



universität  
wien

# MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss phenolischer Verbindungen auf  
Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung in kultivierten  
Enterozyten“

verfasst von

Julia Katharina Hoi, BSc

angestrebter akademischer Grad  
Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt: Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von: Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza



## **Danksagung**

Der experimentelle Teil zu der hier vorliegenden Masterarbeit wurde zwischen Jänner und Juni 2015 am Institut für Ernährungsphysiologie und Physiologische Chemie unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu forschen, sowie für ihre Unterstützung und hilfreichen Diskussionen herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Barbara Lieder, die mir mit zahlreichen Hilfestellungen, wertvollen Tipps und Denkanstößen zur Seite stand. Vielen Dank, dass ich mit Problemen und Fragen zu dir kommen konnte und dass du dir auch aus der Ferne immer Zeit für meine Anliegen genommen hast.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die vielen interessanten Gespräche und das nette Arbeitsklima bedanken.

Ich danke allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz besonders aber meiner Familie, auf die ich während meines Studiums und meiner Masterarbeit immer zählen konnte. Danke!



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Phenolische Verbindungen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Homoeriodictyol .....	3
2.1.2 Phloretin und Phlorizin .....	6
<b>2.2 Caco-2-Modell .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3 Glukoseabsorption .....</b>	<b>10</b>
<b>2.4 Serotonin .....</b>	<b>13</b>
2.4.1 Serotonininsynthese und –freisetzung.....	14
2.4.2 Serotonin und Sättigung .....	20
2.4.3 Zusammenhang zwischen Glukosemetabolismus und peripherem Serotonin .....	25
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Geräte .....	27
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	28
<b>3.2 Zellkultur .....</b>	<b>31</b>
3.2.1 Auftauen der Zellen .....	31
3.2.2 Passagieren und Ausstreuen der Zellen .....	32
<b>3.3 Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.3.1 MTT-Test .....	32
3.3.2 Mykoplasmen-Test .....	34
3.3.3 Analyse der zellulären Glukoseaufnahme .....	36
3.3.4 Untersuchung der <i>SGLT1</i> und <i>GLUT2</i> Expression .....	37
3.3.4.1 Inkubation und RNA-Isolierung .....	37
3.3.4.2 Reverse Transkription .....	39
3.3.4.3 Genexpression mittels quantitativer Real Time PCR .....	40

3.3.5 Serotoninfreisetzung .....	42
3.3.5.1 Stimulierung der Serotoninfreisetzung .....	42
3.3.5.2 Bestimmung der Serotonininkonzentration .....	43
3.3.5.3 Bestimmung des DNA-Gehalts .....	45
3.3.6 Statistische Auswertung .....	45
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 MTT-Tests .....</b>	<b>47</b>
<b>4.2 Analyse der zellulären Glukoseaufnahme .....</b>	<b>52</b>
4.2.1 Einfluss von NaHED, Phlorizin und Phloretin auf die Glukoseaufnahme ....	52
4.2.2 Ermittlung der beteiligten Glukosetransporter .....	55
4.2.2.1 Natriumabhängiger Glukosetransporter 1 (SGLT1) .....	55
4.2.2.2 Glukosetransporter 2 (GLUT2) .....	57
<b>4.3 Einfluss der phenolischen Verbindungen auf die Genexpressionslevel der Glukosetransporter .....</b>	<b>58</b>
4.3.1 Natriumabhängiger Glukosetransporter 1 ( <i>SGLT1</i> ).....	58
4.3.2 Glukosetransporter 2 ( <i>GLUT2</i> ) .....	61
<b>4.4 Einfluss von NaHED auf die Serotoninausschüttung .....</b>	<b>63</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Einfluss des NaHED auf die Glukoseabsorption .....</b>	<b>65</b>
<b>5.2 NaHED-vermittelter Glukoseaufnahmeweg .....</b>	<b>66</b>
<b>5.3 Einfluss von NaHED auf die Expressionsebene der Glukosetransporter.....</b>	<b>69</b>
<b>5.4 Zusammenhang zwischen Glukoseabsorption und Serotoninfreisetzung ....</b>	<b>70</b>
<b>5.5 Einfluss des NaHED auf die Serotoninfreisetzung .....</b>	<b>75</b>
<b>5.6 Bioverfügbarkeit . .....</b>	<b>77</b>
<b>6. Schlussbetrachtung.....</b>	<b>80</b>
<b>7. Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>85</b>

<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>102</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1a: Struktur des Homoeriodictyols .....	3
Abbildung 1b: Eriodictyon californicum .....	3
Abbildung 2: Struktur des Phloretins .....	6
Abbildung 3: Struktur des Phlorizins.....	6
Abbildung 4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Caco-2-Zelle mit Mikrovilli und Tight Junctions .....	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung des klassischen Modells der Glukoseabsorption mit apikal lokalisiertem natriumabhängigen Transporter 1 (SGLT1) und basolateral gelegenem Glukosetransporter 2 (GLUT2) .....	11
Abbildung 6: Struktur von Serotonin.....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Gehirn-Darm-Achse und des serotonergen Mechanismus .....	16
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Serotoninaufnahme über Serotonin Reuptake Transporter in intestinalen Epithelzellen .....	18
Abbildung 9: Mögliche Wege des peripheren Serotonins .....	19
Abbildung 10: 2-[ <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]- 2- Deoxyglukose ....	36
Abbildung 11: Derivatisierung des Serotonins zu N-Acetylserotonin .....	44
Abbildung 12: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer)) nach 60-minütiger Behandlung mit NaHED in Konzentrationen von 0,001 – 100 µM .....	47
Abbildung 13: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1% Ethanol)) nach 60-minütiger Behandlung mit Phlorizin in Konzentrationen von 0,5 – 500 µM .....	48
Abbildung 14: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1% DMSO)) nach 60-minütiger Behandlung mit Phloretin in Konzentrationen von 1 – 1000 µM .....	49

Abbildung 15: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % Ethanol)) nach 60-minütiger Koinkubation mit NaHED (100 µM) und Phlorizin (0,5 – 50 µM) .....	50
Abbildung 16: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % DMSO)) nach 60-minütiger Koinkubation mit NaHED (100 µM) und Phloretin (1 – 100 µM) .....	51
Abbildung 17: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung mit NaHED (0,001 – 100 µM).....	52
Abbildung 18: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % Ethanol) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung mit Phlorizin (0,5 – 500 µM) .....	54
Abbildung 19: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % DMSO) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung mit Phloretin (1 - 1000 µM).....	54
Abbildung 20a: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung mit NaHED (100 µM).....	56
Abbildung 20b: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit NaHED (100 µM) und 0,1 % Ethanol) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Koinkubation mit Phlorizin (0,5 – 50 µM) und NaHED (100 µM) .....	56
Abbildung 21a: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung mit NaHED (100 µM) .....	57
Abbildung 21b: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit NaHED (100 µM) und 0,1 % DMSO) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Koinkubation mit Phloretin (1 – 100 µM) und NaHED (100 µM) .....	57
Abbildung 22: Mittlere x-fache Änderung (bezogen auf entsprechende Lösungsmittelkontrollen ± Standardabweichung) der <i>SGLT1</i> - Genexpression nach 15-, 30- und 60-minütiger Behandlung mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phloretin (100 µM) oder Phlorizin (50 µM) .....	60

Abbildung 23: Mittlere x-fache Änderung (bezogen auf entsprechende Lösungsmittelkontrollen $\pm$ Standardabweichung) der GLUT2- Genexpression nach 15-, 30- und 60-minütiger Behandlung mit NaHED (100 $\mu$ M) mit oder ohne Zugabe von Phloretin (100 $\mu$ M) oder Phlorizin (50 $\mu$ M) .....	62
Abbildung 24: Reduktion der Serotoninausschüttung (% der Kontrolle $\pm$ SEM) nach 15 - minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (0,1 – 100 $\mu$ M) .....	63
Abbildung 25a: Hypothetische NaHED-vermittelte Glukoseaufnahme und Serotonin-ausschüttung .....	73
Abbildung 25b: Möglicher Wirkmechanismus zwischen Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung .....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen und Produktlänge der verwendeten Primer .....	30
Tabelle 2: Probenplan der MTT-Tests .....	34
Tabelle 3: Probenplan für Genexpression .....	38
Tabelle 4: Ansatz zur Herstellung des Mastermix gemäß Hersteller .....	40
Tabelle 5: Herstellung des Mastermix .....	42
Tabelle 6: Probenplan zur Untersuchung der Serotoninausschüttung .....	43
Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Zeitabhängigkeit der SGLT1-Genexpression .....	58
Tabelle 8: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED .....	102
Tabelle 9: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phlorizin .....	103
Tabelle 10: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin .....	104
Tabelle 11: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phlorizin .....	105
Tabelle 12: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phloretin .....	106
Tabelle 13: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2- Zellen mit NaHED .....	107
Tabelle 14: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2- Zellen mit Phlorizin .....	108
Tabelle 15: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2- Zellen mit Phloretin .....	109
Tabelle 16: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger gemeinsamer Behand- lung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phlorizin .....	110
Tabelle 17: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger gemeinsamer Behand- lung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phloretin .....	111
Tabelle 18: Rohdaten der GLUT2-Genexpression nach 15-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	112

Tabelle 19: Rohdaten der <i>GLUT2</i> -Genexpression nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	113
Tabelle 20: Rohdaten der <i>GLUT2</i> -Genexpression nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	114
Tabelle 21: Rohdaten der <i>SGLT1</i> -Genexpression nach 15-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	115
Tabelle 22: Rohdaten der <i>SGLT1</i> -Genexpression nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	116
Tabelle 23: Rohdaten der <i>SGLT1</i> -Genexpression nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM) .....	117
Tabelle 24: Rohdaten des Serotonin-ELISA nach 5-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (0,1-100 µM) .....	118

## **Abkürzungsverzeichnis**

2-NBDG	(2-[ <i>N</i> -(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]- 2-deoxyglukose)
5-HT	Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
AAAD	aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase
CCK	Cholecystokinin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Enterochromaffine Zellen
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	Fetales Kälberserum
GLUT2	Glukosetransporter 2
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
MTT	3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaHED	Homoeriodictyol-Natriumsalz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PT	Phloretin
PZ	Phlorizin
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SERT	Serotonintransporter
SGLT1	Natriumabhängiger Glukosetransporter 1
VMAT1	vesikulärer Monoamintransporter Typ 1



## **1. Einleitung und Fragestellung**

Homoeriodictyol, ein Flavanon des im Südwesten der USA beheimateten Santakrauts (*Eriodictyon californicum*), ist vor allem für seine gesundheitsfördernden Eigenschaften und aufgrund seiner bittermaskierenden Wirkung als Geschmacksmodulator für Lebensmittel und Pharmazeutika bekannt [Doostdar et al., 2000; Ley et al., 2005; Yao et al., 2006].

Im Zuge der vorliegenden Masterarbeit wurde nun ein weiterer Aspekt, nämlich der Einfluss des Homoeriodictyols in Form seines Natriumsalzes auf die zelluläre Glukoseaufnahme sowie die Serotoninfreisetzung im Caco-2-Zellmodell untersucht. Diese Zelllinie eignet sich auf Grund phänotypischer, morphologischer und funktioneller Ähnlichkeiten zu Enterozyten als *in vitro* Modell für die intestinale Barriere. Zum einen ging es dabei um die Fragestellung einer möglichen Einflussnahme des Natriumsalzes von Homoeriodictyol (NaHED) auf die Glukoseaufnahme im Enterozytenmodell sowie die Untersuchung des daran beteiligten Wirkmechanismus. Die Grundlage dieser Fragestellung sind Ergebnisse verschiedener Studien, die darauf hindeuten, dass einzelne Flavonoide die Glukoseaufnahme in den Darmzellen über direkte Interaktion mit Glukosetransportern beeinflussen können [z.B. Johnston et al., 2005; Chen et al., 2007; Kwon et al., 2007; Zheng et al., 2012]. Zum anderen wurde der Frage nachgegangen, ob dieses Flavanon die Freisetzung von Serotonin in den Caco-2-Zellen beeinflusst, um dann, basierend auf den gezeigten Effekten des NaHED auf Glukoseaufnahme und Serotoninausschüttung einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Systemen zu diskutieren. Wie Untersuchungen bereits belegen, zeigt zirkulierendes Serotonin nämlich auch in der peripheren Glukoseregulation komplexe Effekte auf [Sugimoto et al., 1990; Watanabe et al., 2010; Watanabe et al., 2014].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, neben der möglichen Auswirkung des NaHED auf die Glukoseaufnahme im Caco-2-Zellmodell einen potentiellen Beitrag des intestinalen natriumabhängigen Glukosetransporters 1 (SGLT1) und Glukosetransporters 2 (GLUT2) an einem Effekt auf die Glukoseaufnahme zu ermitteln. Außerdem sollten die möglichen Auswirkungen von NaHED auf die Serotoninfreisetzung in Darmzellen geklärt werden, wobei die Hypothese aufgestellt

wurde, dass es durch Behandlung mit dieser Substanz zu einer verringerten Ausschüttung von Serotonin kommt. Diese Annahme beruht auf bereits durchgeföhrten Untersuchungen, die darauf hinwiesen, dass unter dem Einfluss von Homoeriodictyol die Serotoninfreisetzung in neuronalen Zellen signifikant reduziert werden kann [Somoza et al., 2014]. Des Weiteren liefert eine Humanstudie Indizien dafür, dass die Verabreichung von NaHED den Serotonininspiegel im Plasma signifikant senken kann [Somoza et al., 2014]. Es ist schon lange bekannt, dass im Zentralnervensystem synthetisiertes Serotonin als wichtiger Regulator der Energiebalance eine vordergründige Rolle in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme spielt und mit Sättigung assoziiert ist. Doch verdichten sich inzwischen Hinweise, dass peripheres Serotonin, welches den größten Anteil an Serotonin im Körper ausmacht, ebenso wie Serotonin im ZNS am Mechanismus der Sättigungsregulation beteiligt sein könnte. Ausgehend von der Annahme einer verringerten Serotoninausschüttung in neuronalen Zellen, wurde daher in der vorliegenden Arbeit auch die Hypothese einer NaHED-bedingten verringerten Serotoninfreisetzung im Darm getestet, um anhand der neuen Erkenntnisse nicht nur einen möglichen Zusammenhang mit der Glukoseaufnahme in den Caco-2-Zellen, sondern auch eine denkbare Verbindung zum Thema Sättigung aufzeigen zu können.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Phenolische Verbindungen

#### 2.1.1 Homoeriodictyol

Homoeriodictyol zählt innerhalb der Flavonoide, einer Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe, zu den in pflanzlichen Geweben hauptsächlich als Glykoside vorkommenden Flavanonen und ist chemisch betrachtet ein 3'-Methoxy-4', 5, 7-trihydroxyflavanon.

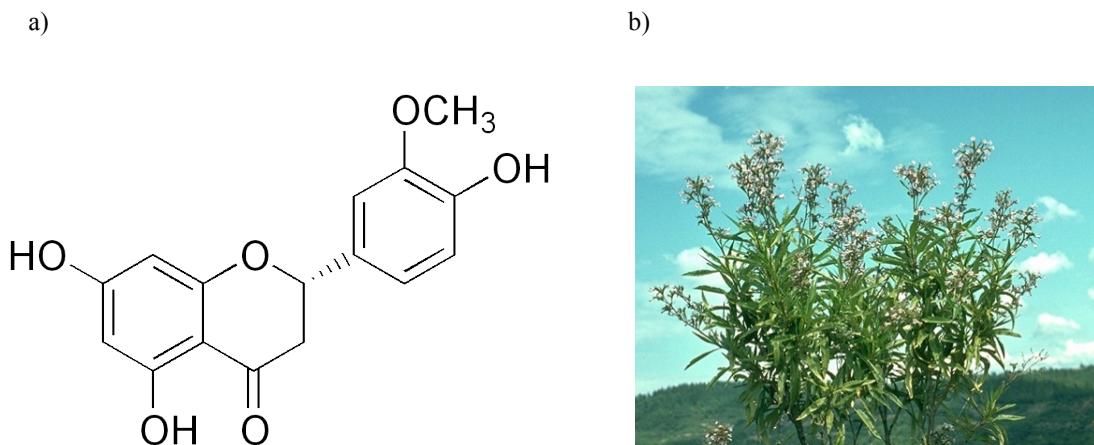


Abb.1: (a) Struktur des Homoeriodictyols

(b) *Eriodictyon californicum* [Brousseau, 1995]

Dieses Flavanon kommt in verschiedenen Pflanzenarten wie etwa dem Santakraut (*Eriodictyon californicum*), auch Herba Santa genannt, einem im Südwesten der USA und in Mexiko verbreiteten Raublattgewächs (Abb.1b), vor. Es wird durch Extraktion aus dieser Pflanze gewonnen [Ley et al., 2004], aber auch mittels chemischer Synthese [Shetgiri und Rege, 2003] oder biosynthetisch hergestellt [Liu et al., 2013].

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanz handelt es sich um das Natriumsalz des Homoeriodictyols (NaHED), das als racemisches Gemisch vorliegt und in Puffer gelöst eingesetzt wurde [Ley et al., 2005].

Wie viele Vertreter aus der Gruppe der Flavonoide zeichnet sich auch Homoeriodictyol durch mögliche gesundheitsfördernde Eigenschaften aus. So konnten Yao et al. [2006] beispielsweise antioxidative Effekte des aus der Pflanze *Viscum coloratum* isolierten (2S)-Homoeriodictyol-7,4'-di-O- $\beta$ -D-glucopyranosids nachweisen. Die radikalfangenden Eigenschaften dieses Homoeriodictyol-Glykosids (Konzentrationen: 0,21 mM und 0,39 mM) wurden hierbei unter Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>- sowie Xanthin/Xanthinoxidase-Testsystemen zur Produktion von Hydroxylradikalen bzw. Superoxidanionradikalen gezeigt. Basierend auf der nachgewiesenen inhibitorischen Wirkung des Homoeriodictyols (0,24  $\mu$ M) auf humane Cytochrom-P450-Enzyme der CYP1-Familie, speziell auf CYP1B1, das auf Grund seines Karzinogen-aktivierenden Potentials bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen kann, wird auch ein möglicher protektiver Effekte dieses Flavanons gegen bestimmte Krebsarten diskutiert [Doostdar et al., 2000]. Bekannt ist außerdem, dass Homoeriodictyol und vor allem dessen Natriumsalz eine bittermaskierende Wirkung aufweisen, weshalb sie auch als Geschmacksmodulator und -verstärker in Lebensmitteln sowie im pharmazeutischen Bereich Anwendung finden können [Ley et al., 2005]. So konnte etwa gezeigt werden, dass NaHED die Bitterkeit von Stoffen wie beispielsweise Coffein, Quinin oder Paracetamol reduzieren kann und somit eine interessante Verwendungsmöglichkeit im Bereich funktioneller Lebensmittel darstellt [Ley et al., 2005].

Über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus des Homoeriodictyols finden sich im Gegensatz zu strukturverwandten Verbindungen, wie die beispielsweise in Zitrusfrüchten vorkommenden Flavanone Hesperetin und Naringenin, die gut untersucht sind [Manach et al., 2003], bis jetzt nur wenige einschlägige Informationen. Bekannt ist allerdings, dass mit Glukose konjugierte Flavonoide vorwiegend im Dünndarm resorbiert werden [Day et al., 2003; Review Khan et al., 2014], während die Absorption von Flavanon-Rutinosiden (Rhamnoglukoside) wie Hesperidin und Naringin, als welche die oben genannten Verbindungen in Zitrusfrüchten hauptsächlich zu finden sind, im Dickdarm stattfindet. Der Grund dafür ist, dass die Lactase-

Phlorizinhydrolase (LPH), die in menschlichen Dünndarmzellen vorkommt, zwar Flavonoid-Glukoside hydrolysieren kann, wie beispielsweise anhand von Quercetin-4'-glukosid, Quercetin-3,4'-diglukosid oder Genistein-7-glukosid gezeigt werden konnte, nicht jedoch Rutinoside (Rhamnoglukoside) wie Quercetin-3-rhamnoglukosid oder Naringenin-7-rhamnoglukosid [Day et al., 2000]. Erst Bakterien, die den Dickdarm besiedeln, können Enzyme, wie etwa die  $\alpha$ -Rhamnosidasen, zur Hydrolyse der Rutinoside zur Verfügung stellen. Die Resorption und Bioverfügbarkeit der somit freigesetzten Aglyka entspricht allerdings an dieser Stelle nicht mehr jener des Dünndarms [Nielsen et al., 2006; Tomás-Navarro et al., 2014].

In einer Studie von Medina et al. [2012] konnte gezeigt werden, dass körperliche Aktivität die Bioverfügbarkeit von Flavanonen nach der Aufnahme eines Aronia-Zitrus-Saftes verbessert. So war die Gesamtexkretion der Flavanone bei Triathleten fünfmal, jene des Homoeeriodictyols sogar neunmal höher als bei Kontrollpersonen, was auf eine gesteigerte Aktivierung des Mikrobiota-Stoffwechsels durch die körperliche Aktivität zurückzuführen sein könnte.

Im Zuge der Passage der Aglyka durch den Dünndarm kommt es in den Enterozyten des Jejunums und Ileums zur Bildung von Metaboliten. Aber auch im Kolon kann es durch bakterielle Enzyme zu einer weiteren Hydrolyse der Glykoside sowie durch Bildung phenolischer Säuren zum Katabolismus der Aglyka kommen. Eine weitere Metabolisierung dieser Verbindungen erfolgt in der Leber, dem Hauptorgan des Flavanonmetabolismus, von wo sie dann über das Plasma im Körper verteilt und in signifikanten Mengen auch über den Urin ausgeschieden werden. Zu den wichtigsten Metaboliten der Flavanone zählen neben Glukuroniden auch Sulfate sowie Sulfoglukuronide [Matsumoto et al., 2004; Review Khan et al., 2014]. Medina et al. [2012] quantifizierten im Urin von Sportlern nach der Gabe eines Aronia-Zitrus-Saftes unter anderem auch Homoeeriodictyol als Aglykon sowie konjugiert an zwei Glukuronide. *In vitro* Untersuchungen im Caco-2-Modell liefern Hinweise dafür, dass Flavanonaglyka wie Hesperetin, Naringenin, Eriodictyol und Homoeeriodictyol (0,5 mM) durch transzelluläre passive Diffusion über den einschichtigen Zellrasen der Caco-2-Zellen absorbiert werden [Kobayashi und Konishi, 2008; Kobayashi et al., 2012]. Kobayashi und Konishi [2008] diskutieren außerdem einen protonengekoppelten

aktiven Transport von Hesperetin, Naringenin und Eriodictyol, der nach 40-minütiger Inkubation der Caco-2-Zellen mit den genannten Flavanonen (50 µM) gezeigt werden konnte. Dass die Absorption von Flavanonaglyka wie Eriodictyol oder Hesperetin rascher erfolgt als jene der glykosidisch verknüpften Flavanone, konnte unter anderem auch von Miyake et al. [2006] in einer Humanstudie nachgewiesen werden. Nach oraler Verabreichung der aus Zitronenschale zubereiteten Flavanonglykoside (4,5 g in 500 ml Wasser) sowie deren Aglyka (3,7 g in 500 ml Wasser) wurden über einen Zeitraum von vier Stunden die entsprechenden Metabolite im Plasma erfasst. Dabei konnten nach Verabreichung der Flavanonaglyka höhere Konzentrationen an Metaboliten nachgewiesen werden als nach Verabreichung der Glykoside. Bei den ermittelten Metaboliten handelte es sich wiederum um Glukuronide und/oder Sulfoglukuronide des Eriodictyols, Hesperetins und Homoeriodictyols [Miyake et al., 2006].

### 2.1.2 Phloretin und Phlorizin

Phloretin und sein glykosyliertes Produkt Phloretin-2'-O- $\beta$ -D-glukosid, auch Phlorizin genannt, gehören ebenfalls zu den phenolischen Verbindungen. Innerhalb der Flavonoide werden sie der Klasse der Dihydrochalkone zugeordnet [Ehrenkranz et al., 2005]. Chemisch gesehen handelt es sich beim Phloretin um ein 2',4',6'-Trihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-propiophenon [Gómez-Zavaglia, 2009].

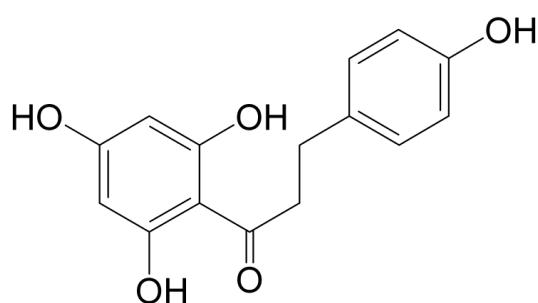


Abb.2: Struktur des Phloretins

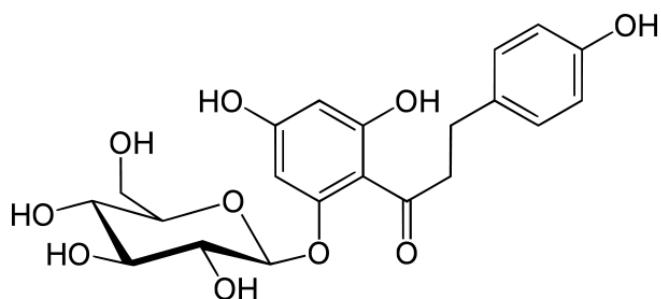


Abb.3: Struktur des Phlorizins

Phloretin und Phlorizin kommen als natürliche Komponenten und Nahrungsbestandteile in einer Reihe von Pflanzen und deren Früchten vor. In beachtlicher Konzentration ist Phlorizin beispielsweise in Äpfeln, aber auch in der Rinde von Apfelbäumen zu finden, aus der es bereits im 19. Jahrhundert erstmals isoliert wurde [Ehrenkranz et al., 2005]. Lata et al. [2009] wiesen etwa in einer Untersuchung von 19 Apfelkultivaren auf darin enthaltene phenolische Verbindungen in der gesamten Frucht Phlorizingehalte von 0,11-0,43 mg/g Trockenmasse, in den Apfelschalen Konzentrationen von 0,71-2,42 mg/g Trockenmasse nach. Für Phloretin und sein Glykosid sind eine Reihe biologischer Effekte bekannt, wie etwa die für viele Flavonoide typischen antioxidativen oder antiinflammatorischen Wirkungen. Einen Hinweis auf die antioxidative Aktivität des Phloretsins ( $24 \mu\text{M}$ ) lieferte etwa dessen inhibierende Wirkung auf die Lipidperoxidation in Rattenleber-Mikrosomen (Rezk et al., 2002). Aber auch Lotito und Frei [2004], die die antioxidativen Effekte von Apfelpolyphenolen, darunter auch Phloretin und Phlorizin, *in vitro* und *in vivo* beim Menschen verglichen (Polyphenol-Konzentrationen:  $1,5\text{-}12,5 \mu\text{M}$ ), konnten die antioxidative Kapazität des Phloretsins und Phlorizins sowie weiterer Apfelpolyphenole nachweisen. Dabei resultierte die Behandlung von humanem Plasma *in vitro* mit Apfelextrakt (Polyphenol-Konzentrationen: 7,1 oder  $14,3 \mu\text{g/ml}$ ; Inkubationszeit 15 min) über einen Zeitraum von 10 min bis 4 Stunden in antioxidativen Effekten. Nach dem Verzehr von 5 Äpfeln wurde den Probanden über einen Zeitraum von 4 Stunden Blut abgenommen. *In vivo* konnten allerdings keine äquivalenten antioxidativen Wirkungen nachgewiesen werden [Lotito und Frei, 2004]. Antiinflammatorische Effekte des Phloretsins wiederum wurden anhand der unterdrückten Lipopolysaccharid-induzierten inflammatorischen Antwort nach Vorbehandlung muriner RAW264.7 Makrophagen mit besagtem Flavanon gezeigt. Die Behandlung mit Phloretin-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  resultierte hierbei in einer reduzierten Bildung von proinflammatorischen Zytokinen [Chang et al., 2012].

Eine weitere wichtige Eigenschaft beider Verbindungen ist außerdem die Fähigkeit, als Inhibitoren von Glukosetransportern zu agieren. Es ist schon lange bekannt, dass Phlorizin die Glukoseabsorption durch Inhibierung des natriumabhängigen Glukosetransporters 1 („sodium-dependent glucose transporter“ SGLT1), der in Dünndarm und Niere zu finden ist, blockiert und somit den Glukosespiegel im Blut

beeinflussen kann [Review White, 2010]. Seit kurzem gibt es auch Hinweise auf eine mögliche protektive Wirkung dieser phenolischen Verbindung bei diabetischer Nephropathie. Eine Studie an diabetischen Ratten zeigte nach 10-wöchiger intragastraler Verabreichung von 20 mg/kg Phlorizin sowohl reduzierte Nüchternblutglukosespiegel und AGE-Konzentrationen (Advanced Glycation Endproducts), als auch positive Auswirkungen auf die Expression unterschiedlicher Proteine, die mit renalen Erkrankungen, molekularem Transport, oxidativem Stress und Lipidmetabolismus assoziiert sind [Pei et al., 2014]. Phloretin hingegen wirkt als Inhibitor des Glukosetransporters 2 („glucose transporter“ GLUT2) [Jordan und Holman, 1992] und kann somit die Glukose-Homöostase ebenfalls positiv beeinflussen [Shu et al., 2014].

## 2.2 Caco-2-Modell

In der vorliegenden Arbeit wurde die Caco-2-Zelllinie als *in vitro* Modell zur Untersuchung des Einflusses von NaHED auf die Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung in Enterozyten verwendet.

Bei diesem *in vitro* Modell handelt es sich um eine seit ca. 30 Jahren verwendete humane, von einem Kolonkarzinom abstammende Zelllinie, die modellhaft die intestinale Barriere imitiert.

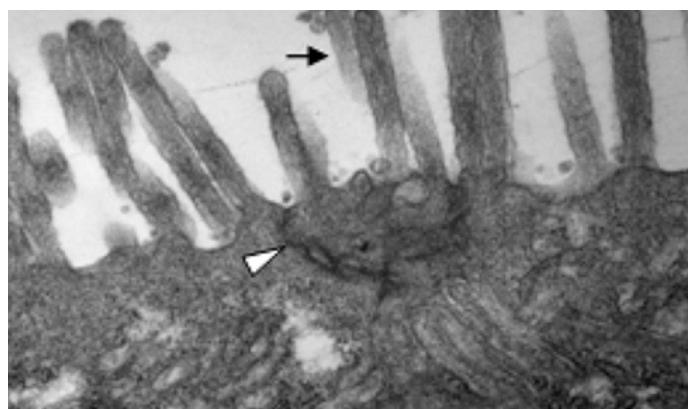


Abb.4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer Caco-2-Zelle mit Mikrovilli (Pfeil) und Tight Junctions (Pfeilspitze), modifiziert nach Zheng et al. [2012].

Im Zuge des Ausdifferenzierens in der Zellkultur über einen Zeitraum von 21 Tagen bilden Caco-2-Zellen einen epithelartigen, einschichtigen Zellrasen mit zwei unterschiedlichen Plasmamembrandomänen - einer apikalen oder Bürstensaum-Membran sowie einer basolateralen Membran. Kultivierte Caco-2-Zellen weisen durch ihre charakteristischen Enterozyten-Mikrovilli und Tight Junctions Ähnlichkeiten zum Phänotyp der reifen Enterozyten auf. Sie exprimieren außerdem viele der bisher bekannten Carrier-Systeme wie beispielsweise die Glukosetransporter und einige Phase-1- und Phase-2-Enzyme des Stoffwechsels, die für Enterozyten typisch sind [Boulenc et al., 1992; van Breemen und Li, 2005; Grefner et al., 2010]. Die Caco-2-Zelllinie ist demnach als relevantes *in vitro* Modell anerkannt und kann für mechanistische Studien der intestinalen Absorption, wie etwa den Transport von Kohlenhydraten, genutzt werden [Pinto et al., 1983; Sambuy et al., 2005; Grefner et al., 2010]. Der natriumabhängige Glukosetransporter 1 (SGLT1) und der Glukosetransporter 2 (GLUT2), die im Wesentlichen für die Glukoseaufnahme im Dünndarm verantwortlich sind, werden, wie oben erwähnt, in Caco-2-Zellen exprimiert [Blais et al., 1987; Mahraoui et al., 1994]. Allerdings existieren noch nicht viele Daten zur Lokalisation dieser Transporter, insbesondere des GLUT2, in diesen Zellen.

