werden. Durch diese beiden Methoden ist es möglich pharmakologische Angriffspunkte für die Regulierung der Serotoninfreisetzung zu suchen.

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Funktion und Physiologie dieser besonderen Darmzellen besser zu verstehen um bessere Therapiemöglichkeiten für Krankheiten zu finden, in welche die serotoninproduzierenden EC Zellen involviert sind.

Diese Ziele sollten durch die Beantwortung folgender Fragen erreicht werden: Durch welche Rezeptoren lassen sich EC Zellen stimulieren? Wie lässt sich die Serotoninfreisetzung hemmen? Gibt es auf EC Zellen neuartige Rezeptoren, die bisher noch nicht in diesem Zelltyp entdeckt wurden?

## II. Material und Methoden

### 1. Isolation und Kultur von EC Zellen und BON Zellen

#### 1.1 Tiere

Zur Organentnahme wurden experimentell naive, weibliche, 6 Wochen alte Sprague-Dawley Ratten verwendet (Charles River, Sulzfeld). Das Körpergewicht der Tiere betrug ca. 180-200g. Die Tiere wurden mit Kohlendioxid anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Die Experimente wurden in Einklang mit den ethischen Richtlinien der Technischen Universität München durchgeführt.

#### 1.2 Materialien

##### Stammlösungen:

Stocklösung I (10x):	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	5mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	10mM
	Na HCO <sub>3</sub>	200mM
	NaCl	700mM
	KCl	200mM
	D(+) Glucose	110mM
	Hepes (10x):	Hepes
EDTA (50x):	EDTA (Na <sub>2</sub> Ca- Salz)	100mM
Lösung IV (10x):	CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	100mM
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	150mM

Alle Chemikalien sind, mit Ausnahme von Hepes (Serva, Heidelberg) und EDTA (Sigma, Deisenhofen), von Merk (Darmstadt) bezogen worden.

### Inkubationslösungen:

Lösung A:

Stock I	100ml
Hepes	100ml
EDTA	3,5ml
Aqua bidest. (H <sub>2</sub> O)	ad. 1000ml

einstellen: pH 7,8 mit 2N KOH Lösung

BSA	10g
-----	-----

Lösung B:

Stock I	100ml
Hepes	100ml
Lösung IV	10ml
H <sub>2</sub> O	ad. 1000ml

einstellen: pH 7,4 mit 2N KOH Lösung

BSA	5g
-----	----

Lösung C:

NaCl	140mM
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1,2mM
CaCl <sub>2</sub>	1mM
Hepes	10mM
D(+) Glucose	11mM

einstellen: pH 7,4 mit 2N KOH Lösung

DTT	100mg/l
BSA	0,5g/l

Enzymlösung:

Collagenase/Dispase	0,5mg/ml
Pronase E	0,64 mg/ml

gelöst in 37°C warmer Lösung A

BSA (bovine serum albumin) und Collagenase/Dispase wurden von Sigma, Dithiothreitol (DTT) von AppliChem, Darmstadt und Pronase E wurde von der Firma Roche (Mannheim) bezogen.

**Dichtegradient Lösungen:**

Nycodenz Puffer:	Tris	0,605g
	KCl	0,223g
	EDTA	1,13g
	H <sub>2</sub> O	ad. 1000ml

einstellen: pH 7,5 mit 1N HCl Lösung

Nycodenzlösung:	Accudenz	68,75g
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	60,9mg
	BSA	2,5g
	Hepes	0,595g
	Nycodenz Puffer	ad. 250ml

einstellen: pH 7,4 mit 2N KOH Lösung

Verdünnungslösung:	BSA	4g
	Lösung C	500ml

Untere Schicht (1,1 g/ml): Nycodenzlösung wurde mit der Verdünnungslösung 1,8:1 vermischt und die Dichte überprüft.

Obere Schicht (1,07 g/ml): Nycodenzlösung wurde mit der Verdünnungslösung 1:1,2 vermischt und die Dichte überprüft.

Die Dichte der Lösungen wurde refraktometrisch (Zeiss, Göttingen) mit Hilfe der Formel: Dichte = optischer Index x 3,287-3,383 bestimmt.

Accudenz wurde von Accurate Chemicals (New York, USA) bezogen.

**Kulturmedium für EC Zellen:**

Opti-MEM I (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)	500ml
Fötale Kalbserum (Gibco)	10ml
Insulin-Transferrin-Nodiumselenit (Sigma)	5ml
nicht essentielle Aminosäuren (Sigma)	5 ml
Tetrahydrobiopterin (Sigma)	156µg
Dibutyryl cAMP (Sigma)	36,7mg
Heparin (Sigma)	25mg
D(+) Glucose	2g
BSA	2g

**Kulturmedium für BON Zellen:**

DMEM mit F12 Supplement 1:1 (Gibco)	500ml
Fötale Kalbserum (Gibco)	50ml
Penicillin/Streptomycin Lösung (Sigma)	5ml

**Trypsin/EDTA Lösung:**

Trypsin/EDTA 10x Stocklösung (Sigma)	25ml
Hank`s balanced salts (HBSS, Gibco)	500ml

**Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS):**

NaCl	8g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

einstellen: pH 7,4 mit 2N KOH Lösung

#### **4% Paraformaldehydlösung:**

4g Paraformaldehyd (Merk) wurde in 20ml Aqua bidest. eingerührt. Die Lösung wurde unter einem Abzug auf 50°C erwärmt und tropfenweise NaOH dazugegeben bis die Lösung klar wurde. Schließlich wurde die Lösung auf 100ml mit PBS aufgefüllt und der pH-Wert mit 1N HCl wieder auf 7,4 eingestellt.

### **1.3 Isolierung der EC Zellen**

Für jede Präparation wurden 5 Ratten getötet. Ein 8-10 cm langes Ileumstück wurde distal mit einem Faden abgebunden und ausgeschnitten. Die Darmstücke wurden auf einer dünnen (1ml) Plastikpipette gewendet und an der offenen Seite abgebunden. Dadurch entstand ein „Sack“, in dem die Mucosa nach außen gedreht ist.

In die Säcke wurde dann je ca. 3-5ml von der Enzymlösung injiziert. Dieser Enzymmix von Collagenase/Dispase und Pronase E löst die Epithelzellen von der Submucosa und der darunter liegenden Muskelschicht herab. Da die Wand der Därme sehr dünn ist, musste der Darm oft hinter dem Injektionsloch nochmals abgebunden werden, anderenfalls hätte die austretende Enzymlösung die Mucosa Zellen schädigen können.

Die so gefüllten 5 Darmsegmente wurden dann bei 37°C unter ständiger leichter Carbogenbegasung 35 min in Lösung A, 10 min in Lösung B und weitere 30 min in Lösung A inkubiert, um die Mucosaschicht abzulösen. Die so vorinkubierten Darmstücke wurden dann 10 min in ca. 30ml Lösung B auf einem Magnetrührer (IKAMAG RCT, IKA-Labortechnik, Staufen) leicht geschüttelt, wodurch eine Zellsuspension aus Mucosazellen gewonnen wurde. Die Zellsuspension wurde dann durch ein Nylonsieb (Fisher Scientific, München; Poren <200µm) gefiltert, mit Lösung C erhöhter DTT-Gehalt (300mg/l) auf 100ml aufgefüllt und bei 800 rpm 3 min abzentrifugiert (Nunc IEC 6000B Zentrifuge, Wiesbaden). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 8ml Lösung C mit erhöhtem DTT-Gehalt resuspendiert. Diese Fraktion wurde MUC (Mucosazellen) genannt.



Die Mucosafraktion wurde 20 min in Lösung C bei Raumtemperatur inkubiert um das Verkleben der Zellen zu verhindern. Danach wurde die Zellsuspension in einem Gegenstrom-Elutriator (Beckman JE6B Rotor J2 kleiner Elutriatorkammer, Beckmann Instruments, München; Masterflex Typ 7014 Pumpe) der Größe nach aufgetrennt. Zuerst wurden die kleineren Zellfraktionen bei 2400 rpm und einer Flussrate von 16 ml/min, dann 2100 rpm und 18 ml/min je 3 min ausgewaschen. Anschließend wurden 100ml von der Fraktion, welche die Zellgrößen von 10-12µm enthält, bei 2000 rpm und 24 ml/min gesammelt. Die so gewonnene Fraktion wurde F2 genannt.

Die F2 Fraktion wurde in Lösung C einmal gewaschen und anschließend auf den Dichtegradienten aufgetragen. Der Gradient wurde in einem 50ml Falcon Gefäß wie folgt überschichtet: 6ml untere Schicht, 7ml obere Schicht, 7ml F2 Fraktion resuspendiert in Lösung C. Der Gradient wurde dann 8 min bei 1100 rpm zentrifugiert (Hettich, Rotanta AP, Tuttlingen), wobei eine langsame Beschleunigung und ein langsames Bremsen erfolgte.

Die Zellschicht mit den EC Zellen befand sich an der Grenze der oberen Schicht und der Lösung C. Diese Zellen wurden dann nochmals in Lösung C gewaschen um Reste von den Gradientenlösungen zu entfernen. Diese Fraktion wurde DG (Dichtegradient Fraktion) genannt und zu weiteren Experimenten verwendet.

## 1.4 Kultivierung der EC Zellen

Die Kultivierung der EC Zellen erfolgte steril, unter der Laminar-Flow Bank und mit sterilen Lösungen, Pipettenspitzen und Kulturplatten. Die Zellen der DG Fraktion (EC Zellen) wurden in 6-Loch Platten kultiviert. Zur Beschichtung dieser Platten wurde Typ 1 Collagen (BD Biosciences, Heidelberg) 1:35 mit sterilem PBS verdünnt und je 1ml Lösung wurde in die Vertiefungen der Platten gegeben. Danach wurden die Platten bei 37°C eine Stunde lang inkubiert, und schließlich 3x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach der Präparation in Kulturmedium aufgenommen, so dass die Konzentration der Zellen  $1 \times 10^5$ /ml betrug. Von der so verdünnten Zellsuspension wurde dann je 1ml in eine Vertiefung auf die Kulturplatten gegeben. Um das Überleben der EC Zellen zu ermöglichen, wurden folgende Wachstumsfaktoren

(*Growth Factor*, *GF*, alle von der Firma Sigma) zu dem Nährmedium gegeben: *Epidermal GF* (EGF, 20ng/ml), *Heparin -Binding-EGF* (HB-EGF, 10ng/ml), *basic Fibroblast GF* (bFGF 1.7ng/ml), *Insulin like GF I* (IGF,10ng/ml), *Nerve GF* (NGF, 50ng/ml), *Transforming GF- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ , 12,5ng/ml), *Platelet derived GF* (PDGF, 10ng/ml). Die Zellen wurden 48-96 Stunden im Zellkulturbrutschrank (Heraeus BB 6220, Hanau) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

In vielen Experimenten wurde versucht, die Kulturbedingungen für EC Zellen zu optimieren. Verschiedene Kulturmedien DMEM, RPMI (beide von Gibco), Kulturmediumüberstand von PC12 und AGS Zellen (wurde freundlicherweise von Bettina Rößner bereitgestellt) wurden ausprobiert. Mehrere Kälberseren, Pferdeserum (Gibco) und Hydrocortison (Sigma) wurden zu den Medien dazugegeben. Weiterhin wurden unterschiedliche Beschichtungen von Kulturplatten mit CellTak, Matrigel (beide von BD Biosciences), Collagen, Collagen Gel und Poly-L-Lysine (Sigma) erprobt.

## 1.5 Kultivierung der BON Zellen

Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Thomas Seufferlein Univ. Ulm, zur Verfügung gestellt. Sie wurden in 25ml Kulturmedium in mittleren Zellkulturflaschen (250ml, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei Erreichen von 80% Konfluenz (2 x wöchentlich) wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 5ml Trypsin/EDTA Lösung für 10 min bei 37°C inkubiert um die Zellen von der Kunststoffoberfläche abzulösen. Anschließend wurde zu den Zellen 5ml Kulturmedium gegeben um die Reaktion anzuhalten und die Zellen bei 800 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen im Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und ca. 2x10<sup>6</sup> in die Kulturflaschen gegeben.

Für Stimulationsexperimente wurden die BON Zellen auf 6-Loch Platten ohne spezielle Beschichtung verwendet. Jeweils 3x10<sup>5</sup> Zellen in 2ml Kulturmedium wurden in die Vertiefungen gegeben. Bis zum Experiment, 48h später, wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

## 1.6 Kultivierung auf Deckgläsern

Für die Anwendung von immunocytochemischen Methoden an kultivierten EC Zellen wurden diese an runden Deckgläsern mit 24mm Durchmesser Stärke 2 (Hecht-Assistent, Sondheim) kultiviert. Die Deckgläser wurden 2x in Ethanol abs. getaucht und durch die Flamme gezogen, dadurch erhielt man eine sterile Oberfläche für die Zellen. Die Deckgläser wurden nach dem Abflammen in 6-Loch Platten gelegt und wie oben beschrieben mit Collagen beschichtet. Auf die Deckgläser wurde zuerst eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^5$  Zellen in 200µl Kulturmedium gegeben und 20 min im Zellkulturschrank inkubiert, dadurch konnten die Zellen an die Deckgläser anwachsen. Danach wurden je Loch noch weitere 800µl Kulturmedium auf die Zellen gegeben, damit die Zellen genügend Nährstoffe haben.

## 1.7 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zahl der intakten Zellen wurde nach der Präparation und nach den Kultivierungsexperimenten bestimmt. Dazu wurde 0,5% Trypanblau gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (Biochrom, Berlin) in 1:10 Verdünnung benutzt. Bei dieser Methode wird die Eigenschaft des Farbstoffs benutzt, dass lebendige Zellen mit intakter Zellmembran den Farbstoff nicht aufnehmen. Dagegen werden tote Zellen durch den Farbstoff blau angefärbt. Die Zellen werden direkt nach der Präparation in Suspension gefärbt, zu 100ml Zellsuspension wurde 10µl Trypanblau hinzugefügt, und die Zellen in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Zu den auf Deckgläsern kultivierten Zellen wurden 100µl Trypanblau gegeben und die Anzahl der toten Zellen lichtmikroskopisch ermittelt.

## 2. Identifikation der EC Zellen in der DG Fraktion

### 2.1 Immunologische Nachweise

Die immunologischen Nachweismethoden beruhen auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, welche durch Fluoreszenz oder durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden kann. Zunächst wird durch Immunisierung eines geeigneten Tieres mit dem zu untersuchenden Antigen Antiserum erzeugt, das dieses Antigen spezifisch erkennt. Dieses Antiserum lässt man dann mit dem Versuchsmaterial reagieren. Da die Antikörper dieses Antiserums generell nicht markiert sind, verwendet man zu ihrer Erkennung ein sekundäres Antiserum, das gegen die konstante Region der primären Antikörper gerichtet ist. Die sekundären Antikörper sind in geeigneter Weise mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen markiert, binden sich an die primären Antikörper und lassen sie dadurch direkt oder über eine Farbreaktion visualisieren.

#### 2.1.1 Serotoninmessung

Mit dieser Technik konnte verglichen werden, wie viel mehr Serotonin in der DG Fraktion vorhanden ist als in der F2 oder MUC Fraktionen.

#### **Probenvorbereitung**

Nach Abschluss der Präparation wurden die Zellen für 3 Stunden im Kulturmedium unter basalen Bedingungen bei 37°C belassen. Zur Bestimmung der Serotoninfreisetzung und des Serotoningehaltes in den drei Fraktionen wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen inkubiert. Nach den drei Stunden wurden die Zellen (bei 1000 rpm) 4 min lang abzentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415) und 500µl des Überstands wurden abgenommen. In den restlichen 500µl wurden die Zellwände durch Ultraschall-Pulse (Branson, Heusenstadt) zerstört, wodurch der verbliebene Serotonininhalt der Zellen frei wurde. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

## Enzym immunometrischer Assay (EIA)

Die Konzentration von Serotonin wurde mit einem kommerziellen Kit immunometrisch bestimmt (Beckmann Coulter, Krefeld; Sensitivität 0,5nM; Kreuzreaktivität mit strukturverwandten Polypepiden <0.003%).

Das Prinzip der immunometrischen Assay für Serotonin beruht auf der Kompetition zwischen dem modifizierten Serotonin in der Probe und dem Enzym-Konjugat, welches als *tracer* benutzt wird, um die Bindung zu den Serotonin-Antikörpern auf einer Mikrotiterplatte aufzuzeigen. Um die Sensitivität der Assay zu erhöhen, werden die Proben wie die Antikörper chemisch modifiziert. Durch diese Modifikation, Acylierung, werden die Proben weiterhin stabilisiert, sie sind 24h bei 2-8°C im Dunkeln haltbar. Die acylierten Proben und die Standards binden dann an den Antikörpern auf der Mikrotiterplatte in einer Inkubationszeit von 3 Stunden. Die Antikörperstellen, welche nicht von den Proben besetzt werden, werden von dem Serotonin-Acetylcholinesterase Konjugat gebunden. Anschließend wird der Überschuss an *tracer* gewaschen und die gebundenen Enzyme werden mit einem chromogenen Substrat (Acetylthiocholin und Natriumdithionitbenzoat) angefärbt. Somit zeigt die Farbentwicklung auf der Platte eine Funktion von Antikörperstellen, die nicht von Serotonin besetzt wurden. Die Farbintensität kann dann photometrisch (BioRad Modell 450, München) bei 405nm bestimmt werden und anhand der Standards die entsprechende Serotoninkonzentration in den Plattenlöchern ermittelt werden.

## 2.1.2 Immunocytochemische Nachweise

Mit dieser Technik konnten die Zellen, die Serotonin bzw. den neuroendokrinen Marker SNAP-25 enthalten, in den verschiedenen Fraktionen visualisiert werden.

### **Herstellung von Zellpräparaten mittels Cytozentrifuge (Cytospins)**

Für die Herstellung von Cytospins wurden silanisierte Glasobjektträger verwendet. Dazu wurden die Objektträger (76x26mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) erst 30 min in Chloroform, dann 30 min in absoluten Ethanol getaucht. Nachdem sie an der Luft getrocknet waren, wurden sie für 5 min in 2% 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aceton getaucht, mit Aceton und mit Aqua bidest. gewaschen. Schließlich wurden sie bei 42°C getrocknet und bis zur Verwendung staubfrei gelagert.

Die Zellen der verschiedenen Fraktionen wurden in 1,5ml Eppendorf Gefäße überführt und bei 2600 rpm 5 min lang zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4% Paraformaldehydlösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann noch einmal abzentrifugiert und mit PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und die Zellsuspension so verdünnt, dass ca.  $5 \times 10^4$  Zellen in 100-200µl PBS waren. Die Halterungen, Trichter, Filterpapier und Objektträger wurden nach Anleitung zusammengebaut, in den Rotor gestellt und ca.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden in die Trichter eingespritzt. In der Cytospin Zentrifuge (Cytospin3, Shandon, Frankfurt) wurden die Zellen dann 10 min bei 500 rpm auf den silansierten Objektträgern zentrifugiert. Die Objektträger mit den fixierten Zellen wurden dann getrocknet und bis zur Verwendung bei -20°C mit Trockenmittel gelagert.

### **Immunfärbungen**

Für die Immunfärbungen wurden die Cytospins zuerst mit 0,2% Triton X-100 (Bio-Rad, München) 5 min permeabilisiert, damit die Antikörper die Zellmembran passieren können. Danach wurden die Zellen mit 10% normalem Ziegenerum

(NGS, Dako, Hamburg) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu blockieren. Anschließend wurden die beiden Primärantikörper, der polyklonale Anti-Kaninchen Serotonin Antikörper (Dianova, Hamburg) und der monoklonale Anti-Maus SNAP-25 Antikörper (Synaptic Proteins, Göttingen) 1:500 in 2% NGS verdünnt, auf die Zellen gegeben und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern zuerst Ziege-Anti-Kaninchen (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 1:100 in 2% NGS verdünnt und dann mit Ziege-Anti-Maus (Alexa Fluor 568, Molecular Probes) 1:50 in 2% NGS verdünnt, eine Stunde lang im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Cytospins 3x für 3 min mit PBS gewaschen. Als Lösungsmittel wurde stets PBS verwendet. Zum Schluss wurden die Zellen einmal mit Aqua bidest. gespült um keine störende Salzflecken auf den Objektträgern zu haben und mit Mounting Medium (Sigma) eingedeckt. Als Negativkontrolle wurden unspezifische Immunglobuline (Dako) anstatt des Primärantikörpers verwendet. Die Objektträger wurden dann mit einem Zeiss Axiovert 135 TV (Zeiss, Göttingen) angesehen und mit der Digitalkamera (Canon, EOS D30) fotografiert.

### **PAS-Färbung**

Die PAS Färbung wurde am dem Pathologischen Institut des Klinikums Rechts der Isar in einem Färbeautomaten durchgeführt. In der PAS (p-Aminosalicylsäure)-Reaktion werden glycogenhaltige Bestandteile der Zellen angefärbt, die Kohlenhydrate oxidieren (5 min) mit Periodsäure. Die entstehenden Aldehydgruppen ergeben mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiff-Reagens, 15 min) eine charakteristische leuchtende Rotfärbung. Zum Schluss wurden die Zellen mit Hämatoxylin (2 min) gegengefärbt. Mit Hämatoxylin werden alle basophilen Zellstrukturen (z.B. Chromatin der Zellkerne) blau angefärbt und alle azidophilen Bestandteile (z.B. Cytoplasma) rot. Nach Amylasevorbehandlung wird Glykogen gespalten, so dass nur noch Glycoproteine, Mukoproteine, und Mukopolysaccharide eine Farbreaktion mit PAS ergeben.

## Detektion apoptotischer Zellen mit TUNEL Färbung

Zellen können prinzipiell auf zwei Arten sterben, passiv durch Nekrose oder aktiv durch Apoptose. Die beiden Vorgänge können durch Besonderheiten in der Morphologie, Biochemie und Molekularbiologie der sterbenden Zellen unterschieden werden. In dieser Arbeit wurden die apoptotische Zellen mit dem *In situ Cell Death Detection Kit* (Roche) detektiert.

Während der Apoptose wird die genomische DNA in niedermolekulare doppelsträngige Fragmente (Mono- oder Oligonukleosomen) gespalten oder durch Einzelstrangbrüche (*nick`s*) in DNA Fragmente mit höherem Molekulargewicht. Diese Brüche können an den freien 3´OH-Enden mit modifizierten Nukleotiden (dUTP`s) in einer enzymatischen Reaktion detektiert werden. Das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert dabei die Polymerisation der Nukleotide an die freien 3´OH-Enden. Daher auch die Name TUNEL–Test (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*). Die mit Fluorescein markierten Strangbrüche können dann mit Merretichperoxidase konjugierten Anti-Fluorescein Antikörper (POD) detektiert werden. Danach können die peroxidasemarkierten Antikörper mit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) Substratlösung (Dako) visualisiert werden.

Zu der Färbung wurden folgende Lösungen benötigt:

Blockierlösung:	30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,5ml
	Methanol	49,5ml
Lysispuffer:	Natriumcitrat	0,1g
	Triton	0,1ml
	H <sub>2</sub> O	100ml
Tris-Puffer:	Tris	1,21g
	NaCl	0,58g
	H <sub>2</sub> O	ad 1000ml
	einstellen: pH 7,5 mit konz. HCl Lösung	
	Magermilchpulver	1g



Fixierlösung:	Bouin`s <i>solution</i>	9,5ml
	Eisessig	0,5ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Natriumcitrat und Bouin`s *solution* wurden von Sigma, Tris und Magermilchpulver von AppliChem, Methanol und Eisessig wurden von der Firma Merk bezogen.

Für die TUNEL-Färbung wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert. Nach 5h und 24 h wurden die Zellen fixiert um festzustellen, ob die EC Zellen durch Apoptose sterben. Dazu wurde das Kulturmedium vorsichtig von den Deckgläsern abgenommen und je 1ml Fixierlösung auf die Deckgläser gegeben. Nach 15 min Inkubationszeit wurden die fixierten Zellen 4x 3 min mit PBS gewaschen um Rückstände von der Fixierlösung zu entfernen. Danach wurden die Deckgläser 30 min bei Raumtemperatur in die Blockierlösung getaucht um unspezifische Peroxidasereaktion bei der Färbung zu vermeiden. Nach jedem folgenden Schritt wurden die Zellen 3x 3 min mit PBS gewaschen. Nach der Blockierung wurden die Zellen auf Eis 2 min mit 1ml Lysispuffer überschichtet, wodurch die Zellen permeabilisiert wurden. Danach wurden die TUNEL-Reagenz (dUTP`s und TdT) aus dem Kit nach Anleitung gemischt und je 50µl wurden (Negativkontrolle ohne TdT oder TUNEL-Reagenz) auf die Deckgläsern verteilt, mit Parafilm abgedeckt und bei 37°C in einem feuchten Kammer 60 min inkubiert. Nach der Stunde Inkubation wurden die Zellen mit dem POD Lösung (mit Trispuffer 1:3 verdünnt) für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Dadurch wurden die Zellen mit Fluorescein markierter Strangbrüche mit POD detektiert. Schließlich wurden die markierten Zellen mit AEC Lösung 4 min gefärbt, welche die Peroxidase mit einer roten Farbe sichtbar macht. Die Deckgläser wurden dann auf Objektträgern mit Kaisers Glyceringelatine (Merk) eingedeckt und lichtmikroskopisch untersucht.

### 3. Charakterisierung der EC und BON Zellen

#### 3.1.1 Stimulation der EC Zellen

Nach Abschluss der Präparation wurden die Zellen in Kulturmedium für 3 Stunden unter basalen Bedingungen bei 37°C belassen. Danach wurden je  $1 \times 10^5$  EC Zellen in 1ml Lösung C mit Noradrenalin (1mM, Artenerol, Sigma), Acetylcholin (1mM, Acetylcholinchlorid, RBI, Natick USA), GABA (1mM, Sigma) oder ohne Stimulus für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach der Stunde wurden die Zellen zur Serotoninmessung vorbereitet und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.1.2 Stimulation der BON Zellen

BON Zellen wurden wie oben beschrieben für 48h auf 6-Loch Platten kultiviert. Danach wurde das Kulturmedium abgenommen und für 3 Stunden durch serumfreies DMEM Medium (Gibco) ersetzt. Demnach wurden die nicht adherenten Zellen abgesaugt und 1ml frisches DMEM Medium auf die Zellen gegeben entweder ohne Stimulus oder mit Noradrenalin (1mM, Artenerol), Acetylcholin (1mM, Carbachol) GABA (1mM), oder Denatonium Benzoat (10mM), Nicotin (10mM), Koffein (10mM), Chloroquin (1mM) und Phenylthiocarbamid (3mM). Nach 120 min wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.1.3 Hemmung der Serotoninfreisetzung bei BON und EC Zellen

Um die Stimulation der Serotoninfreisetzung zu hemmen, Cromoglycinsäure (Sigma) wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen gegeben unmittelbar vor der Zugabe von Noradrenalin. Nach 60 (EC Zellen) bzw. 120 (BON Zellen) min

Inkubationszeit wurde die Überstand von den Zellen abgenommen und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt.