Grefner et al. [2010] konnten zeigen, dass SGLT1-Proteine sowohl in der apikalen, als auch in der basalen Seite der Caco-2-Zellen verteilt sind. Bei Abwesenheit von Hexosen wurde der Transporter GLUT2 ebenfalls in apikalen und basalen Teilen der Zelle exprimiert. Nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit niedrigen Hexosekonzentrationen wurde der Transporter hingegen hauptsächlich in den basalen Bereichen der Zelle, wo er die Zucker aus der Zelle transportiert, nachgewiesen [Grefner et al., 2010]. Auch Zheng et al. [2012] gehen von einer konstitutiven Expression des GLUT2 in der apikalen Membran von Caco-2-Zellen aus sowie einer zusätzlichen Translokation des Transporters aus dem Cytoplasma in die apikale Membran bei hohen Glukosekonzentrationen.

## 2.3 Glukoseabsorption

Die Aufnahme von Zuckern über das intestinale Epithel hängt einerseits von der Anwesenheit von Hydrolasen, die höhermolekulare Zucker in Monosaccharide spalten, und andererseits von der Anwesenheit der Hexosetransporter für den Transport in die Zelle ab [Mahraoui et al., 1992]. Es werden zwei Klassen von Transportern unterschieden, die mit der Glukosehomöostase im Körper assoziiert sind. Dazu gehören zum einen die GLUT Transporter, bei denen es sich um natriumunabhängige Uniporter handelt, die eine erleichterte Diffusion ermöglichen, und zum anderen die SGLT Transporter, auch als  $\text{Na}^+/\text{Glukose}$ -Cotransporter bekannt, die aktive Transporter oder Symporter darstellen. Die Energie für den aktiven Glukosetransport wird durch einen Natriumgradienten über die Bürstensaummembran hinweg, der durch eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe aufrecht erhalten wird, zur Verfügung gestellt [Review Wright et al., 2011].

Die Glukosetransporter, die membrangebundene Transporter darstellen, werden von der Solute-Carrier Gene (SLC) - Überfamilie, die eine Vielzahl an Gen-Familien umfasst, codiert [He et al., 2009]. Von den 5 Vertretern der Hexosetransporter der GLUT Familie wird in Enterozyten nur der Glukosetransporter GLUT2, der mit der basolateralen Membran assoziiert ist, und der Fruktosetransporter GLUT5, der mit der Bürstensaummembran in Verbindung steht, exprimiert [Mahraoui et al., 1992; Thorens, 1993; Mahraoui et al., 1994].

Die intestinale Glukoseabsorption erfolgt in zwei Schritten, wobei zunächst über den natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) die mit der Nahrung aufgenommenen Zucker D-Glukose und D-Galaktose aus dem Lumen des Darms in die Enterozyten transportiert werden. Dieses aktive Transportprotein ist apikal lokalisiert und zeichnet sich durch eine hohe Affinität, aber nur durch eine geringe Transportkapazität aus [Review Kellett und Brot-Laroche, 2005].

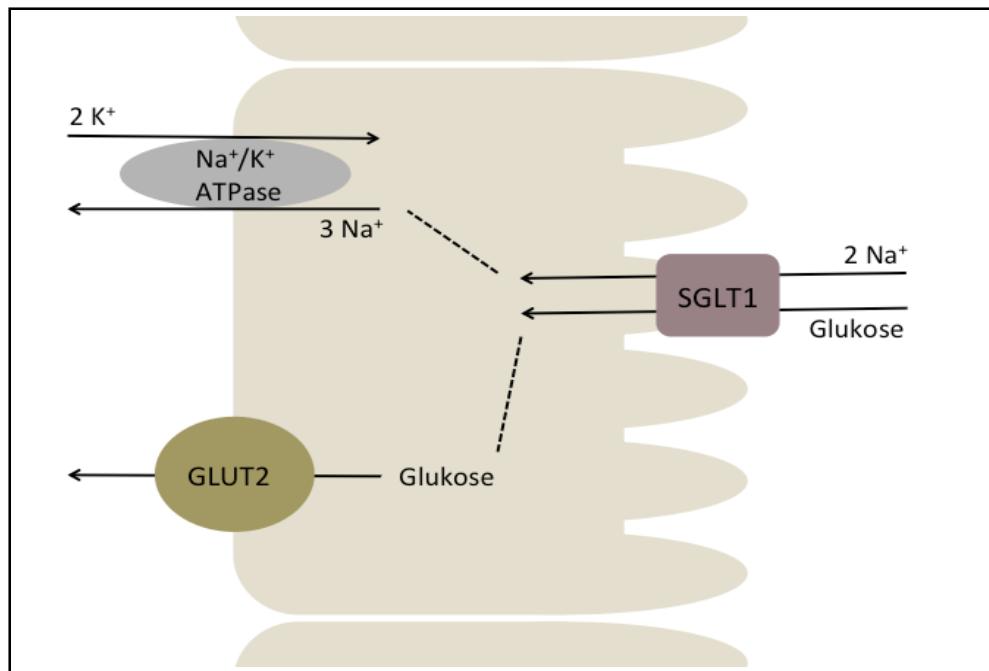


Abb.5: Schematische Darstellung des klassischen Modells der Glukoseabsorption mit apikal lokalisiertem natriumabhängigem Transporter 1 (SGLT1) und basolateral gelegenem Glukosetransporter 2 (GLUT2).

Die zweite Komponente der intestinalen Absorption ist der Glukosetransporter 2 (GLUT2), bei dem es sich um einen Uniporter mit geringer Affinität, aber hoher Transportkapazität [Maenz und Cheeseman, 1987; Cheeseman, 1993; Zheng et al., 2012] handelt. GLUT2 ist Mueckler [1994] zufolge vor allem in der basolateralen Membran der Enterozyten lokalisiert und transportiert Glukose aus diesen Zellen ins Blut.

Dieses klassische Modell, welches in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist, eignet sich gut zur Erklärung der Glukoseabsorption bei niedrigen luminalen Glukose-Konzentrationen ( $\leq 10 \text{ mM}$ ). Allerdings kann damit nicht begründet werden, warum es bei hohen Glukosekonzentrationen im Darm ( $\geq 25 \text{ mM}$ ), die die Transportkapazität des SGLT1 bei weitem übersteigen, zu einem starken Anstieg der Glukoseabsorption kommt [Zheng et al., 2012].

Ein neueres Erklärungsmodell zur intestinalen Glukoseabsorption geht davon aus, dass bei hohen Glukosekonzentrationen im Darm GLUT2 von intrazellulären Vesikeln in

die apikale Membran rekrutiert wird, wodurch die Absorption einer großen Menge an Glukose ermöglicht wird [Kellett und Helliwell, 2000]. Die Translokation von GLUT2 aus dem intrazellulären Pool und der Einbau in die Bürstensaummembran wird dabei durch SGLT1-abhängige Aktivierung der Proteinkinase C und MAP-Kinase-vermittelt [Helliwell et al, 2000; Kellett und Helliwell, 2000]. Auch Grefner et al [2010] unterstützen diese Hypothese mittels immunocytochemischer Methoden, die zeigten, dass nach Behandlung von Enterozyten aus Rattejejunum mit hohen Glukosekonzentrationen von 50 mM, GLUT2 Transporter in großem Ausmaß in den apikalen Bereichen der Zellen lokalisiert waren.

Eine *in vivo* Studie von Scow et al. [2011] konnte allerdings keinen Beweis für die Translokation von GLUT2 in die Apikalmembran der Enterozyten aufzeigen und die Existenz eines intrazellulären Signalweges, der durch die die Translokation mediierende Proteinkinase C vermittelt wird, somit nicht bestätigen. Die partielle Hemmung der durch Transporter vermittelten Glukoseaufnahme unter GLUT2-Inhibierung durch Phloretin deutet darauf hin, dass GLUT2 unter den in dieser Studie getesteten Bedingungen (1 mM, 20 mM und 50 mM Glukose) auf Grund konstitutiver apikaler Expression in den Glukosetransport in die Zellen involviert ist, während die Inhibierung der GLUT2-Aktivität durch den SGLT1-Inhibitor Phlorizin zeigt, dass SGLT1-Aktivität für die Glukoseaufnahme durch GLUT2 erforderlich ist.

## 2.4 Serotonin

Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ist ein Indolamin, das aus einem Indolring und einer Carboxylamid Seitenkette besteht [Review Lam und Heisler, 2007].

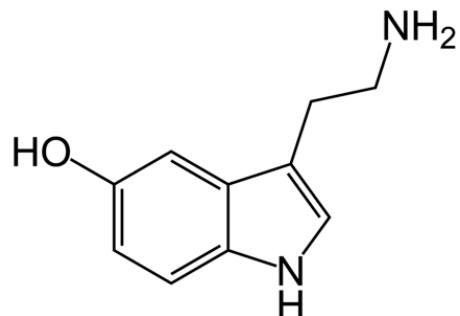


Abb.6: Struktur von Serotonin

Dieses Gewebshormon wird sowohl im Zentralnervensystem als auch im Gastrointestinaltrakt produziert und ist an einer Reihe von Körperfunktionen beteiligt. Hierzu zählen beispielsweise Hormonfreisetzung, Schlaf, Temperaturregelung, Stimmung, Angst, Aggression, Kognition, Stressverarbeitung, motorische Aktivität sowie Regulation kardiovaskulärer und gastrointestinaler Funktionen oder des Appetits [Meguid et al., 2000; Nebigil et al., 2000; Review Lam und Heisler, 2007; Nozawa et al., 2009; Review Lam et al., 2010; Review Marston et al., 2011]. Serotonin fungiert dabei als multifunktionaler Neurotransmitter im Zentralnervensystem, wo die Raphe-Kerne des Mittelhirns die Hauptquelle der serotonergen Neuronen darstellen [Hornung, 2010], und als Autacoid in peripheren Organen wie Duodenum, Jejunum, Kolon, Leber oder Milz [Mosienko et al., 2015]. Als letzteres wirkt es wie ein lokales Hormon und ist auch in der Lage, die Knochenbildung zu regulieren sowie Erythropoese und regenerative Prozesse zu steuern [Yadav et al., 2008; Amireault et al., 2011].

Es konnte auch gezeigt werden, dass peripheres Serotonin in die Entstehung und Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und des Reizdarmsyndroms involviert ist [O'Hara et al., 2004; Spiller et al., 2007]. Aber auch schon im Zuge der frühen Embryonalentwicklung spielt dieses Gewebshormon als morphogenetisches Signal in der Regulierung von Differenzierungsvorgängen eine Rolle [Hüther und Rüther, 2000]. Einer neuen Hypothese zufolge ist die evolutive Funktion des serotonergen Systems die Energieregulation und die Evolution des Mitochondriums

wird darin als jener Ort angesehen, wo sich Serotonin wahrscheinlich entwickelt hat [Andrews et al., 2015].

#### **2.4.1 Serotonin synthese und –freisetzung**

Der Intestinaltrakt stellt die bei weitem wichtigste Produktionsquelle für 5-HT dar, wobei der Großteil des endogenen Serotonins in den enterochromaffinen Zellen (EC) der Darmschleimhaut und nur ein kleiner Anteil in den Neuronen des enterischen Nervensystems gebildet wird [Ersperer, 1954; Gershon und Tack, 2007]. Bei den EC-Zellen handelt es sich um einen Subtyp der enteroendokrinen Zellen, die sich zwischen den Enterozyten der Darmschleimhaut befinden, auf luminales Signale reagieren [Dockray et al., 2003] und mehr als 90% des Gesamtserotonins im Körper synthetisieren, speichern und freisetzen [Keszthelyi et al., 2009].

Die entscheidende Rolle bei der Biosynthese von Serotonin spielt die Aminosäure L-Tryptophan, die dem Körper über die Nahrung zugeführt werden muss. Nach Absorption des L-Tryptophans aus dem Darm ist sie im Blutkreislauf, wo sie in einer freien und einer Albumin-gebundenen Form existiert [Fernstrom und Fernstrom, 2006], verfügbar und kann die Blut-Hirn-Schranke passieren, um an der Serotonin synthese im ZNS teilzunehmen [Ruddick et al., 2006]. Serotonin selbst ist nicht in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, weshalb das im ZNS vorkommende Serotonin im Gehirn synthetisiert werden muss [Review Voigt und Fink, 2015]. Die Synthese des Neurotransmitters im Gehirn macht trotz seiner hohen Wirksamkeit im ZNS nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtproduktion von Serotonin im Körper aus [Ruddick et al., 2006]. Schwerpunktmaßig wird Serotonin, wie oben erwähnt, in den EC-Zellen synthetisiert, aber auch in den enterischen Neuronen erfolgt ein Teil der Produktion [Gershon, 2013].

Ungeachtet des Produktionsortes im Körper ist die synthetische Kaskade des Serotonins sehr ähnlich: Unter Beteiligung der Enzyme Tryptophanhydroxylase (TPH) und aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD) wird aus L-Tryptophan in zwei Schritten Serotonin synthetisiert. Zunächst erfolgt die durch die

geschwindigkeitsbestimmende Tryptophanhydroxylase katalysierte Umwandlung von L-Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), wobei die Aminosäure durch das Enzym am Indolring in 5-Stellung hydroxyliert wird [Grahame-Smith, 1967; Verbeuren, 1989]. Tryptophanhydroxylase existiert in zwei Isoformen, von denen die Tryptophanhydroxylase 1 (Tph1) in den peripheren Geweben vorherrscht und die Tryptophanhydroxylase 2 (Tph2) in zentralen Geweben zu finden ist [Walther et al., 2003; Sakowski et al., 2006]. Der erste Reaktionsschritt in der Serotonin synthese bestimmt die Produktionsrate an gebildetem Serotonin und benötigt neben Sauerstoff noch weitere Faktoren wie Tetrahydrobiopterin und Eisen-II-Ionen [Fitzpatrick, 1999].

In einem zweiten, nicht geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wandelt die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase, ein Enzym, das in serotoninproduzierenden Zellen im Überschuss vorhanden ist, dessen Verteilung und Funktionen jedoch nicht nur auf das serotonerge System beschränkt sind, 5-HTP zu 5-HT um [Verbeuren, 1989; Mosienko et al., 2015]. Diese Reaktionen erfolgen sowohl im ZNS als auch in den Neuronen des enterischen Nervensystems, wobei zwischen Gehirn und Darm ein bidirektionales Kommunikationsnetz existiert und das 5-HT-System eine essentielle Rolle in den Funktionen und Aktionen dieser zwei Hauptorgane spielt [O'Mahony et al, 2015]. In Abbildung 7 sind diese Gehirn-Darm-Achse und der serotonerge Metabolismus sowie die Serotonin synthese im Überblick dargestellt.

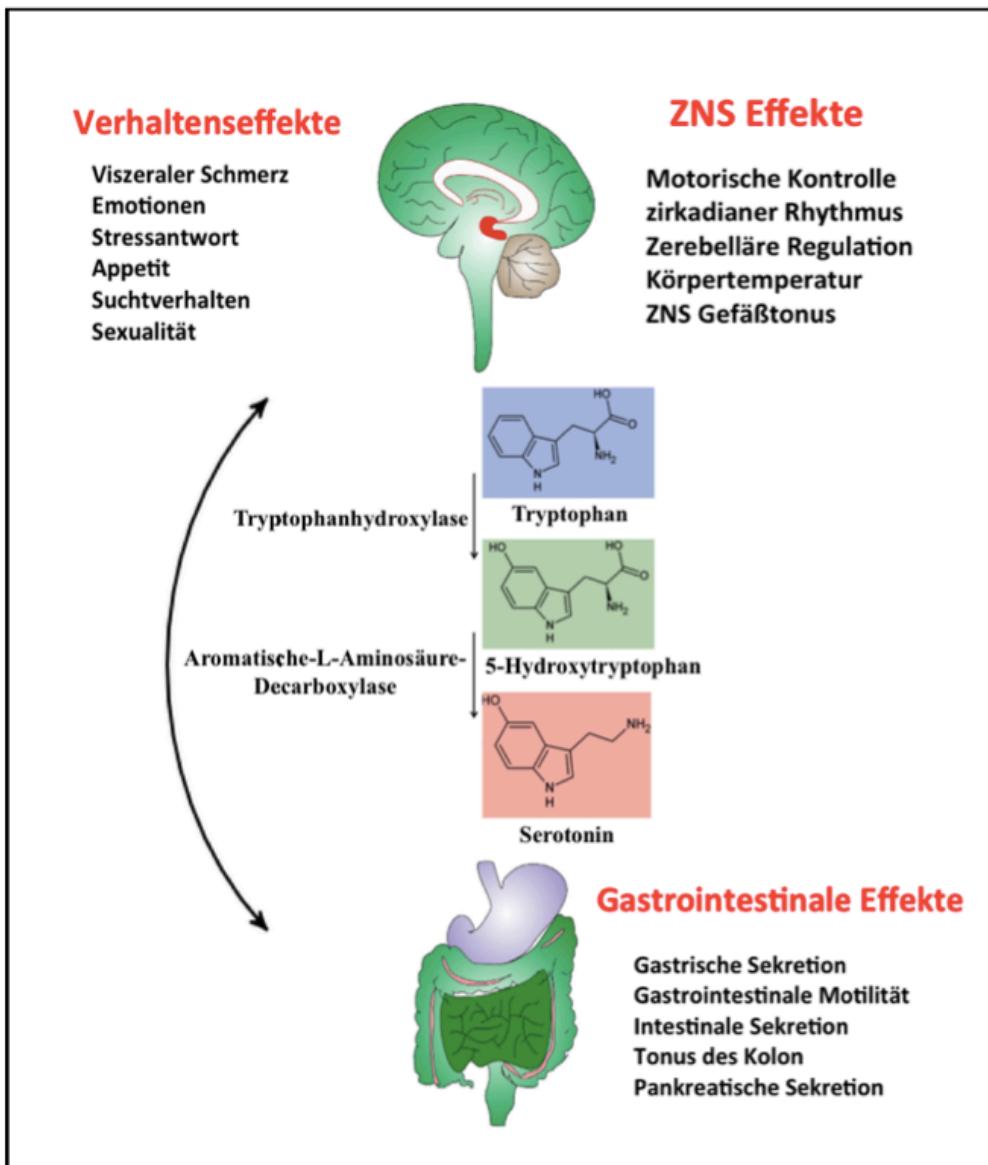


Abb.7: Schematische Darstellung der Gehirn-Darm-Achse und des serotonergen Mechanismus, modifiziert nach O'Mahony et al. [2015].

Im Anschluss an die Synthese wird Serotonin in den EC-Zellen mit Hilfe des vesikulären Monoamintransporters Typ 1 (VMAT1) in synaptische Vesikel geschleust, in denen sie bis zur Freisetzung gespeichert und dann durch Exozytose in den synaptischen Spalt entleert werden, wo das Serotonin an prä- und/oder postsynaptische Serotoninrezeptoren binden kann [Peter et al., 1995]. Es wird in erster Linie von Vesikeln nahe der Basalmembran der enterochromaffinen Zellen freigesetzt, doch gibt es auch Hinweise darauf, dass sich diese Granula in der Nähe

der Apikalmembran befinden können und Serotonin selektiv in das Lumen abgegeben werden kann [Fujimiya et al., 1998].

Die Freisetzung von 5-HT im Darm erfolgt als Antwort enterochromaffiner Zellen auf chemische oder mechanische Stimuli. Nährstoffe, wie Glukose, kurz- oder langkettige Fettsäuren oder Peptide, sowie intraluminale Ausdehnungen oder efferente vagale Stimulationen etwa führen zu einer Serotoninfreisetzung [Raybould, 2002; Gershon und Tack, 2007; Betrand und Bertrand, 2010; Voigt und Fink, 2015]. Racké et al. [1996] diskutieren in diesem Zusammenhang eine Reaktion der enterochromaffinen Zellen auf den Inhalt des Darmlumens durch Aktivierung rezeptorbetriebener oder spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle. Der Kationenkanal TRPA1 (Transient Receptor Potential Cation Channel), der in EC-Zellen vermehrt exprimiert wird, kann durch scharf schmeckende Verbindungen oder Kälte aktiviert werden. TRPA1 Agonisten, wie etwa das Zimtaldehyd, stimulieren enterochromaffine Zellen und führen zu einem gesteigerten intrazellulären Kalziumlevel, der die Serotoninausschüttung induziert [Nozawa et al., 2009].

Aus EC-Zellen freigesetztes Serotonin gelangt in die *Lamina Propria*, wo es an intrinsischen und extrinsischen Nerven wirken kann, was in weiterer Folge in unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Reaktionen, wie etwa gastrointestinalen Kontraktionen, Sekretion, Vasodilation, Schmerzempfindung oder Nausea resultieren kann [Gershon und Tack, 2007]. Aber auch Interaktionen mit Immunzellen wie beispielsweise die Modulation der Immunantwort und somit der potentielle Einfluss der intestinalen Inflammation durch Serotonin [Spiller, 2007] oder die Aufnahme von ins Blut freigesetztem 5-HT durch die Thrombozyten, die selbst kein Serotonin produzieren können, werden diskutiert [Pletscher, 1968].

Beendet wird die Wirkung des Serotonin im Gastrointestinaltrakt durch die Aufnahme über den Serotonin Reuptake Transporter (SERT) in die Epithelzellen [Gill et al., 2008]. Es wird angenommen, dass das von den EC-Zellen freigesetzte 5-HT entweder direkt an den sensorischen Nervenendigungen agieren und in weiterer Folge von SERT aufgenommen werden könnte oder alternativ auch direkt von SERT aufgenommen werden könnte, bevor es die Möglichkeit hat, an den sensorischen Nerven zu wirken (Abb.8) [Bertrand und Bertrand, 2010]. Somit könnte SERT eine primäre Rolle dabei spielen, die Hintergrundkonzentrationen an Serotonin zu kontrollieren, welche wiederum das Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Desensibilisierung der Serotoninrezeptoren regulieren [Bertrand und Bertrand, 2010]. Auch D'Souza und Craig [2010] weisen darauf hin, dass der Großteil des extrazellulären Serotonins über Serotonin Reuptake Transporter, die in vielen peripheren Organen, die Serotonin über das Blut aufnehmen, exprimiert werden, in das präsynaptische Neuron transportiert wird.

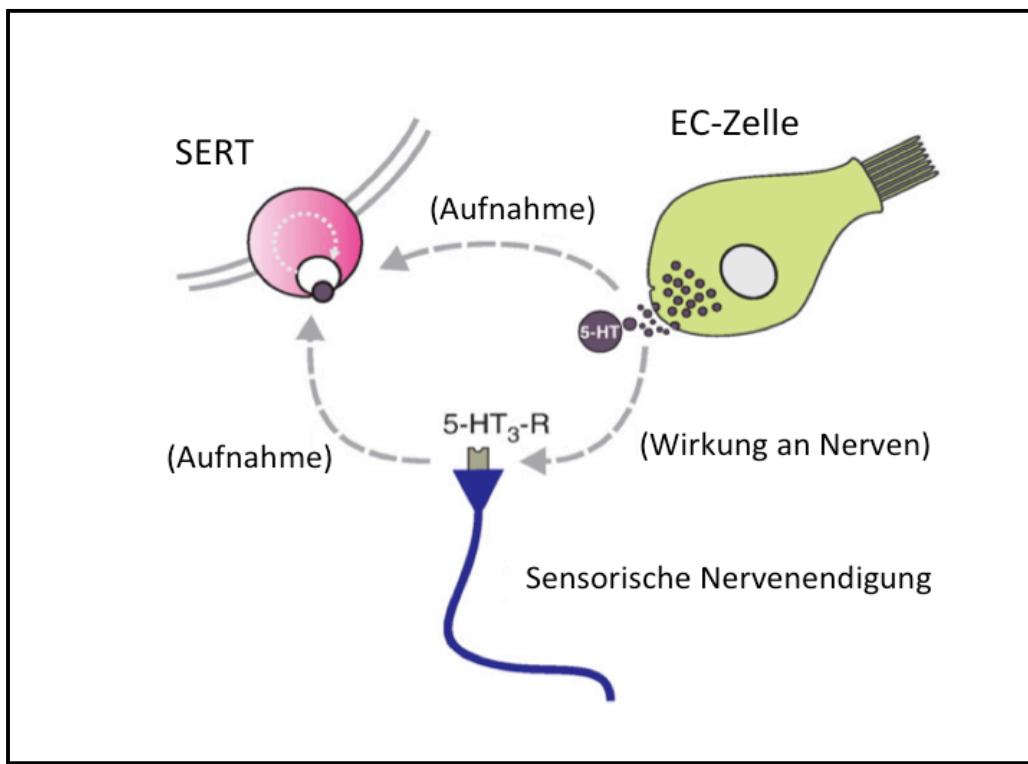


Abb.8: Schematische Darstellung der Serotonintransporterfunktion in intestinalen Epithelzellen: In großen Mengen freigesetztes 5-HT könnte zum Teil auch direkt von SERT aufgenommen werden, bevor es an Nervenendigungen agieren kann. Modifiziert nach Bertrand und Bertrand [2010].

Das aus den enterochromaffinen Zellen freigesetzte Serotonin kann mehrere mögliche Wege einschlagen. Das in das Lumen abgegebene 5-HT kann dort verbleiben und später in den Fäzes nachweisbar sein oder von den Epithelzellen über SERT aufgenommen werden, während das in die *Lamina propria* freigesetzte Serotonin, welches dort mit Nervenendigungen interagiert, aber auch über SERT in die Enterozyten aufgenommen werden oder in die Blutbahn eintreten kann (Abb.9).

In den Epithelzellen wird Serotonin durch oxidative Desaminierung mittels Monoaminoxidase zu einem 5-Hydroxyindol-3-acetaldehyd abgebaut, welches in weiterer Folge durch eine Aldehyddehydrogenase zur 5-Hydroxyindolessigsäure oxidiert wird [Lam et al., 2010].

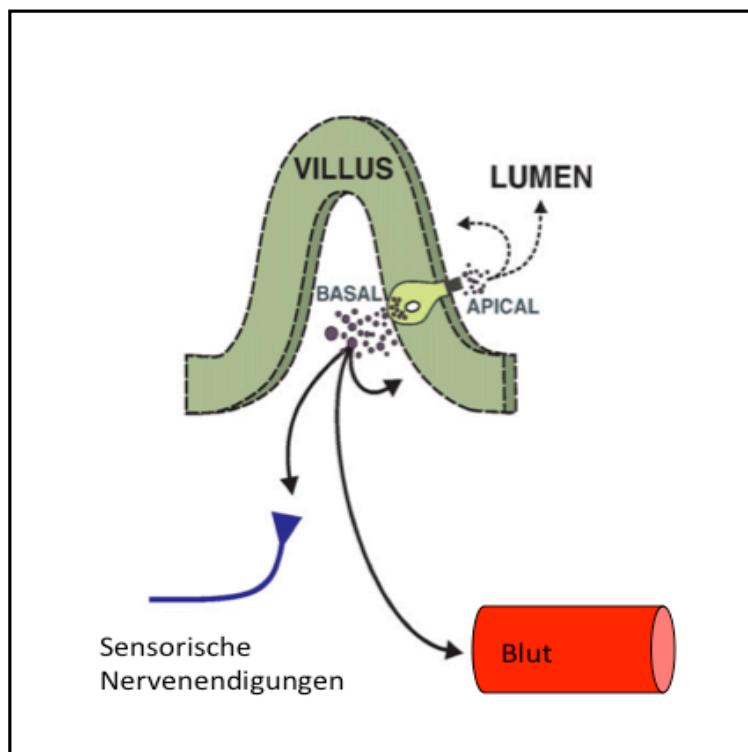


Abb.9: Mögliche Wege des peripheren Serotonins, modifiziert nach Bertrand und Bertrand [2010].

Im Blut liegt 5-HT in freier Form vor oder wird von Blutplättchen über SERT aufgenommen. Das im Blut in freier Form existierende Serotonin wird rasch durch Monoaminoxidasen oder Glukuronidasen abgebaut, während das in die Thrombozyten aufgenommene Serotonin vor seinem Abbau geschützt ist. Somit tritt unter normalen Umständen nur das hier befindliche Serotonin in den Blutkreislauf ein [Bertrand und Bertrand, 2010].

## 2.4.2 Serotonin und Sättigung

Die in die Kontrolle der Nahrungsaufnahme und Sättigung involvierten Mechanismen sind sehr vielschichtig, sowohl in Hinsicht auf die beteiligten Strukturen als auch auf die mitwirkenden Neurotransmitter und Hormone. Im Gehirn wurden mit dem *Nucleus arcuatus* und dem *Nucleus paraventricularis* einerseits Bereiche des Hypothalamus, mit dem *Nucleus parabrachialis* sowie dem Nucleus des Solitärtrakts andererseits auch außerhypothalamische Bereiche als Mediatoren serotonerger Sättigungsmechanismen nachgewiesen [Garfield et al., 2014; Review Voigt und Fink, 2015].

Die Vielfalt an physiologischen Wirkungen und die regulatorische Flexibilität des Serotonins, die jene anderer Neurotransmitter weit überragt, kann durch die große Anzahl an 5-HT Rezeptorfamilien und Subtypen sowie die komplexe serotonerge Versorgung des Gehirns erklärt werden [Lam und Heisler, 2007; Voigt und Fink, 2015]. Es werden mindestens 14 verschiedene Rezeptorsubtypen unterschieden, die aufgrund ihrer Gensequenz und intrazellulären Signalübertragung klassifiziert wurden, zu einer der komplexesten Familie von Neurotransmitter-Rezeptoren zählen und mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors, eines ligandengesteuerten Ionenkanals, G-proteingekoppelt sind [Hoyer et al., 2002].

Multiple Serotonin-Rezeptortypen werden auf vielen verschiedenen Zellen im Gehirn und in der Peripherie des Körpers co-exprimiert [Bonsi et al., 2007]. Die komplexe Kontrolle, die durch die Vielfalt an Rezeptorfunktionen ermöglicht wird, deutet auf die Rolle des serotonergen Systems in der Energeregulation hin [Andrews et al., 2015]. Im Zuge zahlreicher Tierversuche einschließlich verschiedener transgener Modelle

konnten bereits mehrere 5-HT-Rezeptorsubtypen, beispielsweise 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> und 5-HT<sub>6</sub> identifiziert werden, die mit der Regulation der Nahrungsaufnahme in Zusammenhang gebracht werden. So wurde etwa gezeigt, dass die Aktivierung des Rezeptorsubtyps 5-HT<sub>1A</sub> zu einer Verstärkung der Nahrungsaufnahme führt [Mohammad-Zadeh et al., 2008], was durch die verringerte Beteiligung von 5-HT in anorexigenen Stoffwechselwegen bedingt sein könnte [Lam und Heisler, 2007]. Die Stimulierung von 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> oder 5-HT<sub>2C</sub> dagegen fördert die Sättigung und bewirkt somit eine verringerte Nahrungsaufnahme [Rosmond et al., 2002; Jonnakuty und Gragnoli, 2008; Feijó Fde et al., 2011].