### 3.2 Rezeptorennachweis an den EC Zellen

Die Expression von adrenergen, cholinergen GABA-ergen und Guanylatcyclase C Rezeptoren sowie das Peptid Guanylin wurden mittels Immunocytochemie und RT-PCR festgestellt.

Die immunocytochemischen Nachweise wurden analog zu den Serotonin- und SNAP-25 Nachweisen durchgeführt, wobei hier keine Doppelfärbungen vorgenommen wurden. Für die Färbungen wurden folgende Antikörper verwendet: polyklonale Anti-Kaninchen  $\beta$ 1- adrenerge Rezeptor Antikörper (Verdünnung:1:500; Dianova, Hamburg), polyklonale Anti-Kaninchen  $\alpha$ -2A- adrenerge Rezeptor Antikörper (Verdünnung:1:1000; Dianova, Hamburg), polyklonale Anti-Kaninchen muscarinische M3 Acetylcholin Rezeptor Antikörper (Verdünnung:1:500; Santa Cruz, Heidelberg) und der monoklonale Anti-Maus GABA-A Rezeptor ( $\beta$ 2/3 Untereinheit) Antikörper (Verdünnung:1:500; BioMol, Hamburg). Für den Guanylatcyclase C Rezeptor und für das Guanylin gibt es zurzeit keine Antikörper.

## 4. Molekularbiologische Nachweise

### 4.1 RNA Isolierung

RNA wurde aus frisch isolierten Zellen unmittelbar nach der Dichtegradient Zentrifugation (EC Zellen) oder nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA und anschließender Zentrifugation (BON Zellen) mit dem RNeasy Protect Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Diese Technologie benutzt die Bindungseigenschaften einer speziellen Silikagel-Membran, an der bis zu 100 $\mu$ g RNA gebunden werden können. Da diese Membran nur RNA über eine Länge von 200 Basenpaaren bindet, wird eine

Anreicherung von messenger RNA (mRNA) in den Proben erreicht. In einem denaturierenden Guanidinisothiocyanat Puffer werden Proben lysiert und homogenisiert, was den Abbau von RNA in der Probe von Anfang an verhindert. In dieser Arbeit wurden die Zellen in 1 ml Lösung C in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß überführt und bei 2600 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50µl PBS aufgenommen. Dann wurde die RNA mit 450µl RNA later Reagenz stabilisiert. Danach wurden die Zellen bei 5430 rpm in der Tischzentrifuge (Hettich, Mikro 22R, Tuttlingen) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 350µl RLT Lysispuffer aufgenommen, dem vorher 1% 2-Mercaptoethanol (Merk) zugesetzt wurde. Nach kurzer Einwirkzeit wurden 350µl 70% Ethanol hinzugefügt, gut gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde bei 14000 rpm 15s abzentrifugiert dann 1x mit 700µl RW1 und 2x mit 500µl RPE Lösung gewaschen. Bei dem letzten Waschschrift wurde die Säule 2 min lang zentrifugiert um alle Spuren von Alkohol zu entfernen. Danach wurde auf die Säule 50µl RNase-freies Wasser gegeben und die Säule nach einer kurzen Einwirkungszeit 1 min zentrifugiert, wodurch die RNA aus der Säule eluiert wurde. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde photometrisch (Beckman Spektrophotometer DU 640) bestimmt und die Absorption zwischen 220 und 320 nm gemessen. Die Messung gibt auch über die Qualität der Nukleinsäuren Auskunft.

## 4.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde dann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies ist möglich durch den Einsatz von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, auch reverse Transkriptase genannt, welche ursprünglich ein RNA-Viren Enzym ist und für die Übersetzung von RNA in DNA bei einer Infektion verantwortlich ist. Die eingesetzten Primer definieren den RNA Abschnitt, der umgeschrieben werden soll. Hier wurden Random Hexamere als Primer verwendet um eine möglichst große Vielfalt an cDNA umschreiben zu können.

Für die reverse Transkription wurden die Reagenzien von Perkin Elmer (TaqMan Reverse Transcription Reagents, Perkin Elmer, Weiterstadt) wie folgt verwendet.

Puffer	5µl
Random Hexamere	2.5µl
MgCl <sub>2</sub>	11µl
dNTPs	10µl
RNase Inhibitor	1µl
Reverse Transkriptase	0,5µl
RNase freies H <sub>2</sub> O	15µl
RNA	5µl

Der Ansatz wurde in einem 0,5ml Eppendorf Gefäß in den Thermocycler (Eppendorf Mastercycler 5330) gestellt und folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

10 min	25 °C
30 min	48 °C
5 min	95 °C

Nach dem letzten Reaktionsschritt wurde die Nukleinsäurekonzentration gemessen und die cDNA Proben bis weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

### 4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion beruht auf der Synthese von DNA-Sequenzen an einer Einzelstrangnukleinsäure, die zwischen zwei vorgegebenen Oligonukleotidprimern liegt. Temperaturstabile DNA-Polymerasen (Taq-Polymerase) gestatten auf einfache Weise die Durchführung wiederholter DNA-Synthese- und Renatuierungszyklen (Amplifikation) der neusynthetisierten DNA-Doppelstränge. Die Renatuierung erfolgt bei 94°C, die Synthese bei 72°C. Da die Primer jedoch verschiedene Längen und

Basenzusammensetzung haben, ist die Anlagerungstemperatur (AnT) der Primer an den DNA-Abschnitt primerspezifisch.

In dieser Arbeit wurde PCR dazu verwendet, die exprimierten Sequenzen für bestimmte Rezeptoren in dem cDNA-Gemisch zu finden und zu amplifizieren, damit diese in Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können.

Die spezifischen Primer für die Rezeptoren wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Dnastar, Primer Select) entworfen und bei der Fa. MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Die Primer wurden stets in der Konzentration von 25pM eingesetzt.

Für die PCR wurden die Reagenzien von Qiagen (Taq PCR Master Mix) wie folgt verwendet.

Master Mix	15µl
Primer je	0,5µl
H <sub>2</sub> O	7µl
cDNA	2µl

Der Ansatz wurde in einem 0,2ml PCR Gefäß (Biozym, Oldendorf) in den Thermocycler (MWG-Biotech Primus 96 plus) gestellt und folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

1x	5 min	94°C
35x	30s	94°C
	45s	AnT
	1 min	72°C
1x	10 min	72°C

Die jeweiligen Primersequenzen und Anlagerungstemperaturen sind in Tabelle 1. aufgeführt. Nach dem letzten Reaktionsschritt wurden die PCR Produkte auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

Tabelle 1 Sequenzen und Anlagerungstemperaturen (AnT) von verwendeten Primern

Primer	Primer Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)	AnT (°C)
beta1-AR (sense)	GCC GAT CTG GTC ATG GGA	327	58
beta1-AR (antisense)	GTT GTA GCA GCG GCG CG		
beta2-AR (sense)	ACC TCC TTC TTG CCT ATC CA	560	55
beta2-AR (antisense)	TAG GTT TTC GAA GAA GAC CG		
alpha2A-AR (sense)	AGG TGA CGC TGA CGC TGG TGT GC	418	65
alpha2A-AR (antisense)	ATG AGT GGC GGG AAG GAG ATG ACG		
alpha2B-AR (sense)	CTC ATC ATC CCT TTC TCT CTG	712	58
alpha2B-AR (antisense)	CCT CTT CAT CTC CCT CCT CTG		
M3-AchR (sense)	GTG GTG TGA TGA TTG GTC TG	790	58
M3-AchR (antisense)	TCT GCC GAG GAG TTG GTG TC		
5HT3-R (sense)	CAT CGG CAC TCC CCT CAT TGG T	413	58
5HT3-R (antisense)	CCC GCA TCT CAT CCC GCT TCT		
5HT4-R (sense)	AGC TGT CTG GGG CCT GCT TT	484	52
5HT4-R (antisense)	CCA AGA CAT CTG GTT TTA TG		
GABA-A- $\beta$ 3-R (sense)	AGC CAA GGC CAA GAA TGA TCG	224	55
GABA-A- $\beta$ 3-R (antisense)	TGC TTC TGT CTC CCA TGT ACC		
GABA-B-R2-R (sense)	CAT CAT CTT CTG CAG CAC	353	55
GABA-B-R2-R (antisense)	TCT GTG AAG TTG CCC AAG		
Guanylin (sense)	GGT GCC TTG GCT GTC CTG GTA G	459	60
Guanylin (antisense)	TTC CCC GGG GTA GTT GTC TTC T		

GCC-R (sense)	CTG CGC GAA GCC GAA CTA AAT GT	394	60
GCC- R (antisense)	CAG GCT CCG ATC CGT TCT TGT AAA		
GAPDH (sense)	TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC	980	60
GAPDH (antisense)	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC		
VMAT 1 (sense)	CAT GGG GAC TTC GCT TTT GAC G	438	62
VMAT 1 (antisense)	TCG GCG ATG GCA TAG ACA CTC C		
Olfaktorische-R (sense)	TGG C5T AYG AYM G5T WYG T5G C	525	55
Olfaktorische-R (antisense)	RAA 5GG RTT NAG CAT NGG		

#### 4.4 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese macht von der Eigenschaft geladener Substanzen Gebrauch, in einem elektrischen Feld zum ihrer Ladung entgegengesetzten Pol zu wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wird von der Ladungsstärke und der Größe und Konformation der Ladungsträger und von den molekularen Eigenschaften des Elektrophoresesystems (Porengröße des Trägermaterials) bestimmt. Die DNA Fragmente wurden im Agarosegel im elektrischen Feld ihrer Größe nach aufgetrennt. Durch Anfärben mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid (Merk) konnten die Fragmente im UV Licht (254nm) visualisiert werden und im Vergleich mit einem Längenstandard auch ihre Größe ermittelt werden.

Zur Gelelektrophorese wurden folgende Lösungen benötigt:

TAE Puffer:

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



Probenauftragspuffer:

Ficoll 400	25%
EDTA	50mM
Bromphenolblau	0,25%
Xylencyanol	0,25%

2g Agarose (Gibco) wurden in 100ml TAE Puffer durch kurzes Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst. Das Gel wurde unter ständigem Rühren auf ca. 50°C abgekühlt, dann wurden 5µl Ethidiumbromid dazugegeben und das Gel in einen Gelgießstand gegossen. Durch vorheriges Einsetzen eines Kammes konnten Taschen im Gel ausgespart werden.

Für die Gelelektrophorese wurde ein horizontales Gelelektrophoresesystem (Bio-Rad) verwendet. Das PCR-Produkt und der Längenstandard (GeneRuler 100bp DNA Ladder, MBI Fermentas, St.Leon-Rot) wurden mit 7µl Probenpuffer vermischt. Der Kamm wurde aus dem verfestigten Gel entnommen und das Gel in ein TAE-Puffer gefülltes Gelelektrophoresesystem gestellt. Dann wurden der vorbereitete Standard und die PCR-Proben in den Taschen aufgetragen und bei 83V 50 min laufen gelassen. Die Visualisierung erfolgte unter UV Licht, die Gele wurden fotografiert und mit Hilfe des Standards die Produktgrößen ermittelt.

#### 4.5 Extraktion von DNA Fragmenten

Diese Methode erlaubt es DNA Fragmente aus einem Gel zu isolieren und für eine Sequenzierung vorzubereiten. Die PCR-Proben wurden in der Gelelektrophorese von den Primern und anderen DNA-Produkten getrennt. Die unter UV-Licht identifizierte Bande wurde mit einem Skalpell markiert. Nach Abschalten des UV- Lichtes wurde die Bande aus dem Gel vollständig ausgeschnitten und anschließend in ein Eppendorf Gefäß überführt. Das übrige Gel wurde dann auf den Erfolg des Vorgangs kontrolliert.

Die Extraktion des DNA Fragmentes aus der Agarose erfolgte mit der NucleoSpin Extract Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland) nach Protokoll der

Hersteller. Kurz, das Gelstück wurde gewogen und pro 100mg 300µl NT1 Puffer dazugegeben. Folgend wurde die Probe auf 50°C bis zum vollständigen Auflösen erwärmt. Danach wurde die Gellösung auf eine Nucleospin-Säule gegeben und bei 10000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Anschließend wurde die Säule 2x mit NT3 Puffer gewaschen. Schließlich wurde die Säule getrocknet und die DNA mit 50µl NE Puffer eluiert.

Die so extrahierten DNA Fragmente wurden zur Sequenzierung zu der Firma MWG-Biotech, geschickt.

## 4.6 Genexpressionanalyse mit DNA Chip

In dieser Arbeit wurde das Genexpression Profil von EC Zellen mit dem Affymetrix Array (GeneChip Rat Genome RG-U34A Array, Affymetrix, Santa Clara, USA) untersucht. Für die Analyse wurde RNA aus ca. 2 Millionen EC Zellen direkt nach der Präparation wie oben beschrieben isoliert. Die Gene Chip Analyse wurde an der University of California Los Angeles (UCLA, USA) durchgeführt.

Die Affymetrix GeneChip Analyse ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung der Genexpression von mehr als 5000 bekannten Gene und mehreren tausend weiteren Genen, deren Funktion zur Zeit bei Ratten noch nicht bekannt ist.

Der Vorläufer der Genchips war die Entwicklung des *Southern blots* im Jahre 1975. Im Hintergrund dieser Technologie steht die Entdeckung, dass Einzelstrang DNA stark an Nitrozellulose Membrane bindet, so dass diese gleichzeitig auch an komplementären Strängen binden können. Die Weiterentwicklung zu den Genchips kam 1992 mit der Möglichkeit Oligonucleotide *in situ* auf Glas zu synthetisieren.

Durch mehrere Genbanken werden die zu repräsentierenden Gene verglichen und Gruppen von ähnlichen Sequenzen ausgewählt. Für jedes Gen werden von den möglichen Basenabfolgen 15-20 unterschiedliche Oligonukleotide ausgesucht mit einer Länge von 25 Basen, welche als einzigartige sequenzspezifischen Detektoren dienen. Jedes von diesen Oligonukleotiden ist in Paaren angeordnet. Diese Paare sind identisch bis auf eine Base in zentraler Position. Eines der Oligonukleotiden

stellt die genspezifische Sequenz dar (*perfect match*; PM), ein anderes passt in einer zentralen Position nicht zu der Sequenz (*mismatch*; MM). Wenn die Probe dann mit den Oligonukleotiden hybridisiert wird, sollte die Probe an den *perfect match*, nicht aber an den *mismatch* Oligonukleotiden binden. Aus dieser einmaligen Anordnung wird dann die Wahrscheinlichkeit der Expression eines bestimmten Genes errechnet. Dadurch wird die Sicherheit erhöht exprimierte Gene zuverlässig zu identifizieren, es lässt sich aber gleichzeitig eine unspezifische Bindung erkennen (Abb.6).

Für die Analyse wurden mindestens 1µg poly-A RNA benötigt. Die isolierte RNA wurde zuerst mit 3M Natriumacetat eine Stunde bei -20°C ausgefällt und anschließend bei 4°C in einer Mikrozentrifuge bei  $\geq 12000xg$  abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann 2x mit 80% Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen.

Die so aufgereinigte RNA wurde durch reverse Transkription in doppelsträngige cDNA umgewandelt. Für die Synthese der cDNA wurde das Gibco Superscript Choice System benutzt, nach Anleitung der Hersteller aber mit einem speziellen T7-(dT)<sub>24</sub> Primer (5`-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCCG - (dT)<sub>24</sub>-3`).

Danach wurde der Doppelstrang cDNA durch Phase Lock Gel Phenol/Chloroform Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

Das Phase Lock Gel bildet eine geschlossene inaktive Barriere zwischen der wässrigen und der organischen Phase von Phenol-Chloroform Extraktionen und erleichtert dadurch eine saubere Auftrennung.

In dem folgenden Schritt wurde durch *in vitro* Transkription die cDNA mit Biotin markierten Ribonukleotiden in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben (Enzo RNA Transcript Labeling Kit). Die daraus resultierende cRNA Probe wurde dann mit der RNeasy Mini Kit aufgereinigt. Anschließend wurde die cRNA Probe bei 94°C in 35 min in einem Puffer fragmentiert (Endkonzentration: 40mM Trisacetat, pH 8,1; 100mM Kaliumoxidacetat; 30mM Magnesiumoxidacetat) um RNA Fragmente zwischen 35-200 Basen zu erhalten. Zur Hybridisierung wurde foglich die markierte und fragmentierte Probe auf den Chip gegeben und nach 16 Stunden Inkubationszeit mit einem Streptavidinpycoerythrin Konjugat gefärbt.

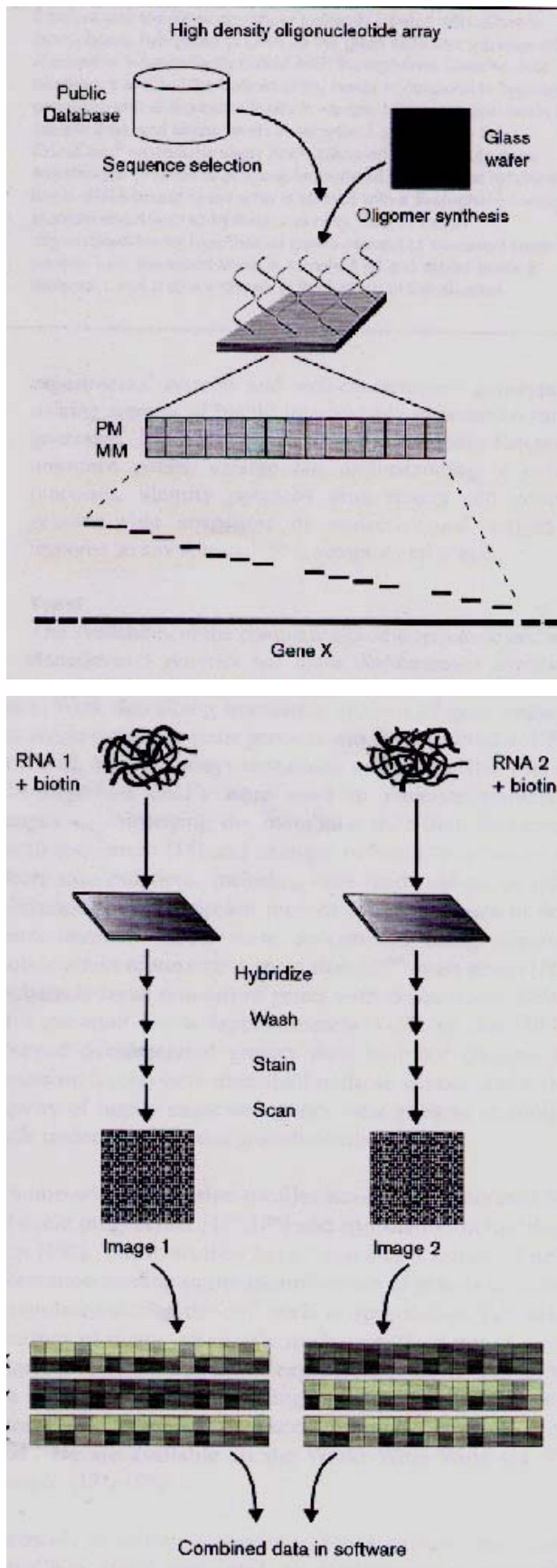


Abb. 6: Selektion und Anordnung der Oligonukleotide auf einem Affymetrix GeneChip. (nach Harrington et al., 2000)

Anschließend wurde in einem Waschautomaten (GeneChip Fluidics Station) das nicht gebundene Konjugat von dem Chip entfernt und durch einen speziellen HP GeneArray Scanner visualisiert.

Danach konnten die Daten mit Hilfe eines Software Paketes (DNA-Chip Analyzer) ermittelt werden. Hierbei können die erhaltenen Daten gegen so genannte *housekeeping* Gene (wie GAPDH und  $\beta$ -actin), die in jeder Zelle annähernd gleich stark exprimiert werden, normalisiert werden. Dadurch erhält man Werte, die eine relative Genexpression ausdrücken.

Schließlich konnten die Expressionsmuster von mehreren Chips miteinander verglichen werden, wodurch falsch positive Signale ausgefiltert werden sollten.

## 4.7 Quantifikation der Genexpression mit *real-time* TaqMan PCR

### 4.7.1 Hintergrund

Real-time TaqMan PCR ist eine neue, hocheffiziente Methode zur quantitativen DNA- und cDNA-Analyse, die sich die 5'  $\rightarrow$  3' Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze macht.

Sämtliche Schritte der herkömmlichen PCR laufen bei der TaqMan PCR in der gleichen Weise ab wie bei der konventionellen PCR. Zur Quantifizierung wird eine spezielle fluorogene Sonde (Probe) eingesetzt. Sie besteht aus einem Oligonukleotid, dessen Enden mit Farbstoffen markiert sind: das 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat), das 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (Rhodaminderivat). Die Sonde ist in ihrer Nukleotidsequenz spezifisch für die zu amplifizierende DNA-Matrize und liegt zwischen den beiden Primern. Während der PCR hybridisiert sie deshalb zusammen mit den Primern am Matrizenstrang. Solange die Sonde intakt ist, ist die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes sehr gering. Aufgrund der räumlichen Nähe der zwei Farbstoffe unterdrückt nämlich der Quencher die Reporterfluoreszenz. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Energie-Transfer (FET) bezeichnet. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase nun auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es entsteht eine

Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5' → 3' -Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase aktiviert und die Sonde geschnitten wird. Hierbei wird die räumliche Nähe – und damit auch die FET – zwischen den beiden Farbstoffen unterbrochen, was zu einer Zunahme der Reporterfluoreszenz führt. Da die freie, nicht hybridisierte Sonde nicht gespalten wird, ist die Zunahme der Reporterfarbstofffluoreszenz zu jedem Zeitpunkt der PCR direkt proportional zur Konzentration der amplifizierten Zielsequenz. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe kann mit Hilfe des 7700 ABI PRISM Sequence Detectors (Perkin Elmer) Zyklus für Zyklus erfaßt werden.

Fluoreszenzwerte, die vom Gerät gemessen bzw. bestimmt werden:

a. Der Rn-Wert - normalisiertes Reportersignal

Der Rn-Wert ist der Quotient aus der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der Emissionsintensität eines passiven Referenzfarbstoffes.

Durch die Einbeziehung des passiven Referenzfarbstoffes in die Ermittlung von Fluoreszenzintensitäten (Normalisierung des Reportersignals) können unspezifische Einflüsse auf die PCR, wie z.B. Voluminaschwankungen bei Pippetierfehlern, ausgeglichen werden.

b. Der  $\Delta Rn$ -Wert

Der  $\Delta Rn$ -Wert ist die Differenz aus dem Rn-Wert und der Baselinefluoreszenz (b).

Die Baselinefluoreszenz wird während der ersten 10-20 Zyklen der PCR gemessen und stellt die von Anfang an vorhandene, nicht auf Amplifikation des PCR-Produktes beruhende Ausgangsfluoreszenz dar. Die durch Amplifikation des PCR-Produktes entstehende Fluoreszenz liegt im Bereich der Baselinefluoreszenz unter der Nachweisgrenze. Da das Baselinesignal ab und zu geringe unspezifische Schwankungen aufweisen kann, wird es, um diese Schwankungen auszugleichen, mit Einführung des  $\Delta Rn$ -wertes gleich Null gesetzt (im Bereich des Baselinesignals entspricht der Rn-Wert dem gemessenen Baselinesignal).

## 4.7.2 PCR-Verlauf - kinetische Analysen

Während des Verlaufs einer PCR unterscheidet man bei Betrachtung der Fluoreszenz *versus* der Zykluszahl folgende vier Phasen:

Phase 1: Baselinefluoreszenz ( $\Delta R_n=0$ ): Wie oben schon erwähnt, findet in diesem Bereich eine exponentielle Replikation der Zielsequenz statt, aber die durch die PCR entstandene Reporterfluoreszenz liegt unterhalb der Nachweisgrenze. Das heißt, es ist nur die von Anfang an vorhandene Ausgangsfluoreszenz der beiden Farbstoffe (Baselinefluoreszenz, z.B.  $R_n=0,5$ ) detektierbar. Diese Baselinefluoreszenz wird mit Einführung des  $\Delta R_n$ -Wertes gleich Null gesetzt. Der Bereich der Baselinefluoreszenz umfaßt je nach eingesetzter DNA- oder cDNA-Menge in der Regel mindestens die ersten 15 Zyklen.

Phase 2: sichtbare exponentielle Replikation: Diese Phase beginnt, wenn die während der PCR entstandene Fluoreszenz zum ersten Mal detektierbar wird. Sie endet, wenn zum ersten Mal keine Verdoppelung des PCR-Produktes pro Zyklus stattfindet. Diese Phase ist von besonderer Bedeutung in der TaqMan-PCR, weil in diesem Bereich die *threshold-cycles* (Ct-Werte) gesetzt werden. Weil diese Phase nicht so lange andauert, kann sie lediglich in der logarithmischen Darstellung von  $\Delta R_n$  (wobei niedrige Fluoreszenzwerte auf der Skala sehr breit dargestellt sind), jedoch nicht in der linearen Darstellung gut beobachtet werden.

Phase 3: mit immer geringerem Anstieg der PCR-Rate: In dieser Phase findet keine exponentielle Replikation des Amplifikates mehr statt, die Amplifikationskurve flacht immer weiter ab. Die Gründe hierfür sind:

- wenn die Amplifikatmenge eine bestimmte Konzentration erreicht hat, ist das Verhältnis von Polymerase zu PCR-Produkt so stark abgesunken, dass innerhalb eines Zyklus nicht mehr für jedes Amplifikat eine Polymerase vorhanden ist und folglich auch keine Verdoppelung des PCR-Produktes pro Zyklus mehr stattfinden kann
- die Aktivität des Enzyms sinkt aufgrund Hitzedenaturierung mit zunehmender PCR-Dauer
- mit zunehmender Konzentration der amplifizierten Stränge hybridisieren diese in der Annealingphase untereinander; diese Reaktion konkurriert mit der Anlagerung der Primer an das Amplifikat und führt ebenfalls zu einer Senkung der PCR-Effizienz

Phase 4: Plateauphase: in dieser Phase kommt es zu einem Erliegen der Amplifikation; dies ist der Fall wenn eines der Reagentien (z.B. dNTPs → keine Bausubstanz mehr vorhanden) verbraucht ist.

## Quantifizierung - von Fluoreszenzen zu Kopienzahlen

Ermittlung des *threshold-cycles* (Ct-Wert):

Der Ct-Wert bezeichnet jene Zykluszahl, bei der zum ersten Mal die Reporterfluoreszenz das Baselinesignal meßbar überschreitet, das heißt, wenn zum ersten Mal die durch die PCR-Amplifikation entstandene Fluoreszenz detektierbar wird. Der Ct-Wert wird zur Quantifizierung herangezogen und ist somit der wichtigste Parameter bei der TaqMan-PCR.

Bezug der Werte auf ein Referenzgen:

Die einzelnen Proben enthalten unterschiedlich viel cDNA, je nachdem wie hoch die eingesetzte Materialmenge ist (z.B. Zellzahl), wie effizient die RNA-Isolierung oder die cDNA-Synthese abläuft etc. Um unabhängig von all diesen Faktoren die Expression von bestimmten Genen untersuchen zu können, müssen die ermittelten Kopienzahlen auf ein Gen bezogen werden, dessen Expression konstant ist und folglich ein Maß für die gesamt-cDNA-Menge in allen Proben ist. Für jede Probe müssen also die Kopienzahlen der Referenzgen-cDNA und die der zu untersuchenden Zielsequenz ermittelt werden. Anschließend werden die Werte aufeinander bezogen.

Für die TaqMan-PCR wurden die Reagenzien von Perkin Elmer (TaqMan Universal Master Mix) verwendet.

DNA-Polymerase AmpliTaq Gold	5U/µl
AmpErase UNG	1U/µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM
dNTPs	10mM



### 10x TaqMan Puffer

KCl	500mM
EDTA	0,1mM
Tris-HCl	100mM
Passiver Referenzfarbstoff (ROX)	600nM

pH 8,3

### 4.7.3 Primer und Probes für die TaqMan-PCR

Die für die TaqMan-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech in lyophilisierter Form geliefert. Die lyophilisierte DNA wurde in sterilem Wasser aufgenommen, wobei jeweils eine Primerkonzentration von 25 pM erstellt wurde.

Ebenfalls in lyophilisierter Form wurden die fluorogenen Oligonukleotidsonden (Proben) geliefert. Sie wurden der Firma Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Bei der Auflösung in sterilem Wasser wurde eine Probekonzentration von 10 pM erstellt.

Die Primer- und Probesequenzen sind in der nachfolgenden Tabelle (2) aufgeführt.

Tabelle 2 Sequenzen und von verwendeten Primern und Proben für die TaqMan Reaktion

5`-3`	VMAT
Primer 1	TCT GGA CAA CAT GCT GCT CAC T
Primer 2	TCT TTG AAC TCT GTC GCG TAC AG
Probe	TGG TGC CCA TTG TGC CCA CCT T

## GABA-A-R

Primer 1	GGG CTA CGC CCG AAA CTT
Primer 2	CTA GGG CAA GCG CCA CAT
Probe	ACC AGG CAT TGG AGG TCC TCC AGT G

## Durchführung der TaqMan-PCR

Folgender Ansatz wurde für ein 30 µl Reaktionsgemisch mit Universal Master Mix (Perkin Elmer) angewandt:

UniversalMaster Mix	15µl
Primer und Probe je	0,6µl
H <sub>2</sub> O	8,2µl
cDNA	5µl

Der Ansatz wurde in einer MicroAmp® 96 well Platte (Applied Biosystems) pipettiert in einem Sequence Detector 7700 folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

1. Zyklus	AmpErase-Verdau	50°C	2 min
	Denaturierung	95°C	10 min
	Annealing	58°C	20 sec
	Extension	72°C	30 sec
2. – 40. Zyklus	Denaturierung	95°C	15 sec
	Annealing	58°C	20 sec
	Extension	72°C	

## 5. Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  mittlerer Standardfehler (SEM) angegeben. Anstiege wurden aus dem Quotient des angereicherten relativen Expressionswerts und des Expressionswerts in Mucosa Zellen errechnet.

Die statistische Analyse wurde mittels eines Computerprogramms (GraphPad, Prism 3,0) durchgeführt. Es wurde eine Zwei-Weg ANOVA (Faktor: Fraktion x Präparationstag oder Behandlung x experimenteller Tag), gefolgt von einem t-Test für abhängige Werte verwendet.

Unterschiede mit  $p < 0.05$  wurden als signifikant angesehen.

### III. Ergebnisse

#### 1. Isolation und Primärkultur von EC Zellen

Enterochromaffine Zellen aus dem Rattenileum wurden durch enzymatischen Verdau, Elutriation und Dichtegradient Zentrifugation isoliert. Mit einer kombinierten Methode von enzymatischem Verdau und der Behandlung mit EDTA über insgesamt 75 min wurde eine Suspension von Epithelzellen hergestellt. Diese Fraktion wurde Mucosa Zellen (MUC) genannt. Die Zellen der Fraktion waren zu 92% intakt, wie es Trypanblau Färbungen ergaben.

Die Mucosa Zellen wurden anschließend in den Beckman Elutriator eingespritzt und bei 2000 rpm zentrifugiert. Von den gesamten Fraktionen, wurden die EC Zellen bei 24ml/min gefunden. Das entspricht einer Größe, ähnlich der ECL Zellen im Magen, von ungefähr 10µm im Durchmesser. Die Fraktion wurde F2 genannt.

Die gesammelten Zellen wurden schließlich auf einen Nycodenz Dichtegradienten aufgetragen, wobei Dichten von 1,051-1,074 verwendet wurden. Diese Zellsuspension ergab eine einheitliche Zellfraktion bei der Dichte von 1,07g/ml. Die resultierende Fraktion wurde Dichtegradient Fraktion genannt (DG).

#### 2. Identifizierung der EC Zellen in der DG Fraktion

##### 2.1 Serotoninmessungen

Die Serotoninfreisetzung (Abb.7A) und der Serotonininhalt (Abb.7B) wurden in den verschiedenen Zellfraktionen in 20 Experimenten untersucht. Drei Stunden nach der Präparation wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen aus den drei Fraktionen entnommen und eine Stunde bei 37°C in Lösung C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm für 4 min abzentrifugiert und 500µl aus dem Überstand wurden abgenommen. In der verbleibenden 500µl Inkubationslösung wurden die Zellen durch Ultraschallpulse

zerstört, wodurch der gesamte Serotoninhalt aus den Zellen frei wurde. Die so gewonnenen Proben wurden in dem Serotonin EIA analysiert.

In  $1 \times 10^5$  Mucosa Zellen war die Serotoninkonzentration nahe der Sensitivitätsgrenze der Assay (0,5nM), sowohl in der Freisetzung als auch in dem intrazellulären Serotoninhalt. Im Vergleich dazu war die Serotoninfreisetzung in der F2 Fraktion 7-fach erhöht. Die Dichtegradient Zentrifugation bewirkte keine weitere Erhöhung der Serotoninfreisetzung.

Der Serotoninhalt in den F2 Zellen war ähnlich der Freisetzung 7 fach erhöht. Eine weitere insgesamt 14 fache Erhöhung des gesamten Serotoninhalts war in der Dichtegradient Fraktion zu beobachten.

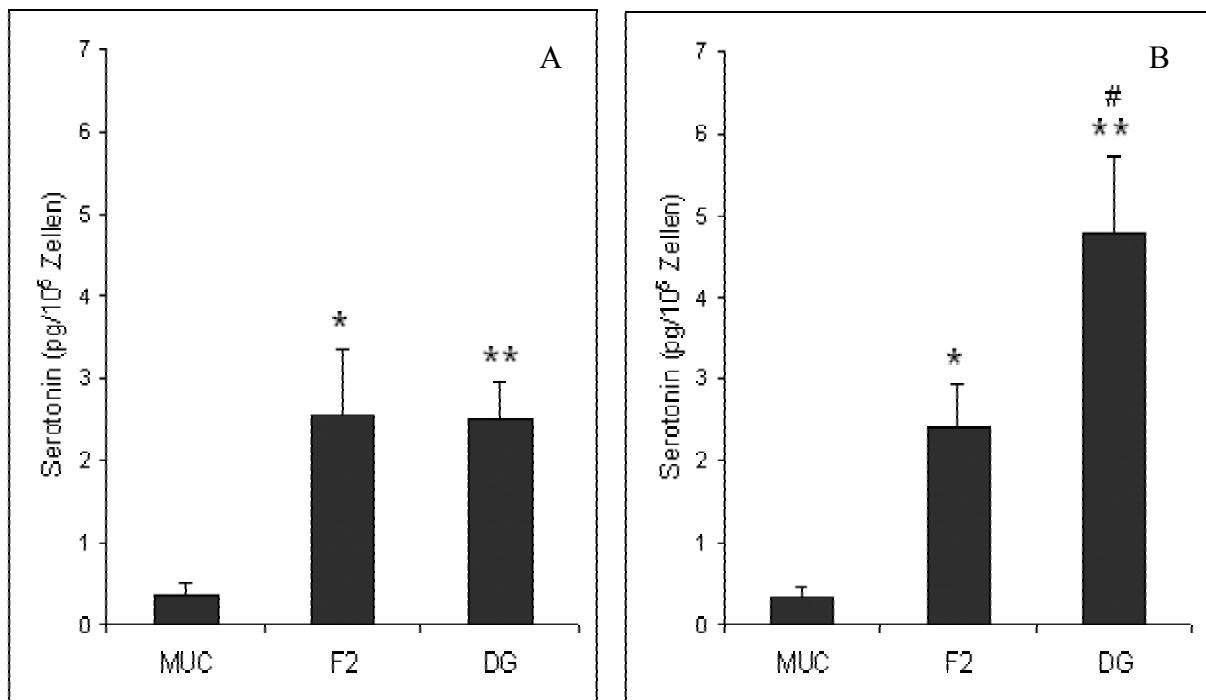


Abb.7. A: Serotoninfreisetzung B: Gesamter Serotoninhalt in den unterschiedlichen Zellfraktionen nach enzymatischem Verdau (MUC), nach Elutriation (F2) und nach Dichtegradient Zentrifugation (DG). Zwei-Weg ANOVA gefolgt von t-Test für abhängige Variablen ergab signifikante Unterschiede in der F2 und DG Fraktionen *versus* MUC \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  und in dem Serotoninhalt F2 *versus* DG #  $p < 0,05$ ;  $n = 20$

## 2.2 Identifizierung der Serotonin-positiven neuroendokrinen Zellen

Um die Anzahl der Serotonin produzierenden EC Zellen in der UF und DG Fraktionen zu ermitteln wurden Cytospins unmittelbar nach Abschluß der Zellisolierung angefertigt. Diese wurden mit Antikörpern gegen Serotonin und gleichzeitig gegen den neuroendokrinen Marker SNAP-25 gefärbt. Insgesamt wurden 5 Experimente durchgeführt und je Experiment wurden mehr als 500 Zellen gezählt. Abbildung 2 zeigt ein repräsentatives Beispiel aus den Färbungen.

Die Auszählungen von den Immunfärbungen ergaben eine positive Färbung gegen Serotonin in  $12\pm 4\%$  der Mucosa Zellen. Dagegen zeigten die Zellen der DG Fraktion in  $84\pm 6\%$  der Zellen eine positive Färbung gegen Serotonin. Somit war eine 7 fache Anreicherung von Serotonin positiven Zellen nach Elutration und Dichtegradient Zentrifugation zu beobachten. Abb. 8A (MUC) und 8D (DG) zeigen ein Beispiel von Immunfärbung gegen Serotonin.

Die Anzahl an neuroendokrinen Zellen wurde mit Antikörpern gegen SNAP-25 nachgewiesen. In der Fraktion von Mucosazellen zeigten  $42\pm 4\%$  der Zellen eine positive Färbung gegen SNAP-25. Der Anteil an positiv gefärbten Zellen für SNAP-25 in der Fraktion nach Elutration und Dichtegradient Zentrifugation betrug  $86\pm 8\%$ .

Die meisten gegen SNAP-25 positiv gefärbten DG Zellen zeigten auch positive Färbung gegen Serotonin, wie es Doppelfärbungsexperimente ergaben. Abb. 8B (MUC) und 8E (DG) zeigen ein Beispiel von Immunfärbung gegen SNAP-25.

Abb. 8C und F zeigen lichtmikroskopische Aufnahmen von den gleichen Zellen, die gegen Serotonin und SNAP-25 Antikörpern gefärbt wurden.

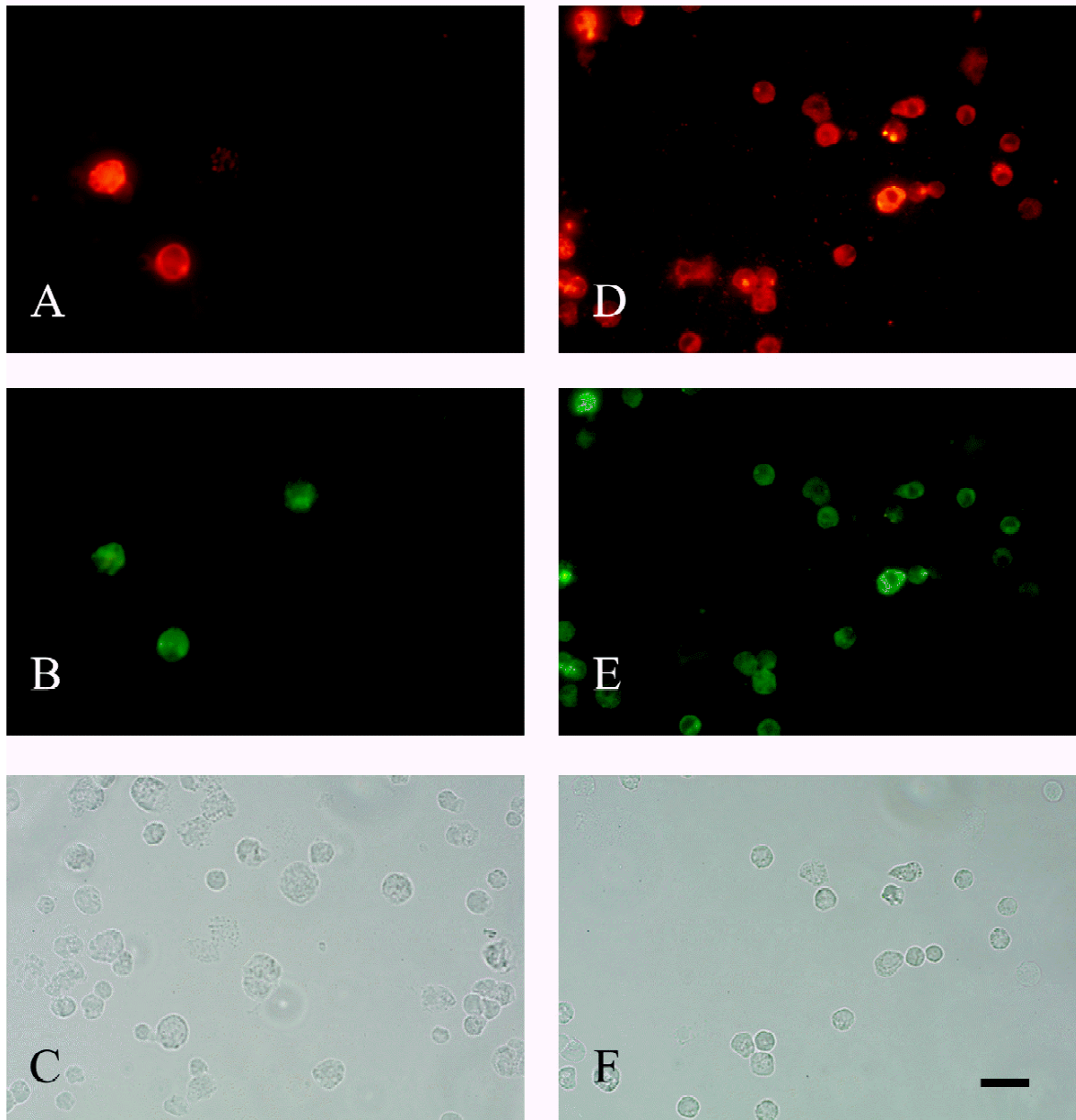


Abb.8: Doppelfärbung auf Cytospins unmittelbar nach der Präparation gegen Serotonin (rote Fluoreszenz) und dem neuroendokrinen Marker SNAP-25 (grüne Fluoreszenz). (n=5)  
Links: Immunfärbung gegen Serotonin (A), gegen SNAP-25 (B) und lichtmikroskopische Aufnahme (C) in der UF Fraktion.  
Rechts: Immunfärbung gegen Serotonin (D), gegen SNAP-25 (E) und lichtmikroskopische Aufnahme (F) in der DG Fraktion. Vergrößerung: 400 fach; Balken:20µm

### 2.3 Nachweis EC Zellen spezifischer Marker mit RT-PCR

Unmittelbar nach der Anreicherung der EC Zellen wurde RNA isoliert und für eine RT-PCR Reaktion verwendet. Die Expression für EC Zellen spezifische Markergene VMAT-1 und Guanylin und der entsprechende Rezeptor Guanylatcyclase C (GCC-R) wurden nachgewiesen. Abb 9 zeigt die spezifischen PCR Produkte für EC Zellen. Komplementäre DNA aus PC12 Zellen und aus dem Duodenum wurden als Positivkontrollen verwendet. Die Expression von Guanylin und dem GCC Rezeptor wurde mit der Expression des *housekeeping* Gen GAPDH verglichen.

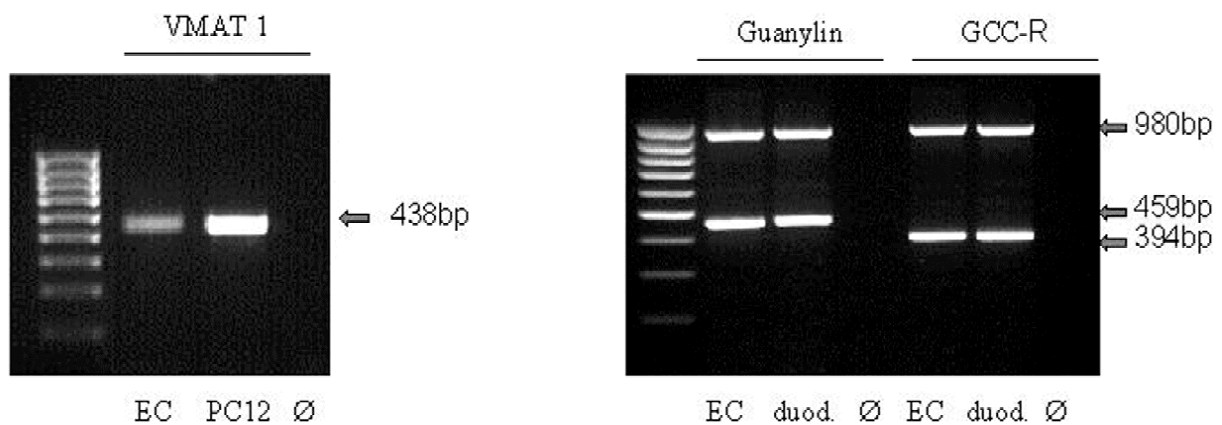


Abb.9 PCR Nachweis der EC Zellen spezifischen Marker VMAT-1 (links) und Guanylin und sein Rezeptor Guanylatcyclase C. In den Bahnen 1 ist der Standard, in 2 und 5 Produkte für EC Zellen, 3 und 6 die Positivkontrollen, 4 und 7 die Negativkontrollen aufgetragen.



## 2.4 Untersuchung kontaminierender Zellen

Die Isolierung der EC Zellen ergab einen insgesamt ca. 85%-igen EC Zellenanteil in der DG Fraktion. Um die verbleibenden 15% der Zellen identifizieren zu können, wurde eine PAS-Färbung durchgeführt, bei der schleimbildende Becherzellen markiert wurden.

Die Becherzellen liegen zwischen den resorbierenden Zellen und produzieren Schleim, der aus Glycoproteinen besteht. Diese Glycoproteine können mit PAS-Färbung sichtbar gemacht werden. Die PAS positiven Zellen zeigen eine leuchtend rote Farbe im Zytoplasma.

Die Färbung ergab einen Anteil von  $8 \pm 4\%$  mucushaltigen Becherzellen in der DG Fraktion. Abb. 10 zeigt ein Beispiel von PAS-Färbung in der DG Fraktion.

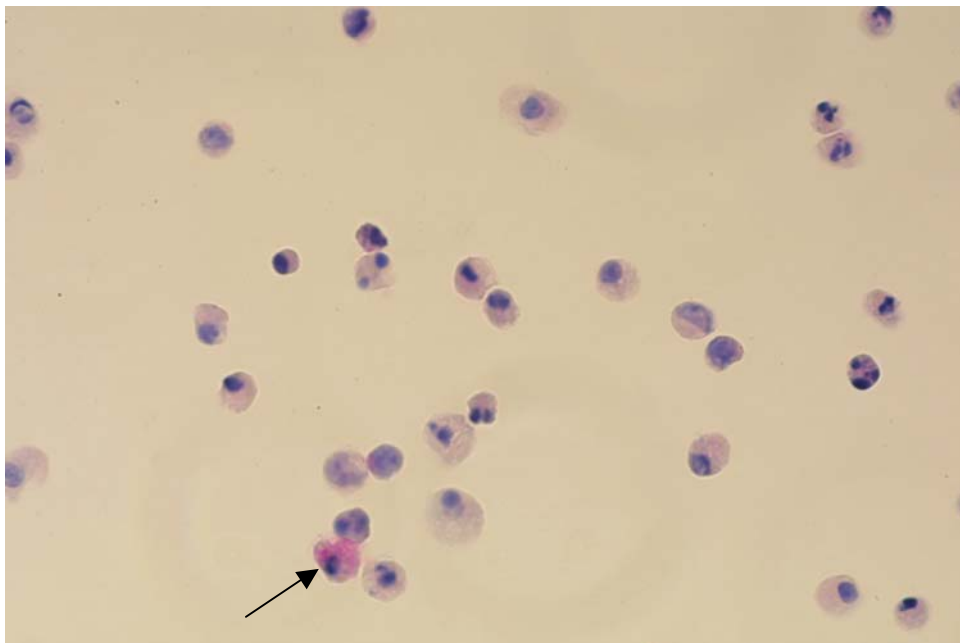


Abb.10: PAS Färbung von EC Zellen auf Cytospins unmittelbar nach Abschluss der Präparation. Der Pfeil zeigt eine violett gefärbte PAS positive Becherzelle. Vergrößerung: 400 fach

### 3. Kultivierung der EC Zellen

#### 3.1 Kulturbedingungen für EC Zellen

Nach der Bestimmung des Reinheitsgrades der DG Fraktion wurde versucht, die EC Zellen zu kultivieren.

Verschiedene Kulturmedien wurden verwendet: DMEM, RPMI, Opti-MEM, Kulturmediumüberstand von PC12 und AGS Zellen.

Mehrere Kälberseren, Pferdeserum, Rattenserum und Hydrocortison wurden zu den Medien dazugegeben.

Weiterhin wurde versucht, durch unterschiedliche Beschichtungen von Kulturplatten wie CellTak, Matrigel, Collagen, Collagen Gel und Poly-L-Lysine die Überlebensrate der Zellen zu erhöhen.

Schließlich wurde ein Ko-Kultur Experiment mit der intestinalen Zelllinie IEC-6 unternommen.

Unter allen Methoden wurde das beste Überleben mit dem Medium Opti-MEM I mit Zugabe von fötalem Kalbserum, Insulin-Transferrin-Sodiumselenit, nicht essentielle Aminosäuren, Tetrahydrobiopterin, Dibutyryl cAMP, Heparin, D(+) Glucose und BSA erzielt.

#### 3.2 Bestimmung der Überlebensrate der Zellen

Die Zellen wurden 5h, ca.3h nach Abschluss der Präparation, 24h und 48h nach der Tiertötung gezählt und durch Trypanblau Ausschluß die Anzahl der intakten Zellen ermittelt (Abb. 11). 5h nach der Tiertötung waren 84% der EC Zellen intakt. Während des Kultivierungsprozesses wurde ein dramatisches Zellsterben beobachtet.

Innerhalb von 24h Kultur starben 97% der Zellen und ein weiterer Zellverlust war in den folgenden Kulturversuchen zu beobachten.

Die Zugabe von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren zu dem Nährmedium wie EGF, HB-EGF, bFGF, IGF, NGF, TGF- $\alpha$  oder PDGF konnte diese Reaktion nicht verändern.

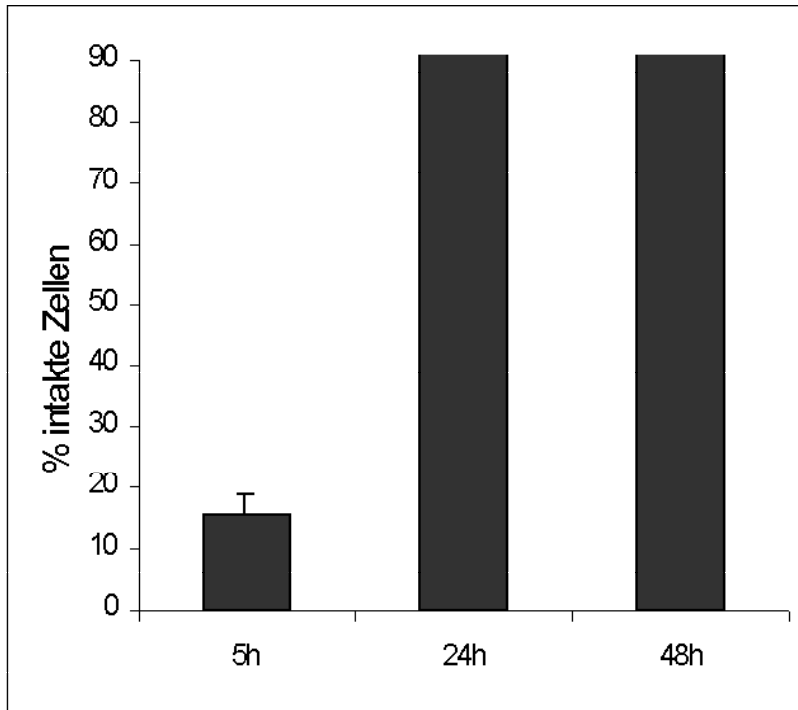


Abb.11: Trypanblau Färbung von EC Zellen 5h, 24h und 48h nach der Tiertötung. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil von Trypanblau positiven Zellen. (n=6)

### 3.3 Detektion apoptotischer Zellen mit TUNEL Färbung

Um den Grund für das massive Zellsterben in den kultivierten Zellen zu finden, wurde untersucht, ob die Zellen durch Apoptose sterben. Dafür wurde eine TUNEL Färbung 5h und 24h nach der Tiertötung durchgeführt. 44% der Zellen zeigten bereits 5h nach der Tiertötung apoptotische Merkmale, dies erhöhte sich auf 74% nach einem Tag (Abb. 12). Abb. 13 zeigt Beispiele von der TUNEL-Färbung 5h und 24h nach der Tiertötung. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder die Vorbehandlung mit dem Breitspektrum Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK konnte den prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen in der Kultur nicht verändern.