Für den ebenfalls im Gehirn einschließlich der hypothalamischen Regionen [Roberts et al., 2002] exprimierten Rezeptorsubtyp 5-HT<sub>6</sub> liegen voneinander abweichende Ergebnisse vor. Während anfänglich kein Nachweis einer Beteiligung an der Sättigung gezeigt werden konnte [Roberts et al., 2002], ergaben spätere Studien einen Zusammenhang zwischen 5-HT<sub>6</sub> und verringelter Nahrungsaufnahme einerseits bzw. Gewichtszunahme andererseits [Bentley, 1999; Woolley et al. 2001] sowie eine Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Inaktivierung des 5-HT<sub>6</sub> Rezeptors [Frassetto et al., 2008]. Es wurde auch diskutiert, dass möglicherweise die Überlappung von Antagonisten an 5-HT<sub>6</sub> Rezeptoren mit der GABAergischen Hemmung indirekt zur Freisetzung von α-Melanozyten stimulierendem Hormon und in weiterer Folge zu Sättigung führen könnte [Woolley et al., 2004].

Garfield et al. [2014] wiesen darauf hin, dass die von einem selektiven 5-HT<sub>6</sub>-Rezeptor-Antagonisten induzierte Hypophagie mit einer signifikanten Zunahme an neuronaler Aktivität im *Nucleus paraventricularis* des Hypothalamus und im Nucleus des Solitärtrakts im Hirnstamm assoziiert ist. Dies könnte nach Voigt und Fink [2015] unter anderem dahingehend interpretiert werden, dass eine verstärkte Expression des 5-HT<sub>6</sub>-Rezeptors im Hirnstamm es 5-HT<sub>6</sub>-Antagonisten ermöglichen könnte, die Weiterleitung von peripheren Sättigungssignalen, die hier enden, zu unterbinden.

Evidenz für den Zusammenhang zwischen zentralem Serotonin und Nahrungsaufnahme - in Form von appetitstimulierenden Effekten nach der Gabe von Serotoninantagonisten sowie einer Hemmung der Nahrungsaufnahme bei gesteigerter Verfügbarkeit von 5-HT

oder einer direkten Aktivierung von 5-HT Rezeptoren - existiert schon seit mehreren Jahrzehnten [Review Voigt und Fink, 2015]. Bereits in den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass der Abbau von zentralem Serotonin zu Hyperphagie und Übergewicht führt.

Die bisherige Forschung zur Frage der appetithemmenden Wirkung dieses Neurotransmitters konzentrierte sich vorwiegend auf dessen Signalübertragung im Gehirn, wo serotonerge Mechanismen der Sättigung, wie oben erwähnt, im Hypothalamus, wo sich das „Appetitzentrum“ des Gehirns befindet, aber auch in Strukturen außerhalb des Hypothalamus, zum Beispiel im Hirnstamm, identifiziert wurden. Serotonin interagiert innerhalb des Hypothalamus mit endogenen orexigenen Peptiden wie Neuropeptid Y/Agouti related protein und anorexigenen Peptiden, wie zum Beispiel das  $\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon. Im Nukleus des Solitärtraks integriert Serotonin periphere Sättigungssignale, wobei 5-HT<sub>3</sub>, aber wahrscheinlich auch 5-HT<sub>2C</sub>, eine Rolle spielen [Review Voigt und Fink, 2015].

Es liegen auch zahlreiche Studien vor, die die Auswirkungen genetischer Störungen des Serotoninsystems auf Nahrungsaufnahme und Körpergewicht untersuchen [z.B. Bechtolt et al., 2008; Wade et al., 2008]. Zusätzlich unterstreichen Ergebnisse zu Manipulationen der endogenen Serotonin synthese und Bioverfügbarkeit durch genetische Veränderungen von Serotonin assoziierten Genen sowie zur pharmakologischen Beeinflussung von Serotoninrezeptoren die Rolle dieses Neurotransmitters im Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme und Körpergewicht und damit die inverse Beziehung zwischen Serotonin-Signalübertragung im Gehirn und Nahrungsaufnahme [Lam et al., 2010].

Obwohl beinahe 95% des gesamten endogenen Serotonins im Gastrointestinaltrakt gebildet werden [Berger et al., 2009], ist dennoch relativ wenig über einen potentiellen Beitrag von peripherem Serotonin an der Sättigung bekannt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Tatsache sein, dass die serotonergen Mechanismen im Gehirn selektiver untersucht werden können, da die involvierten Rezeptor-Subtypen nur oder zum größten Teil im Gehirn exprimiert werden [Review Voigt und Fink, 2015]. Es ist zwar unwahrscheinlich, dass peripheres Serotonin auf Grund der schlechten Passage durch die Blut-Hirn-Schranke direkte Auswirkungen auf das Gehirn hat, doch gibt es

Hinweise darauf, dass auch intestinales 5-HT an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt sein könnte. So konnten beispielsweise Fletcher und Burton [1986], Edwards und Stevens [1991] oder Simansky et al. [1992] im Tierversuch zeigen, dass durch peripher verabreichtes Serotonin die Sättigung früher eintritt und die Größe der Mahlzeiten reduziert wird. Des Weiteren führte peripher injiziertes 5-HT zu einer dosisabhängigen Verringerung der Nahrungsaufnahme bei Ratten [Pollock und Rowland, 1981].

Intravenöse Verabreichung von 5-HT kann die Aktivierung vagaler afferenter Nervenfasern des Dünndarms verursachen, was darauf hindeutet, dass auch aus enterochromaffinen Zellen freigesetztes Serotonin in der afferenten Signaltransduktion beteiligt sein könnte [Hillsley und Grundy, 1998]. Mazda et al. [2004] unterstützten diese These, indem sie zeigen konnten, dass eine Ausdehnung des Magens die Serotoninfreisetzung aus EC-Zellen stimuliert und dass das freigesetzte 5-HT die Rezeptoren an den vagalen afferenten Nervenenden aktivieren kann, was wiederum die *c-fos* Expression in spezifischen Gehirnregionen wie dem Nukleus des Solitärtraks und der *Area postrema* induziert und in weiterer Folge unter anderem auch den *Nucleus paraventricularis* im Hypothalamus aktiviert. Truncale Vagotomie dagegen blockierte die *c-fos* Expression, was darauf hindeutet, dass vagale afferente Pfade diese Antwort vermitteln könnten. Peripheres Serotonin erhöhte also die neuronale Aktivität in Gehirnregionen, die mit Energiebalance assoziiert sind.

Des Weiteren zeigten Wang et al. [2013] Hinweise darauf, dass die serotonerge Degranulation der enterischen Mastzellen und die Freisetzung von Mediatoren, die zu parakrinen Signalen für afferente Nervenfasern werden, durch Stimulation des auch in enterischen Mastzellen exprimierten 5HT<sub>1A</sub>-Rezeptorsubtyps vermittelt wird.

Auch in Caco-2-Zellen wird 5HT<sub>1A</sub> exprimiert, wobei dieser Rezeptor in der Lage ist, nach Stimulation die Aktivität des SERT zu modulieren [Iceta et al., 2009]. Dass Nahrungsentzug die Synthese von peripherem Serotonin fördern kann, welches in weiterer Folge sowohl Fasten induzierte Lipolyse als auch Glukoneogenese in der Leber durch Signaltransduktion in Adipozyten und Hepatozyten begünstigt, wurde in einer Tierstudie von Sumara et al. [2012] gezeigt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen auch darauf hin, dass im Darm synthetisiertes Serotonin die Glukoseaufnahme

durch Hepatozyten verhindert und dadurch des Weiteren zur Aufrechterhaltung normaler Blutglukosespiegel beiträgt.

Im Zusammenhang mit Serotonin und Sättigung muss auch erwähnt werden, dass 5-HT nicht isoliert von anderen Sättigungssignalen arbeitet. Es übt zwar eine eigenständige Wirkung auf die Sättigung aus, doch gibt es auch Interaktionen mit anderen Sättigungssignalen. Eines davon ist das Peptid Cholecystokinin (CCK), das während und nach der Mahlzeit von neuroendokrinen Zellen im proximalen Bereich des Dünndarms sezerniert wird und die postprandiale Sättigung induziert [Overduin et al., 2014].

Die physiologische Rolle von CCK bei der Sättigung wird durch Studien bestätigt, die zeigen konnten, dass einerseits die Nahrungsaufnahme nach systemischer Verabreichung von CCK gehemmt wurde [Hillsley und Grundy, 1998] und sich andererseits die Nahrungsaufnahme nach der Gabe von Antagonisten verschiedener CCK<sub>1</sub>-Rezeptoren verstärkte [z.B. Miesner et al., 1992; Ritter, 2004]. Im lateralen Hypothalamus wurden auch Neuronen identifiziert, die sowohl auf CCK- als auch auf 5-HT-Gabe reagierten und deren Antwort sich bei kombinierter Gabe beider Sättigungssignale verstärkte, was darauf hindeutet, dass die Effekte der Signale auf dem selben Neuron zusammenlaufen [Zippel et al., 1999]. Des Weiteren zeigten synergistische Wirkungen von 5-HT und CCK im *Nucleus paraventricularis* einen Einfluss auf die Motivation zur Nahrungsaufnahme [Helm et al., 2003]. Der Großteil der Studien zu Interaktionen zwischen 5-HT und CCK zeigt jedoch, dass eher CCK Serotonin zur Vermittlung der Sättigung benötigt als umgekehrt [Review Voigt und Fink, 2015].

Ein weiteres Sättigungshormon, das mit dem Serotonin-System in Zusammenhang gebracht wird, ist Leptin, ein in adipösem Gewebe produziertes und bei fettleibigen Menschen in hohen Konzentrationen im Blut vorkommendes Protein, das die Blut-Hirn-Schranke überwindet [Myers et al., 2009]. Allerdings konnte eine Interaktion zwischen Serotonin und Leptin nicht in allen diesbezüglichen Studien gezeigt werden und es ist auch noch nicht völlig geklärt, welche Rolle diese Interaktion in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme spielt. So wurde einerseits beispielsweise in einer Studie, die den Milchkonsum von Mäusen untersuchte, die Involvierung des 5-HT<sub>2</sub>-

Rezeptors in der Vermittlung Leptin-induzierter Anorexie nachgewiesen [Yamada et al., 2003] oder in einer anderen *in vivo* Studie gezeigt, dass ein spezifischer Antagonist des HT<sub>1a</sub>-Rezeptors die Nahrungsaufnahme bei Leptin-defizienten Mäusen verringerte [Yadav et al. 2011]. Andererseits liegen aber auch Studien vor, die keine deutlichen Hinweise auf einen direkten stimulatorischen Effekt von zentralem Leptin auf die Serotoninfreisetzung im Hypothalamus [Halford und Blundell, 2000; Lam et al., 2011; Telles et al., 2013] liefern.

#### **2.4.3 Zusammenhang zwischen Glukosemetabolismus und peripherem Serotonin**

In der Literatur finden sich bereits Hinweise auf Wirkungen von zirkulierendem Serotonin auf die periphere Glukoseregulation und somit auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen peripherem Serotonin und dem Glukosemetabolismus. Allerdings zeigte die periphere Verabreichung von Serotonin in manchen Studien einen Anstieg, in anderen hingegen ein Absinken der zirkulierenden Blutglukoselevel. So konnten beispielsweise von Sugimoto et al. [1990] 30 min nach der peripheren Verabreichung von 5-HT ab 20 mg/kg bei nüchternen Mäusen Hypoglykämien nachgewiesen werden, wobei die Blutglukose-senkenden Effekte mit dem nach der peripheren Injektion von Serotonin ebenfalls angestiegenen Plasmainsulinspiegel assoziiert werden. Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang eine mögliche Wirkung des Serotonins auf die Blutglukosespiegel, indem dieses den Mechanismus der Insulinfreisetzung in pankreatischen  $\beta$ -Zellen beeinflusst. Eine weitere *in vivo* Studie an Ratten zeigte hingegen hyperglykämische Effekte nach peripherer Gabe von Serotonin von 5 mg/kg KG [Yamada et al., 1995]. Auch Watanabe et al. [2010] konnten diese hyperglykämische Wirkung des peripheren Serotonins in Mäusen nachweisen und diese in einer nachfolgenden Studie auch bei Schafen reproduzieren [Watanabe et al., 2014]. Zusätzlich zu den Serotonin-induzierten hyperglykämischen Effekten wurden nach der peripheren Verabreichung von 5-HT auch in diesen Studien entsprechende Hyperinsulinämien nachgewiesen [Watanabe et al., 2010, Watanabe et al., 2014]. Die ermittelten Blutglukose-steigernden Effekte werden von Watanabe et al. [2010] mit einer Inhibierung der Glukoseaufnahme in Gewebe assoziiert, wobei diese Inhibierung aber in Leber- und Muskelgewebe nicht nachgewiesen werden konnte

[Watanabe et al., 2010]. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass der Serotonin-induzierte Anstieg der Blutglukose- und Insulinspiegel mit dem Serotoninrezeptor 5-HT<sub>1</sub> assoziiert ist [Watanabe et al., 2014].

Ein Einfluss des Serotonins auf die Insulinsekretion konnte etwa von Paulmann et al. [2009] nachgewiesen werden, die zeigten, dass Serotonin die Insulinsekretion in pankreatischen  $\beta$ -Zellen durch Serotonylierung von GTPasen regulieren kann. *In vivo* Versuche mit diabetischen Mäusen (*Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse) zeigten außerdem nach einem induzierten Anstieg der intrazellulären Serotonin-Konzentrationen gesteigerte Insulin- und reduzierte Glukosespiegel im Blut. Während aber intrazelluläres Serotonin auf eine Insulinsekretion-fördernde Wirkung schließen ließ, deuteten *in vitro* Versuche mit extrazellulärem 5-HT (500  $\mu$ M; Inkubationszeit 60 min) in Insulin sezernierenden Zelllinien (MIN-6, INS-1 und RINm5F) auf eine Inhibition der Glukose-induzierten Insulinsekretion hin. Auch die erhöhten Blutglukosespiegel nach der systemischen Verabreichung von 5-HT (4mg/kg KG) an Mäuse (*Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse) 30 min vor einer Glukosegabe weisen auf diese inhibitorische Wirkung des extrazellulären Serotonins hin [Paulmann et al., 2009].

Der Mechanismus, der diese hyperglykämischen Effekte im Plasma nach Serotonin-injektion bewirkt, muss also noch geklärt werden [Watanabe et al., 2010]. Auch wenn die Resultate dieser Studien, möglicherweise auf Grund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen, noch keine einheitlichen Ergebnisse liefern, lassen sie zusammenfassend dennoch darauf schließen, dass das peripher zirkulierende Serotonin einen Einfluss auf die Glukoselevel in *in vivo* Modellen hat.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Geräte**

Advanced VMS-C4, Magnetrührer, VWR

Arium 611VF, satorius stedim biotech Wasseraufbereitungsanlage

Autoklav 3870 ML, Tuttnauer

Dry-Line Trockenschrank, VWR

Infinite M200 Plattenlesegerät, Tecan

Inkubator CO<sub>2</sub> Binder C150, Binder

IT400 Trino, Mikroskop, VWR

NanoQuanrTM Platte, Tecan

PioneerTM Waage, OHAUS

StepOnePlus RealTime PCR

Telstar, Biostar Plus Sterilwerkbank

Zentrifuge, Eppendorf 5810R

Zentrifuge, Eppendorf 5804R

### **3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

#### **Verbrauchsmaterialien**

Cellstar tissue culture flask, PS, red standard cap (T25, T175) (Greiner bio-one)

Cryoröhrchen mit Innengewinde, 2 ml (Carl Roth)

Eppendorf Research Mikroliterpipetten, 10 – 5000 µL

Eppendorf Research Multikanalpipette, 100 µL

Multiwell-Plate (6, 24, 96 Wells) mit Abdeckplatte (Greiner bio-one)

Multi-SafeSeal-Tubes (Carl Roth)

Neubauer improved Bright-line Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm<sup>2</sup> (Brand)

Thermo Scientific, Matrix Pipettierhilfe

#### **Reagenzien**

4,6-Diamidino-2-phenylindol (Sigma-Aldrich)

D-(+)-Glukose, wasserfrei (Carl Roth)

Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Dulbecco's Modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich)

Ethanol, ≥ 96 %, vergällt (Carl Roth)

Fetal bovine serum (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

L-Glutamin-Lösung, steril filtriert, 200 nM (Sigma-Aldrich)

Hank's Balanced Salt Solution (Sigma-Aldrich)

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Sigma-Aldrich)

Homoeriodictyol-Natriumsalz (Symrise AG, Holzminden, Deutschland)

Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich)

Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma-Aldrich)

Magnesiumsulfat (Sigma-Aldrich)

2-[*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglukose (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

N-Laurylsarcosin Natrium Salz (Sigma-Aldrich)

Natriumchlorid (Sigma-Aldrich)

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma-Aldrich)

Phloretin (Sigma-Aldrich)

Phlorizin (Sigma-Aldrich)

Sulforhodamin 101

Trypanblau-Lösung (0,4 %) (Sigma-Aldrich)

Trypsin-EDTA-Lösung, steril (Sigma-Aldrich)

Tyazolblau (Carl Roth)

Zimtaldehyd (Sigma-Aldrich)

## Molekularbiologische Kits

High Capacity cDNA Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

peqGOLD Total RNA Kit (Peqlab Biotechnology GmbH)

Serotonin sensitiv ELISA-Kit (DLD Diagnostika, Hamburg, Deutschland)

SYBR Green Mastermix (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)

## qRT-PCR Primer

*GAPDH* (VBC-Biotech, Österreich)

*GLUT2* (Sigma-Aldrich, Österreich)

*HPRT* (Sigma-Aldrich, Österreich)

*SGLT1* (Sigma-Aldrich, Österreich)

Tabelle 1: Sequenzen und Produktlänge der verwendeten Primer

Genname	Forward Primer	Reverse Primer	Produktlänge (bp)
<b><i>GLUT2</i></b>	CATGCTCTGGTC CCTGTC TGTATC	AACCCCATCAA GAGAGCT CCAACT	150
<b><i>SGLT1</i></b>	CCGATATCTCCA TCATCG TTATCTAC	CACGATTGGTG GAAAACA TAGC	78
<b><i>HPRT</i></b>	TGCTCGAGATGT GATGAAGGAG	ATAGCCCCCCTT GAGCACAC	70
<b><i>GAPDH</i></b>	AGGTCGGAGTC AACGGATTG	GGGGTCATTGA TGGCAACAATA	95

## **3.2 Zellkultur**

Die Caco-2-Zelllinie (ATCC) wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - angereichert mit 10 % FBS (Fetal bovine serum), 2 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin - in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierung sowie das Passagieren und der Mediumwechsel der Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellkulturen wurden täglich begutachtet, um mögliche Veränderungen wie Ablösung der Zellen oder Kontaminationen festzustellen.

Außerdem zeigte der im Medium enthaltene pH-Indikator Phenolrot durch einen Farbumschlag ins Gelbe an, ob ein Mediumwechsel notwendig war, da im Verlauf des Nährstoffverbrauchs von den Zellen pH-reduzierende Stoffwechselprodukte gebildet werden, die für die Zellen toxisch sind.

### **3.2.1 Auftauen der Zellen**

Die gefrorenen Zellen wurden aus dem Flüssigstickstofftank entnommen und so schnell wie möglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, da die kryokonservierten Zellen als Gefrierschutzmittel 10 % DMSO enthalten, welches bei 37°C in dieser Konzentration toxisch ist. Die aufgetauten Zellen wurden zu einem bereits vorbereiteten Medium hinzugefügt und der DMSO-Gehalt auf 1 % verdünnt.

Danach wurde bei 25°C 10 min lang bei 115 x g zentrifugiert und im Anschluss daran der Überstand verworfen. Nach Zugabe von frischem Kultivierungsmedium wurde das Zellpellet resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde nun in eine Zellkulturflasche überführt und unter den oben genannten Bedingungen (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

### **3.2.2 Passagieren und Ausstreuen der Zellen**

Nach Erreichen einer 80 – 90 prozentigen Konfluenz in den Zellkulturflaschen wurden die Zellen passagiert. Vor der Verwendung wurden alle Reagenzien im Wasserbad bei 37°C aufgewärmt oder aufgetaut, wobei darauf geachtet wurde, Trypsin nicht zu lange zu erwärmen, um eine Inaktivierung durch Selbstverdau zu vermeiden. Zunächst wurde das alte Medium in der Zellkulturflasche entfernt und mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bevor anschließend 5 min bei 37°C mit Trypsin inkubiert wurde, um die Zellen vom Boden abzulösen. Durch Zugabe von frischem Medium in die Zellkulturflasche wurde das Trypsin anschließend inaktiviert.

Vor der Ermittlung der Zellzahl wurden die Zellen mittels Trypanblau gefärbt, um die lebenden Zellen zu bestimmen. Da sich für Caco-2-Zellen eine 1:5 Verdünnung eignet, wurden 20 µL der Zellsuspension mit 80 µL Trypanblau in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Nach Auftragen der gefärbten Zellsuspension auf das Hämatomometer konnten unter dem Mikroskop durch Differenzieren zwischen toten und lebenden Zellen letztere ausgezählt werden. Für die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension wurde die ermittelte Zellzahl der Großquadrate mit dem Verdünnungsfaktor und dem Zählkammerfaktor von  $10^4$  multipliziert.

Die gewünschte Menge an Zellsuspension wurde nun in der Zellkulturflasche weitergeführt und die Zellen je nach durchgeföhrtem Versuch in 96-Well-Platten ( $65 \times 10^3$  Zellen/Well), 24-Well-Platten ( $3,98 \times 10^5$  Zellen/Well) und 6-Well-Platten ( $1,95 \times 10^6$  Zellen/Well) ausgestreut und über einen Zeitraum von 21 Tagen ausdifferenziert, wobei alle zwei Tage ein Mediumwechsel erfolgte. Die Zellen wurden jeweils bis zu einer Passagernummer von 21 weitergeführt.

## **3.3 Methoden**

### **3.3.1 MTT-Test**

Um auszuschließen, dass die in den Versuchen eingesetzten Konzentrationen der Substanzen toxisch sind, wurden MTT (Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium) - Tests in

mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt. Der MTT-Test basiert auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid zum blau-violett gefärbten Formazan, die unter Beteiligung der reduzierten Pyridinnukleotide NADH und in geringerem Ausmaß auch NADPH erfolgt. Die Reduktion des MTT ist mit Enzymen des endoplasmatischen Retikulums assoziiert, aber auch Succinat kann über die mitochondriale Succinatdehydrogenase in der MTT Reduktion als Elektronendonator agieren. Allerdings ist die letztere Reaktion langsam und trägt nur wenig zur gesamten zellulären MTT Reduktion bei [Berridge und Tan, 1993; Berridge et al., 1996].

Eine reduzierte Formazanbildung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen zeigt eine Beeinträchtigung der Zellproliferation durch die getesteten Substanzen an und dient als Maß für die Zellviabilität.

Im Zuge der Probenvorbereitung wurden NaHED, Phlorizin und Phloretin für jeden Versuch frisch eingewogen und in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (mit  $\text{NaHCO}_3$ , ohne Phenolrot, Calciumchlorid und Magnesiumsulfat)/HEPES (20 mM)-Puffer gelöst. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in Wasser, wurde Phlorizin zunächst in Ethanol und Phloretin in DMSO als jeweils 1000-fach konzentrierte Stammlösung hergestellt.

Für die Durchführung des MTT-Tests in 96-Well-Platten wurde das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellen eine Stunde bei 37°C in glukosefreiem Medium (90  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ) inkubiert, um eine Synchronisierung der Zellen zu forcieren. Anschließend erfolgte eine ebenfalls einstündige Inkubation mit den Testsubstanzen (10  $\mu\text{L}/\text{Well}$ ) NaHED, Phlorizin oder Phloretin allein oder in den Kombinationen NaHED und Phlorizin bzw. NaHED und Phloretin. Die jeweils mitgeführten Kontrollen, auf die die zu testenden Substanzen bezogen werden, sowie die finalen Konzentrationen der Substanzen auf der Reaktionsplatte sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2: Probenplan der MTT-Tests

Testsubstanz (finale Konzentration)	Kontrolle
NaHED (0,001 µM/ 0,01 µM/ 0,1 µM/ 1 µM/ 10 µM/ 100 µM)	HBSS/HEPES-Puffer
Phlorizin (0,5 µM/ 5 µM/ 50 µM/ 500 µM)	HBSS/HEPES-Puffer + 0,1 % Ethanol
Phloretin (1 µM/ 10 µM/ 100 µM/ 1000 µM)	HBSS/HEPES-Puffer + 0,1 % DMSO
NaHED (100 µM) + Phlorizin (0,5 µM/ 5 µM/ 50 µM)	NaHED (100 µM) + 0,1 % Ethanol
NaHED (100 µM) + Phloretin (1 µM/ 10 µM/ 100 µM)	NaHED (100 µM) + 0,1 % DMSO

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium entfernt und die Zellen wurden etwa 15 min bei 37°C mit 100 µL MTT Working Solution (MTT-Stammlösung und serumfreies Medium (DMEM, 2 % L – Glukose, 1% P/S, FBS frei) im Verhältnis 1:6 inkubiert. Für die Herstellung der MTT-Stammlösung wurden 5 mg/ml Tyazolblau in PBS gelöst und filtriert. Nach Entfernen des MTT – Reagenz erfolgte die Zugabe von 150 µL DMSO, um die blauen wasserunlöslichen Formazankristalle zu lösen. Im Anschluss daran wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm die Absorption ermittelt.

### 3.3.2 Mykoplasmen-Test

Durch einen möglichst sterilen Umgang mit Zellkulturen wird versucht, Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Aber auch Mykoplasmen stellen ein häufiges Problem bei der Arbeit mit Zellkulturen dar und können zu nicht verlässlichen oder falschen Ergebnissen in Zellkulturexperimenten führen, da sie um

Nährstoffe konkurrieren oder sich störend auf den Zellstoffwechsel auswirken können. Bei Mykoplasmen handelt es sich um kleine, zellwandlose Prokaryoten, die der Klasse Mollicutes zugeordnet werden [Drexler und Uphoff, 2002; Gstraunthaler und Lindl, 2013]. Sie können unbemerkt über längere Zeiträume sowohl intra- als auch extrazellulär in Kulturen überdauern und weisen Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika auf. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 30 % der Zellkulturen mit Mykoplasmen kontaminiert sind, wobei dieser Wert in den vielen durchgeföhrten Untersuchungen sehr stark variiert [Drexler und Uphoff, 2002].

Es ist daher empfehlenswert, Zellkulturen regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen zu überprüfen. Ein zuverlässiges und leicht durchführbares Verfahren ist etwa die Färbung der Mykoplasmen-DNA mit Farbstoffen, die sich in die DNA einlagern können. Um in der vorliegenden Arbeit eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde an der verwendeten Caco-2-Zelllinie ein Nachweistest mit Hilfe einer DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)-Färbung durchgeführt, bei der Mykoplasmen auf diese Weise sichtbar gemacht werden [Gstraunthaler und Lindl, 2013].

Im Rahmen der Durchführung wurde ein Deckgläschen in eine Petrischale gelegt und anschließend die Zellen - in Form weniger Tropfen Zellsuspension - ausgestreut. Um anwachsen zu können, wurden die Zellen für einen Tag im Inkubator bei 37°C kultiviert. Danach wurden die angewachsenen Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert und der Objektträger mit einigen Tropfen DAPI/SR 101-Lösung (200 mM TRIS, 200 mM NaCl, 8 µM DAPI, 50 µM Sulforhodamin 101, ph = 7,6) angefärbt.

Nach dem Auftragen eines Tropfens Immersionsöl wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zytoplasmabroteine werden durch SR 101 rot gefärbt, während die DNA durch Bindung von DAPI an Hand der blauen Färbung nachweisbar ist. Bei Vorliegen einer Kontamination mit Mykoplasmen sind zusätzlich zu den blau gefärbten Zellkernen kleine blaue Punkte in Zytoplasma und Interzellularräum erkennbar [Gstraunthaler und Lindl, 2013].

### 3.3.3 Analyse der zellulären Glukoseaufnahme

Um die Glukoseaufnahme in die Zellen zu untersuchen, wurden ein Assay, basierend auf Inkubation der Caco-2-Zellen mit 2-NBDG (2-[*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]- 2-deoxyglukose), einem fluoreszierenden Glukoseanalog, und eine anschließende Fluoreszenzdetektion durchgeführt. Dieser sensitive und nicht radioaktive Assay eignet sich für das direkte und schnelle Messen der Glukoseaufnahme durch lebende Zellen [Zou et al., 2005].

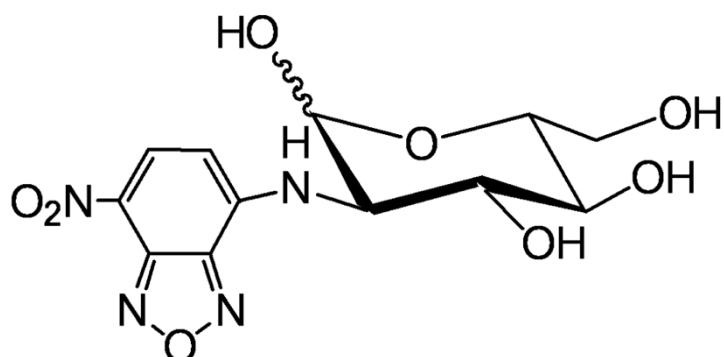


Abb.10: 2-[*N*-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]- 2-deoxyglukose

Für die Durchführung dieses Assays wurden Caco-2-Zellen in 96-Well-Platten ausdifferenziert. Im Zuge der Probenvorbereitung wurden die zu testenden Substanzen NaHED, Phlorizin und Phloretin zunächst in HBSS/HEPES-Puffer gelöst. Phlorizin und Phloretin wurden, wie unter der Durchführung des MTT-Tests beschrieben, in Ethanol bzw. DMSO vorgelöst.

Am Versuchstag wurde zunächst das Kulturmedium von den Zellen entfernt, bevor diese eine Stunde im Inkubator bei 37°C mit glukosefreiem DMEM (90 µL /Well) inkubiert wurden, um wieder eine Synchronisierung der Zellen zu forcieren. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit NaHED, Phlorizin oder Phloretin allein oder im Zuge der Koinkubationsversuche zur Bestimmung der beteiligten Glukosetransporter mit NaHED und Phlorizin bzw. NaHED und Phloretin gemeinsam 30 min inkubiert. Als Kontrollen wurde HBSS/HEPES-Puffer mit oder ohne Zusatz von Ethanol bzw. DMSO

mitgeführt. Für die Koinkubationsversuche wurde NaHED in HBSS/HEPES-Puffer mit Ethanol bzw. DMSO als Kontrolle verwendet. Die finalen Konzentrationen der Testsubstanzen sowie die zugehörigen Kontrollen entsprechen den Angaben des Probenplans (Tabelle 2), der zur Durchführung der MTT-Tests verwendet wurde. Die Konzentrationen der Inhibitoren, die allein inhibierende Wirkungen auf die Glukoseaufnahme in Caco-2-Zellen zeigten, wurden in den Koinkubationsversuchen nicht eingesetzt. Somit sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche signifikante Effekte auf die Glukoseaufnahme bei gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und den Inhibitoren nur auf die starke Wirkung des Inhibitors zurückzuführen sind.

Im nächsten Schritt wurden 50 µL 2-NBDG pro Well in einer finalen Konzentration von 200 µM hinzupipettiert und weitere 30 min inkubiert. Da 2-NBDG als fluoreszierende Verbindung lichtempfindlich ist, wurde ab diesem Schritt unter Vermeidung von Tageslicht gearbeitet. Um die Glukoseaufnahme in die Zellen nach der 30-minütigen Behandlung zu stoppen, wurde schließlich dreimal mit eiskalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bevor letztendlich mittels Tecan Infinite Plate Reader (Tecan, Menningen, Schweiz) die Fluoreszenz der Zellen in 100 µL PBS bei 480 nm Exzitation sowie 550 nm Emission gemessen wurde.