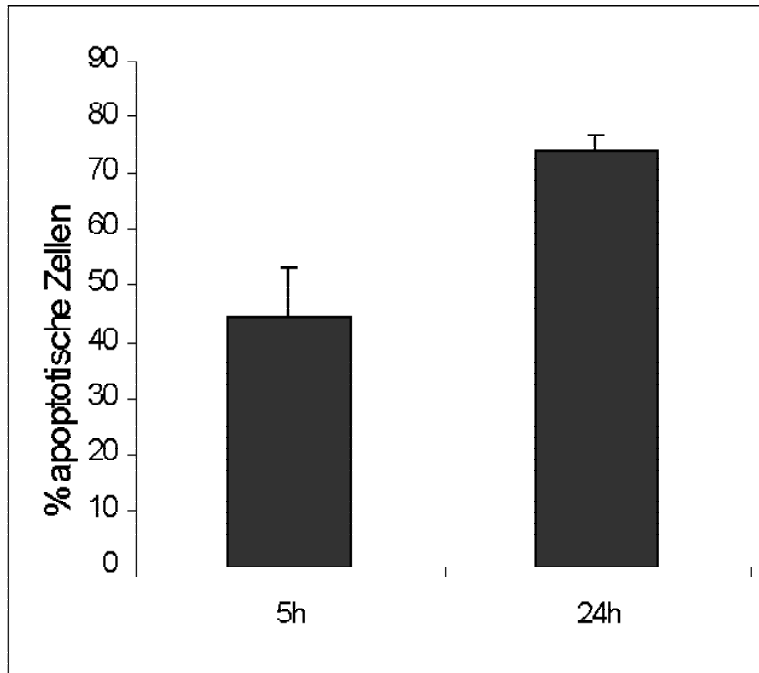


Abb.12: TUNEL Färbung von EC Zellen 5h und 24h nach der Tiertötung. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen. (n=5)

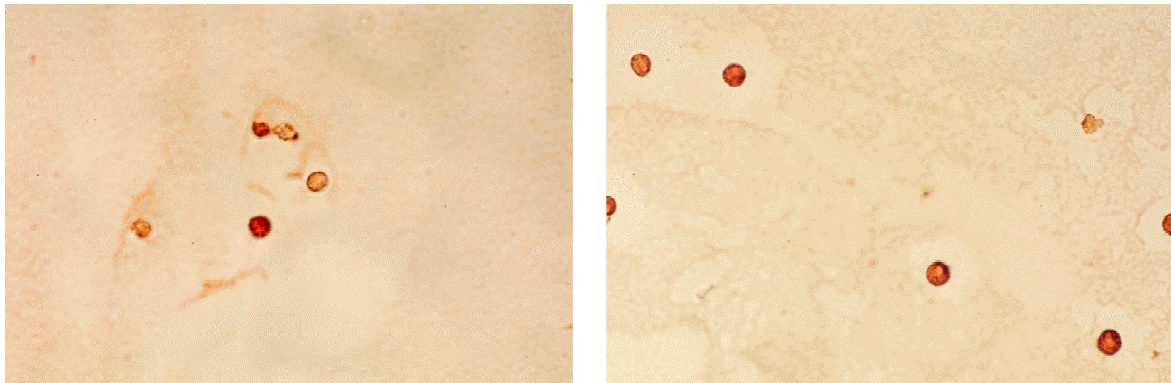


Abb.13: TUNEL Färbung von EC Zellen 5h (links) und 24h (rechts) nach der Tiertötung. Eine braunrote Färbung zeigt die apoptotische Zellen. Vergrößerung: 400 fach

## 4. Charakterisierung der EC Zellen

### 4.1 Rezeptorennachweis an den EC Zellen

#### 4.1.1 Rezeptorennachweis mit RT-PCR

Zur Untersuchung der EC Zellen auf Rezeptoren für bestimmte Neurotransmitter wurde RT-PCR mit spezifischen Primern und Bedingungen (Tabelle 1) angewendet. Dabei wurde RNA unmittelbar nach Abschluss der Präparation isoliert (120-180 min nach der Tiertötung). PCR wurde durchgeführt für die adrenergen Rezeptoren  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  (Abb.14A)  $\alpha_{2A}$  und  $\alpha_{2B}$  (Abb.14B), für den cholinergen Rezeptor muscarinische M3 (Abb.14C), für die GABA-A und GABA-B (Abb.14D) Rezeptoren und für Serotonin 5HT3 und 5HT4 Rezeptoren (Abb.14E).

Für die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren wurde ein positives Signal in der vorausgesagten Größe (323bp für die  $\beta_1$ -adrenergen und 560bp für die  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren) beobachtet. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus Herzmuskelgewebe verwendet. Ähnlich ergab die PCR spezifische Produkte für die  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren in der gleichen Größe (418bp für  $\alpha_{2A}$ -adrenerge und 712bp für  $\alpha_{2B}$ -adrenerge Rezeptoren) wie die Positivkontrollen von Hirn- und Nierengewebe. Bei den Negativkontrollen wurde kein Produkt amplifiziert.

Positive Signale wurden auch für die muscarinische M3 (mit der Größe von 790bp) und für die GABA-A Rezeptoren (224bp) beobachtet. Bei beiden Reaktionen diente cDNA aus Hirngewebe als Positivkontrolle.

Während im Hirngewebe ein PCR Produkt für GABA-B (R2-Untereinheit, 353bp Größe), Serotonin 5-HT3 (413bp) und 5-HT4 (484bp) Rezeptoren amplifiziert wurden, war in EC Zellen für diese Rezeptoren kein Signal zu beobachten. Bei den Negativkontrollen wurde kein cDNA zu der Reaktion gegeben.

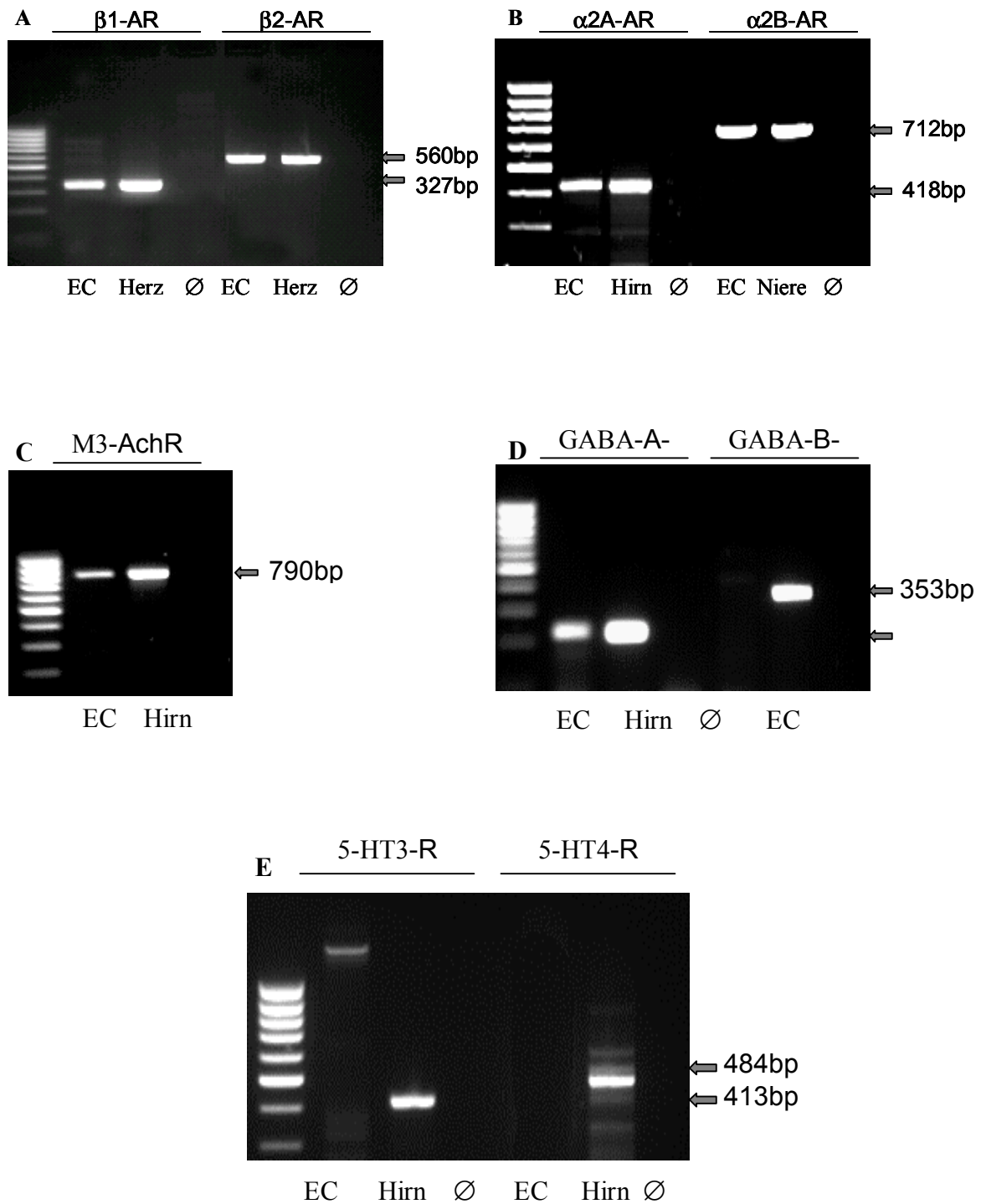


Abb.14. PCR Nachweis von A: die adrenergen Rezeptoren  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ; B:  $\alpha_{2A}$  und  $\alpha_{2B}$ ; C: cholinergischer Rezeptor muscarinisches M3; D: für die GABA-A und GABA-B Rezeptoren und E: für Serotonin 5HT3 und 5HT4 Rezeptoren durchgeführt. In den Bahnen 1 ist der Standard, 2 und 5 Produkte für EC Zellen, 3 und 6 die Positivkontrollen, 4 und 7 die Negativkontrollen aufgetragen.

#### 4.1.2 Rezeptorennachweis mit Immunfärbung

Unmittelbar nach Abschluss der Präparation wurden Cytospins von den EC Zellen angefertigt. Immunfärbungen dieser Präparate ergaben eine positive Färbung für  $\beta$ 1-adrenerge (Abb.15A),  $\alpha$ <sub>2A</sub>-adrenerge (Abb.15B), muscarinische M3 (Abb.15C) und für die GABA-A (Abb.15D) Rezeptoren.

Bei allen Färbungen wurden mehr als 85% der Zellen positiv gefärbt.

Kontrollen, die ohne den ersten Antikörper oder mit unspezifischen IgG Molekülen inkubiert wurden, zeigten keine Fluoreszenz.

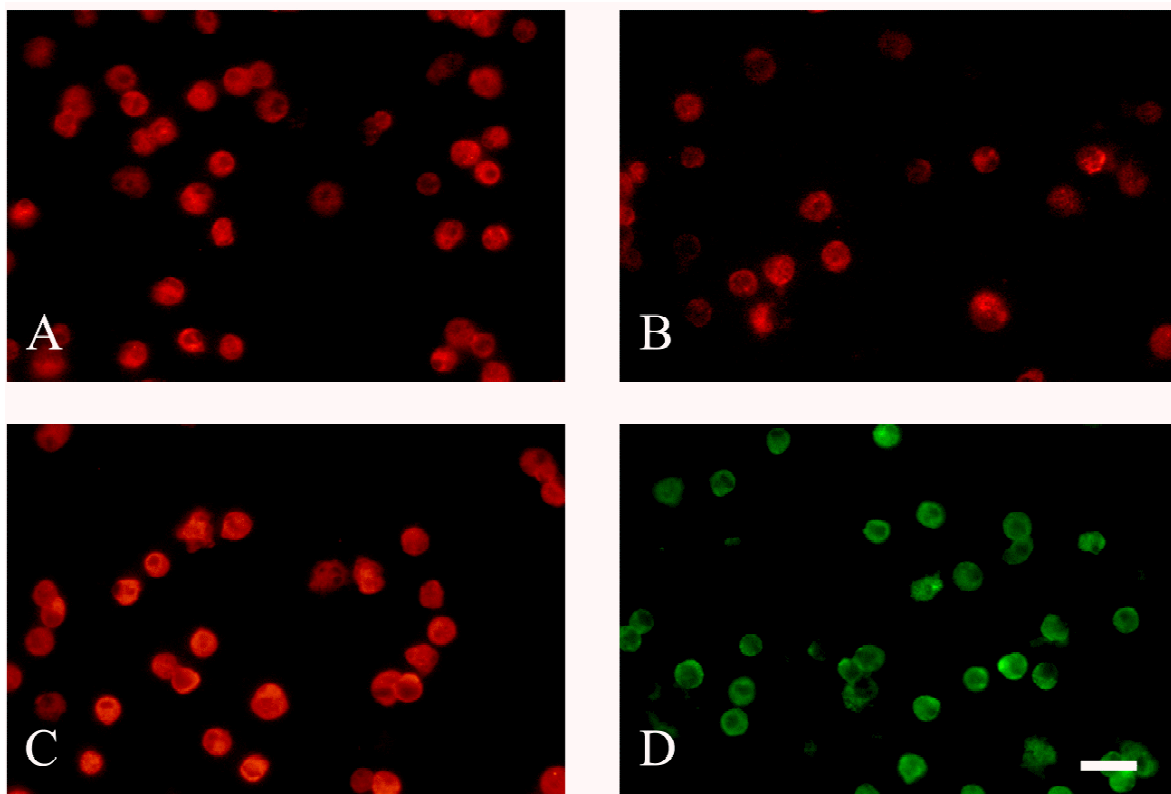


Abb.15: Immunfärbung von EC Zellen auf Cytospins unmittelbar nach der Präparation gegen verschiedene Rezeptoren. A:  $\beta$ 1-adrenerge Rezeptor, B:  $\alpha$ <sub>2A</sub>-adrenerge Rezeptor, C: muscarinischer M3 Rezeptor, D: GABA-A Rezeptor. Vergrößerung: 200 fach.

## 4.2 Stimulation der EC Zellen

Um die Funktion der nachgewiesenen Rezeptoren zu untersuchen, wurden EC Zellen mit Noradrenalin, Acetylcholin und GABA inkubiert und die Serotoninfreisetzung gemessen.

Nach Abschluss der Präparation wurden die Zellen für 3 Stunden unter basalen Bedingungen bei 37°C im Kulturmedium belassen um eine Regenerierung nach dem Isolationsprozess zu erlauben. Danach wurden je  $1 \times 10^5$  EC Zellen in 1ml Lösung C mit Noradrenalin (1mM, Artenerol, Sigma), Acetylcholin (1mM, Acetylcholinchlorid, RBI, Natick USA), GABA (10mM, Sigma) oder ohne Stimulus für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm 4 min lang abzentrifugiert und die Serotoninkonzentration im Überstand gemessen.

Die Serotoninfreisetzung wurde durch Noradrenalin signifikant erhöht. Acetylcholin und GABA stimulierte die Serotoninfreisetzung nicht signifikant. (Abb. 16)

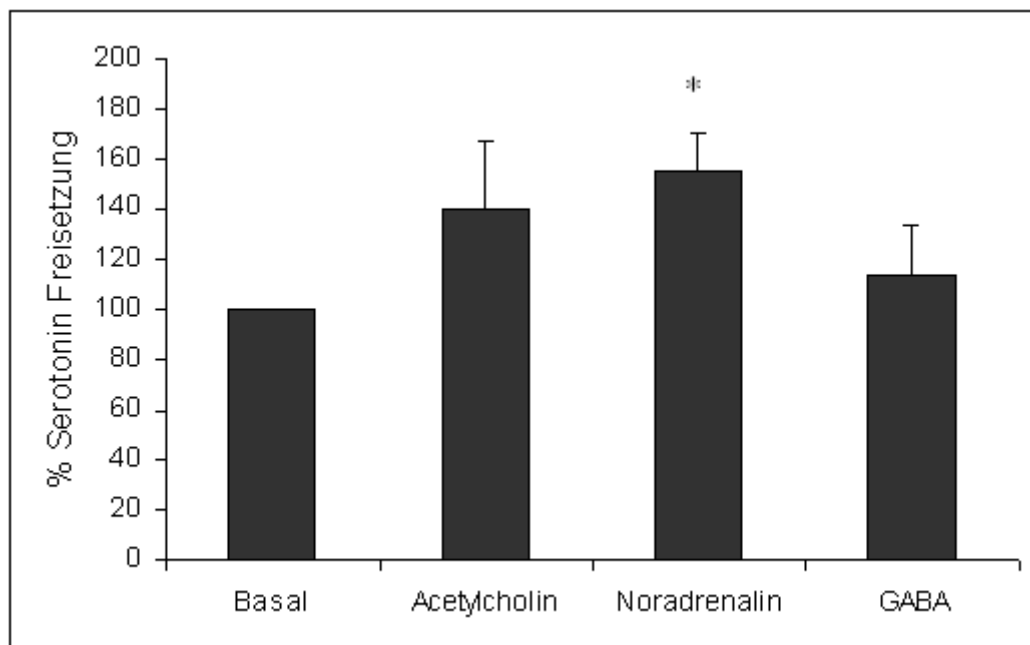


Abb.16: Serotoninfreisetzung aus Zellen nach 60 min Inkubation mit 1mM Acetylcholin, Noradrenalin oder GABA. Noradrenalin stimulierte die Serotoninfreisetzung, Acetylcholin und GABA zeigten keinen Effekt. Zwei-Weg ANOVA gefolgt von t-Test für abhängige Variablen ergab signifikante Unterschiede Noradrenalin *versus* Basal \*  $p < 0,05$ ; (n=17)



### 4.3 Stimulation der BON Zellen

Um die Stimulationsergebnisse der EC Zellen zu verifizieren wurde die serotoninproduzierende Zelllinie BON unter entsprechenden Bedingungen untersucht.

BON Zellen wurden in 17 unabhängigen Experimenten für 48h auf 6-Loch Platten kultiviert. Am Tag des Experiments wurden die Zellen 3 Stunden in serumfreiem DMEM Medium vorinkubiert. Danach wurden die nicht adherenten Zellen abgesaugt und 1ml frisches DMEM Medium auf die Zellen gegeben, entweder ohne Stimulus oder mit Noradrenalin, Carbachol, oder GABA und für 120 min bei 37°C inkubiert.

Ähnlich den Ergebnissen der Stimulation der EC Zellen wurde die Serotoninfreisetzung in BON Zellen signifikant durch Noradrenalin erhöht. Carbachol erhöhte ebenfalls die Serotoninfreisetzung, aber zu einem geringeren Maß als Noradrenalin. Wie auch bei den EC Zellen veränderte GABA die Serotoninfreisetzung der BON Zellen nicht. (Abb. 17)

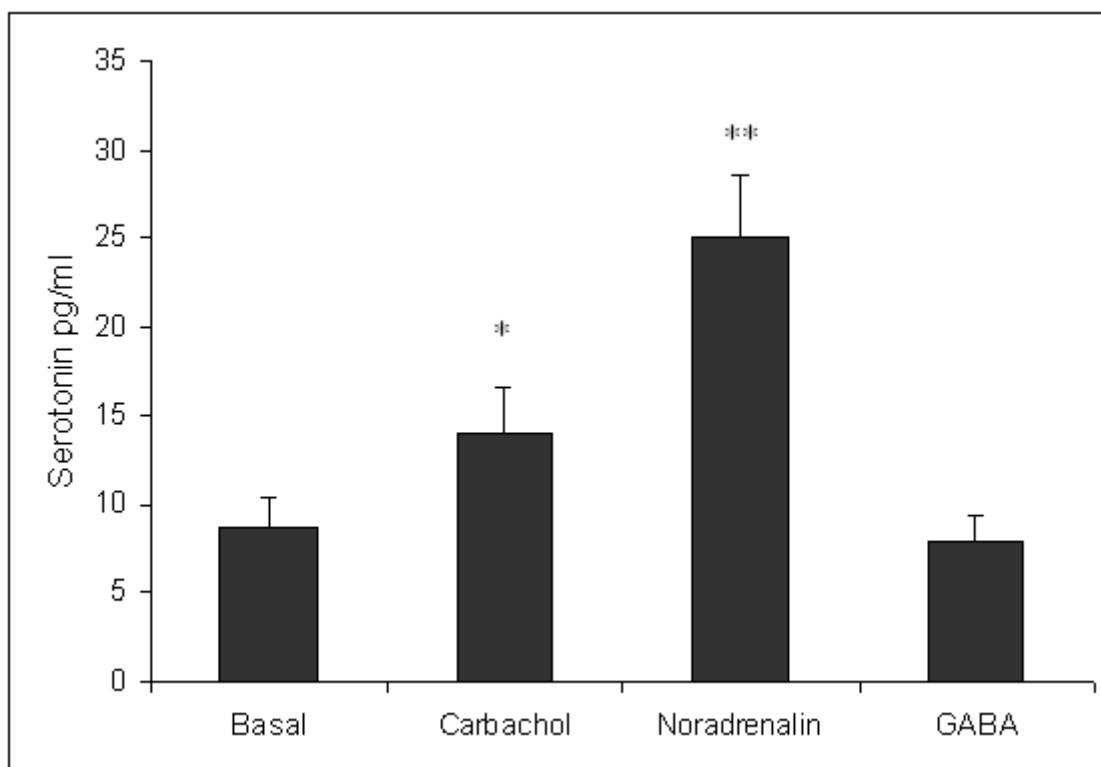


Abb.17 Serotoninfreisetzung aus kultivierten BON Zellen nach 120 min Inkubation mit 1mM Carbachol, Noradrenalin oder GABA. Noradrenalin und Carbachol stimulierten die Serotoninfreisetzung, GABA zeigte kein Effekt. Zwei-Weg ANOVA gefolgt von t-Test für abhängige Variablen ergab signifikante Unterschiede zwischen Noradrenalin und Carbachol versus Basal \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (n=16)

#### 4.4 Stimulation der BON Zellen durch Bitterstoffen

BON Zellen wurden in 4 unabhängigen Experimenten für 48h auf 6-Loch Platten kultiviert. Am Tag des Experiments wurden die Zellen 3 Stunden in serumfreiem DMEM Medium vorinkubiert. Danach wurden die nicht adherenten Zellen abgesaugt und 1ml frisches DMEM Medium auf die Zellen gegeben, entweder ohne Stimulus oder mit verschiedenen Bitterstoffen, wie 10mM Denatonium Benzoat, 10mM Nicotin, 10mM Koffein, 1mM Chloroquin und 3mM Phenylthiocarbamid für 120 min bei 37°C inkubiert.

Alle Bitterstoffe stimulierten die Serotoninfreisetzung aus BON Zellen. Die höchste Stimulation wurde mit Denatonium Benzoat, Nikotin und Koffein beobachtet. Etwas weniger, aber dennoch signifikant erhöhte Chloroquin und Phenylthiocarbamid die Serotoninfreisetzung (Abb. 18).

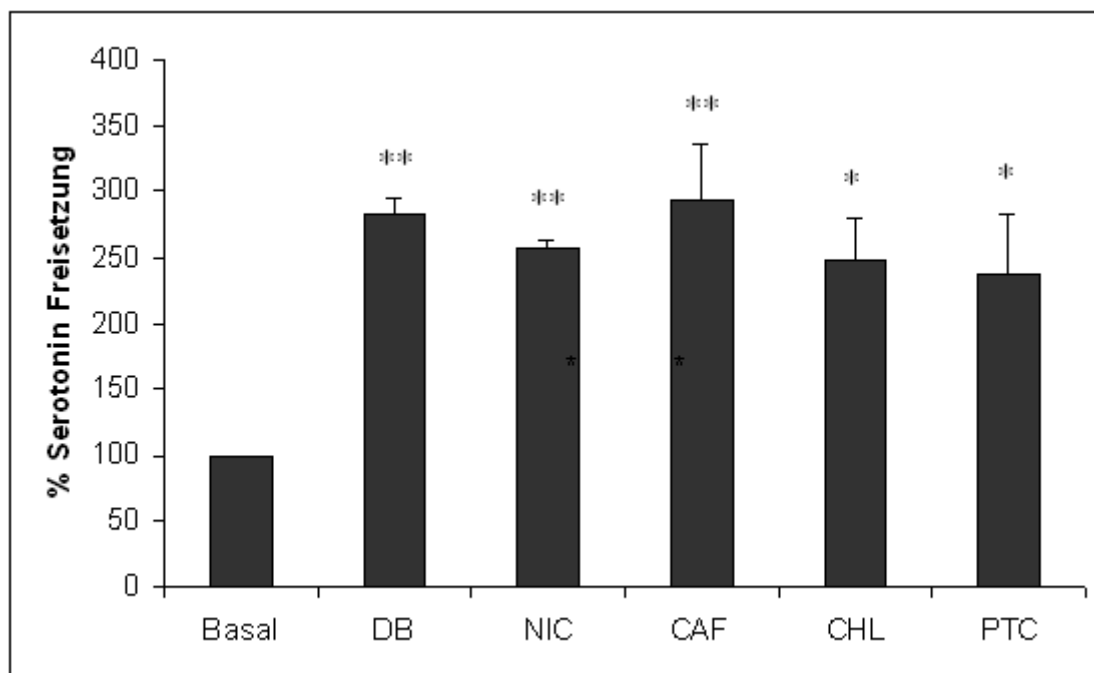


Abb.18 Serotoninfreisetzung aus kultivierten BON Zellen nach 120 min Inkubation mit den Bitterstoffen 10mM Denatonium Benzoat (DB), 10mM Nicotin (NIC), 10mM Koffein (CAF), 1mM Chloroquin und 3mM Phenylthiocarbamid (PTC). Alle Bitterstoffe stimulierten die Freisetzung von Serotonin aus BON Zellen. Ein-Weg ANOVA gefolgt von Newman-Keuls Test ergab signifikante Unterschiede zwischen den Bitterstoffen *versus* Basal \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (n=4)

## 4.5 Hemmung der Serotoninfreisetzung in BON und EC-Zellen

Um die Stimulation der Serotoninfreisetzung zu hemmen, wurde Cromoglycinsäure in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen unmittelbar vor der Zugabe von Noradrenalin gegeben. BON Zellen wurden in 11 unabhängigen Experimenten für 48h auf 6-Loch Platten kultiviert. Am Tag des Experiments wurden die Zellen 3 Stunden in serumfreiem DMEM Medium vorinkubiert. Danach wurden die nicht adherenten Zellen abgesaugt und 1ml frisches DMEM Medium auf die Zellen gegeben, entweder ohne Stimulus oder mit Cromoglycinsäure in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 $\mu$ g und 1000 $\mu$ g. Danach wurde Noradrenalin zu den Zellen gegeben und für 120 min bei 37°C inkubiert.

Cromoglycinsäure konnte in keiner der getesteten Konzentrationen die Serotoninfreisetzung aus BON Zellen hemmen. (Abb.19)

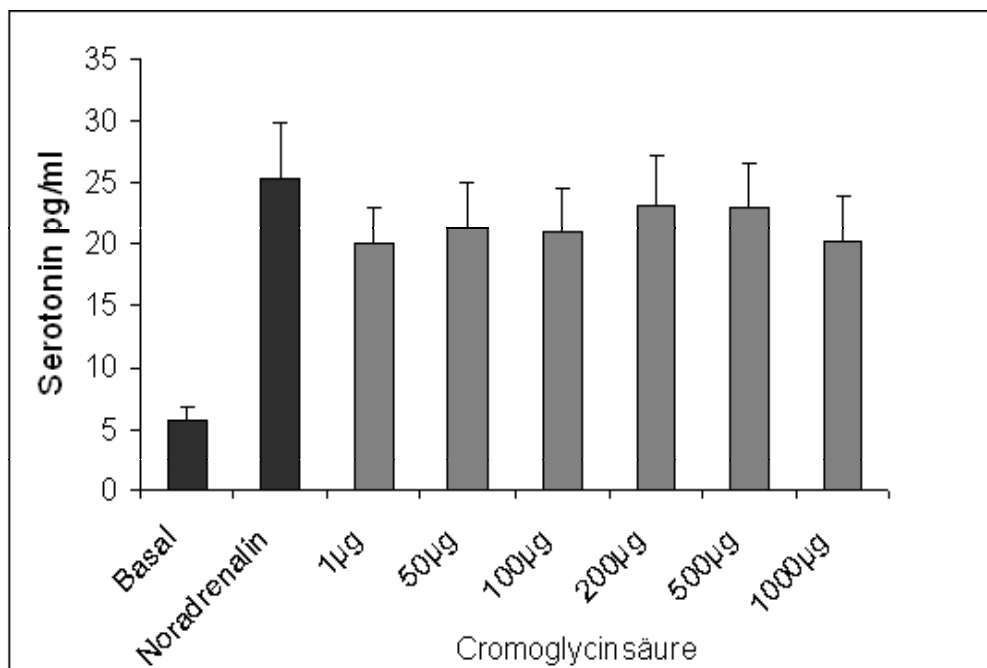


Abb. 19: Serotoninfreisetzung aus kultivierten BON Zellen nach 120 min Inkubation mit 1mM Noradrenalin (schwarze Balken) oder mit Cromoglycinsäure und Noradrenalin. Noradrenalin stimulierte die Serotoninfreisetzung, dies konnte durch die Zugabe von Cromoglycinsäure nicht gehemmt werden. (n=11)

Ein hemmender Effekt von Cromoglycinsäure auf die Freisetzung von Serotonin aus den EC Zellen wurde ebenfalls untersucht.

Nach Abschluss der Präparation wurden die Zellen für 3 Stunden unter basalen Bedingungen bei 37°C im Kulturmedium belassen um eine Regenerierung zu erlauben. Danach wurden je  $1 \times 10^5$  EC Zellen in 1ml Lösung C mit Cromoglycinsäure (200µg) und Noradrenalin (1mM) oder ohne Stimulus, für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 rpm 4 min lang abzentrifugiert und die Serotoninkonzentration im Überstand gemessen.

Die Serotoninfreisetzung wurde durch Noradrenalin signifikant erhöht. Cromoglycinsäure verminderte zwar die durch Noradrenalin induzierte Serotoninfreisetzung, dies erreichte aber kein signifikantes Niveau. (Abb.20)

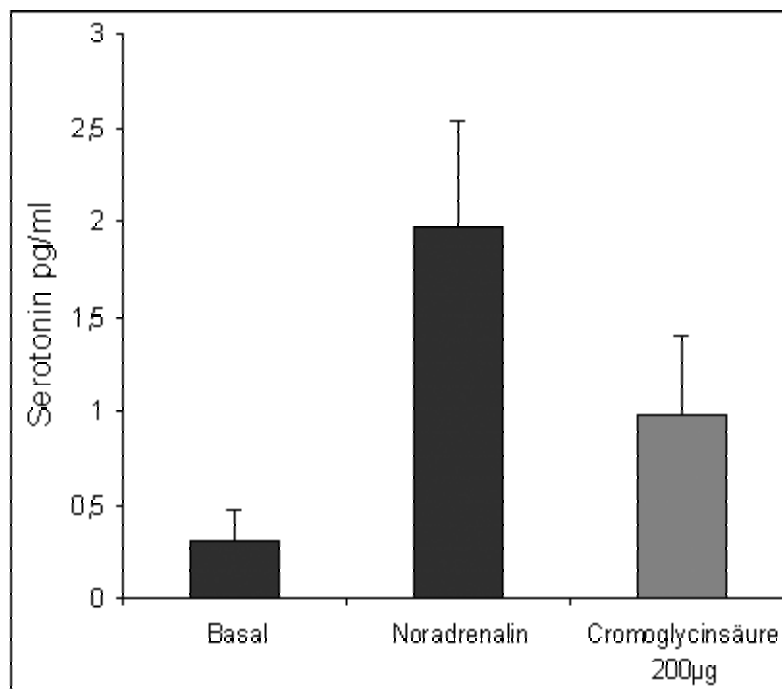


Abb.20: Serotoninfreisetzung aus EC Zellen nach 60 min Inkubation mit 200µg Cromoglycinsäure und 1mM Noradrenalin. Noradrenalin stimulierte die Serotoninfreisetzung, dies konnte durch die Zugabe von Cromoglycinsäure nicht signifikant gehemmt werden. (n=5)

## 5. TaqMan PCR Analyse

Um Ergebnisse der Anreicherung mit anderen Verfahren zu quantifizieren, wurde TaqMan PCR durchgeführt mit Primern und Proben (Tabelle 2), die spezifisch für den vesikulären Monoamintransporter VMAT 1 und für den GABA-A Rezeptor sind. Für dieses Experiment wurde RNA von isolierten Mucosazellen (MUC) und gereinigten enterochromaffinen Zellen (EC) unmittelbar nach Abschluss der Präparation isoliert (120-180 min nach der Tiertötung). Die RNA wurde dann in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wurde in drei unabhängigen Experimenten die quantitative PCR Reaktion durchgeführt.

Die Abbildung 21 zeigt die Kopienzahl von VMAT 1 und dem GABA-A Rezeptor mRNA relativ zu der Kopienzahl des *housekeeping* Gens GAPDH mRNA. EC Zellen zeigten eine signifikant höhere Expression (ca 4-Fach) von VMAT 1 und von GABA-A Rezeptoren im Vergleich zu den Mucosazellen. Die Anreicherung fiel bei diesen Markergenen geringer aus, im Vergleich zur Serotoninfreisetzung und immunocytochemischen Experimenten (siehe Seite 51).

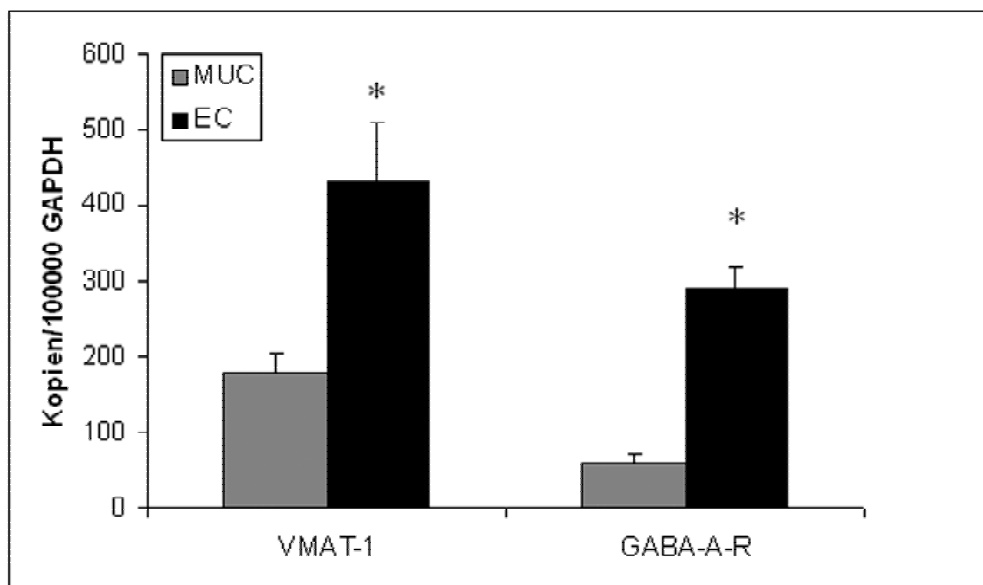


Abb.21 Expression von VMAT 1(links) und dem GABA-A Rezeptor (rechts) in Mucosa (grauer Balken) und EC Zellen (schwarzer Balken) untersucht mit TaqMan PCR Analyse. Der t-Test für abhängige Variablen ergab in beiden Fällen signifikante Unterschiede zwischen EC und Mucosazellen \*  $p < 0,05$ ; (n=3)

## 6. Genexpressionanalyse mit DNA Chip

Unmittelbar nach Abschluss der Präparation ca. 120-180 min nach der Tiertötung wurde RNA aus den EC Zellfraktion und aus der Mucosa Zellfraktion isoliert.

Die gewonnene RNA wurde in biotinylierte cRNA umgewandelt und auf dem Affymetrix Chip Rat Genome U34A hybridisiert. Die Chips wurden in einem speziellen HP GeneArray Scanner eingescannt und das erhaltene Hybridisierungsmuster analysiert. Die Signale für Genexpression wurden dann zu den *housekeeping* Gen GAPDH Signal normalisiert.

Drei unabhängige Hybridisierungsexperimente für EC Zellen und zwei Experimente für Mucosa Zellen wurden unternommen und aus den relativen Expressionswerten jeweils die Mittelwerte gebildet. Die so erhaltenen Expressionswerte wurden zwischen den beiden Gruppen verglichen.

Der Affymetrix Gene Chip analysiert die Expression von 8706 Genen davon 5467 Gene mit bekannten Funktionen. Bei 1943 Gene EST`s (expressed sequence tag`s), ist eine Funktion der Gene nicht bekannt, 687 Gene waren unbekanntes Leserahmen (UI-R-EO) und schließlich 618 Gene cDNA Klone mit unbekanntem Funktion.

Da bei der Isolierung der EC Zellen eine ca. 7-14 Fache Anreicherung von EC Zellen *versus* Mucosa Zellen erhalten wurde wurden aus den Chip Daten diejenige Expressionwerte berücksichtigt, die ein 4-26 Fach erhöhte Genexpression gezeigt haben.

Diese, etwa 140 Gene wurden als spezifische Signale für die EC Zellen angesehen, bei den übrigen Genen war die Expression entweder gleich, oder außerhalb des festgesetzten Expressionrahmens.

Die identifizierte Gene sind in Tabelle 3 aufgelistet. Die Tabelle zeigt die *Gene Accession number*, die Mittelwerte der relativen Expression in EC und Mucosa Zellen, sowie den Quotient aus den Mittelwerten (EC / MUC).

Unter diesen Genen wurden für die Serotoninstoffwechsel und Amintransport spezifische Gene gefunden, verschiedene Rezeptoren, Ionenkanäle, Wachstumsfaktoren, Exocytoseproteine und Adhensionsmoleküle, Peptide die regulative Funktionen haben oder Peptide deren Funktion zur Zeit nicht genau bekannt ist.

Als Positivkontrolle wurde der vesikuläre Monoamintransporter Subtyp1 (VMAT1) in 26 Fach höheren Expressionsniveau gefunden verglichen mit der Expression in den Mucosazellen. Die Expression von VMAT1 stimmte mit der Anreicherung von EC Zellen in der DG Fraktion überein. Tryptophanhydroxylase, ein Schlüsselenzym für die Serotoninsynthese, wurde in 5,5 Fach erhöhten Expression gefunden, wobei die Expressionsniveau in beiden Fraktionen relativ niedrig war. Für ein weiteres Enzym, GTP Cyclohydrolase I, welches bei der Biosynthese des Cofaktors Tetrahydrobiopterin bei der Serotoninsynthese benötigt wird, wurde ebenfalls eine erhöhte Expression gefunden.

In dem zweiten Abschnitt der Tabelle 3 werden Rezeptoren gezeigt, welche eine erhöhte Expression in EC Zellen zeigen. Die adrenerge Rezeptoren alpha-1C, alpha-2, beta-1, beta-2 und beta-3 zeigten ein 4-20 Fach erhöhte Genexpression in der EC Zellfraktion. Relativ erhöhte Expression zeigten auch die muscarinische M3 und M5 Acetylcholin Rezeptoren sowie der neuronale nikotinische Acetylcholin Rezeptor alpha 6 Untereinheit.

Auf dem Genchip war eine erhöhte Expression von den GABA-A Rezeptor Untereinheiten alpha 1,2,5 und 6 zu beobachten sowie die GABA-B Rezeptor Untereinheiten R1c und R1d.

Interessanterweise und vorher nicht beschrieben wurde die Expression von den Histaminrezeptoren H1 und H2, von purinerge und PACAP Rezeptoren, von Glutamat Rezeptoren und ein Glutamat Transporter sowie von der Dopaminrezeptoren D2 und D4 in der DG Fraktion erhöht.

Der dritte Abschnitt der Tabelle 3 zeigt eine erhöhte Expression von verschiedenen Ionenkanälen auf EC Zellen verglichen mit den Mucosazellen, und könnten daher eine spezifische Rolle bei EC Zellen spielen. Darunter wurden Calciumkanäle,

---

einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle, Calcium-abhängige Kaliumkanäle, spannungsabhängige Kaliumkanäle und Chloridkanäle identifiziert.

Der folgende Abschnitt zeigt die erhöhte Expression von mehreren Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren bei EC Zellen. 5,6 Fach erhöht wurde der Hepatozyten-Wachstumsfaktor exprimiert, und 14,4 Fach der entsprechende Rezeptor. Ähnlich wurde ein Signal für bFGF in den EC Zellen detektiert sowie für die FGF Rezeptoren FGF1, 2 und 5. Interessanterweise scheinen die Wachstumsfaktoren IGF1 und 2 auch in den EC Zellen exprimiert werden.

Der fünfte Abschnitt zeigt die Präsenz von Exocytoseproteinen SNAP-23 und SNAP-25B, nicht aber von SNAP-25A. Weiterhin wurden wichtige Glieder des Exocytoseapparates wie Syntaxine und Synaptogamine gefunden, sowie die Proteine Vesl3/homer und Mint2.

Eine Vielzahl von Adhensionsmolekülen wurde in EC Zellen in erhöhter Expression gefunden. Darunter die Protocadherine 2,3 und 4 und mehrere andere Cadherine; Lectine, Integrin Untereinheiten und andere Oberflächenproteine. Weiterhin wurden regulatorische Peptide in erhöhter Expression (Abschnitt 7) detektiert. Solche Proteine waren Vasopressin, der atriale natriuretische Peptid (ANP) und deren Rezeptoren, Secretogranin II, Adrenomedullin und Angiotensinogen.

Weiterhin wurde eine Reihe von Proteinen in erhöhter Expression in der EC Zellfraktion gefunden, deren spezifische Funktion bei EC Zellen noch nicht bekannt ist. Diese waren Komponente der Zellkern oder Zytoskelett, Transkriptionsfaktoren, Proteasen, Phosphatasen und G Proteine.

Schließlich zeigt der letzte Abschnitt der Tabelle 3 eine erhöhte Expression von verschiedenen olfaktorischen Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden in EC Zellen stark exprimiert, wobei sie bisher noch nicht mit dem Darmepithel in Verbindung gebracht wurden.



Tabelle 3

<b>Accession number</b>		<b>EC (n=3)</b>	<b>MUC (n=2)</b>	<b>EC/MUC</b>
	<b>1. AminTransporter und Serotoninstoffwechsel</b>			
M97380	Chromaffin GranuleAminTransporter (CGAT=VMAT-1)	495,3	19,1	26,0
L00603	Vesikuläre Monoamin Transporter Typ 2 (VMAT-2)	166,1	414,6	0,4
X53501	Tryptophan Hydroxylase	74,2	13,5	5,5
U85512	GTP Cyclohydrolase I	230,0	56,4	4,1
	<b>2. Rezeptoren</b>			
	<b>PACAP-Rezeptoren</b>			
Z23272	PACAP Rezeptor, hip-hop1 Splicevariante	78,0	8,0	9,8
	<b>alpha adrenerge Rezeptoren</b>			
M62372	alpha-2-adrenerges Rezeptor Protein (RG20)	212,4	14,3	14,9
S79778	alpha 2A-adrenerger Rezeptor {Promoter}	897,0	189,2	4,7
U13368	alpha1C-adrenerger Rezeptor	677,4	32,4	20,9
	<b>beta-adrenerge Rezeptoren</b>			
D00634	beta-1 adrenerger Rezeptor	155,3	34,9	4,5
X17607	beta-2 adrenerger Rezeptor Gen	570,2	140,3	4,1
S56481	beta 3-adrenerger Rezeptor {Splicevariante}	696,5	118,9	5,9
	<b>cholinerge Rezeptoren</b>			
AB017656	muscarinischer M3 Rezeptor	523,7	119,3	4,4
M22926	muscarinischer M5 Rezeptor	945,2	174,9	5,4
L08227	nikotinische Acetylcholin Rezeptor alpha 6 Untereinheit	607,1	68,3	8,9
	<b>GABA Rezeptoren</b>			
L08490	GABA-A Rezeptor alpha-1 Untereinheit	330,2	46,9	7,0
L08491	GABA-A Rezeptor alpha-2 Untereinheit	455,6	69,6	6,6
L08494	GABA-A Rezeptor alpha-5 Untereinheit	193,0	43,9	4,4

L08495	GABA-A Rezeptor alpha-6 Untereinheit	277,7	22,8	12,2
L08496	GABA-A Rezeptor delta-Untereinheit	1535,6	172,8	8,9
L08497	GABA-A Rezeptor gamma-2 Untereinheit	206,2	50,6	4,1
AB016160	GABA-B R1c	503,5	122,5	4,1
AB016161	GABA-B R1d	1178,8	198,5	5,9
	<b>Glutamat Rezeptoren und Transporters</b>			
D16817	metabotrope Glutamat Rezeptor mGluR7	291,5	15,6	18,7
M36419	Glutamat Rezeptor (GluR-B)	345,3	22,3	15,5
AF038571	Glutamat Transporter	238,3	35,0	6,8
	<b>Histamin Rezeptoren</b>			
D12800	Histamin H1-Rezeptor	109,3	9,1	12,1
S57565	Histamin H2-Rezeptor	731,9	61,9	11,8
	<b>Dopamin Rezeptoren</b>			
X56065	Dopamin Rezeptor D2 (B)	170,7	37,1	4,6
M84009	Dopamin Rezeptor D4	504,3	73,2	6,9
	<b>Purinergic Rezeptoren</b>			
X80477	P2X	481,5	53,4	9
	<b>3. Ionkanäle</b>			
	<b>Calciumkanäle</b>			
U49126	Neuroendocrine Calciumkanal alpha-1 Untereinheit	403,3	36,8	11
Y09453	Calciumkanal gamma Untereinheit	1047,1	195,2	5,4
AF051526	Klasse A Calciumkanal Variante riA-I (BCCA1)	336,2	70,4	4,8
L04684	Dihydropyridine-sensitive L-type Calciumkanal alpha-1	169,7	13,6	12,5
M86621	Dihydropyridine-sensitive L-type Calciumkanal alpha-2	253,8	63,9	4
M89924	L-Typ spannungsabhängige Calciumkanal (VDCC) alpha-1	349,1	27,7	12,6
AF078779	<i>putative four repeat</i> Ionkanal (Natrium und Calcium)	196,6	13	15,2

<b>Accession number</b>		<b>EC (n=3)</b>	<b>MUC (n=2)</b>	<b>EC/MUC</b>
	<b>Kaliumkanäle</b>			
	<b>Einwärts-gleichrichtende Kaliumkanäle</b>			
L40624	Sulfonylurea Rezeptor (SUR)	206,2	12,1	17
AF021137	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal (IRK1)	83,3	10,6	7,9
X87635	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal	238,9	44,7	5,3
AJ003065	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal Kir2.4	131,7	8,9	14,9
U09243	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal (GIRK1/KGA Kir 3.1)	405,2	24,1	16,8
AB013890	Einwärts-gleichrichtender Kaliumkanal Kir 1.4	232,4	27,1	8,6
	<b>Calciumabhängige Kaliumkanäle</b>			
AF000973	Calciumabhängiger Kaliumkanal (rSK1)	541,8	67	8,1
U79661	Calciumabhängiger Kaliumkanal beta Untereinheit	653,2	36,3	18
	<b>Spannungsabhängige Kaliumkanäle</b>			
	<b>a., Shaker Familie</b>			
X12589	spannungsabhängiges Kaliumkanal Protein (Kv)	531,5	41,4	12,8
M27159	Kaliumkanal-Kv2	232,1	29,8	7,8
M77482	Kaliumkanal (Kv2.2; CDRK)	386,9	85,3	4,5
U42975	<i>Shal-verwandtes Kaliumkanal Kv4.3</i>	803	107,4	7,5
J04731	Kaliumkanal Protein (BK2)	143,7	35,8	4
X16002	Putatives Kaliumkanal Untereinheit Protein	557,2	83,9	6,6
	<b>b., EAG Familie</b>			
AF073891	Kaliumkanal (eag2)	385,7	90,5	4,3
AF061957	Kaliumkanal (elk1)	158,4	36,8	4,3
Z96106	Kaliumkanal r-ERG	150,1	31,5	4,8
	<b>Chloridkanäle</b>			
AF005720	Chloridkanal (ClC-2)	260,6	37,0	7,0
D26111	Chloridkanäle (ClC-K2L und ClC-K2S)	215,4	27,6	7,8
Z56277	CLC-5 Chloridkanal	556,0	55,6	10,0
Z67744	CLC-7 Chloridkanal Protein	117,2	29,2	14,3
D13985	Chloridkanal RCL1	431,9	95,8	4,5

	<b>Wachstumsfaktor Rezeptoren</b>			
U58466	FGF Rezeptor 1-ähnliches Protein mRNA	804,0	73,8	10,9
Z35138	FGF Rezeptor 2b, keratinocyte growth factor Rezeptor	220,0	22,5	9,8
L19112	heparin-binding fibroblast growth factor Rezeptor 2	747,5	49,7	15,0
U65007	hepatocyte growth factor Rezeptor	327,0	22,8	14,4
L26110	TGF-beta Typ I Rezeptor	70,6	10,2	6,9
S67770	TGF-beta Typ II Rezeptor	615,5	39,5	15,6
	<b>Wachstumsfaktoren</b>			
M22427	basic fibroblast growth factor (FGF)	540,5	101,5	5,3
D64085	fibroblast growth factor FGF-5	364,7	21,9	16,7
X54400	hepatocyte growth factor	312,6	56,3	5,6
X06107	insulin-like growth factor I	1100,5	161,4	6,8
X16703	insulin-like growth factor II	435,1	18,7	23,3
AF023087	nerve growth factor induzierte Faktor A	6285,0	689,6	9,1
L20913	vascular endothelial growth factor Form 3	205,3	32,7	6,3
	<b>5. Exocytose Proteine</b>			
AF052596	SNAP-23	428,1	74,6	5,7
AB003991	SNAP-25A	155,3	45,2	3,4
AB003992	SNAP-25B	190,8	7,5	25,6
AB020879	Vesl-3/homer	225,1	24,5	9,2
D28512	Synaptotagmin III	830,1	206,4	4,0
AF000423	Synaptotagmin XI	309,7	65,6	4,7
AF029107	Mint2	402,1	20,1	20,1
M95735	Syntaxin B	1427,1	300,3	4,8
L20823	Syntaxin 2	98,7	9,7	8,65
U87971	Syntaxin 5	251,3	53,5	8,65
U56815	Syntaxin 6	120,0	11,1	8,65
M27925	Synapsin 2a	58,4	9,9	5,9
AF060173	SV2 verwandtes Protein (SVOP)	169,2	14,8	11,4
U35099	Complexin II	223,0	38,2	5,8
	<b>6. Adhäsionsmoleküle</b>			
U11031	NCAM BIG-1 Protein	173,5	37,8	4,6
U89744	Putativer Zellen Oberflächenantigen	1986,0	152,2	13,1
AB004278	Protocadherin 2	166,7	34,4	4,8

<b>Accession number</b>		<b>EC (n=3)</b>	<b>MUC (n=2)</b>	<b>EC/MUC</b>
AB004276	Protocadherin 4	243,8	52,0	4,7
AF097593	Testiculäres N-Cadherin	349,6	73,7	4,7
L13445	Sialyltransferase Genfamilie verwandtes mRNA	368,2	53,6	6,9
D25290	K-Cadherin	156,6	26,2	6,0
U72741	36 Kd beta-Galactosid bindendes Lectin	1001,0	195,9	5,1
M73553	intestinales Lactose-bindendes Lectin (L-36)	11376,2	1209,3	9,4
S58528	Integrin alpha v Untereinheit	145,0	25,1	5,8
S58529	Integrin beta 3 Untereinheit	268,0	54,9	4,9
S58644	Integrin beta 5 Untereinheit	6521,8	1130,9	5,8
	<b>7. Regulatorische Peptide: ADH/Vasopressin/ANP/AT</b>			
Z11932	Vasopressin V2 Rezeptor	333,6	27,4	12,2
M85183	Angiotensin/Vasopressin Rezeptor (All/AVP)	362,6	18,3	19,8
M64785	Vasopressin (VP)	698,8	100,1	7,0
S80456	Guanylatcyclase-A (GC-A)/ANP Rezeptor	1013,2	190,4	5,3
E00903	Atriales natriuretisches Peptid (ANP)	407,9	70,6	5,8
E00698	gamma Atrium natriuretisches Polypeptide	165,7	13,9	12,0
D15069	Adrenomedullin Precursor	87,8	16,4	5,4
M12112	Angiotensinogen	99,6	17,7	5,6
M57507	Guanylcyclase-S (GC-S-beta-2)	512,6	75,1	6,8
M93669	Secretogranin II	425,9	65,5	6,5
	<b>8. Gene mit unbekanntem Funktionen in EC Zellen</b>			
AF000901	p23 (p58/p45) Splicevariante, Nucleoporin	95,0	4,6	20,7
AF062594	Nucleosom assembly Protein	79,0	4,6	17,2
AF020618	progression elevated gene 3	1442,3	172,4	8,4
AJ000556	Janus Protein Tyrosinekinase 1, JAK1	257,1	11,1	23,3
AF022081	kleines nucleares RING Finger Protein	153,7	9,9	15,5
U19893	Alpha Actinin	782,1	185,8	4,2
AF054618	Cortactin Isoform C, Actin bindendes Protein	327,7	35,5	9,2
D10699	Ubiquitin Carboxylterminalhydrolase PGP9.5	195,5	35,6	5,5
D38066	UDP Glucuronosyltransferase	205,4	14,9	13,8
D78159	Keratin 6	498,7	32,1	15,5
D84477	RhoA	585,8	91,1	6,4
J02597	Apolipoprotein A-I	599,9	32,6	18,4
M22359	Plasmaproteinase Inhibitor alpha-1-Inhibitor	104,9	15,8	6,6