### **3.3.4 Untersuchung der *SGLT1* und *GLUT2* Expression**

#### **3.3.4.1 Inkubation und RNA-Isolierung**

Um den Einfluss von NaHED auf die Genexpressionslevel der Glukosetransporter GLUT2 und SGLT1 zu untersuchen, wurden die Caco-2-Zellen in 6-Well-Platten ausgestreut und nach der üblichen Vorgehensweise über einen Zeitraum von 21 Tagen ausdifferenziert.

Im Zuge des Versuchs wurde zunächst wieder das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellen eine Stunde mit glukosefreiem DMEM (2700 µl/Well) vorinkubiert. Für die Probenvorbereitung wurden nach dem bekannten Schema NaHED, Phlorizin und Phloretin in HBSS/HEPES- Puffer gelöst, wobei die Inhibitoren zunächst wieder in

Ethanol bzw. DMSO vorgelöst wurden. Die Substanzen (300 µl/Well) wurden im Anschluss daran gemäß dem Probenplan (Tabelle 3) auf die 6-Well-Platten aufgetragen und über die Zeiträume von 15, 30 und 60 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 3: Probenplan für Genexpression

<b>Testsubstanz (finale Konzentration)</b>	<b>Kontrolle</b>
NaHED (100 µM)	HBSS/HEPES-Puffer
NaHED (100 µM) + Phlorizin (50 µM)	NaHED (100 µM) + 0,1 % Ethanol
NaHED (100 µM) + Phloretin (100 µM)	NaHED (100 µM) + 0,1 % DMSO

Die im Anschluss an die Inkubation stattfindende RNA-Isolierung erfolgte mittels peqGOLD Total RNA Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH) gemäß der Anleitung des Herstellers. Dieser Kit kombiniert selektive und reversible Bindungseigenschaften von Silikamembranen und ermöglicht mittels optimierter Puffersysteme die Reinigung von bis zu 100 µg nicht degraderter RNA.

Die aufzuarbeitenden Zellen in den Zellkulturplatten wurden zunächst unter denaturierenden Bedingungen lysiert, wobei alle vorhandenen RNasen und sonstigen Enzyme effizient inhibiert werden. Das Lysat wurde dann auf eine DNA – Removing Column geladen, 1 min bei 12 000 x g zentrifugiert und der Säulendurchfluss anschließend mit einem identischen Volumen an Ethanol (70 %) versetzt. Daraufhin wurde der Säulendurchfluss auf eine RNA- Binding Column geladen und 1 Minute bei 10 000 x g zentrifugiert, um die RNA – Moleküle an die enthaltene Silikamembran zu binden. Zellulärer Überstand und andere Kontaminationen konnten durch weitere Waschschritte mit speziellen Puffern und nachfolgender Zentrifugation (15 sec bei 10 000 x g) entfernt werden. Letztendlich wurde die Säule durch Zentrifugieren (2 min bei 10 000 x g) vollständig getrocknet und die RNA mit RNase – freiem Wasser eluiert (1 min bei 5000 x g).

### **3.3.4.2 Reverse Transkription**

Im Zuge der reversen Transkription erfolgt ausgehend von einem RNA Template mittels reverser Transkriptase die Bildung komplementärer DNA (cDNA), welche direkt als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR verwendet werden kann.

Die zuvor isolierte RNA wurde nun mit Hilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies Corporation) in cDNA umgeschrieben. Um die Reinheit der RNA zu überprüfen sowie zur Bestimmung der für den Kit benötigten RNA Konzentrationen der Proben, wurde zunächst mittels einer nanoQuant Platte auf einem Infinite Plate Reader die Absorption der isolierten RNA, die ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm hat, bei Wellenlängen von 260, 280 sowie 230 nm bestimmt. Die Ermittlung zweier Ratios, nämlich  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$ , sollte Aufschluss über die Qualität der RNA geben. Der Ratio von  $A_{260}/A_{280}$  sollte Werte zwischen 1,8 und 2,1 annehmen. Liegen die Werte unter 1,8, so deutet dies auf die Anwesenheit von Proteinen, Phenolen oder anderen Kontaminanten hin, die bei einer Wellenlänge von 280 nm stark absorbieren. Auch der Ratio von  $A_{260}/A_{230}$  sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Ist dieses Verhältnis zu niedrig, kann wiederum von der Anwesenheit von Kontaminanten ausgegangen werden, die bei einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren.

Für die Durchführung der reversen Transkription wurde zunächst gemäß Anleitung des Kits der Mastermix, bestehend aus 10X RT Puffer, 25X dNTP Mix (100 mM), 10X RT Random Primer, Reverser Transkriptase, RNase Inhibitor sowie nukleasefreiem Wasser, auf Eis hergestellt (Tabelle 4). Danach wurden 10 µL der jeweiligen RNA-Proben (bestehend aus 2 µg RNA in 10 µL nukleasefreiem Wasser) sowie 10 µL des Mastermix in jedes Well der 96-Well-PCR-Platten pipettiert und diese kurz zentrifugiert, bevor die RNA mittels PCR unter den im KIT angegebenen Bedingungen für Temperatur und Zeit (25°C für 10 min/ 37°C für 120 min/ 85°C für 5 min/ 4°C) in cDNA umgeschrieben wurde. Vor der weiteren Verwendung wurde die cDNA schließlich 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Tabelle 4: Ansatz zur Herstellung des Mastermix gemäß Hersteller

<b>Komponente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)/Probe</b>
10X RT Buffer	2,0
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8
10X RT Random Primer	2,0
MultiScribe <sup>TM</sup> Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Nuklease-free H <sub>2</sub> O	3,2
<b>Gesamtvolumen/Reaktion</b>	<b>10,0</b>

### 3.3.4.3 Genexpression mittels quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine molekularbiologische Methode zur Amplifikation spezifischer DNA - Sequenzen dar. Das Prinzip dieser Vervielfältigungsmethode beruht auf den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation, die einen PCR-Zyklus ausmachen. Durch Wiederholen dieser Zyklen wird der Gehalt der spezifischen DNA - Sequenzen vervielfacht [Anton et al., 2006].

Im Zuge der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA durch Hitzeeinwirkung über 90°C in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Durch anschließende Temperatureverringerung können im Verlauf des Primer-Annealing die Forward- und Reverse-Primer an die spezifischen komplementären DNA-Sequenzen hybridisieren. Im dritten Schritt des PCR-Zyklus werden die Primer schließlich durch das Enzym DNA-Polymerase unter geeigneten Temperaturbedingungen mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten elongiert [Anton et al., 2006].

Die quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) kann durch die Messung von Fluoreszenz – Signalen zur Quantifizierung der gewonnenen DNA genutzt werden. Das PCR-Gerät misst die Anreicherung der PCR Produkte im Zuge der Amplifikation durch die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, wie etwa SYBR Green. SYBR Green interkaliert in die gebildete DNA und führt durch Konformationsänderungen des Farbstoffs zur Fluoreszenz-Emission. Die Fluoreszenz steigt mit jedem Amplifikationszyklus an und wird nach jeder Elongationsphase erfasst. Ein Nachteil der Verwendung von SYBR Green ist jedoch, dass der Farbstoff unspezifisch an jede DNA, wie etwa auch an Primer-Dimere, bindet. Durch eine nachfolgende Schmelzkurvenanalyse kann jedoch anhand der spezifischen Schmelztemperaturen zwischen den spezifischen PCR-Produkten und anderen Produkten, wie Primer-Dimeren, unterschieden werden [Anton et al., 2006].

Im Anschluss an die reverse Transkription in cDNA erfolgte die Analyse der Genexpression von humanen *SGLT1* (Sigma-Aldrich, Österreich) und *GLUT2* (Sigma-Aldrich, Österreich) mithilfe quantitativer Real Time PCR (qRT-PCR). Die Spezifität des *GLUT2* Primers wurde von Wilder-Smith et al. [2014] mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Die Primersequenz von *SGLT1* wurde nach Grether-Beck et al. [2012] verwendet und laut NCBI Primerblast Datenbank als spezifisch angegeben, da keine anderen Targetsequenzen gefunden wurden.

Zur Normalisierung wurde auch die Expression von *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase) (VBC-Biotech, Wien, Österreich) und *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase) (Sigma-Aldrich, Österreich), die sich bereits als gute Referenzgene in Caco-2-Zellen erwiesen hatten, bestimmt [Riedel et al., 2014; Rohm et al., 2015]. Die im Zuge der PCR verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Die Real Time PCR wurde mit einem StepOnePlus Real Time PCR-Gerät unter Verwendung eines SYBR Green Mastermix (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Die Herstellung des Mastermix, bestehend aus SYBR Green Mastermix, Forward- und Reverse-Primer sowie nukleasefreiem Wasser, erfolgte wieder auf Eis (Tabelle 5). Insgesamt 29,7 µL dieses Mastermix wurden mit 3,3 µL der cDNA-Proben (1:10 verdünnt) in einem Tube angesetzt und anschließend mit einem

Volumen von 10 µL im Dreifachansatz in die PCR-Platten pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und kurz zentrifugiert, bevor das PCR-Programm gestartet wurde.

Tabelle 5: Herstellung des Mastermix

Komponente	Volumen (µL)
SYBR Green Mastermix	412,5
Forward-Primer	313,5
Reverse-Primer	8,2
Nukleasefreies Wasser	8,2

### 3.3.5 Serotoninfreisetzung

#### 3.3.5.1 Stimulierung der Serotoninfreisetzung

Für die Analyse der Serotoninausschüttung wurden 24-Well-Platten mit Caco-2-Zellen ausgestreut und wie beschrieben 21 Tage lang ausdifferenziert.

Am Versuchstag wurden zunächst das Kultivierungsmedium abgesaugt und die Zellen mit 300 µL PBS gewaschen. Um die Serotoninausschüttung in Caco-2-Zellen zu untersuchen, wurde NaHED gelöst in Krebs-Ringer/HEPES-Puffer (KRHB, 128 mM NaCl, 1,9 mM KCl, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,4 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,3 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, pH = 7,4) mit 0,1 % iger Ascorbinsäure auf die Zellen aufgetragen. Ascorbinsäure wurde zugefügt, um das empfindliche Serotonin vor oxidativem Abbau zu schützen. Zusätzlich wurde unter Lichtausschluss gearbeitet, um Serotoninabbau durch Sonneneinstrahlung ebenfalls zu verhindern. Als Kontrolle wurde Krebs-Ringer/HEPES-Puffer mit 0,1 % iger Ascorbinsäure alleine auf die Zellen pipettiert.

Als Positivkontrolle wurde Zimtaldehyd in KRHB mit 0,1%iger Ascorbinsäure verwendet. Wie bereits erwähnt, konnten Nozawa et al. [2009] zeigen, dass Zimtaldehyd in enterochromaffinen Zellen zu einer gesteigerten Serotoninfreisetzung führte. Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass Zimtaldehyd in den Caco-2-Zellen ebenfalls eine gesteigerte Serotoninausschüttung bewirkte und sich daher als Positivkontrolle eignete.

Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen sind in der nachfolgenden Tabelle 6 aufgelistet, wobei die Proben mit einem Inkubationsvolumen von 300 µL immer im Doppelansatz bestimmt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Zellüberstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung für maximal zwei Wochen bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 6: Probenplan zur Untersuchung der Serotoninausschüttung

Substanz (Konzentration)
Krebs-Ringer/HEPES-Puffer + 0,1 % iger Ascorbinsäure als Kontrolle
Zimtaldehyd (5 mM und 500 µM) als Positivkontrolle
NaHED (0,1 µM/ 1 µM/ 10 µM/ 100 µM)

### 3.3.5.2 Bestimmung der Serotonininkonzentration

Die Serotonininkonzentrationen im Zellüberstand wurden mittels ELISA-Kit (Serotonin sensitiv ELISA, DLD Diagnostika) erfasst, einem kompetitiven Enzymimmunoassay, der eine quantitative Bestimmung von derivatisiertem Serotonin ermöglicht.

Das Prinzip dieses kompetitiven Assays ist die Konkurrenz des derivatisierten Serotonins um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Sobald sich das Gleichgewicht im System eingestellt hat, werden nicht gebundene Antigene und Antigen-Antikörper-Komplexe durch Waschschrifte entfernt. Nach Inkubation mit

Peroxidase konjugierten Antikörpern und nachfolgender Zugabe einer Tetramethylbenzidin (TMB) – Lösung, kommt es zu einer Farbreaktion, deren Intensität mittels Tecan Infinite Plate Reader bestimmt wird.

Die untere Nachweisgrenze des Kits beträgt 0,39 pg/sample und der Intra-Assay-Variationskoeffizient liegt bei 7 – 9 %.

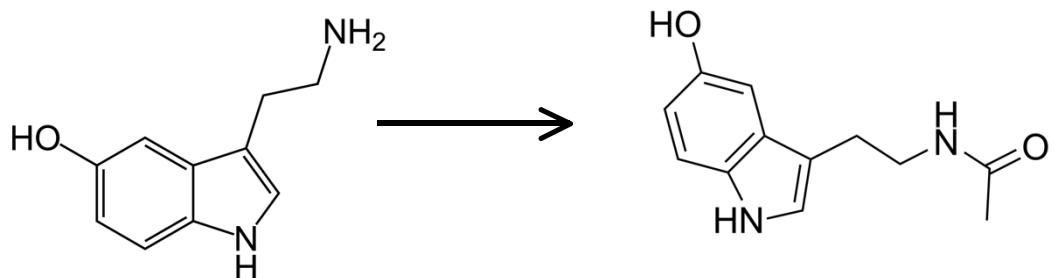


Abb.11: Derivatisierung des Serotonin zu N-Acetylserotonin

Die Derivatisierung von Serotonin in den zu testenden Proben und den mitgelieferten Kontrollen und Standards erfolgte während der Probenvorbereitung, wo der Neurotransmitter durch Acylierungsreagenz in N-Acetylserotonin umgewandelt wurde. Nach der Probenvorbereitung wurden die Standards, Proben und Kontrollen in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert und 15 – 20 Stunden bei 2 – 8°C inkubiert. Daraufhin wurde nach einem Waschschritt das IgG-Peroxidase-Konjugat in die Vertiefungen pipettiert. Nach 60-minütiger Inkubation und einem weiteren Waschschritt wurde Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung zugegeben, welches durch die Peroxidase umgesetzt wurde. Nach etwa 15 min wurde die Reaktion gestoppt und bei einer Messwellenlänge von 450 nm sowie 405 nm die optische Dichte bestimmt. Die Konzentration des gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexes ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Antigens in der Probe.

### **3.3.5.3 Bestimmung des DNA-Gehalts**

Zur Normalisierung der ermittelten Serotonin-Konzentrationen wurde der Serotonin-Gehalt auf den DNA-Gehalt der einzelnen Proben bezogen. Dafür wurden die Zellen direkt nach den Inkubationsversuchen erneut mit PBS gewaschen, mit einem Natrium-Lauryl-Sarkosinat (1 %) enthaltenden Puffer lysiert und für mindestens einen Tag eingefroren, um die Zelllyse zu gewährleisten. Für die DNA-Messung wurden die Platten wieder aufgetaut, der Lysepuffer mit 800 µM PBS verdünnt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die sehr zähflüssige DNA homogenisiert. Der DNA-Gehalt wurde anschließend mithilfe einer nanoQuant Platte auf einem Infinite Plate Reader (Tecan, Menningen, Schweiz) photometrisch erfasst.

### **3.3.6 Statistische Auswertung**

#### **Auswertung der MTT-Tests**

Zur Auswertung der MTT-Tests wurden die ermittelten Daten auf den Mittelwert der jeweiligen Lösungsmittel-Kontrollen bezogen und in Prozent angegeben. Unter Verwendung der Software SigmaPlot 12.0 wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test auf statistische Signifikanz getestet und signifikante Unterschiede in Form von \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$  angegeben. Alle Versuche wurden mit mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt.

#### **Auswertung der Glukoseaufnahme**

Ebenso wie bei der Auswertung der MTT-Tests wurden auch die im Zuge der Glukoseaufnahme-Assays ermittelten Daten der Fluoreszenz nach Abzug des Blindwerts in Bezug auf die Mittelwerte der entsprechenden Lösungsmittel-Kontrollen in Prozent angegeben. Ausreißer wurden zuvor mittels Nalimov-Ausreißertest ausgeschlossen. Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test erfasst (SigmaPlot 12.0) und mit \* $p<0,05$ ,

\*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$  markiert. Die graphische Darstellung erfolgte durch Angabe der Prozent der Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung.

## Auswertung der PCR-Daten

Für die Auswertung der Genexpressionsanalysen sowie zur Effizienzbestimmung der Primer wurde die Software LinRegPCR v.2012.2 verwendet. Die somit ermittelten hypothetischen Startkonzentrationen ( $N_0$ ) wurden dann zur Normalisierung auf das geometrische Mittel beider Referenzgene – *HPRT* und *GAPDH* – bezogen. Die Werte wurden dann wiederum auf die jeweiligen Kontrollen bezogen und als mittlere x-fache Änderung zu diesen angegeben. Nach Ausschließen der Ausreißer mittels Nalimov-Ausreißertest, wurden signifikante Effekte verglichen mit den Kontrollen mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test ermittelt (SigmaPlot 12.0) und durch die Markierungen \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$  angegeben.

## Auswertung des Serotonin ELISA-Kits

Für die Auswertung des Kits wurden die photometrisch erfassten OD-Werte der Standards (linear) gegen die entsprechenden Konzentrationen der Standards (logarithmisch) aufgetragen. Anhand dieser Standardkurve konnten die Konzentrationen der Kontrollen und Proben berechnet werden. Zur Normalisierung der so ermittelten Serotonin-Konzentrationen wurde der Serotoningehalt auf den bestimmten DNA-Gehalt der einzelnen Proben bezogen und schließlich, in Bezug auf den Mittelwert der Kontrollen, in Prozent  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Mittels Nalimov-Ausreißertest wurden Ausreißer ausgeschlossen, bevor durch Verwendung der Software SigmaPlot 12.0 mittels einfaktorieller Varianzanalyse und nachfolgendem Student-Newman-Keuls post-hoc Test auf statistische Signifikanz getestet wurde. Signifikante Unterschiede wurden in Form von \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  und \*\*\* $p<0,001$  angegeben.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 MTT-Tests

Ein Einfluss der verwendeten Substanzen in den eingesetzten Konzentrationen auf die Zellproliferation wurde mittels MTT-Tests ausgeschlossen. Die Ergebnisse der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED, Phlorizin und Phloretin, die zunächst als Einzelsubstanz getestet wurden, und die Ergebnisse der Koinkubationsversuche mit NaHED und Phloretin sowie NaHED und Phlorizin sind in den nachfolgenden Abbildungen (Abb. 12-16) graphisch dargestellt.

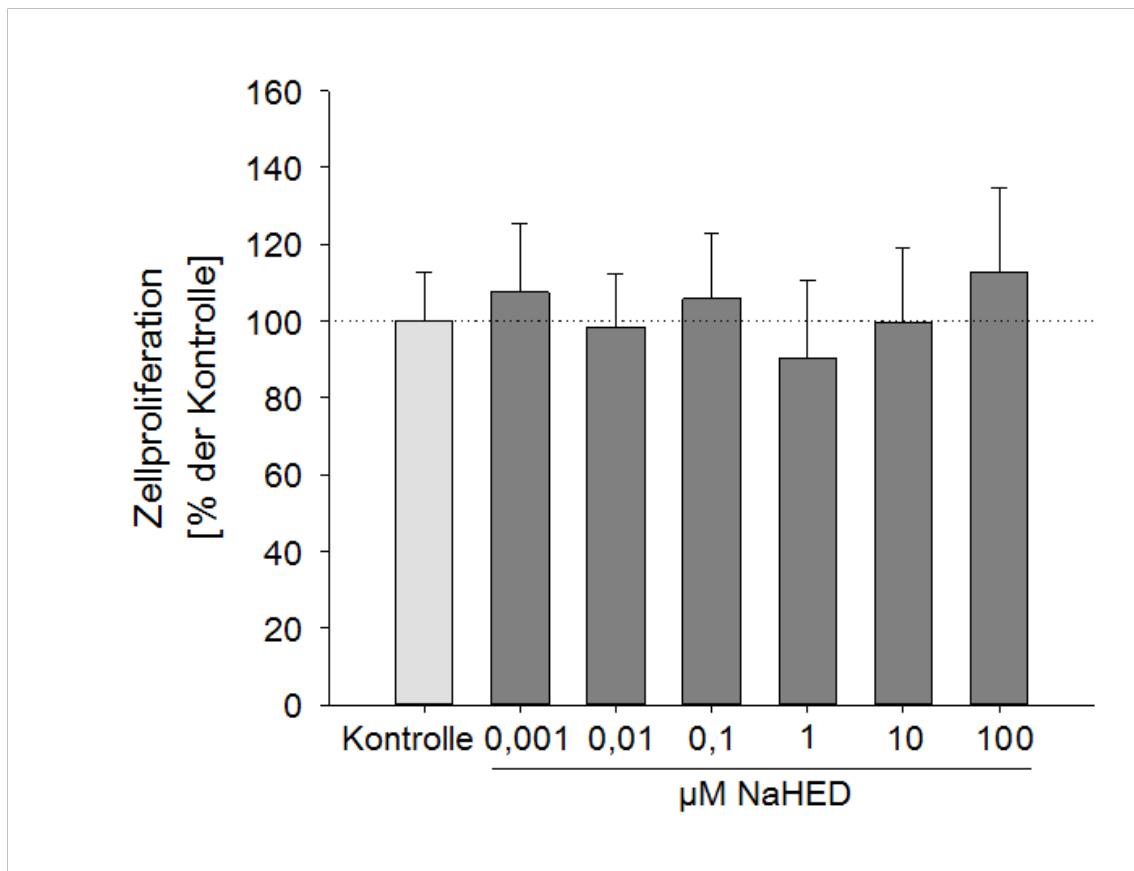


Abb.12: Zellproliferation (%) der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer)) nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED in Konzentrationen von 0,001 – 100  $\mu\text{M}$ ; n = 3 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

In Abbildung 12 ist ersichtlich, dass eine 60-minütige Inkubation der Caco-2-Zellen mit NaHED in den Konzentrationen 0,001 – 100 µM im Vergleich zur HBSS/HEPES-Puffer-Kontrolle, die gleich 100 % gesetzt wurde, keine Effekte auf die Zellproliferation zur Folge hatte. Ebenso sind nach einstündiger Behandlung mit Phlorizin in den Konzentrationen 0,5 – 500 µM im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle (Kontrolle = 100 %) keine Auswirkungen auf die Zellproliferation zu erkennen (Abbildung 13).

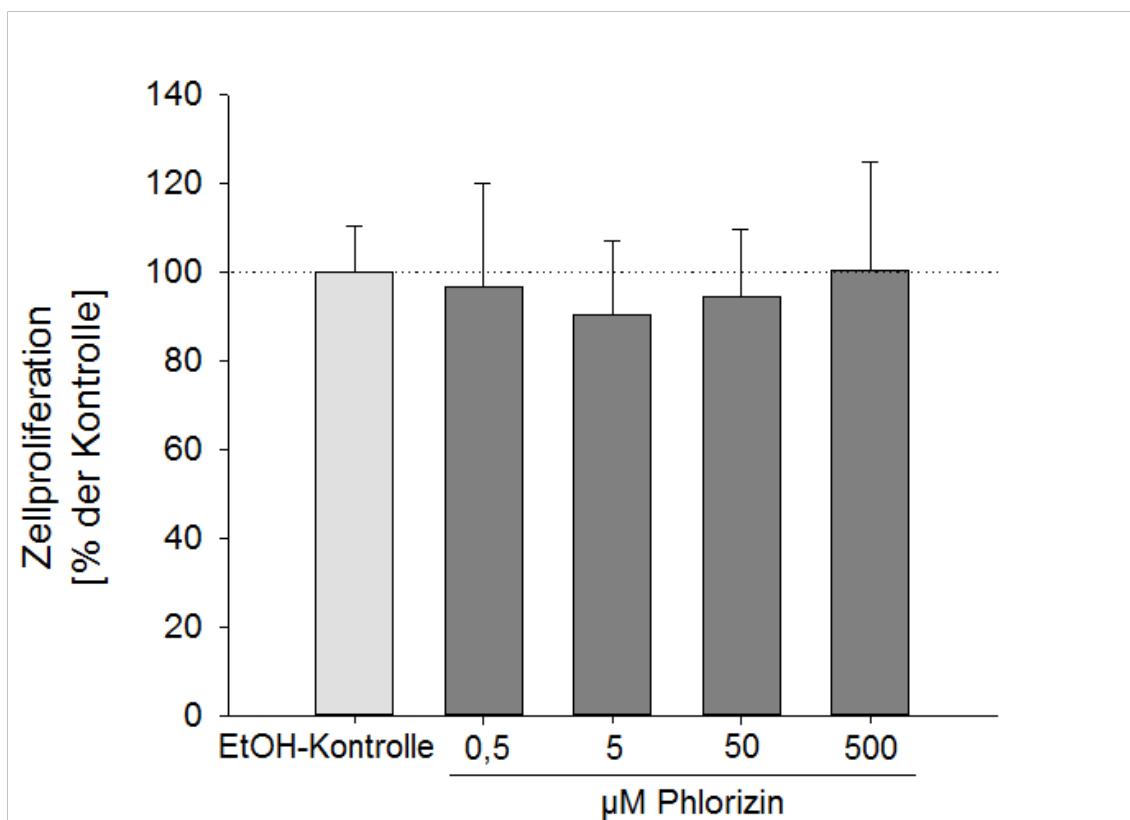


Abb.13: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1% Ethanol)) nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phlorizin in Konzentrationen von 0,5 – 500 µM; n = 3 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

Die einstündige Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin (Abbildung 14) in den Konzentrationen 1, 10 und 100  $\mu\text{M}$  zeigte im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle = 100 %) keine Auswirkungen auf die Zellproliferation. Es ist allerdings in der höchsten Konzentration (1000  $\mu\text{M}$ ) ein starker Anstieg der Zellproliferation auf 184 %  $\pm$  33,5 % ( $p<0,001$ ) im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle = 100 %) zu erkennen.

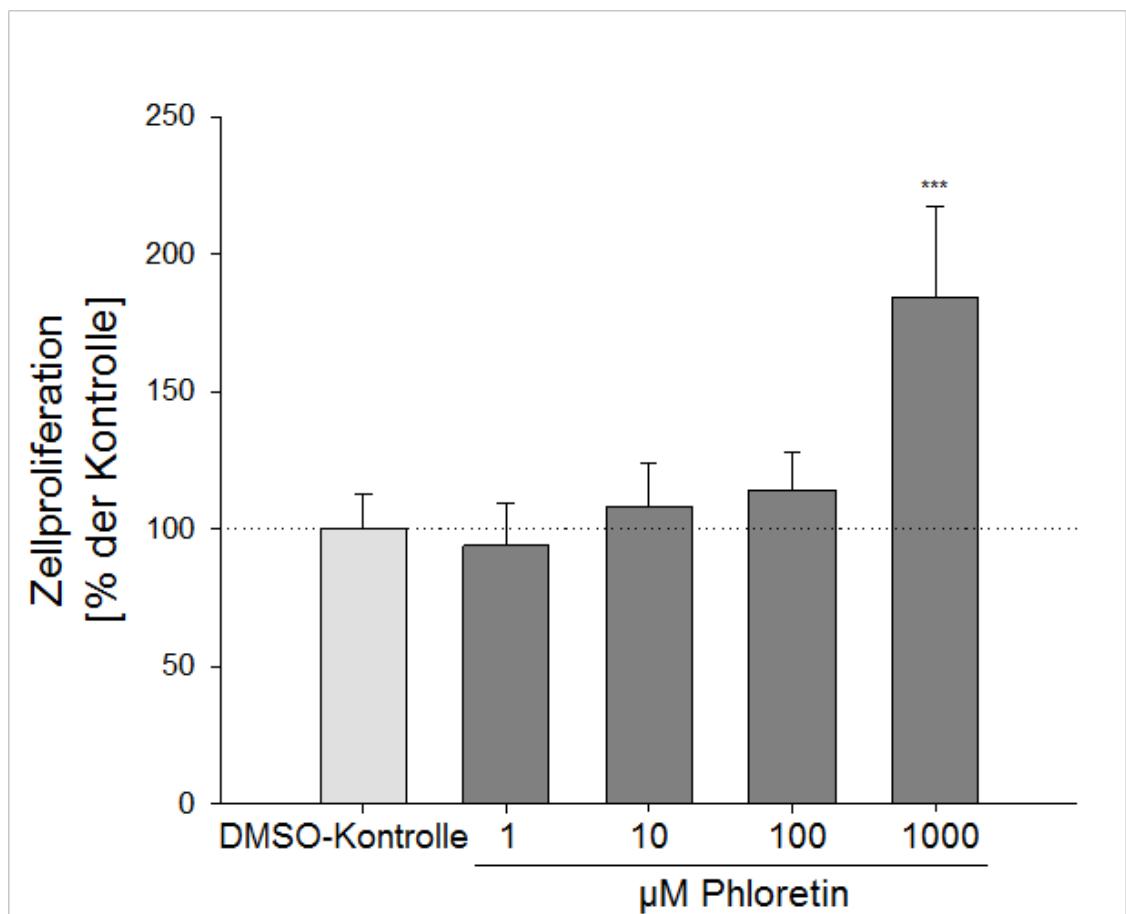


Abb.14: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1% DMSO)) nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin in Konzentrationen von 1 – 1000  $\mu\text{M}$ ;  $n = 3$  (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und als \*\*\* $p<0,001$  angegeben.

Abbildung 15 und 16 zeigen, dass Effekte auf die Zellproliferation durch die Versuchsbedingungen im Zuge der Koinkubationsexperimente ebenfalls ausgeschlossen werden konnten. Die gemeinsame Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100  $\mu$ M) und Phlorizin (0,5 – 50  $\mu$ M) ebenso wie mit NaHED (100  $\mu$ M) und Phloretin (1 – 100  $\mu$ M) über einen Inkubations-Zeitraum von 60 Minuten zeigte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Kontrolle = 100 %) keine Effekte auf die Zellproliferation.