	III			
S66024	Transcriptioneller Repressor CREM	108,5	7,4	14,8
S80345	VHL= von Hippel-Lindau Tumorsuppressor	88,8	17,6	5,0
U21101	Cyclische GMP stimulierte Phosphodiesterase (PDE2A2)	488,8	23,4	20,9
D23676	regenerating Protein III (reg III)	275,6	9,9	27,8
U10071	CART Protein mRNA	420,7	41,0	10,3
U36482	Endoplasmatisches Reticulum Protein ERp29 Precursor	97,7	18,5	5,3
D38056	B61	135,8	18,4	7,4
J04963	Ekto-ATPase	361,7	50,8	7,1
D86086	Canaliculärer multispezifischer organischer Anion Transporter	268,2	45,9	5,8
X86178	azgp1Gen	355,3	70,3	5,1
X99773	Serpin, ZG-46p	411,6	40,8	10,1
L03201	Cathepsin S	1785,1	264,7	6,7
	<b>9. Olfaktorische Rezeptoren</b>			
AF091572	HGL-SL3 olfaktorischer Rezeptor	339,5	38,5	8,82
AF091573	HGL-SL2 olfaktorischer Rezeptor	290,5	102,0	2,85
AF091576	HVL-VN1 olfaktorischer Rezeptor	573,2	11,9	48,37
AF029357	Olfakt. rezeptor-ähnliches Protein	1144,5	468,1	2,45
AF091578	EVA-TN1 olfaktorischer Rezeptor	610,0	11,9	51,47
AF034900	SCR D-7 olfakt. rez.-ähnlich. Prot.	2876,9	1406,7	2,05
AF016178	putativer Pheromonrezeptor Go-VN1	741,8	287,6	2,58
U36897	putativer Pheromonrezeptor VN5	416,0	125,5	3,32
AF53987	putativer Pheromonrezeptor V2R1	840,4	103,7	8,10

## 7. Identifikation olfaktorischer Rezeptoren auf EC Zellen

Zur Untersuchung der EC Zellen auf die mögliche Expression von olfaktorischen Rezeptoren RT-PCR wurde durchgeführt mit degenerierten Oligonukleotid Primern (Tabelle 1). Dafür wurde RNA unmittelbar nach Abschluss der Präparation isoliert (120-180 min nach der Tiertötung). PCR wurde unter Standardbedingungen durchgeführt mit cDNA von EC Zellen und BON Zellen und als Kontrolle mit cDNA aus der Bulbus olfaktorius der Ratte. Um die Integrität der cDNA zu überprüfen wurde auch der *housekeeping* Gen GAPDH aus den gleichen Proben amplifiziert (Abb.22).

Aus der cDNA Probe der EC Zellen und BON Zellen wurden positive Signale in der vorausgesagten Größe (525bp, obere Bande) für die olfaktorischen Rezeptoren amplifiziert. Aus der Positivkontrolle wurden die gleichen Signale beobachtet. Bei den Negativkontrollen wurde kein Produkt amplifiziert.

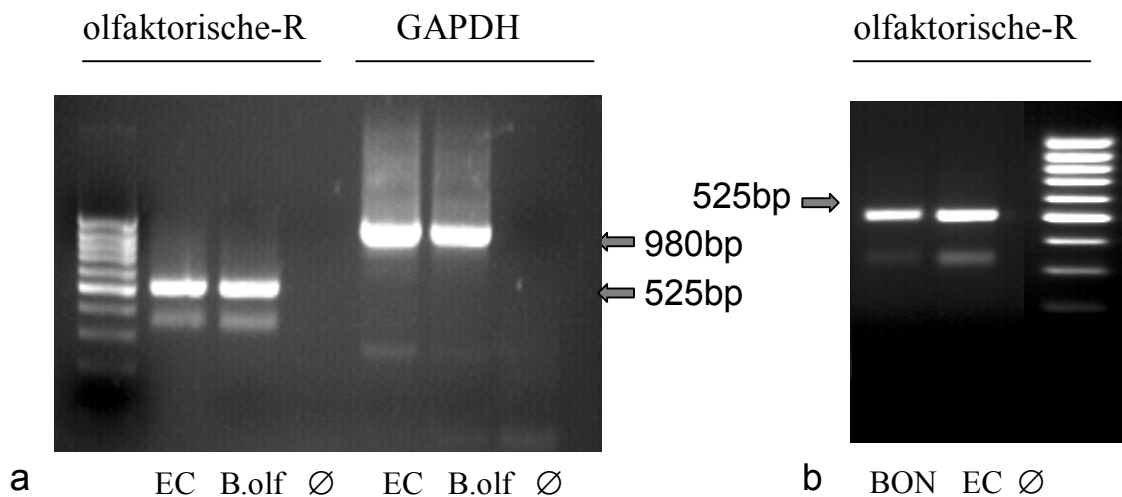


Abb.22 PCR Nachweis von olfaktorischen Rezeptoren Auf EC und BON Zellen. (a) Als Positivkontrolle wurde Rattenhirngewebe aus dem Bulbus olfaktorius verwendet. Um die Integrität der cDNA zu testen GAPDH wurde aus den gleichen Proben mitamplifiziert. In den Bahnen 1 ist der Standard, 2 und 5 Produkte für EC Zellen, 3 und 6 die Positivkontrollen, 4 und 7 die Negativkontrollen aufgetragen. (b) In den Bahnen 1 ist der PCR Produkt für BON Zellen in 2 für die EC Zellen in 3 die Negativkontrolle und in 4 der Standard aufgetragen.

Die PCR Produkte aus der EC Zelle wurde sequenziert um die Identität des exprimierten Genes aufzuklären. Um die Sequenzierung zu ermöglichen musste der PCR Produkt in einer höheren Kopienzahl vorliegen. Aus diesem Grund wurde das PCR Produkt kloniert und sequenziert. Die so erhaltene Sequenz stimmte mit dem Rattus norvegicus Gen ähnlich dem olfaktorischen Rezeptor MOR186-1 (*Accession number*: XM\_230104) der Maus überein (Abb.23).

```

TGTAATACGA CTCACTATAG GGCGAATTGG GCCCTCTAGA TGCATGCTCG 50
AGCGGCCGCC AGTGTGATGG ATATCTGCAG AATTCGGCTT GAAGGGGTTT 100
AGCATGGGGA TAACCAGTGT ATAGAACAAA GAAGTGATTT GGCCAGTCTC 150
AAAAGAGTGA GTGGATTTTG GTTGTGCATA CATGAAAAAT AGAGTACCNG 200
TAGAATATAA CTATCACTGT CAGATGAGAG CCACAGGTTG AGAAGGCCTT 250
GTGCCTGCCC TCTGAAGAGT TAATCTTGAT AATGGACACA AGGATCAAGA 300
TGTAAGACAT GGAGACTACT AGAAGAGAAG AAATTAATT AAAAGTTGCA 350
AAGATTAATA TTATCAGCTT AATTTTCATGT GTGTCTGAGC ACAGCATCAA 400
TATCAATGGC AGACTGTAC AGTAGAAATG CCTGATGACA TTATGGCCAC 450
GAACCTATCA TACGCCAAAG CCGAATTCCA GCACACTGGC GGCCGTTACT 500
AGTGGATCCG AGCTCGGTAC CAAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT 550
TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC 600
GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC 650
ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT NCAGTCGGGA AACCTGTCGT 700
GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGGTTGCGT 750
ATTGGGCGCT CTTCCGCTTN CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT 800
TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACNGGTAT 850
NCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAGAA CATGTGAGCA AAAGNCAGCA 900
AAGG

```

Abb.23 Ergebnis der Sequenzierung: Fettdruck zeigt die Sequenz des PCR-Produktes, Normaldruck die Sequenz des verwendeten Vectors, die unterstrichene Stelle stellt die EcoRI Schnittstelle dar.



## IV. Diskussion

### 1. Charakterisierung isolierter EC Zellen aus dem Ileum

Im Dünndarm wird Serotonin hauptsächlich aus EC Zellen sezerniert und stimuliert dabei die intestinale Motilität und die Sekretion. Dabei ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht genau bekannt, durch welche Mechanismen Serotonin aus den EC Zellen freigesetzt wird.

Frühere Arbeiten verwendeten Gewebepreparate oder isolierte intestinale Krypten. Diese Techniken konnten allerdings Einflüsse aus der Umgebung nicht ausschließen. Unklar blieb, ob die Stimulation der Serotoninfreisetzung direkt durch eine Wirkung auf die EC Zellen oder indirekt durch Interaktionen mit den umgebenden Zellen erfolgte (Racke et al., 1996). Beispielsweise könnten bei Untersuchungen an perfundierten Ileumabschnitten die Wirkung von Somatostatin oder GLP (*glucagon-like peptide*) nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neues Modell von isolierten EC Zellen präsentiert, in dem die EC Zellen zu mehr als 84% angereichert wurden. Aufgrund der geringen Größe dieser Zellen (10µm) und einer Dichte von 1,070 g/ml wurden die EC Zellen aus einer epithelialen, enzymatisch verdauten Zellsuspension isoliert und aufgereinigt. Im Vergleich dazu wurden die ECL Zellen aus der Magenschleimhaut bei einer geringeren Dichte von 1,052 angereichert, was vermuten lässt, dass EC Zellen mehr Peptide oder Hormone enthalten könnten als ECL Zellen (Prinz et al., 1999). Dies lässt auch der Vergleich der sekretorischen Vesikel beider Zelltypen vermitteln. Die Vesikel der ECL Zellen zeigen nämlich einen helleren Hof zwischen ihren Membranen und einen dichteren Inhalt als die der EC Zellen. Die meisten isolierten EC Zellen zeigten keine polarisierte Struktur in Gegensatz zu deren Gestalt im Gewebe bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Dey und Hoffpauir, 1984; Portela-Gomes et al., 1984).

Die Reinheit der Dichtegradientenfraktion wurde zuerst mit Immunfärbungen bestimmt. Die Immunfärbung gegen Serotonin ergab einen Anteil von über 84% positiv gefärbter Zellen in der DG Fraktion. In dieser Fraktion ergab die Immunfärbung gegen SNAP-25 einen ähnlichen, aber um zwei Prozent höheren

Anteil an positiv gefärbten Zellen. SNAP-25 ist auch vorhanden in anderen neuroendokrinen Zellen der Darm, somit ist es kein ausschließlicher Marker für EC Zellen. Der leicht erhöhte Anteil an SNAP-25 positiven Zellen lässt vermuten, dass in geringen Mengen auch andere neuroendokrine Zellen in der Fraktion vorhanden sind.

Ein möglicher kontaminierender Zelltyp ist die glucagonhaltige A-Zelle, die zumindest im menschlichen Ileum den zweithäufigsten neuroendokrinen Zelltyp darstellt (Sjölund et al., 1983). Um das zu überprüfen wurde Glucagon in dem Überstand und der Zellinhalt der DG Fraktion mit einer Radioimmunoassay gemessen, es konnte aber kein messbarer Glucagongehalt festgestellt werden (Daten wurden nicht gezeigt). Somit verblieben in der DG Fraktion 16% der Zellen, die nicht genauer identifiziert wurden. Mit PAS Färbung wurden schleimhaltige Becherzellen gefunden. 8% der Zellen in der DG Fraktion zeigten eine PAS positive Färbung. Damit wurde die größte Gruppe von kontaminierenden Zellen als schleimhaltige Becherzellen identifiziert.

Um die funktionelle Integrität der EC Zellen Präparation zu prüfen, wurde die Expression bekannter Markergene mit RT-PCR Experimenten untersucht. Dabei wurde die Expression des vesikulären Monoamintransporters VMAT1 und des Peptides Guanylin nachgewiesen.

Vesikuläre Monoamintransporter transportieren Catecholamine, Serotonin und Histamin aus der Zytosol in die Vesikeln. Dabei werden sie mit einem Protonengradienten durch die Vesikelmembran angetrieben. Es gibt zwei VMAT Subtypen, welche zwar strukturverwandt sind, jedoch unterschiedliches pharmakologisches Profil haben (Liu et al., 1992, 1994). Der Subtyp VMAT1 ist ein spezifischer Marker für EC Zellen, der Subtyp VMAT2 hat eine 10-Fach höhere Affinität für Histamin und wird in ECL Zellen exprimiert (Peter et al., 1995; Gerhard et al., 2001). Guanylin ist ein endogener Ligand für den *heat-stable enterotoxin* Rezeptor der mit Guanylat-Cyclase-C gekoppelt ist. Dieses Peptid wurde erstmals aus dem Jejunum der Ratte isoliert (Currie et al., 1992). Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zur Sekretion von Wasser und Elektrolyten in die gastrointestinalen Lumen (Forte und Currie, 1995). Die Produktion und die Sekretion von Guanylin wurden bereits früher als spezifische Eigenschaft der EC Zellen beschrieben (Cetin et al., 1994). Damit kann festgestellt werden, dass die EC Zelle parakrin eine

wichtige Funktion der Schleimhaut des Darmes, nämlich die Sekretion von Wasser und Elektrolyten reguliert.

Durch die gleichen Techniken, RT-PCR und Immunocytochemie, wurde auch untersucht, welche Rezeptoren auf EC Zellen exprimiert werden. Unter den adrenergen Rezeptoren wurden die  $\alpha$ 2A- und  $\alpha$ 2B-adrenergen sowie  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptor Subtypen mit RT-PCR Technik in der angereicherten EC Zellen Präparation identifiziert. Die PCR Produkte zeigten spezifische Banden in der erwarteten Größe entsprechend den Positivkontrollen. Die Präsenz dieser Rezeptoren wurde durch positive Immunfärbung verifiziert, für die  $\alpha$ 2A- sowie für die  $\beta$ 1- adrenergen Rezeptoren zeigten mehr als 84% der Zellen in dieser Fraktion eine positive Färbung. Ähnlich wurden muscarinerge M3 Rezeptoren detektiert. Interessanterweise zeigten manche gegen den muscarinergen M3 Rezeptor positiv gefärbte EC Zellen eine polarisierte Struktur, eine Form, die auch schon bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen in diesem Zelltypen beobachtet wurde (Dey und Hofpaur, 1984). Diese Daten entsprechen früheren Beobachtungen von Racke et al. (1996). In diesen Experimenten wurden Gewebestreifen von Schweinen oder Meerschweinchen mit pharmakologischen Methoden untersucht. Das Modell von isolierten und angereicherten EC Zellen hat somit diese vorigen Daten bestätigt. Die Präsenz von GABA-A Rezeptoren wurde durch RT-PCR und immunocytochemische Färbung nachgewiesen. Die Aminosäure Gamma-amino-Buttersäure, GABA, ist der verbreiteteste hemmende Überträgerstoff im Zentralnervensystem, sowohl im Hirn als auch im Rückenmark. Sie wird im Nervensystem aus Glutaminsäure synthetisiert. Einige Krampfgifte, wie das Alkaloid Bicucullin und Pikrotoxin scheinen spezifische Antagonisten des GABA sein. Es gibt drei Typen von GABA Rezeptoren, die als GABA-A und GABA-B und GABA-C Rezeptoren gruppiert werden. GABA-A und GABA-C Rezeptoren gehören zu den Ligandgesteuerten Ionkanälen. Die Bindung des Liganden an dem Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung, wodurch der Ionenkanal geöffnet wird und in den meisten Fällen Chloridionen in die Zelle fließen. Außer GABA können an dem GABA-A Rezeptor weitere pharmakologisch interessante Liganden binden wie Barbiturate, Steroide, Konvulsiva, und Anästhetika (Sieghart 1995). Der GABA-A Rezeptor setzt sich aus 5 Untereinheiten zusammen. Diese 5 Untereinheiten werden aus vielen Untereinheiten kombiniert ( $\alpha$ 1-6;  $\beta$ 1-4;  $\gamma$ 1-3;  $\delta$ ;  $\epsilon$ ;  $\pi$ ;  $\theta$ ;  $\rho$ 1-3). Die übliche

Stöchiometrie ist  $2\alpha:2\beta:1\gamma$  (Smith und Simpson 2003). Unterschiedliche Untereinheiten können mit unterschiedlichen Rezeptorfunktionen zusammenhängen. In dieser Arbeit wurden die Primer für die PCR Reaktion gegen die  $\beta 3$  Untereinheit des GABA-A Rezeptors entwickelt. Der Antikörper für die Immunfärbung band an den  $\beta 2$  und  $\beta 3$  Untereinheiten. Diese Untereinheiten stellen einen Teil der Bindungsstelle für GABA an dem Rezeptor dar. Dieser Rezeptor wurde bereits in früheren Untersuchungen vermutet und mit einer hemmenden Wirkung auf die Serotoninsekretion in Verbindung gebracht (Schwörer et al., 1989). Andere Arbeiten fanden eine GABA-A Rezeptor vermittelte Regulation der Kontraktionen im Ileum von Meerschweinchen (Koutsoviti-Papadopoulou et al., 2001).

Indessen wurde kein Signal für die GABA-B Rezeptoren gefunden. Der GABA-B Rezeptor ist ein an das G-Protein gekoppelter, metabotroper Rezeptor, dessen Aktivierung einen  $Ca^{2+}$  Einstrom und einen  $K^+$  Ausstrom an der Zellmembran bewirkt. Morphologisch ist der Rezeptor ein Heterodimer, für einen funktionierenden GABA-B werden Expressionen von beiden Dimeren benötigt (Bowery und Enna 2000). GABA-B Rezeptoren finden auch klinische Anwendungen. Beispielsweise ist Baclofen (Lioresal), ein GABA-B Rezeptor Agonist, der in der medikamentösen Behandlung der Multiplen Sklerose eingesetzt wird. Multiple Sklerose ist die häufigste demyelinisierende Erkrankung mit multifokalen Entmarkungsherden und einem meist schubförmigen Verlauf aufgrund von Autoimmunreaktionen des Organismus. Da eine kausale Therapie der Multiplen Sklerose nicht möglich ist kommt der symptomatischen Behandlung für eine Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen eine besondere Bedeutung zu. Eines der Hauptsymptome sind Mobilitätseinschränkungen, wie Schwäche, Spastizität und Ataxie. Verschiedene Medikamente Vermögen den Muskeltonus zu reduzieren und muskuläre Spasmen zu verringern. Baclofen wirkt vor allem an den terminalen Endigungen der primär afferenten Fasern im Rückenmark und verringert die monosynaptische Dehnungsreflexe (Kesselring und von Hippel 2001).

Für die Identifizierung des GABA-B Rezeptors wurden Primer verwendet, die gegen den Rezeptor Heterodimer R2 gerichtet waren. Dieser Teil des Rezeptors konnte nicht mit RT-PCR nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten die Präsenz von GABA-B Rezeptoren auf EC Zellen (Nakajima et al., 1996). Dies konnte jedoch mit den EC Zellen aus dieser Präparation, zumindest die R2

Untereinheit betreffend, nicht bestätigt werden. Dieses Ergebnis zeigt daher, dass das Modell der isolierten EC Zelle offensichtlich genauere Antworten gibt. Die Immunofärbung an Schnitten kann häufig nicht eindeutig differenzieren, von welchen Zellen das Signal kommt, es sei denn es wurden aufwändigere Doppelfärbungen durchgeführt oder Serienschnitte angefertigt.

In den Genchip Experimenten wurden verschiedene Rezeptoren in erhöhter Expression bei den EC Zellen im Vergleich zu Mucosazellen gefunden, wie  $\alpha 1B$  – und  $\alpha 1C$ -adrenerge, nikotinische cholinerge GABA-A und GABA-B 1c Rezeptoren. Im Gegensatz zu dem RT-PCR Experiment, in dem die GABA-B Rezeptor R2 Untereinheit nicht gefunden wurde, wurde die Expression der GABA-B R1 Untereinheit in der Genchip Analyse festgestellt. Der GABA-B Rezeptor ist ein heterodimerer Komplex, welcher aus R1 und R2 Untereinheiten zusammengesetzt wird (Blein et al., 2000). Die R1 Untereinheit hat mehrere Splicevarianten, wobei die bekanntesten die R1a und R1b Varianten sind. An dieser Untereinheit befindet sich auch die Bindungsstelle für GABA Agonisten. Frühere Arbeiten postulierten die Präsenz von GABA-B Rezeptoren an EC Zellen (Nakajima et al., 1996). Die vorliegende Studie kann dies nicht vollständig ausschließen, weitere Untersuchungen werden benötigt, um die Rolle von GABA-B Rezeptoren in diesem Zelltyp zu spezifizieren. Andererseits erscheint es möglich, dass die Detektierungssequenzen an einem strukturähnlichen Rezeptor mit Verwandten Sequenzen bindet, beispielsweise an den metabotropen Glutamatrezeptor (Jingami et al., 2003).

Um die gewonnenen Daten der Anreicherung zu verifizieren, wurde eine quantitative TaqMan PCR durchgeführt. Untersucht wurden das Markergen VMAT-1 und der GABA-A Rezeptor. In beiden Fällen wurde die erhöhte Expression der Gene in der EC Zellen Präparation bestätigt. Diese um den Faktor 4 erhöhte mRNA Kopienzahl ist aber geringer ausgefallen als die Anreicherung, welche aus den Serotoninfreisetzungsexperimenten und aus den Immunfärbungen zu vermuten ist. Eine Möglichkeit ist, dass die Zellen der Dichtegradientenfraction durch die Anreicherungsprozess, Elutriation und Dichtegradientenzentrifugation, mehr belastet wurden als die unfraktionierten Zellen, und deswegen eine geringere RNA Expression zeigten. Andererseits wurden sowohl für die Serotonin Freisetzungsexperimente als auch für die Immunfärbungen hochspezifische

Antikörper verwendet; daher sind beide Methoden auch bei unterschiedlichen Ergebnisse als spezifisch zu werten.

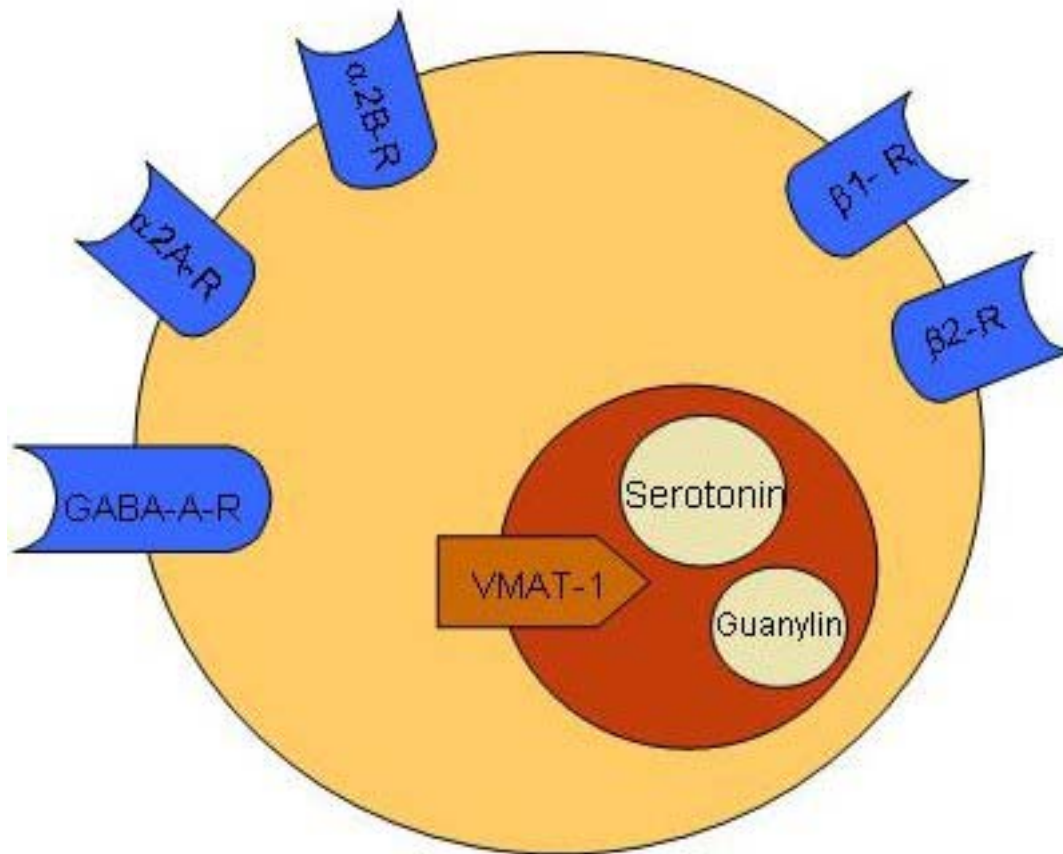


Abb.23 Illustration der Rezeptoren, Transmitter und Transporter der EC Zelle.

Bei der Untersuchung von Serotonin Rezeptoren auf der EC Zellen wurden deutliche Unterschiede zu früheren Arbeiten gefunden. Die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren sollten eine stimulierende Wirkung auf die Serotoninsekretion haben. Dagegen wurde den 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren eine negative *feedback* Inhibition zugesprochen (Schwörer und Ramadori 1998). Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen von Gebauer wurden an isolierten EC Zellen *keine* 5-HT<sub>3</sub> oder 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren gefunden. Gebauers Experimente wurden an perfundierten Meerschweinchen Ileum durchgeführt, in Gegenwart von Tetrodotoxin, um neurale Einflüsse auszuschließen. Tropisetron, Granisetron, Ondansetron und Cisaprid wurden zu den Schnitten gegeben und die Serotoninfreisetzung gemessen. Bezüglich der Serotoninrezeptoren ist Cisaprid ein

Agonist an den 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren und ein Antagonist an den 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren, daher keineswegs spezifisch für 5HT<sub>4</sub> Rezeptoren. Weiterhin wurde in diesen Versuchen Ondansetron verwendet, der zurzeit meistverwendete 5HT<sub>3</sub> Antagonist, welcher jedoch ohne Wirkung blieb. Somit ist aus diesen Experimenten nicht eindeutig nachgewiesen, ob die 5-HT<sub>3</sub> und 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren auf den EC Zellen als Autorezeptoren funktionieren. In der Präparation aus der vorliegenden Arbeit konnte in RT-PCR Experimenten ein klares Signal in der erwarteten Größe für die Positivkontrollen amplifiziert werden, nicht aber für die EC Zellen. Der Affymetrix GeneChip zeigte wie die RT-PCR Experimente ebenfalls keine Expression von 5-HT<sub>3</sub> oder 5-HT<sub>4</sub> Rezeptoren in der EC Zellfraktion. Somit können die Resultate aus dieser Arbeit die Präsenz von diesen Serotoninrezeptoren auf EC Zellen nicht bestätigen, die beobachtete *feedback* Regelung wird somit eher durch Signale aus dem umgebenden Zellverband zustande kommen.

Nach Abschluss der Präparation waren mehr als 84% der Zellen intakt. Innerhalb von 24h aber starben fast alle Zellen. Dieser Vorgang zeigte apoptotische Merkmale in der TUNEL-Färbung. Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist ein weit verbreiteter Regulationsmechanismus in Metazoa. Zellen sterben durch Apoptose während der Embryonalentwicklung, in erwachsen Organismen während der Gewebeerneuerung, bei der Beendigung eines Immunantwortes und anderen Vorgängen. Signale aus der Umgebung einer Zelle und interne Sensoren für die Zellintegrität halten normalerweise Gleichgewicht mit den Apoptosesignalen. Auf die Zellen befinden sich spezifische Oberflächenrezeptoren, welche bestimmte Apoptoseliganden binden können. Die Bindung an den Rezeptoren bewirkt dann innerhalb von Sekunden die Aktivierung von Caspasen, was wiederum innerhalb von weniger Stunden den Tod der Zelle bewirkt (Ashkenazi und Dixit, 1998). Für einen apoptotischen Vorgang in isolierten EC Zellen würde sprechen, dass diese aktive Prozess sehr schnell fortschreitet, in Gegensatz zum passiven Absterben. Auch in der TUNEL-Färbung wurden Merkmale der Apoptose nachgewiesen. Dagegen spricht jedoch, dass der Zellverlust durch die Zugabe von einem Breitspektrum Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK (Biomol, Hamburg, Daten wurden nicht gezeigt) nicht verhindert werden konnte. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass der Zeitpunkt der Inhibition (während der enzymatischen Verdau) bereits zu spät war.

Durch die Zugabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren konnte der Zellverlust auch nicht eingeschränkt werden. Ähnliche Probleme sind auch bei anderen Arbeitsgruppen aufgetreten, die versucht haben intestinale Epithelzellen zu isolieren (Podolsky, 1993; Evans et al., 1993). Zum jetzigen Zeitpunkt ist keine Präparation bekannt, in dem isolierte Epithelzellen über längere Zeit erfolgreich kultiviert gewesen wären. Dagegen lassen sich die verwandten chromaffine Zellen aus der Nebennierenmark problemlos isolieren. Die Schwierigkeiten bei der Isolierung von EC Zellen aus der Darmepithel könnten daran liegen, dass die Epithelzellen im Darm unter Umständen einen direkten Zellkontakt benötigen, oder dass der normalerweise im Epithel der Darmschleimhaut andauernde Vorgang der Apoptose experimentell nicht verhindert werden kann. Andererseits wäre es möglich, dass die EC Zellen einen bisher nicht definierten Wachstumsfaktor für das Überleben benötigen. Die bis heute einzige erfolgreiche Kultur von intestinalen Zellen stellt die Isolation von Epithelzellen aus neugeborenen Ratten dar (Evans et al., 1992).

## 2. Stimulation und Hemmung der Serotoninfreisetzung aus EC Zellen und BON Zellen

Nach der Identifizierung dieser Rezeptoren auf EC Zellen wurde auch versucht die funktionelle Rolle dieser Rezeptoren zu bestimmen. Dazu wurden EC Zellen drei Stunden nach Abschluss der Präparation mit Noradrenalin, Acetylcholin oder GABA inkubiert und die Serotoninfreisetzung gemessen. Von diesen Substanzen konnte nur Noradrenalin eine erhöhte Serotoninfreisetzung stimulieren. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Arbeiten überein, in denen die Serotoninfreisetzung durch Noradrenalin an perfundierten Meerschweinchenileum beobachtet wurde (Racke et al., 1988). Acetylcholin steigerte in manchen Experimenten die Serotoninfreisetzung, blieb aber in einigen Versuchen ohne Wirkung, insgesamt konnte also durch die Streuung keine signifikante Stimulation nachgewiesen werden. Die Stimulation durch Acetylcholin ist im Einklang mit früheren Arbeiten, da an isolierten Kolonsegmenten von Meerschweinchen wirkte der Acetylcholinesterase-Hemmer Physostigmin ebenfalls stimulierend auf die Serotoninfreisetzung (Kojima und Ikeda 1998). GABA



wirkte in keinem der Experimente stimulierend oder hemmend auf die basale Serotoninfreisetzung. Es muss erwähnt werden, dass die basale Serotoninfreisetzung bereits 30% des gesamten Serotonininhalt der Zellen betrug. Im Vergleich dazu werden unter basalen Bedingungen in ECL Zellen nur 1-5% des gesamten Histamingehaltes freigesetzt. Möglicherweise war die Serotoninfreisetzung in diesen Zellen schon während der Präparation durch die mechanischen Einwirkungen beim Elutriieren stimuliert (Kellum et al., 1999). In mehreren Arbeiten wurden für diesen Zelltyp Mechanorezeptoren postuliert, durch die eine Serotoninfreisetzung stimuliert werden könnte. Weiterhin ist es möglich, dass die EC Zellen während der Präparation durch die EDTA Exposition intrazellulär an Calcium verarmen. Dadurch können die Zellen nicht auf die Stimulation auf Acetylcholin antworten. Eine niedrigere basale Serotoninfreisetzung könnte durch längere Kultivierung der Zellen vielleicht unterdrückt werden. In vorausgehenden Studien wurde Acetylcholin stimulatorisch und GABA inhibitorisch auf die Serotoninfreisetzung beschrieben. Wegen der hohen basalen Freisetzung ist es in diesem Experiment nicht sicher, welche Wirkungen Acetylcholin oder GABA auf die EC Zellen ausüben können. Noradrenalin schien daher der stärkste Stimulans für die Serotoninfreisetzung zu sein.

Um die Stimulationsdaten aus der vorliegenden EC Zellen Präparation zu verifizieren, wurden die Stimulationsexperimente bei der Karzinoid Zelllinie BON wiederholt. Die BON Zellen wurden ursprünglich aus einer humanen Lymphknotenmetastase eines Pankreaskarzinoids isoliert, die Fibroblasten entfernt und die Zellen an *in vitro* Bedingungen adaptiert (Evers et al., 1994). Diese Zelllinie produziert und sezerniert Serotonin und hat ihren Ursprung in den EC Zellen. Durch diese Eigenschaften bieten die BON Zellen ein angemessenes Modell für die EC Zellen. Die physiologischen Eigenschaften dieser Zelllinie sind noch nicht vollständig aufgeklärt, es wurden jedoch Dopaminrezeptoren auf BON Zellen nachgewiesen (Lemmer et al., 2002), und weiterhin eine Stimulation durch Serotonin-, Acetylcholin,  $\beta$ -adrenergen, und Gastrin beobachtet (Evers et al., 1994). Ebenso wurde beobachtet, dass BON Zellen nach mechanischer Stimulation vermehrt Serotonin freisetzen (Kim et al., 2001).

BON Zellen zeigten in den eigenen Stimulationsexperimenten ein ähnliches Verhalten wie die EC Zellen. Die Menge an freigesetztem Serotonin war in den

beiden Modellen vergleichbar, wobei die basale Freisetzung in BON Zellen niedriger war. Am stärksten wurde auch bei BON Zellen durch Noradrenalin die Freisetzung von Serotonin stimuliert, in geringerem Maße, aber auch signifikant, wurde die Freisetzung durch Carbachol auch erhöht. GABA bewirkte auch bei den BON Zellen wie bei den EC Zellen keine erhöhte Serotoninfreisetzung.

Für GABA Rezeptoren besteht ein pharmakologisches Interesse, was die Behandlung von Refluxerkrankungen betrifft. Es wird untersucht welche Rolle GABA als Prokinetikum spielen könnte. Prokinetika sind Medikamente, welche die Magenentleerung beschleunigen und die Rücktritt von Mageninhalt in die Speiseröhre verhindern. Die derzeit verwendete Prokinetika sind antidopaminerge Medikamente, wie Metoclopramid und Domperidon (Briejer et al., 1995). Weiterhin wird die Wirkung von Serotonin als prokinetischer Wirkstoff untersucht. Auch GABA hat möglicherweise eine Wirkung auf die Motilität. Untersuchungen an Hunden ergaben, dass durch die Aktivierung von GABA-B Rezeptoren die Relaxation der Ösophagussphinkter (*transient lower esophageal sphincter relaxation, TLESR*) gehemmt werden kann (Lehmann et al., 1999). Diese *TLESR* Mechanismus verursacht die Refluxerkrankung in den meisten Patienten, die nur eine milde Ösophagitis haben (Mittal et al., 1995). Die EC Zellen zeigten keine Reaktion auf die Stimulation mit GABA und besitzen keine GABA-B Rezeptoren. Allerdings könnte GABA über die vorhandenen GABA-A Rezeptoren die durch Noradrenalin stimulierte Serotoninfreisetzung beeinflussen. Diese Fragestellung erfordert noch weitere Untersuchungen.

Es wurde auch versucht die Freisetzung von Serotonin aus EC Zellen und BON Zellen durch Cromoglycinsäure zu hemmen. Cromoglycinsäure wird bei allergischen Erkrankungen vor allem bei Asthma verwendet. Bei einer allergischen Reaktion spielen Mastzellen eine Schlüsselrolle. Durch Kontakt mit Antigen-Antikörper-Komplexen werden die Mastzellen zur Exocytose ihrer Granula angeregt. Die ausgeschütteten Mediatoren, vor allem Histamin und Serotonin vermitteln dann die anschließende Reaktion. Die Exocytose der Mastzellen ist ein calciumabhängiger Prozess. Der nötige Einstrom von Calcium kann durch Cromoglycinsäure gehemmt werden, und dadurch die Degranulation der Mastzellen verhindern. Ähnlich zu diesem Prozess könnte auch die Freisetzung von Serotonin aus EC und BON Zellen durch Cromoglycinsäure gehemmt werden. Es gab auch schon Überlegungen

Cromoglycinsäure bei Diarrhö- prädominanten Reizdarmsyndrom einzusetzen (Spanier et al., 2003).

Die durch Noradrenalin stimulierte Serotoninfreisetzung konnte durch Cromoglycinsäure weder bei EC Zellen noch bei BON Zellen signifikant vermindert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass durch ein ungünstiges Membranpotential der EC Zelle die Cromoglycinsäure nicht aufgenommen werden konnte, oder dass die EC Zellen einen Calciumkanal besitzen an dem Cromoglycinsäure nicht binden kann, und dadurch den Calciumeinstrom an dieser Zelltyp nicht verhindern kann.

### 3. Bedeutung von Chemorezeptoren auf den EC Zellen

Eine völlig neue Erkenntnis der Genchip Analyse bereite der Nachweis von einer Gruppe von olfaktorischen und Pheromonrezeptoren im Darmepithel. Die Expression dieser Rezeptoren war vollkommen unerwartet, manche von ihnen schienen mit einem starken Expressionsniveau spezifisch für die EC Zellen zu sein. Der Affymetrix GeneChip wurde verwendet um einen Überblick über das Genexpressionsprofil dieses Zelltyps zu erhalten und möglicherweise neue Rezeptoren auf EC Zellen zu finden. Dies ist die erste Arbeit, die eine Genchip Analyse für EC Zellen vorgenommen hat. Die Vorteile dieser Methode liegen darin, im Vergleich zu Mikroarrays, dass ein Gen durch 20 Oligonukleotid Abschnitte präsentiert wird. Dadurch wird die Möglichkeit eine falsche Hybridisierung als Signal zu bewerten, verringert. Dieser Genchip kann die Expression von ca. 9000 Genen bei Ratten analysieren. Davon wurden etwa 70 Gene gefunden, die relativ angereichert gegenüber intestinale Zellen erscheinen. Diese Gene kodieren für verschiedene Rezeptoren, Wachstumshormone, Ionenkanäle, Adhäsionsmoleküle oder Peptide. Es wurden zwei Hybridisierungsexperimente für Mucosazellen und drei für die EC Zellen unternommen. Die jeweiligen Mittelwerte aus den Experimenten wurden dann verglichen. Als spezifisch für die EC Zellen wurden diejenigen Expressionswerte betrachtet, die eine Expression von mindestens 300 und eine mindestens 2 fach erhöhte Expression in der EC Zellfraktion zeigten. Diese Selektion war notwendig, da

die Expressionswerte kein absolut quantitatives, sondern nur ein relatives Maß im Vergleich zum GAPDH Signal darstellen. Manche von diesen Genen zeigen einen Unterschied im Expressionsniveau, der 7-fach und mehr erhöht war, was mit dem Anreicherungsmaß von EC Zellen übereinstimmt.

Geschmack und Geruch sind chemische Sensorsysteme, die entwicklungsgeschichtlich zu unseren ältesten Sinnen gehören. Selbst sehr einfache Lebewesen verfügen über Chemosensoren, mit denen sie ihre unmittelbare Umwelt analysieren und über die sie ihr Verhalten entsprechend modifizieren. Geschmack hat die vier Grundqualitäten süß, sauer, bitter und salzig. Nebenqualitäten sind alkalisch, metallisch und umami. Diese sind auf der Zungenoberfläche ohne eindeutige Topographie angeordnet. Die Wahrnehmungsschwellen liegen besonders für bittere und saure Stoffe sehr niedrig. Der Geschmacksinn dient vor allem der Prüfung der Nahrung auf unverdauliche oder giftige Stoffe. Zusätzlich beteiligt er sich an der Steuerung der Sekretion der Verdauungsdrüsen. Düfte werden in 7 typische Duftklassen eingeteilt: blumig, ätherisch, Moschus-artig, Campher-artig, faulig, stechend und schweißig (Birbaumer und Schmidt 1996). Bei allen natürlich vorkommenden Düften handelt es sich um Duftgemische, in denen es charakteristische Leitdüfte gibt. Es können mehrere Tausend Düfte unterschieden, aber nicht benannt werden. Bei Säugetieren werden ca. 500-1000 unterschiedliche olfaktorische Rezeptoren vermutet, mit denen die Vielfalt der Gerüche erfasst werden können (Crasto et al., 2001). In situ Hybridisation Studien bei Neuronen ergaben, dass diese immer nur einen olfaktorischen Rezeptortyp exprimieren (Ressler et al., 1993). Interessanterweise sind die meisten Neuronen in der Lage auf mehrere Duftstoffe zu reagieren (Firestein et al., 1993), die einzelnen Düfte werden aber von mehreren Neuronen erfasst (Malnic et al., 1999). Wahrscheinlich werden daher die unterschiedlichen Antworten der Neuronen miteinander verrechnet, bevor ein Eindruck von einem Duft entsteht.

Die meisten olfaktorische wie Geschmacksrezeptoren bilden eine Untergruppe der Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die 7 Transmembrandomänen besitzen. Mit der Identifikation dieser Rezeptoren wurde erst begonnen, diese sind sich aber ähnlich und zeigen hohe Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Spezies. Die bekanntesten aus der Familie der Geschmackrezeptoren sind die

Bitterstoffrezeptoren (T2R). T2R Rezeptoren sind entfernt verwandt mit den V1R Pheromonrezeptoren und mit den Opsinen (Adler et al., 2000). Zurzeit sind 26 humane Bitterstoffrezeptoren bekannt. Eine Gemeinsamkeit aller Zellen, die T2R Rezeptoren besitzen, ist die Produktion von Gustducin. Gustducin ist ein mit Transducin verwandtes G-Protein, das durch bittere Verbindungen aktiviert wird (Montmayeur und Matsunami 2002). Jede Geschmackzelle kann eine Reihe von T2R Rezeptoren gleichzeitig exprimieren, was eine Unterscheidung von verschiedenen Bitterstoffen kaum ermöglicht. Das Erlebnis des Schmeckens ist mit der Zunge und der Nasen-Rachenraum verbunden. Die Topographie der Geschmacksrezeptoren ist aber nicht nur auf dieses Areal beschränkt. Bitterstoffrezeptoren außer der Zunge und der Nasenschleimhaut auch in der gastrointestinalen Trakt entdeckt, speziell auf enteroendokrinen Zelllinien (Wu et al., 2002). Die intestinale Zelllinie, STC-1, reagierte dosisabhängig mit Calciumeinstrom auf die Stimulation mit Bitterstoffen. Auch im Pankreas wurde Gustducin gefunden, was eine chemosensorische Kontrolle von der Sekretion im Pankreas vermuten lässt (Höfer und Drenckhahn 1998). T2R Rezeptoren wurden bei Ratten in verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes gefunden. Insbesondere wurden Expressionssignale der Bitterstoffrezeptorsubtypen im Antrum und Fundus im Magen, sowie im Duodenum gefunden. Auch in der cDNA Bibliothek von endokrinen Zellen des Magens wurden Signale von T2R Rezeptoren nachgewiesen. Jedoch wurden keine Bitterstoffrezeptoren auf der intestinalen epithelialen Zelllinie der Ratte IEC-6 gefunden (Wu et al., 2002). Die Präsenz von Bitterstoffrezeptoren auf EC Zellen ist nicht eindeutig geklärt bisher. Die Affymetrix Genexpressionsanalyse von EC Zellen zeigte keine hohe Expression von dem, zu der T2R Rezeptoren gehörige *second messenger* Gustducin (Daten wurden nicht gezeigt). Der Präsenz von Gustducin und T2R Rezeptoren auf EC Zellen soll daher mit anderen Untersuchungsmethoden nachgeprüft werden.

Um die Funktionalität dieser Rezeptoren nachzuweisen, wurden BON Zellen mit verschiedenen Bitterstoffen inkubiert. BON Zellen reagierten mit vermehrten Serotoninfreisetzung auf die Präsenz von den Bitterstoffen wie Denatonium Benzoat, Chloroquin, Phenylthiocarbamid, Nikotin und Koffein. Ähnliches wurde auch bei anderen endokrinen Zelllinien gefunden (Wu et al., 2002).

Prinzipiell ist es nicht ausgeschlossen, dass olfaktorische Rezeptoren nicht nur auf das Riechen und Schmecken typische Areale, wie Nasen-Rachenraum und Zunge,

beschränkt sind, beispielsweise wurden olfaktorische Rezeptoren, außer der Nasenschleimhaut, auch bei Spermien gefunden (Thomas et al., 1996; Vanderhaeghen et al., 1997; Walensky et al., 1998). Möglicherweise können daher EC Zellen die Zusammensetzung des Chymus analysieren, ähnlich wie andere epitheliale Sensoren in den Atemwegen und im Blutkreislauf. Diese Rezeptoren könnten dem Organismus helfen potentiell toxische Substanzen zu erkennen und rechtzeitig zu eliminieren. (Glendinning et al., 1999).

Die Affymetrix GenChip zeigte, dass EC Zellen eine Gruppe von olfaktorischen Rezeptoren und Pheromonrezeptoren exprimieren. Diese Familie von Rezeptoren weist eine hohe Strukturähnlichkeit auf, daher ist es wahrscheinlich, dass nicht alle der gefundenen Rezeptoren tatsächlich von EC Zellen exprimiert werden. Welche dieser Rezeptoren eine Bedeutung für EC Zellen hat, wurde mit RT-PCR untersucht. Olfaktorische Rezeptoren wurden in dieser Arbeit auch durch RT-PCR sowohl auf EC Zellen als auch auf BON Zellen nachgewiesen. Die dafür verwendete Primer wurden speziesübergreifend mit degenerierten Oligonucleotiden für die konservierte Regionen der dritten und der siebten Transmembrandomänen der olfaktorischen Rezeptoren entwickelt (Vanderhaeghen et al., 1997). Die Sequenzierung dieses Gens ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Maus olfaktorischen Rezeptor MOR186-1. Ein Sequenzvergleich zwischen dieser und der T2R Rezeptor ergab keine Übereinstimmung. Dieser für den Darm neu entdeckte olfaktorische Rezeptor gehört also nicht zu den Bitterstoffrezeptoren, scheint jedoch den vorherrschenden Chemorezeptortyp auf EC Zellen darzustellen.

Es werden noch weitere Untersuchungen notwendig um die Funktion dieser Rezeptoren auf EC Zellen aufzuklären. Eine der wichtigsten Fragen dabei wäre, welche Stoffe an diesem Rezeptor binden können? Um diese Frage beantworten zu können, könnte eine Fluoreszenz-gesteuerte Ligandenanalyse durchgeführt werden. Mit geeigneten Liganden wäre es vielleicht möglich, die Regulation der Serotoninfreisetzung durch die olfaktorischen Rezeptoren zu modifizieren, ohne dabei anderen Organsystemen zu schaden.

#### 4. Weitere bisher unentdeckte Genprodukte auf den EC Zellen

Außer den olfaktorischen Rezeptoren wurden weitere Rezeptoren gefunden, welche bisher noch nicht mit EC Zellen in Verbindung gebracht wurden. Beispielsweise wurden durch die Affymetrix GenChip Analyse Glutamatrezeptoren gefunden. Glutamatrezeptoren sind bisher hauptsächlich im Zentralnervensystem bekannt, wo sie sich in erregenden Synapsen beteiligen, wobei unterschiedliche Subtypen verschiedene Funktionen erfüllen (Cull-Candy et al., 2001) Die Funktion dieser Rezeptoren im Darm oder in EC Zellen ist unklar, möglicherweise sind Glutamatrezeptoren in die Serotoninfreisetzung nach neuronaler Stimulation involviert.

Ähnlich wurde Vasopressin und sein Rezeptor in EC Zellen mehr exprimiert als in Mucosazellen. Vasopressin ist ein starker Vasokonstriktor in dem Jejunum von Ratten, wirkt proliferativ bei Schleimhautzelllinien und wurde schon in früheren Studien im gastrointestinalen Trakt in Nervenfasern und in enteroendokrinen Zellen gefunden (Sanchez-Franco et al., 1986; Chiu et al., 2002). Die Präsenz von Vasopressin und dessen Rezeptor auf EC Zellen könnte darauf hindeuten, dass EC Zellen eine wichtige Rolle bei der Motilität via Vasopressin V1 Rezeptoren auf glatte Muskelzellen spielen könnten, sowie in der Resorption von Elektrolyten und Wasser im Darm.

Weiterhin wurde der  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängige Neurotransmittertransporter (el Mestikawy et al., 1994) in erhöhter Expression in der EC Zellpräparation gefunden. Gegebenenfalls könnte dieser Transporter in der Serotoninaufnahme der Zellen eine Rolle spielen. Untersuchungen deuten nämlich darauf hin, dass Tiere, welche die Serotoninwiederaufnahmetransporter (SERT) nicht besitzen, dennoch die Möglichkeit haben Serotonin aus der Umgebung aufzunehmen (Chen et al., 2001) Die Ergebnisse aus der Genchip Analyse deuten darauf hin, dass die SERT nicht von EC Zellen exprimiert wird.

Ergebnisse von dem Affymetrix GeneChip zeigten die Expression von L-Typ dihydropyridine sensitiv Calciumkanäle. Die L-Typ Calciumkanäle wurden bereits in

früheren Arbeiten durch immunohistochemische und pharmakologische Methoden gezeigt (Racke und Schwörer 1993; Lomax et al., 1999). Ähnlich wurden L-Typ Calciumkanäle auch bei ECL Zellen gefunden (Bufler et al., 1998; Zanner et al., 2002) und sind auch bei anderen endokrinen Zellen bekannt. Vermutlich wird in EC Zellen, wie bei anderen neuroendokrinen Zellen auch, die exocytotische Freisetzung von Transmittern durch diese Calciumkanäle geregelt (Schlegel und Mollard 1995). Interessanterweise, und vorher nicht beschrieben, sind mehrere Kaliumkanal Typen bei den EC Zellen vermehrt exprimiert als in der Mucosa. Diese Kanäle könnten bei der Erhaltung der Membranpotential eine Rolle spielen ähnlich zu den Beobachtungen in ECL Zellen (Loo et al., 1996). Der SUR1 Untereinheit beispielsweise, welche bei den EC Zellen vermehrt gebildet wird spielt eine prominente Rolle in der Regelung der Insulinfreisetzung in Inselzellen der Pankreas. Weiterhin wurden zwei Typen von Calcium aktivierte Kaliumkanäle gefunden, welche wichtige Funktionen in der Exocytose bei verschiedenen Zelltypen erfüllen.

Die detektierten Chloridkanäle wurden bei EC Zellen bisher auch nicht beschrieben worden. Diese Kanäle, wie ClC-2, CLC-5 and -7 Kanäle könnten bei Sekretionsvorgängen eine Rolle spielen.

Insgesamt ist die hohe Anzahl von exprimierten von Ionenkanälen, wie in dieser Arbeit gefunden wurde, ist eine typische Eigenschaft von Neuronen oder für hochspezialisierte endokrine Zellen.

Verschiedene Exocytoseproteine wurden in der DG Fraktion mit erhöhter Genexpression gefunden. Unter diesen wurde SNAP-23 und SNAP25B nicht aber SNAP-25A als vorherrschende Splicevarianten gefunden. Dagegen ist bei ECL Zellen der exprimierte Splicevariante die SNAP-25A. Die erhöhte Expression von SNAP-25 bestätigt auch die Ergebnisse aus den Immunfärbungen. Weitere wichtige Komponenten der Exocytoseapparates, wie Synaptogamine und Syntaxine wurden auch erhöht bei den EC Zellen gefunden. Diese Proteine wurden bislang nicht mit EC Zellen in Verbindung gebracht.