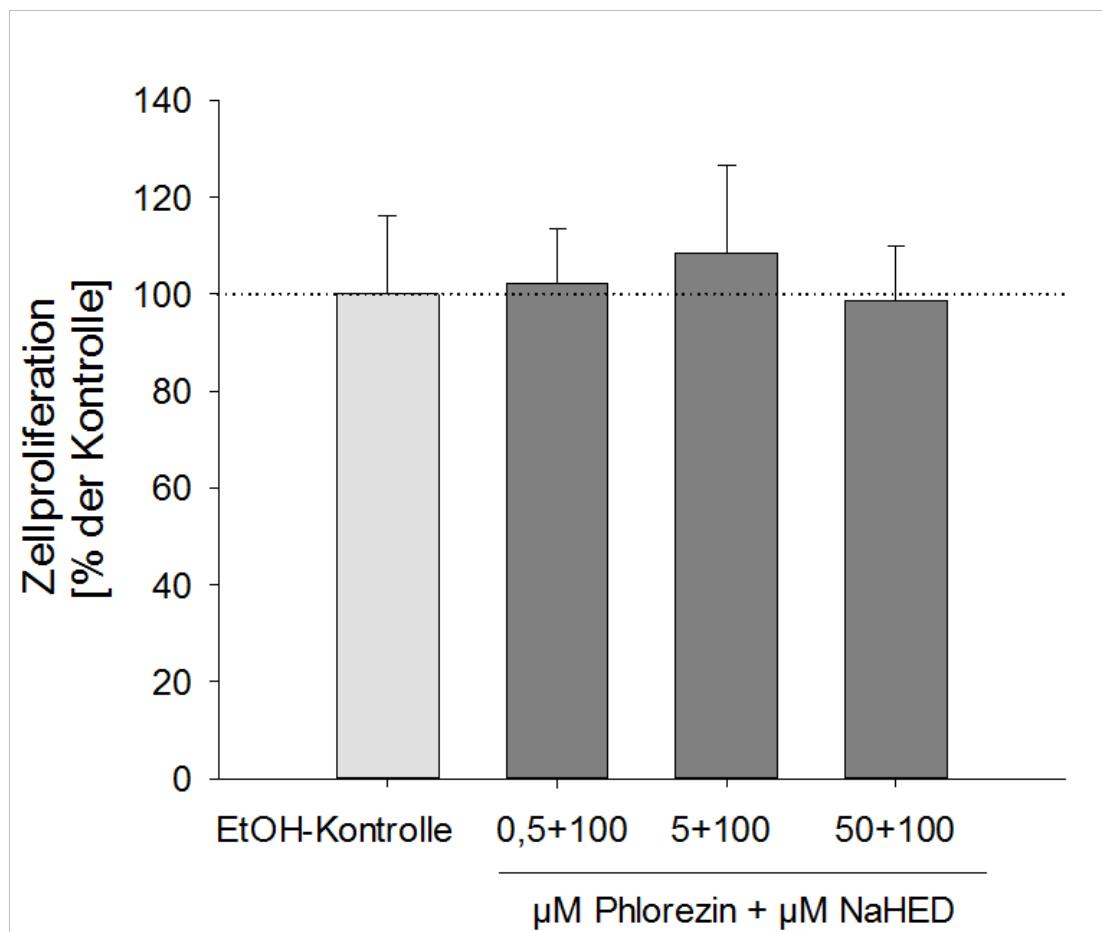


Abb.15: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % Ethanol)) nach 60-minütiger Koinkubation der Caco-2-Zellen mit NaHED (100  $\mu$ M) und Phlorizin (0,5 – 50  $\mu$ M); n = 3 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

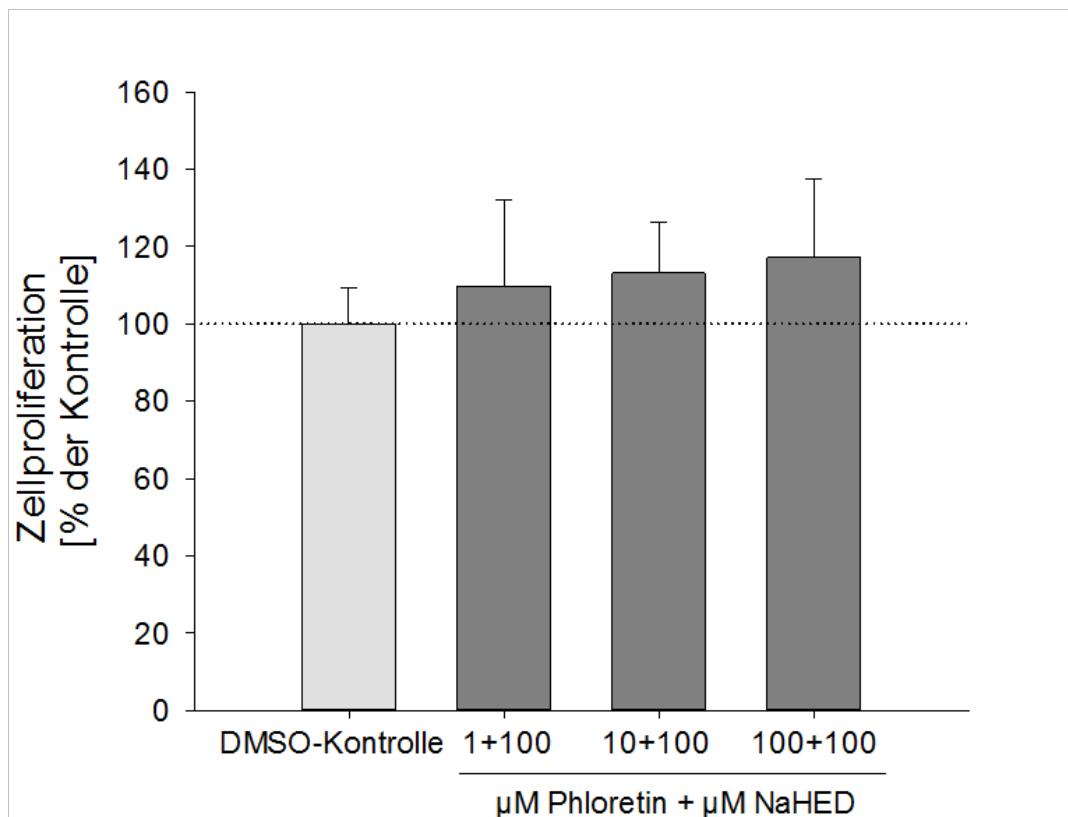


Abb.16: Zellproliferation (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % DMSO)) nach 60-minütiger Koinkubation der Caco-2-Zellen mit NaHED (100  $\mu$ M) und Phloretin (1 – 100  $\mu$ M); n = 3 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

## 4.2 Analyse der zellulären Glukoseaufnahme

### 4.2.1 Einfluss von NaHED, Phlorizin und Phloretin auf die Glukoseaufnahme

#### NaHED:

Um die erwarteten Glukoseaufnahme-steigernden Effekte des Homoeriodictyol-Natriumsalzes in Caco-2-Zellen zu bestätigen, wurden diese mit der Testsubstanz in den Konzentrationen 0,001 – 100  $\mu\text{M}$  über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, führte die Behandlung mit NaHED in der höchsten getesteten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verglichen mit der Kontrolle (Kontrolle = 100%) zu einer gesteigerte Aufnahme von Glukose von  $129\% \pm 17,5\%$  ( $p<0,001$ ). Als Testkonzentration für NaHED wurde daher in den nachfolgenden Experimenten eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

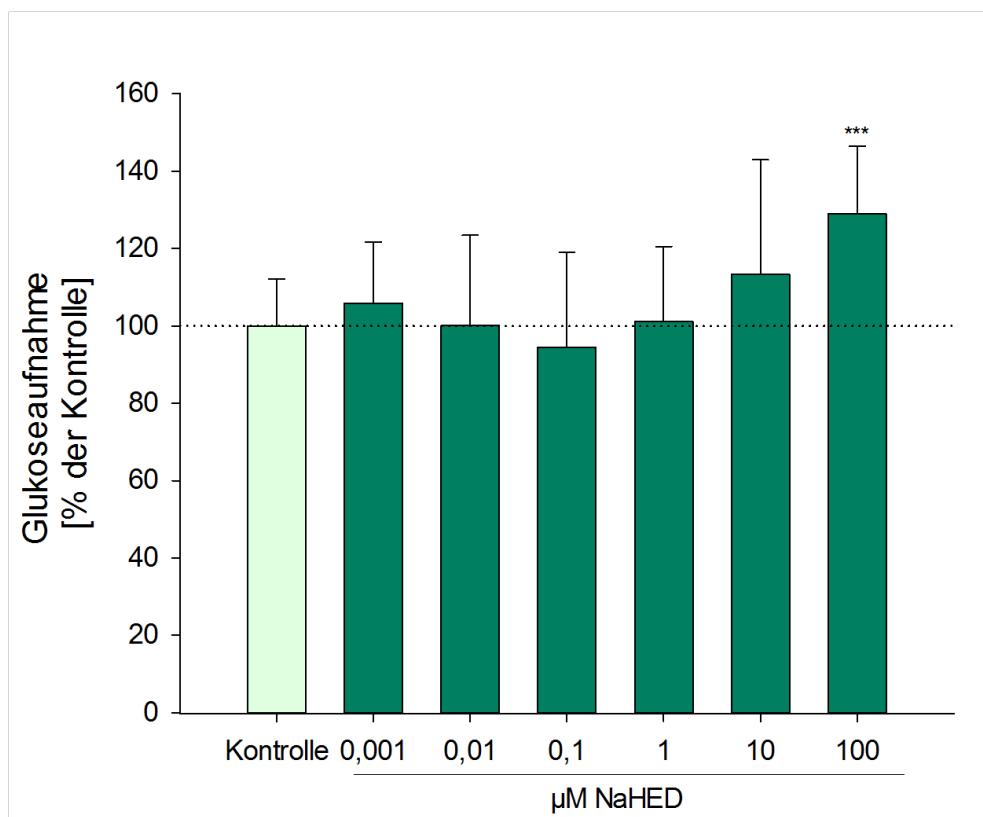


Abb.17: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer)  $\pm$  Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (0,001 – 100  $\mu\text{M}$ ); n = 8 (technische Replikate = 2-3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form von  $***p<0,001$  markiert.

### Phlorizin und Phloretin:

Um zu untersuchen, welche der in Caco-2-Zellen exprimierten Glukosetransporter an den Glukoseaufnahme-steigernden Effekten des NaHED beteiligt sind, wurden die Inhibitoren Phlorizin und Phloretin eingesetzt, die bekanntermaßen die Glukosetransporter SGLT1 und GLUT2 blockieren können.

Bevor allerdings die Caco-2-Zellen mit NaHED und den Inhibitoren gemeinsam behandelt werden konnten, war es erforderlich, die Konzentrationen von Phlorizin und Phloretin zu ermitteln, die allein keine Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme zeigten. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass mögliche Effekte im Zuge der Koinkubationsexperimente nur auf Grund eines starken Einflusses der Inhibitoren bedingt sind. Zu diesem Zweck wurde der gleiche Assay zur Bestimmung der Glukoseaufnahme auch für Phlorizin und Phloretin durchgeführt.

Wie in Abbildung 18 und 19 zu erkennen ist, zeigten die jeweils höchsten eingesetzten Konzentrationen der beiden Phenole die erwarteten inhibierenden Effekte auf die Glukoseaufnahme.

Verglichen mit den entsprechenden Kontrollen, die gleich 100 % gesetzt wurden, senkten Phlorizin in einer Konzentration von 500 µM und Phloretin in einer Konzentration von 1000 µM die Glukoseaufnahme. Nach Behandlung mit 500 µM Phlorizin sank die Glukoseaufnahme im Vergleich zur Kontrolle auf  $71,9\% \pm 13,5\%$  ( $p<0,01$ ), während eine Inkubation mit 1000 µM Phloretin im Vergleich zur Kontrolle zu einer Glukoseaufnahme von  $73,8\% \pm 4,49\%$  ( $p<0,001$ ) führte.

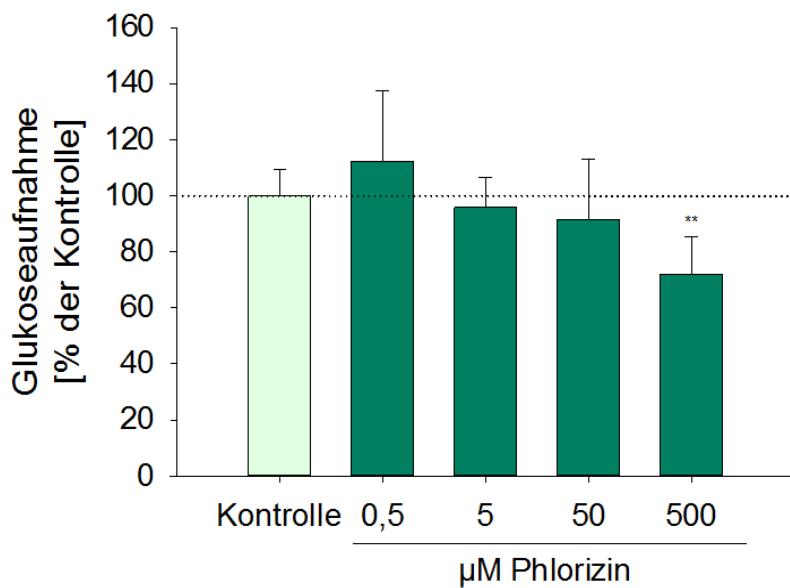


Abb.18: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % Ethanol) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phlorizin (0.5 – 500  $\mu\text{M}$ ); n = 4 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form von \*\* $p<0,01$  markiert.

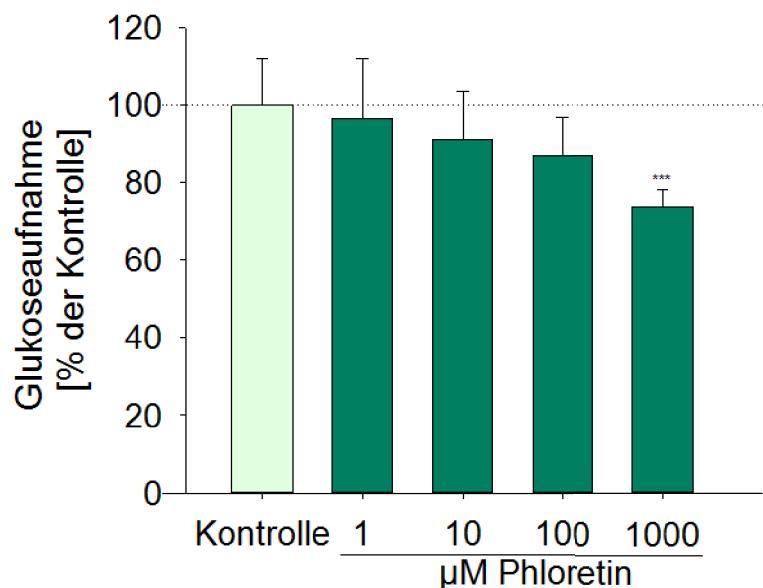


Abb.19: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit 0,1 % DMSO) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin (1 - 1000  $\mu\text{M}$ ); n = 3 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und mit der Markierung \*\*\* $p<0,001$  angegeben.

## **4.2.2 Ermittlung der beteiligten Glukosetransporter**

Der Nachweis der Glukosetransporter, die an der NaHED-bedingten gesteigerten Glukoseaufnahme beteiligt sind, erfolgte mit Hilfe von Koinkubationsversuchen, in deren Verlauf die Zellen jeweils mit den Kombinationen von NaHED und Phlorizin bzw. NaHED und Phloretin behandelt wurden.

Da die Glukoseaufnahme-steigernden Effekte von NaHED in einer Konzentration von 100 µM signifikant waren, wurde in den Koinkubationsversuchen NaHED ebenfalls in dieser Konzentration eingesetzt. Die SGLT1- und GLUT2-Inhibitoren wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die allein keine inhibierende Wirkung auf die Glukosetransporter zeigten, um auszuschließen, dass signifikante Effekte im Zuge der Koinkubationsversuche nur auf die starke Wirkung der Inhibitoren zurückzuführen sind.

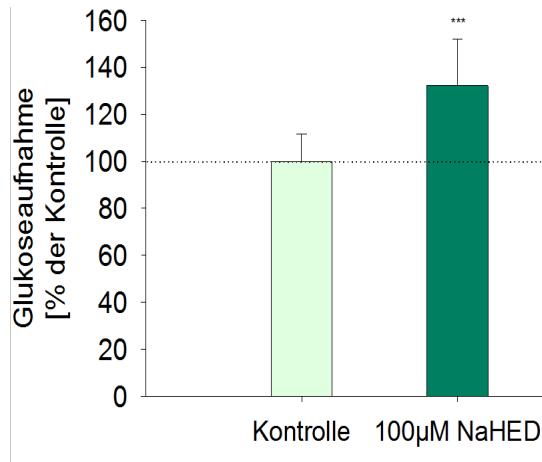
Um sicherzustellen, dass die steigernden Effekte des NaHED auf die Glukoseaufnahme in den jeweiligen Koinkubationsversuchen auch tatsächlich stattfanden, wurde als Positiv-Kontrolle immer NaHED in einer Konzentration von 100 µM mitgeführt (Abbildung 20a und 21a).

### **4.2.2.1 Natriumabhängiger Glukosetransporter 1 (SGLT1)**

Um einen möglichen Beitrag des natriumabhängigen Glukosetransporters 1 (SGLT1) an der gesteigerten Glukoseaufnahme festzustellen, wurde Phlorizin in den Konzentrationen 0,5 - 50 µM eingesetzt, da diese Konzentrationen keine signifikanten Effekte auf die Glukoseaufnahme gezeigt hatten.

Wie aus Abbildung 20b zu erkennen ist, führte die gemeinsame Behandlung mit NaHED (100 µM) und Phlorizin in der höchsten Konzentration (50 µM) im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED in einer Konzentration von 100 µM (Kontrolle = 100 %) zu einer verringerten Glukoseaufnahme in die Zellen, die nun  $77,9 \pm 11,9$  ( $p < 0,05$ ) ausmachte.

(20a)



(20b)

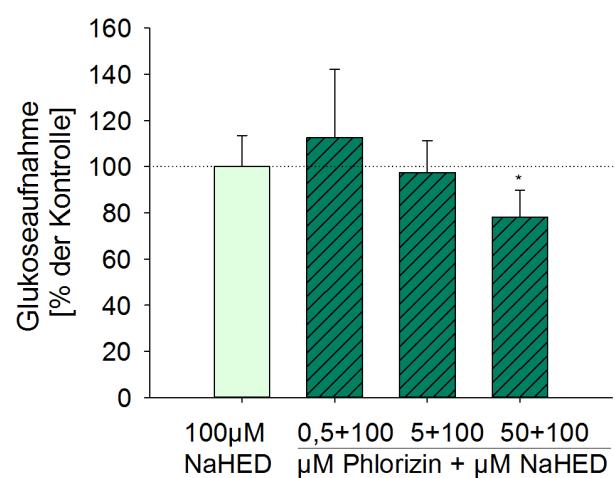


Abb.20a: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM); n = 5 (technische Replikate = 2 – 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und mit \*\*\*p<0,001 markiert.

Abb.20b: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit NaHED (100 µM) und 0,1 % Ethanol) ± Standardabweichung) nach 30-minütiger Koinkubation der Caco-2-Zellen mit Phlorizin (0,5 – 50 µM) und NaHED (100 µM); n = 5 (technische Replikate = 2 – 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form von \*p<0,05 markiert.

#### 4.2.2.2 Glukosetransporter 2 (GLUT2)

Eine mögliche Beteiligung des Glukosetransporters 2 (GLUT2) an der gesteigerten Glukoseaufnahme in die Caco-2-Zellen wurde mit Hilfe von Koinkubationsversuchen, bei denen NaHED (100  $\mu$ M) mit Phloretin (1 – 100  $\mu$ M) kombiniert wurde, getestet. Im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittel-Kontrolle (Kontrolle = 100 %) konnten durch die gemeinsame Behandlung mit NaHED und Phloretin allerdings in keiner der eingesetzten Konzentration Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme festgestellt werden (Abbildung 21b).

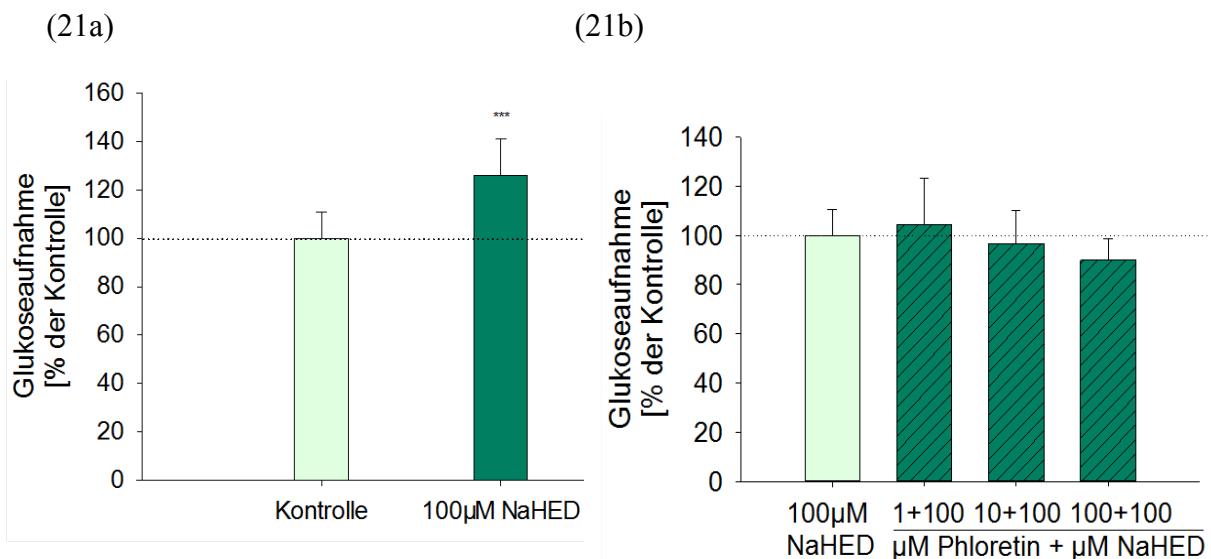


Abb.21a: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle  $\pm$  Standardabweichung) nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100  $\mu$ M); n = 7 (technische Replikate = 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form \*\*\* $p<0,001$  markiert.

Abb.21b: Glukoseaufnahme (% der Kontrolle (HBSS/HEPES-Puffer mit NaHED (100  $\mu$ M) und 0,1 % DMSO)  $\pm$  Standardabweichung) nach 30-minütiger Koinkubation der Caco-2-Zellen mit Phloretin (1 – 100  $\mu$ M) und NaHED (100  $\mu$ M); n = 7 (technische Replikate = 2 – 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

## **4.3 Einfluss der phenolischen Verbindungen auf die Genexpressionslevel der Glukosetransporter**

Um zu untersuchen, ob sich die Behandlung der Zellen mit NaHED und den Inhibitoren auf die Expression der Glukosetransporter der Caco-2-Zellen auswirkt, wurde eine quantitative Real Time PCR durchgeführt. Dabei wurde sowohl getestet, ob NaHED allein einen Einfluss auf Ebene der Genexpression ausübt, als auch überprüft, ob sich die gemeinsame Behandlung mittels NaHED und Phlorizin oder NaHED und Phloretin in einer veränderten Expression von *GLUT2* oder *SGLT1* äußert. Die Zellen wurden dafür mit den entsprechenden Substanzen über Zeiträume von 15, 30 und 60 Minuten inkubiert.

### **4.3.1 Natriumabhängiger Glukosetransporter 1 (SGLT1)**

Wie in Tabelle 7 dargestellt, zeigt sich zwischen 15-minütiger und 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ). Ebenso ist zwischen der 15-minütigen und 30-minütigen ( $p<0,001$ ) sowie zwischen der 15-minütigen und 60-minütigen ( $p<0,01$ ) gemeinsamen Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) und Phlorizin (50 µM) ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Der Vergleich der verbleibenden Behandlungen nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigte jedoch keinen Einfluss des Faktors Zeit auf die Genexpression.

<b>NaHED (100 µM)</b>	15 min vs. 30 min ( $p<0,05$ )	15 min vs. 60 min ( $p>0,05$ )	30 min vs. 60 min ( $p>0,05$ )
<b>NaHED (100 µM) +PT (100 µM)</b>	15 min vs. 30 min ( $p>0,05$ )	15 min vs. 60 min ( $p>0,05$ )	30 min vs. 60 min ( $p>0,05$ )
<b>NaHED (100 µM) + PZ (50 µM)</b>	15 min vs. 30 min ( $p<0,001$ )	15 min vs. 60 min ( $p<0,01$ )	30 min vs. 60 min ( $p>0,05$ )

Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der Zeitabhängigkeit der *SGLT1*-Genexpression. Signifikante Unterschiede wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form des p-Wertes angegeben.

In den Abbildungen 22a, b und c ist zu erkennen, dass die Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED allein nach keiner der drei Inkubationszeiten verglichen mit den entsprechenden Kontrollen zu einem Effekt auf Expressionsebene des natriumabhängigen Glukosetransporters 1 (SGLT1) führte.

Nach 15-minütiger Koinkubation (Abbildung 22a) mit 100 µM NaHED und 50 µM Phlorizin war jedoch zu erkennen, dass *SGLT1* im Vergleich zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle = 1) mit x-facher Änderung von  $1,29 \pm 0,19$  ( $p<0,001$ ) hinaufreguliert wurde. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die *SGLT1* – Expression nach Koinkubation mit 100 µM NaHED und 100 µM Phloretin verglichen mit der alleinigen Behandlung mit 100 µM NaHED oder der Koinkubation mit 100 µM NaHED und 50 µM Phlorizin verringert war.

Nach Behandlung der Zellen mit NaHED (100 µM) in Kombination mit Phlorizin (50 µM) für 30 Minuten (Abbildung 22b) sank die *SGLT1* – Expression wieder ab und zeigte im Vergleich zur Ethanol – Kontrolle (Kontrolle = 1) keinen Effekt mehr auf die Expression des Transporters ( $0,88 \pm 0,11$  ( $p=0,21$ )). Allerdings wurde eine Herunterregulierung von *SGLT1* nach Behandlung mit 100 µM NaHED und 100 µM Phloretin im Vergleich zur DMSO – Kontrolle (Kontrolle = 1) mit x-facher Änderung von  $0,74 \pm 0,18$  ( $p<0,001$ ) nachgewiesen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch nach 60-minütiger Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen (Abbildung 22c): die *SGLT1* – Expression nach Koinkubation der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED und 100 µM Phloretin im Vergleich zur DMSO – Kontrolle (Kontrolle = 1) sowie auch nach gemeinsamer Behandlung mit NaHED (100 µM) und Phloretin (50 µM) wurde herunterreguliert.

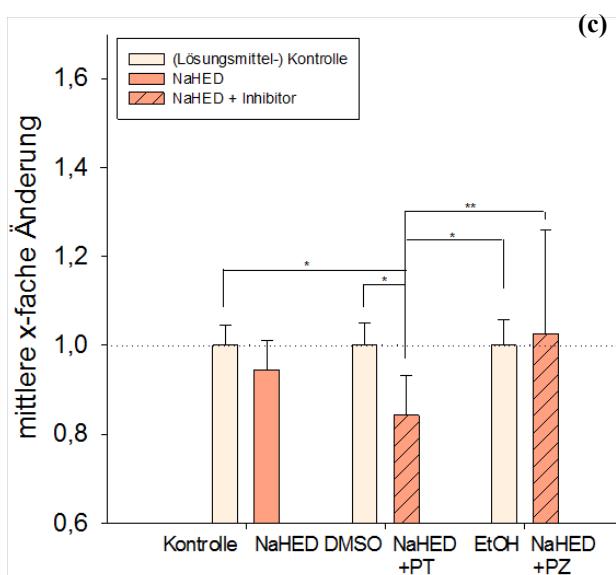
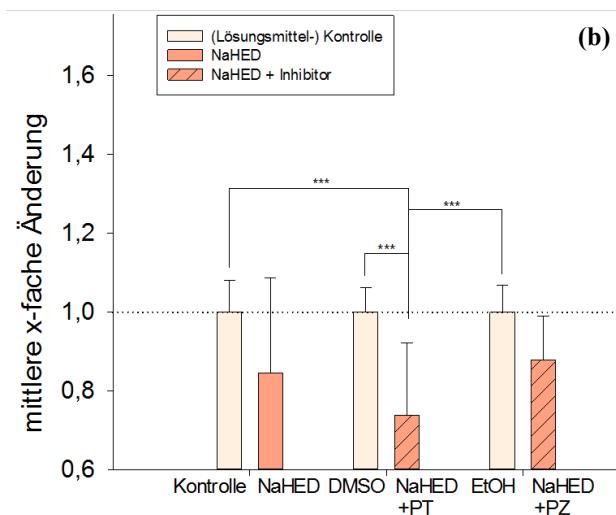
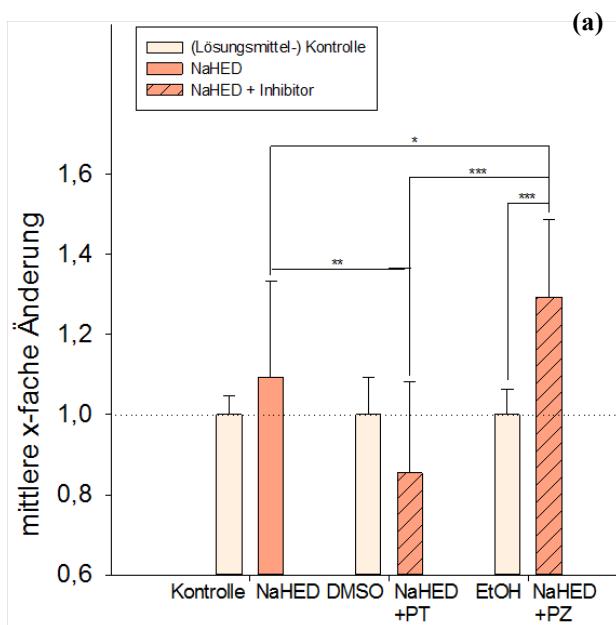


Abb.22: Mittlere x-fache Änderung (bezogen auf entsprechende Lösungsmittelkontrollen  $\pm$  Standardabweichung) der SGTL1-Genexpression nach 15- (a), 30- (b) und 60- (c) minütiger Behandlung mit NaHED (100  $\mu$ M) mit oder ohne Zugabe von Phloretin (100  $\mu$ M) oder Phlorizin (50  $\mu$ M); n=4 (technische Replikate = 2 - 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und in Form von  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  und  $***p<0,001$  markiert.

#### **4.3.2 Glukosetransporter 2 (GLUT2)**

Wie in Abbildung 23 (a,b,c) dargestellt ist, zeigte die Inkubation der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) allein für 15, 30 und 60 Minuten ebenfalls keinen Einfluss auf die Expression des Glukosetransporters 2.

Auch die gemeinsame Behandlung der Zellen mit 100 µM NaHED und 50 µM Phlorizin oder 100 µM NaHED und 100 µM Phloretin hatte nach keiner der drei Inkubationszeiten im Vergleich zu den jeweiligen Lösungsmittel-Kontrollen (Kontrolle = 1) einen Effekt auf die GLUT2 – Expression.

Der Faktor Zeit zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeiten konnte ausgeschlossen werden ( $p>0,05$ ), weshalb die Genexpression der untersuchten Glukosetransporter hier nur zu den einzelnen Behandlungszeiträumen betrachtet wird.

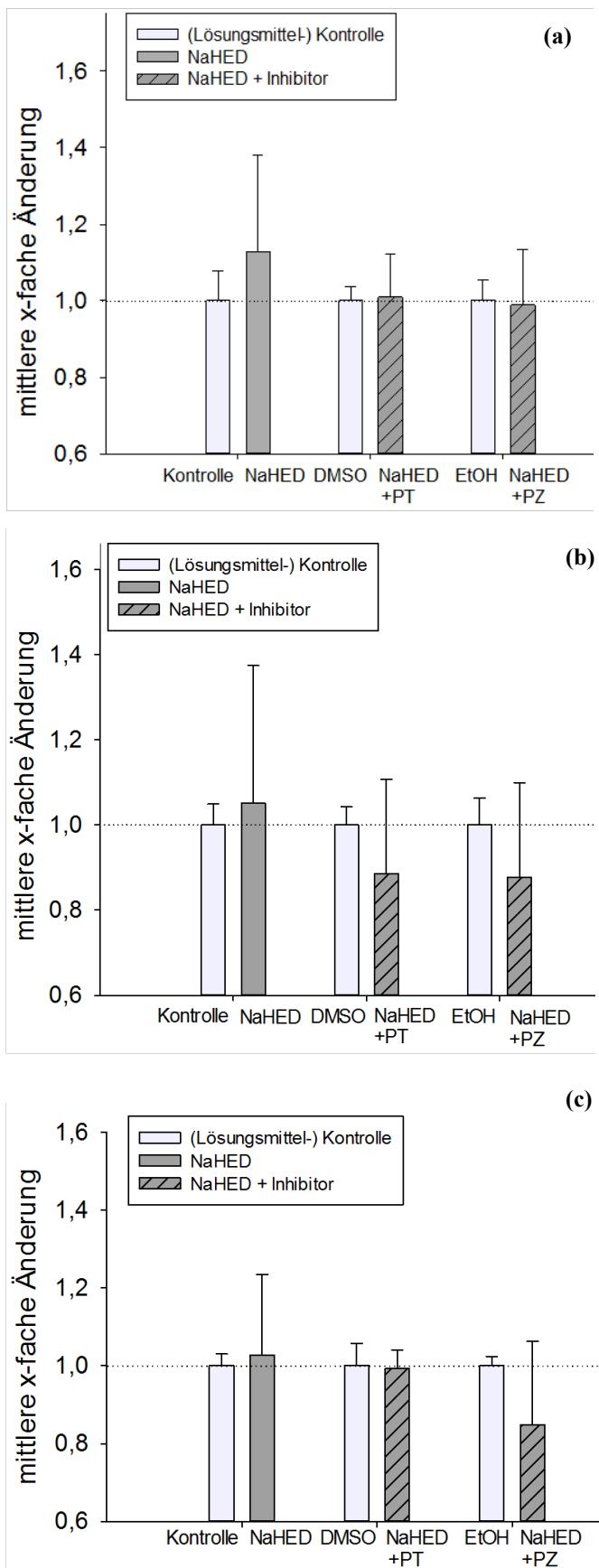


Abb.23: Mittlere x-fache Änderung (bezogen auf entsprechende Lösungsmittelkontrollen  $\pm$  Standardabweichung) der GLUT2-Genexpression nach 15- (a), 30- (b) und 60- (c) minütiger Behandlung mit NaHED (100  $\mu$ M) mit oder ohne Zugabe von Phloretin (100  $\mu$ M) oder Phlorizin (50  $\mu$ M); n = 3-4 (technische Replikate = 2 - 3). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse ausgeschlossen.

#### 4.4 Einfluss von NaHED auf die Serotoninausschüttung

Um die hier aufgestellte Hypothese, dass NaHED auch im Darm zu einer verringerten Serotoninfreisetzung führt, zu testen, wurde nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit Homoeriodictyol-Natriumsalz deren Serotoninausschüttung untersucht. Diese Untersuchung erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Serotonin-sensitiven ELISA-Kits der Firma DLD Diagnostika GmbH.

Die Zellen wurden dafür mit NaHED in Konzentrationen von 0,1 – 100 µM oder Krebs-Ringer/HEPES-Puffer ohne NaHED als Kontrolle behandelt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, führte NaHED in einer Konzentration von 100 µM verglichen mit der Kontrolle (Kontrolle = 0) zu einer verringerten Serotonin-Ausschüttung. Die Ergebnisse zeigten somit nur nach Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED in der höchsten Testkonzentration eine signifikante Reduktion der Serotoninfreisetzung um  $48,8\% \pm 7,57\%$  (MW  $\pm$  SEM;  $p < 0,01$ ).

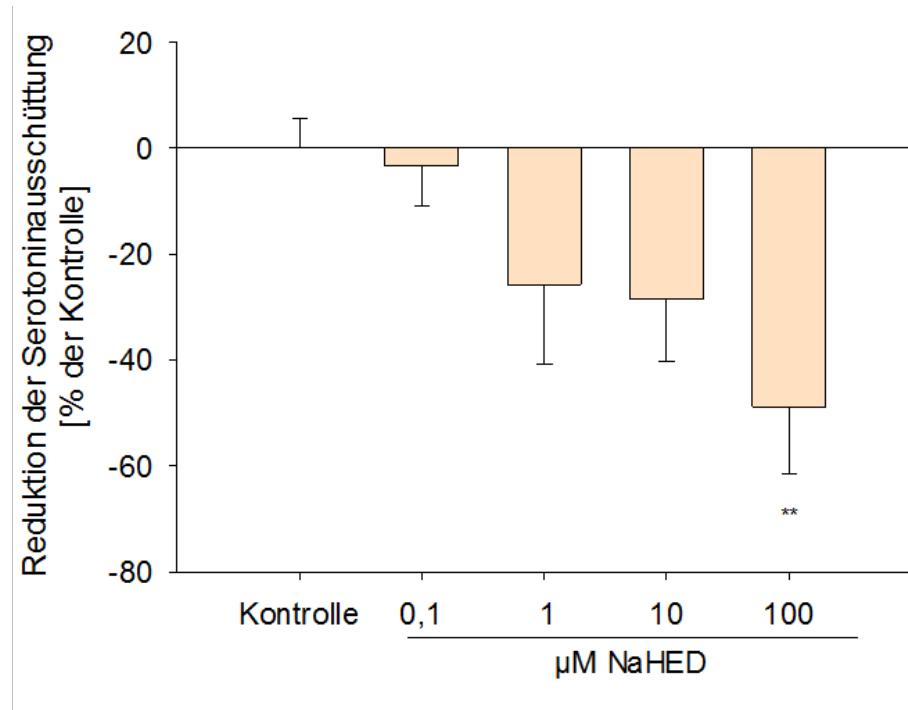


Abb.24: Reduktion der Serotoninausschüttung (% der Kontrolle  $\pm$  SEM) nach 5-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (0,1 – 100 µM);  $n = 5$  (technische Replikate = 2 - 5). Statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak post-hoc Test getestet und mit  $**p < 0,01$  markiert.

## **5. Diskussion**

In der vorliegenden Masterarbeit wurde der Fragestellung eines möglichen Einflusses des Natriumsalzes von Homoeriodictyol auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung in kultivierten Enterozyten nachgegangen. Als *in vitro* Modell für die intestinale Barriere eignete sich auf Grund phänotypischer, morphologischer und funktioneller Ähnlichkeiten zu Enterozyten die Caco-2-Zelllinie. Im Zuge der Arbeit sollte zum einen ein möglicher Effekt der Testsubstanz auf die Glukoseaufnahme mittels Glukoseaufnahme-Assays ermittelt werden. Zum anderen wurde basierend auf Indizien aus der Literatur [Somoza et al., 2014] die Hypothese aufgestellt, dass NaHED die Serotoninfreisetzung in Caco-2-Zellen reduziert. Im Zentralnervensystem synthetisiertes Serotonin spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme und ist mit Sättigung assoziiert. Die gezeigten reduzierenden Effekte des Homoeriodictyols auf die Serotoninausschüttung in neuronalen Zellen [Somoza et al., 2014] können daher auf einen gegenteiligen und somit appetitanregenden Effekt dieser Substanz hindeuten. Evidenz aus der Literatur existiert mittlerweile auch hinsichtlich eines möglichen Beitrags des peripher synthetisierten Serotonins an der Regulation der Sättigung, weshalb die gezeigte Wirkung des Homoeriodictyols auf die Serotoninfreisetzung in neuronalen Zellen [Somoza et al., 2014] als Hinweis auf vergleichbare Effekte dieser Substanz in intestinalen Zellen verstanden werden könnte. Somit könnte nicht nur der mögliche Beitrag des peripheren Serotonins an der Sättigung diskutiert werden, sondern auch ein Hinweis dafür geliefert werden, dass auf Grund des Einflusses von NaHED auf beide Systeme ein Zusammenhang zwischen Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung besteht. Zusätzlich sollte durch Verwendung der Inhibitoren Phlorizin und Phloretin ein Hinweis darauf geliefert werden, welche der intestinalen Glukosetransporter – SGLT1 und GLUT2 – an einer hypothetischen NaHED-vermittelten Wirkung auf die Glukoseaufnahme beteiligt sein könnten und ob sich die Behandlung der Zellen mit NaHED auch auf Genexpressionsebene der Glukosetransporter auswirkt.

## **5.1 Einfluss des NaHED auf die Glukoseabsorption**

Wie die Ergebnisse des Glukoseaufnahme-Assays zur Untersuchung der Einflussnahme des Natriumsalzes von Homoeriodictyol auf die Glukoseaufnahme im Enterozytenmodell zeigen, konnte eine 30-minütige Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED in der höchsten getesteten Konzentration von 100 µM die Glukoseaufnahme um etwa 30 % erhöhen. Für dieses Flavanon konnte somit in intestinalen Zellen ein Glukoseaufnahme-steigernder Effekt nachgewiesen werden.

Dass verschiedene Flavonoide die Glukoseaufnahme in den Darmzellen über direkte Interaktion mit Glukosetransportern beeinflussen können, ist bereits mehrfach nachgewiesen worden [z.B. Johnston et al., 2005; Chen et al., 2007; Kwon et al., 2007; Zheng et al., 2012]. Während in diesen Studien jedoch durchwegs Glukoseaufnahmesenkende Effekte verschiedener phenolischer Verbindungen festgestellt wurden, sind in der Literatur bisher kaum Indizien für die gegenteilige Wirkung dieser Substanzen zu finden.

Ein großer Teil der Studien zum hemmenden Effekt von Flavonoiden auf die intestinale Glukoseaufnahme wurde *in vitro* durchgeführt. So zeigte etwa eine 2-minütige Behandlung von Caco-2-Zellen mit Flavonoid-Glykosiden wie Naringin, Neohesperidin oder Phlorizin in Konzentrationen von 100 µM unter natriumabhängigen Bedingungen eine inhibierende Wirkung auf die Glukoseaufnahme, während Aglyka wie Apigenin, Phloretin oder Quercetin die Glukoseaufnahme in Abwesenheit von Natrium inhibierten [Johnston et al., 2005]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die untersuchten Aglyka die Glukoseaufnahme via erleichterter Diffusion inhibieren, während die Flavonoid-Glykoside den aktiven Glukosetransport hemmen. Auch Kwon et al. [2007] konnten auf eine Quercetin-vermittelte Inhibierung des GLUT2 hinweisen. Des Weiteren zeigte eine Untersuchung der Glukoseaufnahme in Anwesenheit verschiedener Flavonoide wie Quercetin-3-O-Glykoside, Fisetin oder Gossypin (0,1 mM) unter Verwendung von aus Rattenjejunum isolierten basolateralen Membranvesikeln ebenfalls eine inhibierende Wirkung der getesteten Substanzen auf intestinale Glukosetransporter [Chen et al., 2007].

Doch auch Tierversuche, wie etwa in den Studien von Shiroasaki et al. [2012a,b], liefern ähnliche Hinweise. Extrakte aus Apfel- oder Pfirsichblättern zeigten bei Mäusen ein inhibierendes Potential auf SGLT1, was auch zu einer Verbesserung der postprandialen Blutglukosespiegel beitrug. Auf die mögliche Beteiligung phenolischer Verbindungen an diesem Effekt konnte durch die ebenfalls mit Phlorizin (500 mg/kg) durchgeführten Tests, die zu vergleichbaren Ergebnissen führten, hingewiesen werden [Shiroasaki et al. 2012a]. Und auch bei diabetischen Ratten konnte nach der Gabe von Glukose (2 g/kg KG) und Quercetin (3–65 mg/kg KG) über einen Zeitraum von 5 Tagen eine dosisabhängige Reduktion der Hyperglykämien gezeigt werden [Song et al., 2002].

Somit könnte auch der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Effekt des NaHED auf die Glukoseaufnahme im *in vitro*-Modell des Dünndarms auf eine Wirkung dieses Flavanons in den Enterozyten hindeuten. Die in diesem Fall jedoch steigernden Effekte der Testsubstanz auf die Glukoseaufnahme unterstützen die Hypothese, dass NaHED möglicherweise auch *in vivo* zu einer gesteigerten Absorption von Glukose führen könnte.

## 5.2 NaHED-vermittelter Glukoseaufnahmeweg

Im Zusammenhang mit den steigernden Effekten von NaHED auf die Glukoseaufnahme wurden auch die mechanistischen Grundlagen, im Speziellen die Frage, welche Transporter am Aufnahmeweg beteiligt sind, beleuchtet.

Gemäß dem klassischen Modell der Hexoseabsorption ist der natriumabhängige Transporter (SGLT1) für die Absorption der Glukose in die Enterozyten und der Glukosetransporter 2 (GLUT2) für die Abgabe der Glukose aus den Zellen ins Blut verantwortlich und somit der SGLT1 Transporter im apikalen und der GLUT2 Transporter im basolateralen Bereich der Zellen lokalisiert [Hediger et al., 1987; Corpe und Burant, 1996]. Während sich dieses Modell zur Erklärung von Fällen eignet, in denen Glukosekonzentrationen im intestinalen Lumen niedriger sind als in den Enterozyten, wird neueren Erkenntnissen zufolge jedoch davon ausgegangen, dass GLUT2 Transporter bei hoher luminaler Glukosekonzentration auch auf die apikale

Seite der Zelle transloziert werden [Helliwell et al., 2000].

Die hier verwendeten Caco-2-Zellen eignen sich auch in diesem Zusammenhang als Modell für humane Enterozyten, da sie ebenso wie die Darmzellen beide an der Glukoseabsorption beteiligten Transporter konstitutiv in der apikalen Membran exprimieren [Mahraoui, 1994]. Grefner et al. [2010] detektierten bei Abwesenheit von Hexosen GLUT2 Transporter in apikalen und basalen Bereichen der Caco-2-Zellen. Nach Behandlung der Zellen mit niedrigen Glukosekonzentrationen (2,5 mM) war der Transporter hauptsächlich in der basalen Membran lokalisiert. Aber auch in der Caco-2-Zelllinie gibt es Evidenz für eine zusätzliche Translokation des Glukosetransporters 2 in die apikale Zellmembran nach Behandlung mit hohen Glukosekonzentrationen. Zheng et al. [2012] beschreiben in ihrer Studie eine solche konstitutive Expression des GLUT2 Transporters in der apikalen Membran, die durch 1-minütige Behandlung der Caco-2-Zellen mit dem bekannten GLUT2-Inhibitor Phloretin (1 mM) mittels Glukoseaufnahme-Assay bei einer Glukosekonzentration von < 10 mM ermittelt werden konnte. Zusätzlich wurde eine Translokation von zytoplasmatischem GLUT2 in die apikale Membran nach 1-stündiger Abwesenheit von Glukose und nachfolgender 10-minütiger Inkubation mit einer hohen Glukosekonzentration von 50 mM mittels immunhistochemischer Methode nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inhibitoren Phlorizin für den SGLT1 Transporter und Phloretin für den GLUT2 Transporter eingesetzt. Für beide Inhibitoren wurde eine konzentrationsabhängige Abnahme der zellulären Glukoseaufnahme in Caco-2-Zellen nachgewiesen. Die Ergebnisse der Koinkubationsversuche im Rahmen dieser Masterarbeit zeigen nun, dass durch gemeinsame Behandlung der Zellen mit NaHED und dem SGLT1-Inhibitor Phlorizin über einen Zeitraum von 30 min im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NaHED die Glukoseaufnahme gesenkt werden konnte. Diese Wirkung konnte in der höchsten eingesetzten Phlorizinkonzentration von 50 µM nachgewiesen werden. Der nach gemeinsamer Behandlung mit dem SGLT1-Inhibitor nicht mehr nachweisbare steigernde Effekt des NaHED auf die Glukoseaufnahme kann als Hinweis darauf verstanden werden, dass der natriumabhängigen Transporter 1 an der Wirkung des NaHED auf die Glukoseaufnahme in den Caco-2-Zellen beteiligt ist. Allerdings muss bei dieser Annahme berücksichtigt werden, dass die signifikant

wirksame Phlorizin-Konzentration von 500 µM im Rahmen der Koinkubationsversuche nicht eingesetzt wurde, um auszuschließen, dass mögliche signifikante Effekte nach gemeinsamer Behandlung der Zellen mit beiden Testsubstanzen nur auf Grund der starken Wirkung des Inhibitors zustande kommen. In den Koinkubationsversuchen wurden daher nur die Phlorizinkonzentrationen eingesetzt, die allein keine signifikante Inhibition des SGLT1 im Caco-2-Modell zeigten. Auf Genexpressionsebene konnte aber dennoch auch in der geringeren Phlorizin-Konzentration von 50 µM ein Effekt auf die *SGLT1*-Expression nachgewiesen werden. Um aber die Vermutung einer SGLT1-vermittelten steigernden Wirkung des NaHED auf die Glukoseaufnahme zusätzlich zu bestätigen, wären weitere Untersuchungen, wie etwa vollständige Dosis-Wirk-Beziehungen des Inhibitors mit und ohne Zusatz von NaHED, erforderlich.

Die Verwendung des GLUT2-Inhibitors Phloretin in den Konzentrationen von 1-100 µM, die allein ebenfalls keine Wirkung auf die GLUT2-Transporter aufwiesen, zeigte im Zuge der gemeinsamen 30-minütigen Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED verglichen mit der alleinigen Behandlung der Zellen mit NaHED keine Auswirkungen auf die Glukoseaufnahme. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der Glukosetransporter 2 nicht an den Glukoseaufnahme-steigernden Effekten des NaHED beteiligt ist. Allerdings muss auch hier beachtet werden, dass keine vollständige Dosis-Wirk-Beziehung des Inhibitors erstellt werden kann. Um die Hinweise aus diesen durchgeföhrten Koinkubationsversuchen auf eine nicht vorhandenen Beteiligung des GLUT2 an der NaHED-vermittelten Glukoseaufnahme zu unterstützen, sind aber ebenfalls weitere Untersuchungen notwendig.

Da der SGLT1 Transporter laut aktueller Literatur der wichtigere Glukosetransporter in der apikalen Membran der Zellen zu sein scheint, entspricht das Ergebnis, das auf eine SGLT1-vermittelte Wirkung des NaHED auf die Glukoseaufnahme hindeutet, den Erwartungen. Der Glukosetransporter 2 wird zwar ebenso in der apikalen Membran exprimiert, ist aber, wie bereits erwähnt, dort erst bei hohen Glukosekonzentrationen in größerem Ausmaß zu finden. Im Zuge dieser Arbeit lag die eingesetzte Glukosekonzentration des Assays zur Glukoseaufnahme bei 200 µM. Zheng et al. [2012] wiesen Effekte zur zusätzlichen Translokation des Glukosetransporters 2 in der Caco-2-Zelllinie bei Glukosekonzentrationen von 50 mM auf. Im Vergleich dazu

werden die tatsächlichen physiologischen Glukosekonzentrationen, die nach einer Mahlzeit an der Oberfläche der apikalen Membran des Darms zu finden sind, auf 50 – 300 mmol/L geschätzt [Ferraris et al., 1990; Pappenheimer und Reiss, 1987; Kellett und Brot-Laroche, 2005]. Möglicherweise würde der Einsatz einer höheren Glukosekonzentration in den durchgeführten Glukoseaufnahme-Assays zu einer Translokation des Glukosetransporters 2 führen und somit ebenfalls einen Beitrag zur NaHED-vermittelten gesteigerten Glukoseaufnahme leisten. Unter den hier getesteten Bedingungen mit einer niedrigen Glukosekonzentration zeigt NaHED zwar Hinweise auf einen SGLT1-vermittelten Einfluss auf die Glukoseaufnahme, jedoch keine Wirkung auf die apikalen GLUT2-Level in Caco-2-Zellen. Die gesteigerte Glukoseaufnahme nach Behandlung mit 100 µM NaHED unter den genannten Testbedingungen ist somit nicht auf eine Förderung der Translokation von GLUT2 an die apikale Membranseite zurückzuführen.

Grundsätzlich kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Wege existieren, über die NaHED die Glukoseaufnahme in die Zellen beeinflussen könnte, wobei beispielsweise passive Diffusion oder die Auswirkung höherer Glukosekonzentrationen auf die durch NaHED gesteigerte Glukoseaufnahme zu nennen wäre.

### **5.3 Einfluss von NaHED auf die Expressionsebene der Glukosetransporter**

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob sich die steigernden Effekte des NaHED auf die Glukoseaufnahme, die in den Glukoseaufnahme-Assays nachgewiesen wurden, auch auf Ebene der Genexpression der beiden Glukosetransporter auswirken.

Eine Untersuchung auf Zeitabhängigkeit der *SGLT1*-Genexpression zeigte zwar zwischen 15- und 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED einen signifikanten Unterschied ( $p<0,05$ ), allerdings wurde ein solcher zwischen 15- und 60-minütiger oder 30- und 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED nicht erbracht. Auch nach gemeinsamer Inkubation der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) und Phlorizin (50 µM) ist ein signifikanter Unterschied zwischen

15- und 30-minütiger ( $p<0,001$ ) sowie zwischen 15- und 60-minütiger ( $p<0,01$ ) Behandlung zu erkennen. Die verbleibenden Behandlungen zeigten jedoch nach den unterschiedlichen Inkubationszeiten keinen Einfluss des Faktors Zeit auf die Genexpression. Ein Einfluss des Faktors Zeit auf die Expression des Glukosetransporters 2 (GLUT2) wurde für alle Behandlungen ausgeschlossen ( $p>0,05$ ), weshalb die Genexpression der untersuchten Glukosetransporter hier nur zu den einzelnen Behandlungszeiträumen betrachtet wird.

Die 15-, 30- und 60-minütige Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED in der Testkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  allein zeigte weder Effekte auf Expressionsebene des SGLT1 noch auf jener des GLUT2. Die Ergebnisse der quantitativen Real Time PCR zeigten somit keine Hinaufregulierung der Glukosetransporter, speziell des SGLT1, wie, basierend auf den ermittelten Glukoseaufnahme-steigernden Effekten des Flavanons, hätte erwartet werden können. Jedoch wurde ein Effekt nach der gemeinsamen Behandlung der Zellen mit den phenolischen Verbindungen nachgewiesen. Eine Inkubation mit NaHED und Phlorenzin äußerte sich in einer gesteigerten *SGLT1*-Expression nach 15-minütiger Behandlung. Da NaHED allein keinen Effekt zeigte, ist die gesteigerte *SGLT1*-Expression vermutlich auf den Einfluss des Phlorizins zurückzuführen und als mögliche Gegenregulation der Zellen auf die Inhibition des natriumabhängigen Transporters 1 (SGLT1) zu erklären. Nach 30 Minuten war diese Hinaufregulierung des SGLT1 Transporters allerdings nicht mehr vorhanden. Nach 30-minütiger gemeinsamer Behandlung mit NaHED und Phloretin kam es hingegen zu einer Herunterregulierung der *SGLT1* – Expression, die auch nach 60-minütiger Behandlung noch erkennbar war.

#### **5.4 Zusammenhang zwischen Glukoseabsorption und Serotoninfreisetzung**

Basierend auf den Effekten des NaHED sowohl auf die Glukoseaufnahme als auch auf die Serotoninausschüttung in Caco-2-Zellen könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Systemen diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, lieferte eine Humanstudie Indizien dafür, dass die Verabreichung von NaHED den Serotoninspiegel im Plasma signifikant senken kann [Somoza et al., 2014]. Des Weiteren führte die

Behandlung neuronaler Zellen mit Homoeriodictyol zu einer reduzierten Serotoninausschüttung [Somoza et al., 2014]. Da intestinale enterochromaffine Zellen die bei weitem wichtigste Quelle der Serotoninproduktion im Körper darstellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit daher einerseits untersucht werden, ob die Behandlung mit NaHED in Caco-2-Zellen analog zu den neuronalen Zellen zu einer Reduzierung der Serotoninausschüttung führt. Andererseits sollte auch, basierend auf bereits nachgewiesenen Effekten unterschiedlichster phenolischer Verbindungen auf die intestinale Glukoseaufnahme [z.B. Johnston et al., 2005; Chen et al., 2007; Kwon et al., 2007; Zheng et al., 2012], ein möglicher Einfluss des Flavanons auf die Glukoseaufnahme untersucht werden.

Auch in der Literatur gibt es bereits Hinweise, die einen potentiellen Zusammenhang zwischen peripherem Serotonin, das den größten Anteil an Serotonin im Körper ausmacht, und dem Glukosemetabolismus in Betracht ziehen. Sugimoto et al. [1990] etwa zeigten hypoglykämische Effekte bei nüchternen Mäusen durch peripher verabreichtes Serotonin in Dosen ab 20 mg/kg, die möglicherweise auf einen Anstieg des ebenfalls untersuchten Plasmainsulins zurückzuführen waren, was Yamada et al. [1989] zufolge vermutlich durch 5-HT Rezeptoren mediert wird. Andererseits induzierte zirkulierendes 5-HT in Ratten in Konzentrationen ab 5 mg/kg Hyperglykämien, was wiederum mit der Adrenalinausschüttung durch Aktivierung von peripher lokalisierten Serotoninrezeptoren assoziiert wurde [Yamada et al., 1995]. Ein ähnlicher Effekt des peripheren Serotonins auf den Glukosemetabolismus konnte bei nüchternen Mäusen [Watanabe et al., 2010] und, trotz einiger Unterschiede der physiologischen Funktionen zu Mäusen, auch bei Schafen nachgewiesen werden, die nach einer auf eine 24-stündige Nahrungskarenz folgenden Injektion von peripherem Serotonin ebenfalls erhöhte Spiegel an Plasmaglukose aufwiesen [Watanabe et al., 2014].

Watanabe et al. [2010] diskutierten, dass diese Serotonin-induzierten Hyperglykämien sowie die ebenfalls nachgewiesenen Hyperinsulinämien wahrscheinlich mit einer Inhibierung der Glukoseaufnahme in Gewebe assoziiert sind. Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine Assoziation dieses Serotonin-induzierten Anstiegs der Blutglukose- sowie Insulinspiegel mit dem Serotoninrezeptor 5-HT<sub>1</sub> [Watanabe et al., 2014]. Dass

Serotonin aber auch die Insulinsekretion beeinflussen kann, konnten etwa Paulmann et al. [2009] zeigen. Hierbei regulierte Serotonin die Insulinsekretion in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen durch Serotonylierung von GTPasen. Zusätzlich resultierten gesteigerte intrazelluläre Serotonin-Konzentrationen bei diabetischen Mäusen in gesteigerten Insulin- und reduzierten Glukose-Spiegeln im Blut. Die nach systemischer Verabreichung von Serotonin (4mg/kg KG) an *Tph1*<sup>-/-</sup> Mäuse (tryptophan hydroxylase 1 knockout mice) ermittelten angestiegenen Blutglukose-Spiegel wiederum deuten auf eine inhibitorische Wirkung des extrazellulären Serotonins auf die Insulinsekretion hin [Paulmann et al., 2009].

Somit könnten sowohl die direkte Wirkung des Serotonins auf die Glukoseaufnahme in Gewebe, als auch sein Einfluss auf die Insulinsekretion die Blutglukose-Spiegel beeinflussen. Der Mechanismus, der die Modulation der Glukose-Konzentrationen im Plasma nach Serotonin-Injektion bewirkt, muss also noch geklärt werden [Watanabe et al., 2010]. Es zeigte sich also, dass die Verabreichung von peripherem Serotonin in manchen Untersuchungen mit einem Anstieg, in anderen jedoch mit einem Rückgang der zirkulierenden Blutglukose-Level einherging. Trotz der zum Teil, wahrscheinlich auch auf Grund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen, konträren Ergebnisse dieser Studien kann dennoch demonstriert werden, dass Serotonin im Plasma die Glukose-Level in *in vivo* Modellen beeinflussen kann.

Nachdem im Rahmen der Glukoseaufnahme-Assays ein Glukoseaufnahme-steigernder Effekt des NaHED gezeigt werden konnte, sollte mit den nachfolgenden Experimenten bezüglich des Einflusses dieser Verbindung auf die Serotoninfreisetzung in Caco-2-Zellen die Hypothese, dass es einen Zusammenhang zwischen der Glukoseaufnahme und der Serotoninfreisetzung gibt, unterstützt werden. Die Untersuchung der Serotonin-Ausschüttung nach 5-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED resultierte nur in der höchsten eingesetzten NaHED-Konzentration von 100  $\mu$ M in einem signifikanten Effekt, der eine Reduktion der Serotonin-Ausschüttung um 48,8%  $\pm$  7,57% (MW  $\pm$  SEM; p<0,01) darstellt.

Die Effekte des Natriumsalzes von Homoeriodictyol sowohl auf die Glukoseaufnahme als auch auf die Serotoninfreisetzung konnten somit in der gleichen Konzentration von 100  $\mu$ M gezeigt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass NaHED beide

Systeme beeinflussen kann und werfen die Frage auf, ob diese Mechanismen möglicherweise gekoppelt sind. Die hypothetische NaHED-vermittelte Glukoseaufnahme und Serotoninausschüttung in intestinale Zellen ist in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

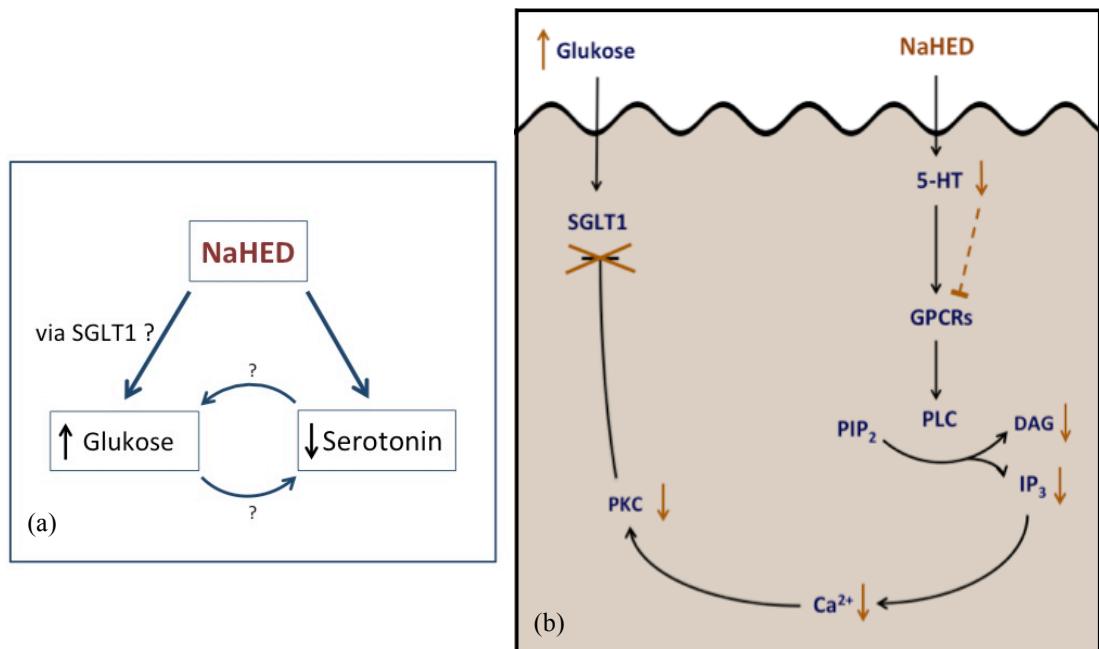


Abb.25: Hypothetische NaHED-vermittelte Glukoseaufnahme und Serotoninausschüttung (a); möglicher Wirkmechanismus zwischen Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung (b)

Wie hier abgebildet, könnte also ein Zusammenhang zwischen Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung existieren. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die verringerte Serotoninausschüttung die Glukoseaufnahme verstärkt, anderseits könnte aber auch eine gesteigerte Glukoseaufnahme die Serotoninfreisetzung beeinflussen.

Ein Vorschlag eines möglichen Wirkmechanismus, der den Zusammenhang zwischen den gezeigten Effekten auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung erklären könnte, ist in Abbildung 25b dargestellt. Serotonin ist ein Neurotransmitter, der in die Regulation diverser physiologischer Prozesse verwickelt ist. Diese funktionelle Vielfalt ist auf die Fähigkeit des Neurotransmitters, mit den zahlreichen Serotoninrezeptoren (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) zu interagieren, zurückzuführen, wodurch intrazelluläre Signaltransduktions-Mechanismen aktiviert werden können. Mit Ausnahme des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors, der einen ligandengesteuerten Ionenkanal darstellt, handelt es sich bei diesen

Rezeptoren um G-Protein gekoppelte Rezeptoren [Hoyer et al., 2002]. So kann es etwa im Zuge der Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCRs) zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) kommen. Der Signaltransduktions-Weg, der zur Aktivierung dieser Proteinkinase führt, beginnt durch die Bindung der Liganden an GPCRs, die an Gq-Proteine gekoppelt sind. Diese wiederum aktivieren in weiterer Folge Phospholipase C (PLC), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. Das gebildete IP<sub>3</sub> öffnet Kalziumkanäle am Endoplasmatischen Retikulum, wodurch Kalziumionen aus den Speichern des ER ins Zytosol freigesetzt werden. Der Anstieg der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ - und DAG-Konzentrationen ist an zahlreichen zellulären Prozessen, wie etwa der Aktivierung der Proteinkinase C, beteiligt [Lam und Heisler, 2007; Cox et al., 2012]. Dass die PKC nun wiederum auch einen Effekt auf SGLT1 aufweist, konnte bereits nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der PKC den SGLT1-vermittelten Transport von Hexosen inhibiert. Barrenetxe et al. [2003] demonstrierten zum Beispiel die Beteiligung der PKC in der Leptin-vermittelten Inhibierung der Galaktoseabsorption via SGLT1 im Dünndarm von Ratten. Ducroc et al. [2005] zeigten ebenfalls im Jejunum von Ratten, dass Leptin den aktiven intestinalen SGLT1-vermittelten Glukosetransport reduziert, wobei für diesen Effekt die Aktivierung der PKC erforderlich war. Aber auch in COS-7-Zellen, die tierische SGLT1 exprimierten, reduzierte die Aktivierung der PKC die maximale Transportgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) des SGLT1 [Vayro und Silverman, 1999].