Interessanterweise zeigte die Genchip Daten die Expression von mehreren Adhensionsmolekülen, wie Lectine, Protocadherine, und Integrine. Diese Moleküle wurden noch nie mit EC Zellen in Verbindung gebracht, spielen aber eine prominente Rolle bei der Carcinogenese. Protocadherine beispielsweise induzieren eine



Kontakthemmung in humanen Tumorzelllinien aus dem Colon (Okazaki et al., 2002). Die Bedeutung von NCAM (*neural cell adhesion molecule*) in der Tumorentwicklung ist bereits bekannt in mehreren endokrinen Zelltypen. Weiterhin, Integrine spielen eine Rolle in der Embryonalentwicklung und Wundheilung, aber auch während der Tumorprogression. Somit könnten diese Moleküle auch von Bedeutung sein in der Entwicklung von EC Zellen Karzinoide.

Immunohistochemische Studien zeigten, dass EC Zellen außer Serotonin auch verschiedene Peptide enthalten, darunter Substanz P und Chromogranin A (Heitz et al., 1976; Cetin et al., 1989). Anhand der Genchip Daten scheinen die EC Zellen eine wesentliche Quelle für Secretogranin II darzustellen. Sekretogranin II wird im Darm in Sekretoneurin umgewandelt und spielt eine Rolle als Vermittler zum Immunsystem indem es die Migration von Monozyten und Leukozyten stimuliert (Schurmann et al., 1995). Sekretoneurin wurde in früheren Studien in den Somatostatin bildenden D-Zellen lokalisiert.

Ein anderes Peptid das in EC Zellen vorhanden scheint ist das ANP und sein Rezeptor. Möglicherweise ist ANP in Wasser- und Elektrolytentransport in der Schleimhaut beteiligt.

Schließlich wurde eine höhere Expression für Adrenomedullin beobachtet in der EC Zellen Präparation. Dieses Peptid wurde auch schon früher in Subpopulationen von EC Zellen gefunden (Mulder et al., 1996). Die mögliche klinische Relevanz von Adrenomedullin Freisetzung in Dünndarm wurde mit der polymicrobiellen Sepsis assoziiert.

Zahlreiche weitere Gene wurden mit einer erhöhten Expression in der EC Zellfraktion beobachtet, denen zur jetzigen Zeitpunkt keine bekannte Funktion zugeordnet werden konnte. Diese Gene können mögliche Ziele für zukünftige Forschung bieten, und Ideen für weitere Experimente geben.

Die Daten aus der Affymetrix GeneChip Analyse sollten nur die Präsenz von dem aufgelisteten Gene andeuten. Definitive Beweis, und funktionelle Analyse sollte durch weitere, möglicherweise durch Einzelzell, Untersuchungen bestimmt werden.

## V. Zusammenfassung

Enterochromaffine Zellen sind Serotonin produzierende Zellen im Darmepithel und regulieren die intestinale Motilität und die Sekretion von Wasser und Elektrolyten. Eine Fehlfunktion dieser Zellen spielt eine Rolle bei zahlreichen gastrointestinalen Krankheiten.

In dieser Arbeit ist es das erste Mal gelungen EC Zellen mit einer über 80%-igen Reinheit zu isolieren. Die Reinheit der Dichtegradientenfraction wurde durch Immunfärbungen bestimmt. Die Immunfärbung gegen Serotonin ergab einen Anteil von über 84% positiv gefärbter Zellen in der EC Zellfraktion. Diese Zellfraktion setzte auch 7mal mehr Serotonin frei als die unfraktionierten Mucosazellen. Um die gewonnenen Daten der Anreicherung zu verifizieren, wurde eine quantitative TaqMan PCR durchgeführt. Untersucht wurden das Markergen, VMAT-1 und der GABA-A Rezeptor. In beiden Fällen wurde die erhöhte Expression der Gene in der EC Zellen Präparation bestätigt.

Verschiedene Rezeptoren, wie alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren, muscarinische Acetylcholinrezeptoren und der GABA-A Rezeptor wurden mit RT-PCR und Immunfärbung auf den EC Zellen gefunden. Um die physiologische Rolle dieser Rezeptoren zu untersuchen, wurden Stimulationsexperimente mit frisch isolierten Zellen vorgenommen. Noradrenalin, und zu einem geringeren Maße Acetylcholin erhöhten die Serotoninfreisetzung aus den EC Zellen, GABA beeinflusste die Freisetzung von Serotonin nicht. Ebenfalls wurde die serotoninproduzierende Tumorzelllinie BON untersucht. BON Zellen zeigten ein ähnliches Stimulationsverhalten wie EC Zellen. Auch diese Zellen zeigten eine erhöhte Serotoninfreisetzung nach Stimulation mit Noradrenalin und Acetylcholin. GABA zeigte ebenso kein Effekt auf die Serotoninfreisetzung aus BON Zellen. Die Freisetzung konnte mit Cromoglycinsäure weder in BON Zellen noch in EC Zellen gehemmt werden.

Die Genexpressionsanalyse dieser Zellen zeigte die Präsenz von Rezeptoren, Ionenkanälen, Wachstumsfaktoren, Exocytoseproteinen, Adhäsionsmolekülen und

zahlreichen regulatorischen Peptiden und Proteinen auf EC Zellen, die bisher nicht mit diesem Zelltyp in Verbindung gebracht wurden. Von besonderer Bedeutung war dabei die Expression von olfaktorischen Rezeptoren auf EC Zellen. Aus der großen Gruppe von olfaktorischen Rezeptoren ist es gelungen einen bisher unbekanntem Rezeptor zu identifizieren, welcher eine Homologie zu dem Maus olfaktorischen Rezeptor MOR186-1 aufweist und wird bei EC Zellen und BON Zellen exprimiert. Dieser Rezeptor zeigt keine Homologie zu der Familie der Bitterstoffrezeptoren (T2R). BON Zellen setzen jedoch vermehrt Serotonin frei wenn sie mit Bitterstoffen stimuliert werden. Da neuroendokrine Zellen gewöhnlich nur wenige Rezeptortypen exprimieren, könnte die Funktion dieses Rezeptors darin bestehen potentiell toxische Substanzen zu erkennen und durch eine starke Serotoninfreisetzung zu der frühzeitigen Eliminierung beizutragen.

Das EC Zellen Modell, das in dieser Arbeit beschrieben wurde, eröffnet neue Perspektiven die physiologische Funktion dieses Zelltyps besser zu verstehen und Substanzen zu finden, die bei Erkrankungen des Magen-Darm Traktes gezielter eingesetzt werden können.

## VI. Literaturverzeichnis

- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJP, Zucker CS. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702
- Alumets J, Hakanson R, Sundler F, Chang K-J. (1978) Leu-Enkephalin-like material in nerves and enterochromaffin cells in the gut. *Histochemistry* 56: 187-196
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science* 281:1305-1308
- Barnes NM, Ge J, Jones WG, Naylor RJ, Rudd JA. (1990) Cisplatin induced emesis: preliminary results indicative of changes in plasma levels of 5-hydroxytryptamine. *Br J Cancer* 62:862-864
- Baumgarten HG, Grozdanovic Z. (1997) Anatomy of central serotonergic projection system. In *Handbook of Exptl Pharmacol* 129:41-90
- Birbaumer N, Schmidt RF. (1996) Geschmack und Geruch, In: *Biologische Psychologie*, 3. Auflage: 435-449, *Springer Verlag*
- Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. (1994) Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* 196:263-281
- Blein S, Hawrot E, Barlow P. (2000) The metabotropic GABA receptor: molecular insights and their functional consequences. *Cell Mol Life Sci* 57:635-65
- Borman RA, Burleigh DE. (1996) Human colonic mucosa possesses a mixed population of 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 309:271-274
- Bowery NG, Enna SJ. (2000) Gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther* 292:2-7

- Briejer MR, Akkemans LMA, Schuurkes JAJ. (1995) Gastrointestinal prokinetic benzamides: the pharmacology underlying stimulation of motility. *Pharmacol Rev* 47:631-635
- Briejer MR, Schuurkes JAJ. (1996) 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors and cholinergic and tachykininergic neurotransmission in the guinea-pig proximal colon. *Eur J Pharmacol* 308:173-180
- Bufler J, Choi GC, Franke C, Schepp W, Prinz C. (1998) Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Am J Physiol* 274:424-429
- Camilleri M, Northcutt AR, Kong S, Dukes G, McSorley D, Mangel AW. (2000) Efficacy and safety of alosetron in women with irritable bowel syndrome: a randomized, placebo controlled trial. *Lancet* 355:1035-1040
- Cetin Y, Muller-Koppel L, Aunis D, Bader MF, Grube D. (1989) Chromogranin A (CgA) in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system. II. CgA in mammalian entero-endocrine cells. *Histochemistry* 92:265-275
- Cetin Y, Kuhn M, Kulaksiz H, Adermann K, Bargsten G, Grube D, Forssmann WG. (1994) Enterochromaffin cells of the digestive system: cellular source of guanylin, a guanylate cyclase-activating peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2935-2939
- Chen J-X, Pan H, Rothman TP, Wade PR, Gershon MD. (1998) Guinea pig 5-HT transporter: cloning, expression, distribution and function in intestinal sensory reception. *Am J Physiol* 275:G433-G448
- Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy DL, Tamir H, Koepsell H, Gershon MD. (2001) Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and expression of cation transporters. *J Neurosci* 21:6348-6361

- Chiu T, Wu SS, Santiskulvong C, Tangkijvanich P, Yee H, Rozengurt E. (2002) Vasopressin-mediated mitogenic signalling in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:434-450
- Cooke HJ, Sidhu M, Wang Y-Z. (1997) 5-HT activates neural reflexes regulating secretion in the guinea-pig colon. *Neurogastroenterol Motil* 9:181-186
- Craeto C, Singer MS, Shepherd GM. (2001) The olfactory receptor album. *Genome Biol* 2:reviews1027
- Cubeddu LX, Hoffmann IS, Fuenmayor NT, Malave JJ. (1992) Changes in serotonin metabolism in cancer patients: its relationship to nausea and vomiting induced by chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer* 66:198-203
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335
- Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. (1992) Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:947-951
- Dey RD, Hoffpauir J. (1984) Ultrastructural immunocytochemical localization of 5-hydroxytryptamine in gastric enterochromaffin cells. *J Histochem Cytochem* 32:661-666
- Erspamer, V. (1966) Occurrence of indolealkylamines in nature. In *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie* (Eichler, O and Farah, A., eds), pp. 132-181, Springer Verlag, Berlin, Deutschland
- Evans GS, Flint N, Somers AS, Eyden B, Potten CS. (1992) The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci* 101:219-231

- Evans GS, Flint N, Potten CS. (1994) Primary cultures for studies of cell regulation and physiology in intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 56:399-417
- Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Thompson JC. (1994) The human carcinoid cell line, BON. A Modell system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci* 733: 393-406
- Farthing, MJG. (2002) Novel targets for the control of secretory diarrhoea. *Gut* 50(Suppl. III)15-18
- Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, Gershon MD. (2002) 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282:G877-G893
- Firestein S, Picco C, Menini A. (1993) The relation between stimulus and response in olfactory receptor cells of the tiger salamander. *J Physiol (Lond)* 468:1-10
- Forte LR, Currie MG. (1995) Guanylin: peptide regulator of epithelial transport. *FASEB J* 9:643-650
- Fujimiya M, Okumiya K, Kuwahara A. (1997) Immunoelectron microscopic study of the luminal release of serotonin from rat enterochromaffin cells induced by high intraluminal pressure. *Histochem Cell Biol* 108:105-113
- Gebauer A, Merger M, Kilbinger H. (1993) Modulation by 5-HT3 and 5-HT4 receptors of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea-pig small intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 347:137-140
- Gerhard M, Neumayer N, Presecan-Siedel E, Zanner R, Lengyel E, Cramer T, Hocker M, Prinz C. (2001) Gastrin induces expression and promoter activity of the vesicle monoamine transporter subtype 2. *Endocrinology* 142:3663-3672
- Gershon, MD. (1999) Review article: roles played by 5-hydroxytryptamine in the physiology of the bowel. *Aliment Pharmacol Ther Suppl* 2:15-30

- Grider JR, Kuemmerle JF, Jin JG. (1996) 5-HT released by mucosal stimuli initiates peristalsis activating 5-HT<sub>4</sub>/5-HT<sub>1p</sub> receptors on sensory CGRP neurons. *Am J Physiol* 270:G778-G782
- Glendinning JI, Tarre M, Asaoka K. (1999) Contribution of different bitter-sensitive taste cells to feeding inhibition in a caterpillar (*Manduca sexta*). *Behav Neurosci* 113:840-854
- Grondahl ML, Jensen GM, Nielsen CG, Skadhauge E, Olsen JE, Hansen MB. (1998) Secretory pathways in *Salmonella Typhimurium*-induced fluid accumulation in the porcine small intestine. *J Med Microbiol* 47:151-157
- Hansen MB, Skadhauge E. (1995) New aspects of the pathophysiology and treatment of secretory diarrhoea. *Physiol Res* 44:61-78
- Hardcastle J, Hardcastle PT, Redfern JS. (1981) Action of 5-hydroxytryptamine on intestinal ion transport in the rat. *J Physiol* 320:41-55
- Harrington CA, Rosenow C, Retief J. (2000) Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 3:285-291
- Heitz P, Polak JM, Timson DM, Pearse AG. (1976) Enterochromaffin cells as the endocrine source of gastrointestinal substance P. *Histochemistry* 49: 343-347
- Höfer D, Drenckhahn D. (1998) Identifikation of the taste cell G-Protein,  $\alpha$ -gustducin, in brush cells of the pancreatic duct system. *Histochem Cell Biol* 110:303-309
- Höltje M, von Jagow B, Pahner I, Lautenschlager M, Hortnagl H, Nürberg B, Jahn R, Ahnert-Hilger G. (2000) The neuronal monoamine transporter VMAT2 is regulated by the trimeric GTPase Go(2). *J Neurosci* 20:2131-2141
- Hollerbach S, Eisenbruch S, Enck P. (2001) Reizdarmsyndrom als interdisziplinäre klinische Herausforderung. *Dtsch Med Wschr* 126:472-478



- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 46:157-203
- Humphrey PPA, Bountra C, Clayton N, Kozlowski K. (1999) The therapeutic potential of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists in treatment of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 13:77-82
- Hüther G, Rüther E. (2000) Das serotonerge System. *UNI-MED Verlag AG*, Bremen, Deutschland
- Jingami H, Nakanishi S, Morikawa K. (2003) Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Curr Opin Neurobiol* 13:271-278
- Kim M, Javed NM, Yu JG, Christofi F, Cooke HJ. (2001) Mechanical stimulation activates G<sub>αq</sub> signaling pathways and 5-hydroxytryptamine release from human carcinoid BON cells. *J Clin Invest* 108:1051-1059
- Kellum JM, Albuquerque FC, Stoner MC, Harris RP. (1999) 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* 277:G515-G520.
- Kesselring J, von Hippel C. (2001) Symptomatische Therapie der Multiplen Sklerose. *Schweiz Med Forum* 42:1051-1056
- Kojima S, Ikeda M. (1998) Facilitation by endogenous acetylcholine and nitric oxide of luminal serotonin release from the guinea pig colon. *Eur J Pharmacol* 355:51-55
- Koutsoviti-Papadopoulou M, Nikolaidis E, Kouneis G. (2001) Biphenylacetic acid enhances the antagonistic action of fluoroquinolones on the GABA(A)-mediated responses of the isolated guinea pig ileum. *Pharmacol Res* 44:229-233

- Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, Kaestner KH. (2002) Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16:1488-1497
- Lehmann A, Antonsson M, Bremner-Danielsen M, Flårdh M, Hansson-Bränden L, Kärrberg L (1999) Activation of the GABA<sub>B</sub> receptor inhibits transient lower esophageal sphincter relaxations in dogs. *Gastroenterology* 117:1147-1154
- Lemmer K, Ahnert-Hilger G, Höpfner M, Hoegerle S, Faiss S, Grabowski P, Jockers-Scherübl M, Riecken EO, Zeitz M, Scherübl H. (2002) Expression of dopamine receptors and transporter in neuroendocrine gastrointestinal tumor cells. *Life Sci* 71:667-678
- Li X, Wu XY, Zhu JX, Owyang C (2001) Intestinal serotonin acts as paracrine substance to mediate pancreatic secretion stimulated by luminal factors. *Am J Physiol* 281:G916-923
- Liu I, Peter D, Roghani A, Schuldiner S, Prive GG, Eisenberg D, Brecha N, Edwards RH. (1992) A cDNA that suppresses the MPP<sup>+</sup> toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70:539-551
- Liu I, Schweitzer E, Nirenberg MJ, Pickel VM, Evans CJ, Edwards RH.(1994) Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells. *J Cell Biol* 127:1419-1433
- Lomax RB, Gallego S, Novalbos J, Garcia AG, Warhurst G. (1999) L-Type calcium channels in enterochromaffin cells from guinea pig and human duodenal crypts: an in situ study. *Gastroenterology* 117:1363-1369
- Loo DD, Sachs G, Prinz C. (1996) Potassium and chloride currents in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Am J Physiol* 270:739-745
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96:713-723

- el Mestikawy S, Giros B, Pohl M, Hamon M, Kingsmore SF, Seldin MF, Caron MG. (1994) Characterization of an atypical member of the Na<sup>+</sup> /Cl<sup>-</sup> - dependent transporter family: chromosomal localization and distribution in GABAergic and glutamatergic neurons in the rat brain. *J Neurochem* 62:445-455
- Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA, Dent J. (1995) Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* 109:601-610
- Montmayeur JP, Matsunami H. (2002) Receptors for bitter and sweet taste. *Curr Opin Neurobiol* 12:366-371
- Mulder H, Ahren B, Karlsson S, Sundler F. (1996) Adrenomedullin: localization in the gastrointestinal tract and effects on insulin secretion. *Regul Pept* 62:107-112
- Nakajima K, Tooyama I, Kuriyama K, Kimura H. (1996) Immunohistochemical demonstration of GABA B receptors in the rat gastrointestinal tract. *Neurochem Res* 21:211-215.
- Okazaki N, Takahashi N, Kojima S, Masuho Y, Koga H. (2002) Protocadherin LKC, a new candidate for a tumor suppressor of colon and liver cancers, its association with contact inhibition of cell proliferation. *Carcinogenesis* 23:1139-1148
- Page, IH. (1976) The discovery of serotonin. *Perspect Biol Med* 20:1-8
- Pauwels, PJ. (2000) Diverse signalling by 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors. *Biochem Pharmacol* 60:1743-1750
- Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH. (1995) Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *J Neurosci* 15:6179-6188
- Peterson JW, Cantu J, Duncan S, Chopra AK. (1993) Molecular mediators formed in the small intestine in response to cholera toxin. *J Diarrhoeal Dis Res* 11:227-234

- Pletscher, A.(1968) Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Br J Pharmacol* 32:1-16
- Podolsky DK. (1993) Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am J Physiol* 264:G179-G186
- Polak JM, Pearse AGE, Heath CM. (1975) Complete identification of endocrine cells in the gastrointestinal tract using semithin-thin sections to identify motilin cells in human and animal intestine. *Gut* 16:225-229
- Portela-Gomes GM, Grimelius L, Bergstrom R. (1984) Enterochromaffin (Argentaffin) cells of the rat gastrointestinal tract. An ultrastructural study. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 92:83-89
- Prins NH, Briejer MR, Schuurkes JA. (1997) Characterization of the contraction to 5-HT in the canine colon longitudinal muscle. *Br J Pharmacol* 120:714-720
- Prins NH, Briejer MR, Van Bergen PJ, Akkermans LM, Schuurkes JA. (1999) Evidence for 5-HT<sub>7</sub> receptors mediating relaxation of human colonic circular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 128:849-852
- Prinz C, Kajimura M, Scott DR, Mercier F, Helander HF, Sachs G. (1993) Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology* 105:449-461
- Prinz C, Sachs G, Walsh JH, Coy DH, Wu SV. (1994) The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology* 107:1067-1074
- Prinz C, Zanner R, Gerhard M, Mahr S, Neumayer N, Hohne-Zell B, Gratzl M. (1999) The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am J Physiol* 277:C845-C855.
- Racke K, Schwörer H, Kilbinger H. (1988) Adrenergic modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the vascularly perfused ileum of the guinea pig. *Br J Pharmacol* 95:923-931

- Racke K, Schwörer H. (1991) Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. *Pharmacol Res* 21:13-25
- Racke K, Schwörer H. (1993) 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* 347:1-8
- Racke K, Reimann A, Schwörer H, Kilbinger H. (1996) Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behav Brain Res* 73:83-87
- Rapport, MM. (1997) The discovery of serotonin. *Perspect Biol Med* 40:260-273
- Rehfeld, FJ. (1998) The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol Rev* 1087-1108
- Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73:597-609
- Sachs G, Zeng N, Prinz C. (1997) Physiology of isolated gastric endocrine cells. *Annu Rev Physiol* 59:243-256
- Sanchez-Franco F, Cacicedo L, Vasallo JL, Blazquez JM, Munoz BL. (1986) Arginine-vasopressin immunoreactive material in the gastrointestinal tract. *Histochemistry* 85:419-422
- Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. (1996) P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest* 97:2517-2524
- Schlegel W, Mollard P. (1995) Electrical activity and stimulus secretion in neuroendocrine cells. In: The electrophysiology of neuroendocrine cells. Boca Raton, FL: CRC: 23-28

- Schurmann G, Bishop AE, Facer P, Eder U, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Polak JM. (1995) Secretoneurin: a new peptide in the human enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* 104:11-19
- Schworer H, Racke K, Kilbinger H. (1987) Cholinergic modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the guinea pig ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:127-132
- Schworer H, Racke K, Kilbinger H. (1989) GABA receptors are involved in the modulation of the release of 5-hydroxytryptamine from the vascularly perfused small intestine of guinea pig. *Eur J Pharmacol* 165:29-37
- Schworer H, Racke K, Kilbinger H. (1991) 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* 344:143-149
- Schworer H, Ramadori G. (1998) Autoreceptors can modulate 5-hydroxytryptamine release from porcine and human small intestine in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357:548-552
- Sieghart W. (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 47:181-234
- Sidhu M, Cooke HJ. (1995) Role for 5-HT and ACh in submucosal reflexes mediating colonic secretion. *Am J Physiol* 269:G346-G351
- Siriwardena AK, Smith EH, Borum EH, Kellum JMJ. (1993) Identification of a 5-hydroxytryptamine (5-HT<sub>2</sub>) receptor on guinea pig small intestinal crypt cells. *Am.J.Physiol.* 265: G339-G346
- Sjölund K, Sanden R, Hakanson R, Sundler F. (1983) Endocrine cells in human intestine: An immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85:1120-1130

- Skipper M, Lewis J. (2000) Getting to the guts of enteroendocrine differentiation. *Nat Genet* 24:3-4
- Smith AJ, Simpson PB. (2003) Methodological approaches for the study of GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology and functional responses. *Anal Bioanal Chem* 377:843-851
- Spanier JA, Howden CW, Jones MP (2003) A systematic review of alternative therapies in the irritable bowel syndrome. *Arch Intern Med* 163:265-274
- Spiller, RC. (2001) Effects of serotonin on intestinal secretion and motility. *Curr Opin Gastroenterol* 17:99-103
- Somerville, BW. (1976) Platelet-bound and free serotonin levels in jugular and forearm venous blood during migraine. *Neurology* 26:41-45
- Talley, NJ. (2001)<sup>1</sup> Serotonergic neuroenteric modulators *Lancet* 358:2061-2068
- Talley, NJ. (2001)<sup>2</sup> Drug therapy options for patients with irritable bowel syndrome. *Am J Manag Care* 7:S261-S267
- Talley NJ, Spiller R. (2002) Irritable bowel syndrome: a little understood organic bowel disease? *Lancet* 360:555-564
- Tam FS, Hillier K, Bunce KT, Grossmann C. (1995) Differences in response to 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists and antagonists of the 5-HT<sub>4</sub>-like receptor in human colon circular smooth muscle. *Br J Pharmacol* 115:172-176
- Thomas MB, Haines SL, Akeson RA. (1996) Chemoreceptors expressed in taste, olfactory and male reproductive tissues. *Gene* 178:1-5
- Turvill JL, Farthing MJG. (1997) Effect of granisetron on cholera toxin-induced enteric secretion. *Lancet* 349:1293

- Vanderhaeghen P, Schurmans S, Vassart G, Parmentier M. (1997) Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics* 39:239-246
- Viner CV, Selby PJ, Zulian GB, Gore ME, Butcher ME, Wootton CM, McElwain TJ. (1990) Ondansetron-a new safe and effective antiemetic in patients receiving high-dose melphalan. *Cancer Chemother Pharmacol* 25:449-453
- Waeber C, Hoyer D, Palacios JM. (1989) 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub>-receptors in the human brain: autoradiographic visualization using [3H]ICS 205-930. *Neuroscience* 31:393-400
- Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. (1996) Localisation and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 16:2352-2364
- Walensky LD, Ruat M, Bakin RE, Blackshaw S, Ronett GV, Snyder SH. (1998) Two novel odorant receptor families expressed in spermatids undergo 5'-splicing. *J Biol Chem* 273:9378-9387
- Weihe E, Eiden LE. (2000) Chemical neuroanatomy of the vesicular amine transporters. *FASEB J* 14:2435-2449
- Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, Rozengurt E. (2002) Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *PNAS* 99:2392-2397
- Zanner R, Hapfelmeier G, Gratzl M, Prinz C (2002) Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:374-382



Zhu JX, Wu XY, Owyang C, Li Y (2001) Intestinal serotonin acts as a paracrine substance to mediate vagal signal transmission evoked by luminal factors in the rat. *J Physiol* 530:431-442

---

Die experimentellen Arbeiten zu der hier vorliegenden Dissertation wurden am Klinikum Rechts der Isar in München von Januar 2000 bis Juni 2003 durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. A. Bacher für die Bereitschaft zur Vertretung der Dissertation. Prof. M. Gratzl und Prof. C. Prinz für die hilfreiche Diskussionen im Labor und im Graduiertenkolleg und für die fachliche und menschliche Unterstützung die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Der Laborgemeinschaft: R. Zanner, P. Randlkofer, B. Rössner, M. Neuhofer, Dr. P. Voland, N. Neumayer, , R. Rad, A. Dossumbekova, und P. Körner für die gute Zusammenarbeit und für die vielen Hilfestellungen im Laboralltag. N. Hafsi, V. Stenset und M. Zeitner für die gute Gesellschaft.

Schließlich sei der Deutschen Forschungsgemeinschaft insbesondere dem Graduiertenkolleg 333 für die Förderung der Arbeit gedankt.