Eine gesteigerte Serotonin-Konzentration, die über die Aktivierung der GPCRs in einer Aktivierung der Proteinkinase C resultiert, könnte nun somit eine Hemmung des SGLT1 bewirken. Im Gegensatz dazu käme es bei den hier gezeigten NaHED-vermittelten verringerten Serotonin-Konzentrationen zu keiner Aktivierung der PKC. Die Verringerung der SGLT1-Aktivität wäre somit aufgehoben und könnte zu der gezeigten gesteigerten SGLT1-vermittelten Glukoseaufnahme führen. Bei diesem vorgeschlagenen hypothetischen Mechanismus muss allerdings berücksichtigt werden, dass die gezeigten Effekte der PKC auf den SGLT1 nur in Tierstudien gezeigt wurden und daher für humanen SGLT1 noch fraglich sind.

Um zu testen, ob dieser hypothetische Zusammenhang aber tatsächlich besteht oder ob die nachgewiesenen Effekte des NaHED unabhängig voneinander bestehen, beziehungsweise um den am hypothetischen Zusammenhang beteiligten Mechanismus zu finden, wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

## **5.5 Einfluss des NaHED auf Serotoninfreisetzung**

Abgesehen von dem oben bereits diskutierten Zusammenhang zwischen dem Serotonin- und Glukosemetabolismus, wird auch der Beitrag von Serotonin in der Kontrolle der Nahrungsaufnahme näher beleuchtet. Nicht nur zentrales 5-HT ist mit der Regulation von Nahrungsaufnahme und Sättigungsmechanismen im Gehirn assoziiert, sondern es liegen auch Hinweise dafür vor, dass peripheres Serotonin an der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beteiligt ist. So wurde etwa anhand von *in vivo* Studien gezeigt, dass peripher verabreichtes Serotonin zu früherem Sättigungseintritt und verringelter Nahrungsaufnahme führt [Pollock und Rowland, 1981; Edwards und Stevens, 1991; Simansky et al. 1992]. Mazda et al. [2004] weisen außerdem darauf hin, dass peripher freigesetztes Serotonin die neuronale Aktivität von mit Energiebalance assoziierten Gehirnregionen erhöht und Wang et al. [2013] liefern Hinweise auf die Expression des Serotoninrezeptors 5-HT<sub>1A</sub> in den Mastzellen des Dünndarms. Des Weiteren konnte auch *in vitro* gezeigt werden, dass 5-HT<sub>1A</sub> in Caco-2-Zellen exprimiert wird, wo der Serotoninrezeptor in der Lage ist, nach Stimulation die Aktivität des Serotonin Reuptake Transporters zu beeinflussen [Iceta et al., 2009].

Die Reduktion der Serotoninausschüttung nach Behandlung mit NaHED, die bereits in neuronalen Zellen gezeigt [Somoza et al., 2014] und im Zuge der vorliegenden Masterarbeit auch in den als Modell für Enterozyten verwendeten Caco-2-Zellen bestätigt werden konnte, kann als Hinweis auf eine mögliche appetitstimulierende Wirkung des Natrium-Homoeriodictyols interpretiert werden. Dieses Ergebnis unterstützt außerdem die Hypothese, dass die Sättigung betreffende analoge Wirkungsmechanismen in Gehirn und Darm stattfinden.

Etwas im Widerspruch zu diesem auf Grund der reduzierten Serotoninfreisetzung möglichen appetitstimulierenden Effekt des NaHED steht die Glukostatische Theorie, die von Jean Mayer Mitte der 50er Jahre zur Kurzzeitregulation von Hunger und Nahrungsaufnahme vorgeschlagen wurde [Mayer, 1955]. Diese Theorie postuliert, dass Veränderungen der Blutglukosekonzentrationen sowie Unterschiede zwischen den Blutzuckerspiegeln des arteriellen und venösen Blutes durch Glukorezeptoren erkannt werden und auf diese Weise die Energieaufnahme beeinflussen. Ein Anstieg der Blutglukosekonzentrationen resultiert also dieser Hypothese zufolge in Sättigungsgefühlen, während ein Absinken der Blutglukosekonzentrationen zu den gegenteiligen Effekten führt. Die Wahrnehmung von Hunger und Sättigung kommt durch eine reduzierte beziehungswiese gesteigerte Glukoseverwertung in den entsprechenden gluko-sensitiven Gehirnregionen zustande [Mayer, 1955]. Es ist bekannt, dass bestimmte Bereiche des Gehirns, besonders im Hypothalamus und im Gehirnstamm, an der Kontrolle des Glukosestatus und der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt sind [Penicaud et al., 2002] und als Mediatoren serotogener Sättigungsmechanismen nachgewiesen wurden [Garfield et al., 2014; Review Voigt und Fink, 2015]. Auch wenn die Glukostatische Theorie zwischenzeitlich auf Grund von nicht konsistenten Ergebnissen größtenteils fallen gelassen wurde, hat diese Hypothese von Mayer in jüngerer Zeit wieder an Interesse gewonnen [Chaput und Tremblay, 2009]. Forschungsergebnisse, die dafür sprechen, sind etwa die Untersuchungen, die zeigten, dass das Absinken der Blutglukosekonzentration mit dem Einsetzen der Nahrungsaufnahme in *in vivo* Versuchen assoziiert war. Sinkende Glukosekonzentrationen wurden von den Autoren demnach als Signal für Nahrungsaufnahme vorgeschlagen [Louis-Sylvestre und Le Magnen, 1980; Campfield und Smith, 1990]. Außerdem resultierten Reduktionen der Glukoseverfügbarkeit unter hypoglykämischen Bedingungen beim Menschen in Hungergefühlen [Heller und Cryer, 1991]. Es ist somit bekannt, dass eine sehr niedrige oder sehr hohe Glukoseverfügbarkeit die Nahrungsaufnahme beeinflussen kann, ob allerdings tägliche Glukoseschwankungen innerhalb des physiologischen Bereichs eine primäre Rolle in der Regulation der Initiation oder Beendigung der Nahrungsaufnahme spielen, bleibt weiterhin unklar. Dementsprechend besteht immer noch Unsicherheit bezüglich der

Hypothese von Mayer, der zufolge Glukose einen wichtigen Regulator in der Nahrungsaufnahme darstellt [Levin et al., 2004].

Unter der Annahme, dass der Anstieg der Blutglukosekonzentrationen nach der Glukostatischen Theorie in Signalen der Sättigung resultiert, könnten auf Grund der Glukoseaufnahme-steigernden Effekte des NaHED in Enterozyten und den sich daraus ergebenden gesteigerten Glukosekonzentrationen im Plasma sättigende Effekte erwartet werden. Es lässt sich allerdings nicht sagen, ob die Glukosespiegel im Plasma nach der Glukoseabsorption der Enterozyten in einer Konzentration von 100 µM hoch genug sind, um diese sättigenden Effekte auszulösen. Außerdem steht die Glukostatische Theorie eher in Zusammenhang mit der kurzzeitigen Regulation von Hunger und Nahrungsaufnahme. Der angenommene kurzfristige und schnelle Anstieg der Glukosespiegel im Blut nach der Absorption im Darm könnte demnach zwar für kurze Zeit sättigende Gefühle auslösen, aber ein schnelles Erreichen der maximalen Blutglukosekonzentrationen wird durch Wirkung des Insulins eventuell auch schneller wieder aus dem Blut entfernt und auf Grund der beschleunigten Aufnahme kann Glukose weniger lang nachgeliefert werden. Somit könnten nach dem anschließenden Absinken der Glukosekonzentrationen im Blut die hypothetischen appetitstimulierenden Effekte, die auf Grund der verringerten Serotoninausschüttung aus den Darmzellen diskutieren werden könnten, zur Wirkung kommen. Allerdings fehlen dazu noch Daten aus *in vivo* Studien, die möglicherweise mehr Klarheit bringen könnten.

## 5.6 Bioverfügbarkeit

Über Absorption und Metabolismus der zu den sekundären Pflanzenstoffen gehörenden Flavonoide wurden im Allgemeinen schon viele *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt. Allerdings umfassen die Flavonoide eine Vielzahl an Verbindungen, deren Absorptionsraten und Bioverfügbarkeiten sich auf Grund zahlreicher Faktoren, wie etwa Art und Ausmaß der Glykosilierung, Nahrungsquellen, Lebensmittelmatrix sowie auch interindividuelle Unterschiede in Enzymaktivitäten oder mikrobieller Darmbesiedelung stark unterscheiden können [Graefe et al., 2001; D'Archivio et al., 2010]. Verbindungen, die in großer Menge in pflanzlicher Nahrung vorkommen,

müssen daher nicht notwendigerweise auch zu den höchsten Konzentrationen an Metaboliten in Plasma und Geweben führen. Während Flavonoidaglyka aufgrund ihrer Lipophilie besser absorbiert werden können, müssen Flavonoidglykoside erst deglykosiliert werden, um in den systemischen Kreislauf zu gelangen [Crespy et al., 2002].

Zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Flavanons Homoeriodictyol finden sich in der Literatur kaum Hinweise, doch liegen bereits *in vitro* Studien vor, die auf eine transzelluläre passive Diffusion über den einschichtigen Zellrasen der Caco-2-Zellen hinweisen [Kobayashi und Konishi, 2008; Kobayashi et al., 2012]. Außerdem wurden auch in Humanstudien nach Verabreichungen von Zitrussäften oder aus Früchten isolierten Flavanonglykosiden glukuronidierte und sulfatierte Metabolite des Homoeriodictyols in Plasma und Urin nachgewiesen [Miyake et al., 2006; Medina et al., 2012]. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde das Homoeriodictyol allerdings in Form des Agykロン als dessen Natriumsalz eingesetzt.

Abgesehen von diskutierten gesundheitsfördernden Eigenschaften dieses Flavanons, wie zum Beispiel antioxidativen [Yao et al., 2006] oder antikanzerogenen Effekten [Doostdar et al., 2000], ist vor allem auch seine Verwendungsmöglichkeit als bittermaskierende Substanz im pharmazeutischen Bereich sowie im Bereich funktioneller Lebensmittel von Interesse. Aufgenommen werden Homoeriodictyol und seine Glykoside über Zitrusfrüchte oder Kräuterpflanzen. Mittels Extraktion kann das Flavanon aus dem Strauch Herba Santa (*Eriodictyon californicum*), in dem es in hohen Konzentrationen vorkommt, gewonnen werden [Ley et al., 2004]. Herba Santa wurde historisch zum Beispiel zur Behandlung von Erkältungen oder Asthma eingesetzt und bereits im späten 19. Jahrhundert wurden alkoholische Extrakte des Strauchs verwendet, um die Bitterkeit von Quinin zu maskieren [Gaudette und Pickering, 2012]. Produkte aus Herba Santa wurden in der pharmazeutischen Industrie auf Grund der bittermaskierenden Eigenschaften schon länger eingesetzt, allerdings sind diese Produkte wegen ihres Aromas für viele pharmazeutische Anwendungen oder den Einsatz im Lebensmittelbereich nicht geeignet. Es konnte aber gezeigt werden, dass in dieser Pflanze vorkommendes Homoeriodictyol (331 $\mu$ M) und besonders sein

Natriumsalz (308 µM) die Bitterkeit von Bitterstoffen wie Koffein reduzieren [Ley et al., 2005] und somit eine interessante Verwendungsmöglichkeit im Bereich funktioneller Lebensmittel darstellen.

Da diese Verbindung im *in vitro* Modell der Darmzellen die besprochenen Effekte gezeigt hat, könnte man nun hypothetisch davon ausgehen, dass sie auch *in vivo* zu den diskutierten Effekten führt. Um nun im menschlichen Darm eine Konzentration von 100 µM NaHED, die Testkonzentration, die in signifikanten Effekten auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung resultierte, zu erreichen, müssten entsprechend etwa 33 mg/L NaHED vorliegen. Im Zuge der Passage durch den Magen kann es durch die Sekretion des Magensafts im Zuge der Verdauung zu einer Verdünnung der Testsubstanz kommen, wodurch sich die Menge, die man aufnehmen müsste, erhöht. Als Basissekretionsmenge im nüchternen Zustand werden beim Menschen 5-15 ml/h angenommen [Spornitz, 2013], während pro Mahlzeit etwa 400-800 ml Magensaft sezerniert werden [Tsaioun und Kates, 2011]. Um die ermittelten Effekte der Testsubstanz hypothetisch auch *in vivo* zu erhalten, müsste das NaHED mit zusätzlicher Nahrung aufgenommen werden. Unter Berücksichtigung dieser Verdünnung mit sezerniertem Magensaft und unter Annahme der Aufnahme in 500 ml Flüssigkeit, wären hypothetisch insgesamt mindestens 23-30 mg NaHED erforderlich, um die gewünschte Konzentration im Darm zu erreichen.

Fletcher et al. [2011] erhalten nach alkoholischer Extraktion aus 2 kg getrockneter *E. californicum* Blätter eine Ausbeute von 10 g Homoeriodictyol (0,5 %), während Ley et al. [2005] sogar eine Ausbeute von 1,5-2,5 % Homoeriodictyol bezogen auf die Trockenmasse angeben. Um die Homoeriodictyol-Konzentration im Darm zu erhalten, die für die gezeigten Effekte auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung erforderlich sind, werden durchschnittlich mindestens 1,5-2 g Blätter von *E. californicum* benötigt. Ob allerdings die Aufnahme der Pflanze selbst direkt oder in Form eines Teeaufgusses in dieser Menge für die nachgewiesenen physiologischen Effekte ausreicht, ist fraglich, da diese extrahierten Homoeriodictyol-Konzentrationen mittels optimierter Methoden gewonnen wurden und bisher auch keine Daten zur Bioverfügbarkeit des Homoeriodictyol zur Verfügung stehen.

## **6. Schlussbetrachtung**

Die Wirkmechanismen vieler phenolischer Verbindungen auf zellulärer und molekularer Ebene sowie deren pharmakologisches Potential sind gut erforscht. So sind die zur Gruppe der Flavonoide zählenden Substanzen Phloretin und dessen Glykosid Phlorizin unter anderem schon lange wegen ihrer inhibierenden Wirkungen auf den intestinalen Glukosetransporter (GLUT2) [Jordan und Holman, 1992] beziehungsweise den natriumabhängigen Glukosetransporter 1 (SGLT1) [Review White, 2010], der in Dünndarm und Niere zu finden ist, bekannt. Wegen dieser Fähigkeit, die Glukoseaufnahme in die Enterozyten zu hemmen, wurden sie auch für die Experimente im Zuge der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Auch für die hier getestete, ebenfalls zu den Flavonoiden gehörende Verbindung Homoeriodictyol sind bereits physiologische Effekte wie beispielsweise antioxidative oder antikanzerogene Eigenschaften [Doostdar et al., 2000] nachgewiesen worden.

Zahlreiche Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass unterschiedliche Flavonoide durch direkte Interaktion mit den Glukosetransportern die Glukoseaufnahme in intestinalen Zellen beeinflussen können [z.B. Johnston et al., 2005; Chen et al., 2007; Kwon et al., 2007; Zheng et al., 2012]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob auch das Natriumsalz von Homoeriodictyol einen möglichen Einfluss auf die Glukoseaufnahme im Enterozytenmodell aufweist. Im Gegensatz zu den gezeigten inhibierenden Wirkungen der unterschiedlichen getesteten phenolischen Verbindungen auf die Glukoseaufnahme [z.B. Johnston et al., 2005; Chen et al., 2007; Kwon et al., 2007; Zheng et al., 2012], stimulierte NaHED in einer Konzentration von 100 µM die intestinale Glukoseaufnahme. Zusätzlich wiesen die Resultate der gleichzeitigen Behandlung der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED und den Inhibitoren der intestinalen Glukosetransporter in Konzentrationen, die allein keine signifikante Inhibition der zellulären Glukoseaufnahme bewirkten, auf einen Beitrag des natriumabhängigen Glukosetransporters 1 (SGLT1) an der NaHED-vermittelten gesteigerten Glukoseaufnahme hin. Unter den hier getesteten Bedingungen mit einer niedrigen Glukosekonzentration zeigt sich jedoch kein Effekt des NaHED auf den Glukosetransporter 2 (GLUT2). Aufgrund der möglichen Abhängigkeit der Lokalisation des Glukosetransporters 2 (GLUT2) von Glukosekonzentrationen [Grefner et al., 2010;

Zheng et al., 2012], kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass NaHED bei höherer Glukosekonzentration auch auf den Glukosetransporter 2 wirken könnte. Allerdings muss ebenso in Betracht gezogen werden, dass noch weitere potentielle Wege existieren könnten, über die das NaHED die Glukoseabsorption beeinflussen könnte, wie etwa passive Diffusion.

Auf Ebene der Genexpression der untersuchten Glukosetransporter der Enterozyten hingegen konnten keine Effekte des NaHED gezeigt werden. Weder die Expression des SGLT1 noch jene des GLUT2 resultierten nach 15-, 30- und 60-minütiger Inkubation der Caco-2-Zellen mit dem Homoeriodictyol-Natriumsalz in einer Hinauf- oder Herunterregulierung. Die gemeinsame Behandlung der Zellen mit NaHED und den Inhibitoren der Glukosetransporter zeigte jedoch zum Teil unerwartete Effekte auf Genexpressionsebene des SGLT1-Transporters, die nur teilweise durch gegenregulatorische Maßnahmen der Zelle erklärbar sind.

Obwohl die gemessenen Werte am Detektionslimit waren, ergab die Überprüfung der Annahme einer NaHED-vermittelten verringerten Serotoninfreisetzung in Caco-2-Zellen, dass eine 5-minütige Behandlung der Zellen mit der höchsten Testkonzentration von 100 µM NaHED zu einer signifikanten Reduktion der Serotoninausschüttung führte.

Die im Rahmen der Fragestellung formulierten Hypothesen, dass das Natriumsalz des Homoeriodictyols einerseits die Glukoseaufnahme in Caco-2-Zellen beeinflusst und andererseits die Ausschüttung von Serotonin reduziert, konnten somit anhand der erhaltenen Resultate verifiziert werden. Außerdem sollte anhand des Einflusses von NaHED auf Glukoseaufnahme und Serotoninausschüttung in Caco-2-Zellen ein möglicher Zusammenhang der beiden Systeme diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, konnte in Untersuchungen schon auf eine NaHED-vermittelte reduzierte Serotoninausschüttung in neuronalen Zellen und reduzierte Serotonininspiegel in Plasma nach Verabreichung von Homoeriodictyol im Zuge einer Humanstudie hingewiesen werden [Somoza et al., 2014]. Unterstützt wird diese Annahme eines Zusammenhangs der beiden Systeme durch mehrfache Hinweise aus der Literatur, die ebenfalls auf eine Beziehung zwischen peripherem Serotonin und Blutglukosespiegel hindeuten. So wurden etwa in *in vivo* Studien nach peripherer Verabreichung von 5-HT sowohl

hypoglykämische [Sugimoto et al., 1990] als auch hyperglykämische Wirkungen [Yamada et al., 1995; Watanabe et al., 2010; Watanabe et al., 2014] nachgewiesen, wobei unterschiedliche, mit diesen Effekten möglicherweise assoziierte Wirkmechanismen diskutiert werden. Auch wenn diese Ergebnisse, vermutlich auf Grund unterschiedlicher experimenteller Bedingungen, noch nicht konsistent sind, demonstrieren sie dennoch, dass sich das Serotonin im Plasma und der Blutglukosespiegel beeinflussen können.

Da NaHED im Zuge dieser Arbeit nun sowohl auf den Mechanismus der Glukoseaufnahme als auch auf jenen der Serotoninausschüttung im Caco-2-Zellmodell in der gleichen Testkonzentration von 100 µM Einfluss nimmt, kann dies als Indiz für einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen beiden Systemen interpretiert werden. In welche Richtung diese Einflussnahme geht, ob sich also eine verringerte Freisetzung von peripherem Serotonin auf die Glukoseabsorption auswirkt oder eine gesteigerte Glukoseaufnahme die Serotoninausschüttung beeinflusst, bleibt weiter offen. In der vorliegenden Arbeit waren die Versuchsbedingungen nicht spezifisch genug, um dies zu beantworten, doch wäre diese Fragestellung ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen.

Des Weiteren könnte die hier nachgewiesene Reduktion der intestinalen Serotoninausschüttung als mögliche appetitstimulierende Wirkung des Homoeriodictyols angesehen werden, denn es existieren bereits Hinweise darauf, dass auch peripheres Serotonin an der Sättigung beteiligt ist. Auch wenn 5-HT die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und somit nicht direkt im Gehirn wirken kann, liegt offenbar trotzdem die Möglichkeit einer indirekten Wirkung vor, wie *in vivo* Modelle zeigen, in denen peripher verabreichtes Serotonin ein früheres Eintreten von Sättigung auslöste [Edwards und Stevens, 1991; Simansky et al., 1992]. Außerdem liefert die Arbeit von Hillsley und Grundy [1998] Hinweise zur Annahme, dass Serotonin über Aktivierung vagaler afferenter Nervenfasern des Dünndarms im Gehirn wirken könnte und Mazda et al. [2004] zeigen, dass peripheres Serotonin die neuronale Aktivität in Gehirnregionen, die mit Energiebalance assoziiert sind, erhöht.

Abschließend betrachtet könnten die gezeigten stimulierenden Effekte des NaHED auf die Glukoseaufnahme in Caco-2-Zellen, die auch auf eine mögliche gesteigerte

Glukoseaufnahme *in vivo* hindeutet, sowie die NaHED-vermittelte verringerte Serotoninfreisetzung, die als Hinweis auf eine mögliche appetitstimulierende Wirkung dieser Verbindung interpretiert werden kann, auch in der Humananwendung von Interesse sein. So wäre es beispielsweise denkbar, dass die genannten Effekte dieses hier getesteten Flavanons ein Ausgangspunkt für die Entwicklung von Methoden zur Behandlung von Mangelernährung und Untergewicht sein könnten.

## 7. Zusammenfassung

Während das in *Eriodictyon californicum* vorkommende Flavonoid Homoeriodictyol bisher vor allem für gesundheitsfördernde und bittermaskierende Wirkungen bekannt war, wurden nun im Rahmen dieser Masterarbeit der Einfluss des Homoeriodictyol-Natriumsalzes (NaHED) auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung sowie eine mögliche Interaktion dieser beiden Systeme im Caco-2-Zellmodell untersucht, welches auf Grund vieler Ähnlichkeiten zu Enterozyten modellhaft die intestinale Barriere imitiert. Um einen möglichen NaHED-vermittelten Effekt auf die Glukoseaufnahme sowie die mögliche Beteiligung der intestinalen Glukosetransporter in Caco-2-Zellen zu ermitteln, wurde ein fluoreszenz-basierter Glukoseaufnahme-Assay unter Verwendung spezifischer Inhibitoren von GLUT2 und SGLT1 durchgeführt. Zusätzlich wurde mittels qRT-PCR der mögliche Einfluss des NaHED auf Genexpressionsebene der Glukosetransporter ermittelt. Die Hypothese einer verringerten Serotoninausschüttung in Caco-2-Zellen nach Behandlung mit NaHED, basierend auf Untersuchungen, die eine NaHED-vermittelte verringerte Serotoninfreisetzung in neuronalen Zellen, sowie reduzierte Serotonininspiegel in Plasma nach Verabreichung von NaHED im Zuge einer Humanstudie zeigen, wurde mittels Serotonin-sensitiven ELISA Kits getestet. Hinweise in der Literatur deuten zudem auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen peripherem Serotonin und Glukosemetabolismus hin. Die Ergebnisse der Masterarbeit zeigen sowohl Glukoseaufnahme-steigernde als auch Serotoninausschüttung-verringende Effekte nach 30- bzw. 5-minütiger Inkubation der Caco-2-Zellen mit 100 µM NaHED. Der Einsatz der Inhibitoren Phloretin und Phlorizin deutet auf Mitwirken des SGLT1 an der gesteigerten Glukoseaufnahme hin, während unter den eingesetzten Testbedingungen keine Wirkung auf die apikalen GLUT2-Level in Caco-2-Zellen gezeigt wurde. Auf Genexpressionsebene zeigte die Behandlung der Zellen mit NaHED weder eine Hinauf- noch Herunterregulierung der Glukosetransporter. Der Einfluss des NaHED in gleicher Konzentration (100 µM) auf Glukoseaufnahme und Serotoninfreisetzung könnte als Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen peripherem Serotonin und Glukosemetabolismus gedeutet werden, während die verringerte Serotoninausschüttung, unterstützt durch Hinweise auf einen potentiellen Beitrag des peripheren Serotonins an der Sättigung, als appetitstimulierende Wirkung des NaHED interpretiert werden kann.

## 8. Summary

Up to now homoeriodictyol, a flavanone from *Eriodictyon californicum* has been known mainly for its bitter-masking and health-promoting effects. Here, another physiological aspect, the influence of homoeriodictyol sodium salt (NaHED) on glucose uptake and serotonin release, as well as a possible interaction between these two systems in Caco-2 cells were investigated. This human colonic cell line sharing similarities with enterocytes is adapted to imitate the intestinal barrier. To determine a potential NaHED-mediated effect on glucose uptake as well as the possible involvement of the intestinal glucose transporters in Caco-2 cells, a fluorescence-based glucose uptake assay with use of specific inhibitors of GLUT2 and SGLT1 was carried out. Moreover, the influence of NaHED at the level of gene expression of GLUT2 and SGLT1 was investigated by means of qRT-PCR. The hypothesis of a decreased serotonin release in Caco-2 cells after treatment with NaHED, which is also based on preliminary studies, showing a NaHED mediated reduced serotonin release in neural cells and a decreased serotonin level in plasma after treatment with NaHED in a human intervention study, was tested by means of a serotonin sensitive ELISA kit. In addition, several studies already suggest a relationship between peripheral serotonin and glucose metabolism. The results of this master thesis show both, glucose uptake increasing effects after 30 minutes incubation of Caco-2 cells with NaHED in a concentration of 100 µM, and a decreased serotonin release after 5 minutes incubation, respectively. The use of GLUT2 and SGLT1 inhibitors Phloretin and Phlorizin indicated the contribution of the sodium dependent glucose transporter 1 in the increased glucose, while NaHED did not show any effects on apical GLUT2 levels in Caco-2 cells under the mentioned conditions. On the level of gene expression of SGLT1 and GLUT2 the treatment of Caco-2 cells with NaHED neither resulted in an up- nor in a down-regulation of these transporters.

The influence of NaHED in the same concentration of 100 µM on glucose uptake and serotonin release in Caco-2 cells could be interpreted as an indication of a possible relationship between peripheral serotonin und glucose metabolism, while the decreased serotonin release could be understood as appetite stimulating effect of NaHED.

## 9. Literaturverzeichnis

Alfred Brousseau © 1995 Saint Mary's College of California

Amireault P, Hatia S, Bayard E, Bernex F, Collet C, Callebert J, Launay JM, Hermine O, Schneider E, Mallet J, Dy M, Côté F. Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108 (32): 13141–13146.

Andrews OW, Bharwani A, Lee KR, Fox M, Thomson JA. Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2015; 51: 164-188.

Anton M, Bekele YZ, Biggs PJ, Dante R, Deniz S, Foernzler D, Franke I, Green A, Harrison ESI, Hermann D, Hloch B, Holzer GW, Konetschny C, Magdinier F, Metzler T, Mustill WJ, Ortega X, Paduch DA, Pohjanvirta R, Rüger B, Schmidt M, Schubert M, Seth O, Skarnes WC, Sobek H, Valvano MA, White I: PCR Applications Manual 3<sup>rd</sup> edition. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim 2006. Internet: <http://www.gene-quantification.de/ras-pcr-application-manual-3rd-ed.pdf> (Stand 20.06.2015)

Barrenetxe J, Sainz N, Barber A, Lostao MP. Involvement of PKC and PKA in the inhibitory effect of leptin on intestinal galactose absorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004; 317 (3): 717-721.

Bechtold DA, Brown TM, Luckman SM, Piggins HD. Metabolic rhythm abnormalities in mice lacking VIP-VPAC2 signaling. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2008; 294: 344–351.

Bentley JC, Marsden CA, Sleight AJ, Fone KCF. Effect of the 5-HT<sub>6</sub> agonist, Ro 04-6790 on food consumption in rats trained to a fixed feeding regime. *British Journal of Pharmacology* 1999; 126: 66.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* 2009; 60: 355–366.

Berridge MV, Tan AS, Mccoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 15–20.

Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1993; 303 (2): 474-82.

Bertrand PP, Bertrand RL. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. *Autonomic Neuroscience* 2010; 153 (1-2): 47–57.

Blais A, Bissonnette P, Berteloot A. Common characteristics for Na<sup>+</sup>-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *The Journal of Membrane Biology* 1987; 99 (2): 113-25.

Bonsi P, Cuomo D, Ding J, Sciamanna G, Ulrich S, Tscherter A, Bernardi G, Surmeier DJ, Pisani A. Endogenous serotonin excites striatal cholinergic interneurons via the activation of 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, and 5-HT<sub>7</sub> serotonin receptors: implications for extrapyramidal side effects of serotonin reuptake inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 1840-1854.

Boulenc X, Bourrie M, Fabre I, Roque C, Joyeux H, Berger Y, Fabre G. Regulation of cytochrome P450IA1 gene expression in a human intestinal cell line, Caco-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1992; 263 (3): 1471-8.

Campfield LA, Smith FJ. Transient declines in blood glucose signal meal initiation. *International Journal of Obesity* 1990; 14 (3): 15-31; discussion 31-4.

Chang W-T, Huang W-C, Liou C-J. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry* 2012; 134 (2): 972-9.

Chaput JP, Tremblay A. The glucostatic theory of appetite control and the risk of obesity and diabetes. *International Journal of Obesity (London)* 2009; 33 (1): 46-53.

Cheeseman CI. GLUT2 is the transporter for fructose across the rat intestinal basolateral membrane. *Gastroenterology* 1993; 105 (4): 1050-6.

Chen CH, Hsu HJ, Huang YJ, Lin CJ. Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters. *Planta Medica* 2007; 73 (4): 348-54.

Corpe CP, Burant CF. Hexose transporter expression in rat small intestine: effect of diet on diurnal variations. *American Journal of Physiology* 1996; 271 (1 Pt 1): 211-6.

Cox LS, Harris DA, Pears CJ. *Thrive in Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford and University Press, Oxford, United Kingdom; 2012.

Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50 (3): 618–21.

D'Archivio M, Filesi C, Varì R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. International Journal of Molecular Sciences, 2010; 11 (4): 1321-1342.

D'Souza UM, Craig IW. Genetic organization of the serotonergic system. In: Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin (Müller CP, Jacobs BL; Hsg.), Academic Press, London, UK; 2010.

Daniel D. Lam, Alastair S. Garfield, Oliver J. Marston, Jill Shaw, Lora K. Heisler. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 2010; 97 (1): 84-91.

Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. FEBS Letters 2000; 468 (2-3): 166-170.

Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, Williamson G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. Biochemical Pharmacology 2003; 65 (7): 1199-1206.

Dockray GJ. Luminal sensing in the gut: an overview. Journal of physiology and pharmacology 2003; 54 (4): 9–17.

Doostdar H, Burke MD, Mayer RT. Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. Toxicology 2000; 144 (1-3): 31–38.

Drexler HG, Uphoff CC. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal 2002; 38 (2): 79-85.

Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology 2002; 39 (2): 75–90.

Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal Leptin Induces Rapid Inhibition of Active Intestinal Absorption of Glucose Mediated by Sodium-Glucose Cotransporter 1. Diabetes, 2005; 54 (2): 348-354.

Edwards S, Stevens R. Peripherally administered 5-hydroxytryptamine elicits the full behavioural sequence of satiety. Physiology & Behavior 1991; 50 (5): 1075-1077.

Ehrenkranz JR, Lewis NG, Kahn CR, Roth J. Phlorizin: A review. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 2005; 21 (1): 31-38.

Erspamer V. The pharmacology of indolealkylamines. *Pharmacological Reviews* 1954; 6 (4): 425-487.

Feijó Fde M, Bertoluci MC, Reis C. Serotonin an hypothalamic control of hunger: a review. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2011, 57 (1): 74-7.

Fernstrom JD, Fernstrom MH. Exercise, serum free tryptophan, and central fatigue. *Journal of Nutrition* 2006; 136: 553–559.

Ferraris RP, Yasharpour S, Lloyd KCK, Diamond JM. Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *American Journal of Physiology* 1990; 259: 822-837.

Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry* 1999; 68: 355–81.

Fletcher JN, Kinghorn AD, Slack JP, McCluskey TS, Odley A, Jia Z. In vitro evaluation of flavonoids from *Eriodictyon californicum* for antagonist activity against the bitterness receptor hTAS2R31. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59 (24): 13117-21.

Fletcher PJ, Burton MJ. Microstructural analysis of the anorectic action of peripherally administered 5-HT. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1986; 24: 1133–1136.

Frassetto A, Zhang J, Lao JZ, White A, Metzger JM, Fong TM, Chen RZ. Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT6 receptor. *Brain Research* 2008; 1236: 140–4.

Fujimiya M, Yamamoto H, Kuwahara A. Effect of VIP and PACAP on basal release of serotonin from isolated vascularly and luminally perfused rat duodenum. *American Journal of Physiology* 1998b; 275 (4 Pt 1): 731-9.

Garfield AS, Burke LK, Shaw J, Evans ML, Heisler LK. Distribution of cells responsive to 5-HT receptor antagonist-induced hypophagia. *Behavioural Brain Research* 2014; 266 (100): 201–206.

Gaudette NJ, Pickering GJ. The efficacy of bitter blockers on health-relevant bitterants. *Journal of Functional Foods*, 2012; 4 (1): 177–184.

Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 2007; 132 (1): 397–414.

Gershon MD. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 2013; 20: 14–21.

Gill RK, Pant N, Saksena S, Singla A, Nazir TM, Vohwinkel L, Turner JR, Goldstein J, Alrefai WA, Dudeja PK. Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 2008; 294 (1): 254–262.

Gómez-Zavaglia A. Quantum chemical calculations in the structural analysis of phloretin. Journal of Molecular Structure 2009; 930 (1-3): 187–194.

Graëfe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. Journal of Clinical Pharmacology 2001; 41: 492–499.

Grahame-Smith DG. The biosynthesis of 5-hydroxytryptamine in brain. Biochemical Journal 1967; 105: 351-360.

Grefner NM, Gromova LV, Gruzdkov AA, Komissarchik YY. Comparative Analysis of SGLT1 and GLUT2 Transporters Distribution in Rat Small Intestine Enterocytes and Caco-2 Cells during Hexose Absorption. Cell and Tissue Biology 2010; 4 (4): 354-361.

Grether-Beck S, Felsner I, Brenden H, Kohne Z, Majora M, Marini A, Jaenicke T, Rodriguez-Martin M, Trullas C, Hupe M, Elias PN, Krutmann J. Urea uptake enhances barrier function and antimicrobial defense in humans by regulating epidermal gene expression. Journal of Investigative Dermatology 2012; 132 (6): 1561–1572.

Halford JCG, Blundell JE. Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. Annals of Medicine 2000; 32 (3): 222–32.

He L, Vasiliou K, Nebert DW. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. Human Genomics 2009; 3 (2): 195-206.

Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Nature 1987; 330 (6146): 379-81.

Heller SR, Cryer PE. Reduced neuroendocrine and symptomatic responses to subsequent hypoglycemia after 1 episode of hypoglycemia in nondiabetic humans. Diabetes 1991; 40 (2): 223-6.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck JA, Kellett GL. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the ERK, p38 and PI 3-kinase

intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. Biochemical Journal 2000b; 350:163–169.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck JA, Kellett GL. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. Biochemical Journal 2000a; 350:149–154.

Helm KA, Rada P, Hoebel BG. Cholecystokinin combined with serotonin in the hypothalamus limits accumbens dopamine release while increasing acetyl-choline: a possible satiation mechanism. Brain Research 2003; 963: 290–7.

Hillsley K, Grundy D. Serotonin and cholecystokinin activate different populations of rat mesenteric vagal afferents. Neuroscience Letters 1998; 255 (2) 63–66.

Hornung J-P. The neuroanatomy of the serotonergic system In: Handbook of the Behavioural Neurobiology of Serotonin (Müller CP, Jacobs BL; Hsg.), Academic Press, San Diego, USA; 2010.

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacol Biochem Behav 2002;71:533–54.

Hüther G, Rüther E. Das serotonerge System. Uni-Med Verlag AG, Bremen, Deutschland; 2000.

Iceta R, Mesonero JE, Aramayona JJ, Alcalde AI. (2009). Expression of 5-HT1A and 5-HT7 receptors in Caco-2 cells and their role in the regulation of serotonin transporter activity. Journal of Physiology and Pharmacology 2009; 60 (1): 157–164.

Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. FEBS Letters 2005; 579 (7): 1653-7.

Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? Journal of Cellular Physiology 2008; 217 (2): 301-6.

Jordan NJ, Holman GD. Photolabelling of the liver-type glucose-transporter isoform GLUT2 with an azirifluoroethylbenzoyl-substituted bis-D-mannose. Biochemical Journal 1992; 286 (2): 649–656.

Kellett GL, Brot-Laroche E. Apical GLUT2: A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. Diabetes 2005; 54 (10): 3056-3062.

Kellett GL, Helliwell PA. The diffusive component of intestinal glucose absorption is

mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochemical Journal* 2000; 350 (1): 155–162.

Keszthelyi D, Troost FJ, Mascllee AA. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology & Motility* 2009; 21 (12): 1239-49.

Khan MK, Huma ZE, Dangles O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 2014; 33 (1): 85–104.

Kobayashi S, Konishi Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 368 (1): 23-9.

Kobayashi S, Nagai T, Konishi Y, Tanabe S, Morimoto K, Ogihara T. Transport mechanisms of flavanone aglycones across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 64 (1): 52-60.

Kwon O, Eck P, Chen S, Corpe CP, Lee JH, Kruhlak M, Levine M. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *FASEB Journal* 2007; 21 (2): 366-377.

Lam DD, Heisler LK. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2007; 9 (5): 1-24.

Lata B, Trampczynska A, Paczesna J. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 2009; 121, 176–181. 121 (2): 176-181.

Levin BE, Routh VH, Kang L, Sanders NM, Dunn-Meynell AA. Neuronal Glucosensing What Do We Know After 50 Years? *Diabetes* 2004; 53 (10): 2521-2528.

Ley JP, Krammer G, Reinders G, Gatfield IL, Bertram HJ. Evaluation of Bitter Masking Flavanones from Herba Santa (*Eriodictyon californicum* (H. & A.) Torr., Hydrophyllaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53 (15): 6061–6066.

Ley JP, Reiss I, Blings M, Hoffmann-Lucke P, Herzog J. 2004. Technical process for isolating homoeriodictyol. WO Patent 2,004,041,804.

Gstraunthaler G, Lindl T. Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013.

Liu Q, Liu L, Zhou J, Shin H-D, Chen RR, Madzak C, Li J, Du G, Chen J. Biosynthesis of homoeriodictyol from eriodictyol by flavone 3-O-methyltransferase from recombinant *Yarrowia lioplytica*: Heterologous expression, biochemical characterization, and optimal transformation. *Journal of Biotechnology* 2013; 167 (4): 472–478.

Lotito SB, Frei B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine* 2004; 36 (2): 201-11.

Louis-Sylvestre J, Le Magnen J. Fall in blood glucose level precedes meal onset in free-feeding rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 1980; 4 (1): 13-5.

Maenz DD, Cheeseman CI. The Na<sup>+</sup>-independent D-glucose transporter in the enterocyte basolateral membrane: orientation and cytochalasin B binding characteristics. *The Journal of Membrane Biology* 1987; 97 (3): 259-66.

Mahraoui L, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Zweibaum A, Rousset M, Brot-Laroche E. Presence and differential expression of SGLT1, GLUT1, GLUT2, GLUT3 and GLUT5 hexose-transporter mRNAs in Caco-2 cell clones in relation to cell growth and glucose consumption. *Biochemical Journal* 1994; 298 (3): 629-33.

Mahraoui L, Rousset M, Dussaulx E, Darmoul D, Zweibaum A, Brot-Laroche E. Expression and localization of GLUT-5 in Caco-2 cells, human small intestine, and colon. *American Journal of Physiology* 1992; 263 (3 Pt 1): 312–318.

Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémesy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57 (2): 235-42.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 81 (1): 230-242.

Marston OJ, Garfield AS, Heisler LK. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *European Journal of Pharmacology* 2011; 660 (1): 70-9.

Matsumoto H, Ikoma Y, Sugiura M, Yano M, Hasegawa Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52 (21):

6653–6659.

Mayer J. Regulation of energy intake and the body weight, the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1955; 63 (1): 15–43.

Mazda T, Yamamoto H, Fujimura M, Fujimiya M. Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT<sub>3</sub> receptors in conscious rats. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004; 287 (1): 228–235.

Medina S, Dominguez-Perles R, Garcia-Viguera C, Cejuela-Anta R, Martinez-Sanz JM, Ferreres F, Gil-Izquierdo A. Physical activity increases the bioavailability of flavanones after dietary aronia-citrus juice intake in triathletes. *Food Chemistry* 2012; 135 (4): 2133-2137.

Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutrition* 2000; 16 (10): 843-57.

Miesner J, Smith GP, Gibbs J, Tyrka A. Intravenous infusion of CCKA-receptor antagonist increases food intake in rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1992; 262 (2): 216–219.

Miyake Y, Sakurai C, Usuda M, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, Osawa T, Kondo K. Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in human. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2006; 52 (1): 54-60.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2008; 31 (3): 187-99.

Mosienko V, Beis D, Pasqualetti M, Waider J, Matthes S, Qadri F, Bader M, Alenina N. Life without brain serotonin: Reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behavioural Brain Research* 2015; 277: 78–88.

Mueckler M. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry* 1994; 219 (3): 713-25.

Myers MG Jr, Münzberg H, Leinninger GM, and Leshan RL. The geometry of leptin action in the brain: more complicated than a simple ARC. *Cell Metabolism* 2009; 9 (2): 117–123.

Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, Hickel P, Le Meur M, Messaddeq N, Launay JM, Maroteaux L. Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97 (17): 9508-13.

Nielsen I L F, Chee W SS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen S E, Frederiksen H, Enslen M, Barron D, Horcajada M-N, Williamson G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. *The Journal of Nutrition* 2006; 136 (2): 404-408.

Nozawa K, Kawabata-Shoda E, Doihara H, Kojima R, Okada H, Mochizuki S, Sano Y, Inamura K, Matsushima H, Koizumi T, Yokoyama T, Ito H. TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009; 106 (9): 3408-3413.

O'Hara JR, Ho W, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA. Enterendoctrine cells and 5-HT availability are altered in mucosa of guinea pig with TNBS ileitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004; 287 (5): 998-1007.

O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research* 2015; 277: 32-48.

Overduin J, Gibbs J, Cummings DE, Reeve JR Jr. CCK-58 elicits both satiety and satiation in rats while CCK-8 elicits only satiation. *Peptides* 2014; 54: 71-80.

Pappenheimer JR, Reiss KZ. Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat. *Journal of Membrane Biology* 1987; 100: 123-136.

Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinkel J, Bader M, Skelin M, Jevšek M, Fink H, Rupnik M, Walther DJ. Intracellular Serotonin Modulates Insulin Secretion from Pancreatic  $\beta$ -Cells by Protein Serotonylation. *PLOS Biology* 2009; 7 (10): e1000229.

Pei F, Li B-Y, Zhang Z, Yu F, Li X-L, Lu W-D, Cai G, Gao H-Q, Shen L. Beneficial effects of phlorizin on diabetic nephropathy in diabetic db/db mice. *Journal of Diabetes and its Complications* 2014; 28 (5): 596-603.

Penicaud L, Leloup C, Lorsignol A, Alquier T, Guillod E. Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and*

Metabolic Care 2002; 5 (5): 539-43.

Peter D, Liu Y, Sternini C, de Giorgio R, Brecha N, Edwards RH. Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15: 6179-6188.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell* 1983; 47: 323-30.

Pletscher A. Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 1968; 32 (1): 1-16.

Pollock JD, Rowland N. Peripherally administered serotonin decreases food intake in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1981; 15 (2): 179-183.

Puel C, Quintin A, Mathey J, Obled C, Davicco MJ, Lebecque P, Kati-Coulibaly S, Horcajada MN, Coxam V. Prevention of bone loss by phloridzin, an apple polyphenol, in ovariectomized rats under inflammation condition. *Calcified Tissue International* 2005; 77 (5): 311-8.

Racké K, Reimann A, Schwörer H, Kilbinger H. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research* 1996; 73(1-2): 83-7.

Raybould H. Visceral perception: sensory transduction in visceral afferents and nutrients. *Gut* 2002; 51 (I): 11-14.

Rezk BM, Haenen GRMM, van der Vijgh WJF, Bast A. The antioxidant activity of phloretin: the disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 295 (1): 19-13.

Riedel A, Lang R, Rohm B, Rubach M, Hofmann T, Somoza V. Structure-dependent effects of pyridine derivatives on mechanisms of intestinal fatty acid uptake: Regulation of nicotinic acid receptor and fatty acid transporter expression, and modification of trans-epithelial electrical resistance in enterocyte-like Caco-2-cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2014; 25: 750-7.

Ritter RC. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiology & Behavior* 2004; 81: 249-273.

Roberts JC, Reavill C, East SZ, Harrison PJ, Patel S, Routledge C, Leslie RA. The dis-

- tribution of 5-HT(6) receptors in rat brain: an autoradiographic binding study using the radiolabelled 5-HT(6) receptor antagonist. *Brain Research* 2002; 934 (1): 49–57.
- Rohm B, Riedel A, Ley JP, Widder S, Krammer GE, Somoza V. Capsaicin, nonivamide and trans-pellitorine decrease free fatty acid uptake without TRPV1 activation and increase acetyl-coenzyme A synthetase activity in Caco-2 cells. *Food & Function* 2015; 6: 172-84.
- Rosmond R, Bouchard C, Björntorp P. Increased abdominal obesity in subjects with a mutation in the 5-HT(2A) receptor gene promoter. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; 96: 571-57.
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2006; 8: 1–27.
- Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, Levi E, Hatfield JS, Kuhn DM. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Research* 2006; 1085 (1):11-18.
- Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology* 2005; 21(1):1-26.
- Scow S, Iqbal CW, Jones TW III, Qandeel HG, Zheng Y, Duenes JA, Nagao M, Madhavan S, Sarr MG. Absence of evidence of translocation of GLUT2 to the apical membrane of enterocytes in everted intestinal sleeves. *Journal of Surgical Research* 2011; 167 (1): 56-61.
- Shetgiri N, Rege L. Novel Synthesis of 4',5,7-Trihydroxy-3'-methoxyflavanone (Homoeriodictyol). *ChemInform* 2003; 34 (24): 648–650.
- Shirosaki M, Koyama T, Yazawa K. Apple leaf extract as a potential candidate for suppressing postprandial elevation of the blood glucose level. *Journal of nutritional science and vitaminology (Tokyo)*, 2012; 58 (1): 63-7.
- Shirosaki M, Koyama T, Yazawa K. Suppressive effect of peach leaf extract on glucose absorption from the small intestine of mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2012; 76(1): 89-94.
- Shu G, Lu N-S, Zhu X-T, Xu Y, Du M-Q, Xie Q-P, Zhu C-J, Xu Q, Wang S-B, Wang L-N, Gao P, Xi Q-Y, Zhang Y-L, Jiang Q-Y. Phloretin promotes adipocyte differentiation

in vitro and improves glucose homeostasis in vivo. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2014; 25 (12): 1296–1308.

Simansky KJ, Jakubow J, Sisk FC, Vaidya AH, Eberle-Wang K. Peripheral serotonin is an incomplete signal for eliciting satiety in sham-feeding rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 1992; 43 (3): 847-54.

Somoza V, Rohm B, Liszt K, Pignitter M, Hochkogler CM, Ley J, Widder S, Krammer G. Hydroxyflavanone als Mittel zur Beeinflussung des Appetits und der Energieaufnahme, als Mittel zur Steigerung des Appetits sowie entsprechende Stoffmischungen, oral konsumierbare Produkte und Verfahren; (C3268 EP, SY 442 EP, 14179087.3-1460). 2014.

Song J, Kwon O, Chen S, Daruwala R, Eck P, Park JB, Levine M. Flavonoid Inhibition of Sodium-dependent Vitamin C Transporter 1 (SVCT1) and Glucose Transporter Isoform 2 (GLUT2), Intestinal Transporters for Vitamin C and Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 15252-15260.

Spiller R. Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterology & Motility* 2007; 19 (2): 25-31.

Spiller R. Serotonin, inflammation, and IBS: fitting the jigsaw together? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2007; 45 (2): 115–9.

Spornitz UM. Anatomie und Physiologie für Pflegeberufe. Springer-Verlag, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2013.

Sugimoto Y, Kimura I, Yamada J, Watanabe Y, Takeuchi N, Horisaka K. Effects of Serotonin on Blood Glucose and Insulin Levels of Glucose and Streptozotocin-Treated Mice. *The Japanese Journal of Pharmacology* 1990; 54 (1): 93-96.

Sumara G, Sumara O, Kim JK, Karsenty G. Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metabolism* 2012; 16 (5): 588–600.

Telles MM, da Silva TG, Watanabe RLH, de Andrade IS, Estadella D, Nascimento CMO, Oyama LM, Ribeiro EB. Lateral hypothalamic serotonin is not stimulated during central leptin hypophagia. *Regulatory Peptides* 2013; 184: 75-80.

Thorens B. Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Annual Review of Physiology* 1993; 55: 591-608.

Tomás-Navarro M, Vallejo F, Borrego F, Tomás-Barberán FA. Bioavailability and Metabolism of Citrus Fruit Beverage Flavanones in Humans. In: Polyphenols in Human Health and Disease (Watson RR, Preedy VR, Zibadi S; Hsg.), Academic Press; 2014.

Tsaioun K, Kates SA. ADMET for Medicinal Chemists: A Practical Guide. John Wiley & Sons, 2011.

van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 2005; 1 (2):175-85.

Vayro S, Silverman M. PKC regulates turnover rate of rabbit intestinal Na<sup>+</sup>-glucose transporter expressed in COS-7 cells. American Journal of Physiology, 1999; 276 (5 Pt 1): 1053-60.

Verbeuren TJ. Synthesis, storage, release, and metabolism of 5-hydroxytryptamine in peripheral tissues. In: The Peripheral Actions of 5-HT (Fozard JR; Hsg.), Oxford Medical Publications, Oxford; 1989.

Voigt JP, Fink H. Serotonin controlling feeding and satiety. Behavioural Brain Research 2015; 277: 14-31.

Wade JM, Juneja P, Mackay AW, Graham J, Havel PJ, Tecott LH, Goulding EH. Synergistic impairment of glucose homeostasis in ob/ob mice lacking functional serotonin 2C receptors. Endocrinology 2008; 149 (3): 955–961.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science 2003; 299 (5603): 76.

Wang AY, Miura K, Uchida N. The dorsomedial striatum encodes net expected return, critical for energizing performance vigor. Nature Neuroscience. 2013; 16: 639–647.

Wang GD, Wang X-Y, Zou F, Qu M, Liu S, Fei G, Xia Y, Needleman BJ, Mikami DJ, Wood JD. Mast cell expression of the serotonin<sub>1A</sub> receptor in guinea pig and human intestine. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology 2013; 304 (10): 855–863.

Watanabe H, Akasaka D, Ogasawara H, Sato K, Miyake M, Saito K, Takahashi Y, Kanaya T, Takakura I, Hondo T, Chao G, Rose MT, Ohwada S, Watanabe K, Yamaguchi T, Aso H. Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. Endocrinology 2010; 151 (10): 4776–4786.

Watanabe H, Saito R, Nakano T, Takahashi H, Takahashi Y, Sumiyoshi K, Sato K, Chen X, Okada N, Iwasaki S, Harjanti DW, Sekiguchi N, Sano H, Kitazawa H, Rose MT, Ohwada S, Watanabe K, Aso H. Effect of peripheral 5-HT on glucose and lipid metabolism in wether sheep. PLoS One 2014; 9 (2): e88058.

White JR Jr. Apple Trees to Sodium Glucose Co-Transporter Inhibitors: A Review of SGLT2 Inhibition. Clinical Diabetes 2010; 28 (1): 5-10.

Wilder-Smith CH, Li X, Ho SSY, Leong SM, Wong RK, Koay ESC, Ferraris RP. Fructose transporters GLUT5 and GLUT2 expression in adult patients with fructose intolerance. United European Gastroenterology Journal 2014; 2 (1): 14–21.

Woolley ML, Bentley JC, Sleight AJ, Marsden CA, Fone KC. A role for 5-HT(6) receptors in retention of spatial learning in the Morris water maze. Neuropharmacology 2001; 41 (2): 210–219.

Woolley ML, Marsden CA, Fone KC. 5-HT<sub>6</sub> receptors. Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders 2004; 3 (1): 59–79.

Wright EM, Loo DDF, Hirayama BA. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. Physiological Reviews 2011; 91 (2): 733-794.

Yadav VK, Oury F, Tanaka K, Thomas T, Wang Y, Cremers S, Hen R, Krust A, Chambon P, Karsenty G. Leptin-dependent serotonin control of appetite: temporal specificity, transcriptional regulation, and therapeutic implications. Journal of Experimental Medicine 2011; 208 (1): 41–52.

Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. Cell 2008; 135 (5): 825–837.

Yamada J, Sugimoto Y, Kimura I, Takeuchi N, Horisaka K. Serotonin-induced hypoglycemia and increased serum insulin levels in mice. Life Sciences 1989; 45 (20): 1931-6.

Yamada J, Sugimoto Y, Yoshikawa T, Kimura I, Horisaka K. The involvement of the peripheral 5-HT<sub>2A</sub> receptor in peripherally administered serotonin-induced hyperglycemia in rats. Life Sciences 1995; 57 (8): 819-25.

Yamada, J., Sugimoto, Y., Hirose, H., and Kajiwara, Y. Role of serotonergic mechanisms in leptin-induced suppression of milk intake in mice. Neuroscience Letters

2003; 348 (3): 195–197.

Yao H, Liao ZX, Wu Q, Lei GQ, Liu ZJ, Chen DF, Chen JK, Zhou TS. Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of *Viscum coloratum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2006; 54 (1): 133-135.

Zheng Y, Scow JS, Duenes JA, Sarr MG. Mechanisms of glucose uptake in intestinal cell lines: Role of GLUT2. *Surgery* 2012; 151 (1): 13-25.

Zippel U, Heidel E, Davidowa H. Action of cholecystokinin and serotonin on lateral hypothalamic neurons of rats. *European Journal of Pharmacology* 1999; 379:135–40.

Zou C, Wang Y, Shen Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2005; 64 (3): 207–215.

Zuo A-R, Yu Y-Y, Shu Q-L, Zheng L-X, Wang X-M, Peng S-H, Xie Y-F, Cao S-W. Hepatoprotective effects and antioxidant, antityrosinase activities of phloretin and phloretin isonicotinyl hydrazone. *Journal of the Chinese Medical Association* 2014; 77 (6): 290-301.

## 10. Anhang

	<b>Kontrolle</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>100 µM</b>
	107,39	82,70	86,91	101,07	95,15	122,45	119,80
	106,87	122,38	90,97	112,70	124,79	76,50	108,44
	85,73	121,36	114,17	127,53	121,61	101,79	133,41
	85,21	115,77	114,92	93,98	78,25	120,71	90,27
<b>Einzelwerte (%)</b>	90,22	130,21	114,57	95,64	71,50	108,95	144,35
	124,57	117,06	79,54	139,11	67,57	108,19	138,05
	96,59	102,54	93,18	97,72	81,87	77,10	91,65
	97,98	92,37	104,95	88,84	81,34	71,00	91,08
	105,42	83,14	86,33	95,58	89,68	108,03	96,31
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	107,50	98,39	105,79	90,20	99,41	112,60
<b>STD (%)</b>	12,59	17,86	13,88	17,15	20,49	19,57	21,86

Tabelle 8: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>0,5 µM</b>	<b>5 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>500 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>					
99,05	86,53	71,38	82,11	69,84	
97,44	93,88	85,51	96,65	82,13	
103,51	78,49	106,18	92,43	76,36	
91,97	144,67	88,93	98,13	109,33	
85,95	73,34	104,98	89,00	142,43	
122,08	125,35	121,48	93,51	85,72	
103,71	94,42	77,45	116,10	105,57	
93,43	86,18	79,04	114,93	128,73	
102,86	88,19	77,46	67,26	103,48	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	96,78	90,27	94,46	100,40
<b>STD (%)</b>	10,21	23,18	16,88	15,14	24,36

Tabelle 9: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phlorizin; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>1000 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>					
75,65	77,85	96,67	105,12	216,84	
112,48	86,06	96,39	121,37	214,55	
111,88	90,81	129,13	119,90	201,38	
108,08	93,77	89,93	121,93	166,14	
102,46	92,90	107,40	114,32	216,01	
89,46	83,71	105,76	139,53	182,96	
101,02	103,11	106,79	101,77	190,48	
91,10	130,28	139,05	90,93	147,21	
107,89	85,84	97,92	111,24	121,36	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	93,82	107,67	114,01	184,10
<b>STD (%)</b>	12,32	15,44	16,23	14,02	33,50

Tabelle 10: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	Kontrolle (NaHED 100 µM + EtOH)	NaHED 100 µM + PZ 0,5 µM	NaHED 100 µM + PZ 5 µM	NaHED 100 µM + 50 µM
<b>Einzelwerte (%)</b>				
117,94	86,26	111,60	124,98	
90,72	114,53	129,77	106,32	
91,34	105,81	133,56	100,48	
90,07	118,83	107,01	86,34	
77,78	88,10	80,59	95,18	
132,16	103,02	124,27	93,71	
98,25	97,68	90,95	96,80	
102,81	97,87	103,97	92,81	
98,94	108,88	95,10	91,98	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	102,33	108,54	98,73
<b>STD (%)</b>	16,28	11,06	18,12	11,32

Tabelle 11: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phlorizin; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle (NaHED 100 µM + EtOH)</b>	<b>NaHED 100 µM + PT 1 µM</b>	<b>NaHED 100 µM + PT 10 µM</b>	<b>NaHED 100µM + PT 100 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>				
94,37	134,09	123,69	116,29	
91,76	114,83	105,62	120,71	
113,87	140,87	114,36	116,41	
92,54	70,47	88,57	92,12	
105,28	123,71	103,20	150,50	
102,18	95,66	111,43	125,81	
111,94	87,08	114,80	133,08	
86,60	112,28	133,83	82,63	
101,46	107,73	122,50	116,78	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	109,64	113,11	117,15
<b>STD (%)</b>	9,38	22,49	13,19	20,23

Tabelle 12: Rohdaten der MTT-Tests nach 60-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phloretin; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

Tabelle 13: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Ca-co-2-Zellen mit NaHED nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>0,001 µM</b>	<b>0,01 µM</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>100 µM</b>
	110,20	85,53	98,36	101,32	86,51	118,09	123,03
	109,21	102,30	140,79	95,39	103,29	116,12	134,87
	80,59	98,36	113,16	91,45	101,32	125,99	128,95
	100,00	79,26	76,50	57,14	68,20	83,41	149,77
	109,68	104,15	83,41	64,06	75,12	65,44	105,53
	90,32	98,04	88,94	18,89	76,50	82,03	112,44
	111,70	80,65	121,45	98,40	136,18	94,56	122,04
	105,17	100,27	142,58	88,15	106,72	68,94	104,08
	83,13	100,00	63,18	65,19	103,52	92,00	159,23
	102,24	105,39	94,13	66,75	104,30	126,99	158,59
	97,76	123,35	134,03	51,11	112,13	108,21	108,00
	112,13	127,03	72,23	63,49	133,79	91,79	136,38
	87,87	131,53	71,66	106,81	87,43	100,14	109,78
	126,43	108,11	110,08	87,19	94,61	146,71	133,25
	69,21	125,41	75,75	96,41	85,63	144,91	120,71
	104,36	109,19	121,56	121,56	101,80	119,76	117,44
	100,00	120,54	105,39	12,57	126,13	159,46	130,54
	100,00		114,37	103,60	117,12	158,56	141,32
	100,00		99,10	141,44		151,35	117,96
	107,21		85,59	122,16			159,46
	107,21		90,09	120,54			135,14
	85,59		105,95				
	99,46						
	99,46						
	101,08						
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	105,83	100,11	94,53	101,13	113,39	128,98
<b>STD (%)</b>	12,05	15,78	23,33	24,53	19,40	29,59	17,48

	<b>Kontrolle</b>	<b>0,5 µM</b>	<b>5 µM</b>	<b>50 µM</b>	<b>500 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>					
91,97	102,19	91,97	65,69	71,53	
108,03	137,23	110,95	106,57	77,37	
114,59	108,03	80,29	67,15	62,77	
94,12	75,06	92,71	103,29	49,65	
91,29	94,82	89,18	66,59	60,94	
112,85	87,06	82,82	73,65	52,47	
87,15	102,27	105,29	88,66	67,51	
103,69	140,05	109,82	127,96	78,09	
101,23	84,13	94,71	75,06	87,15	
95,08	134,43	103,69	112,30	90,16	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	112,41	95,86	91,60	71,94
<b>STD (%)</b>	9,55	25,17	10,78	21,45	13,46

Tabelle 14: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phlorizin nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>100 µM</b>	<b>1000 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>					
111,06	92,96	98,99	82,91	68,16	
88,94	76,92	85,00	98,99	70,00	
90,77	72,31	76,92	86,15	81,54	
94,23	87,31	98,85	80,38	71,15	
115,00	118,15	75,85	93,08	73,42	
96,76	108,91	99,19	84,60	73,42	
104,05	99,19	91,90	89,95	72,93	
93,60	115,76	98,03	93,35	74,38	
83,25	95,07	77,34	74,38	80,30	
123,15	105,42	112,81	102,46		
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	96,47	91,29	86,93	73,76
<b>STD (%)</b>	12,14	15,50	12,33	9,91	4,49

Tabelle 15: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit Phloretin nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte sind auf die Kontrolle bezogen und in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>NaHED 100 µM</b>	<b>Kontrolle (NaHED 100 µM+ EtOH)</b>	<b>NaHED 100 µM + PZ 0,5 µM</b>	<b>NaHED 100 µM + PZ 5 µM</b>	<b>NaHED 100 µM + PZ 50 µM</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>						
86,82	127,84	106,41	62,43	76,76	82,30	
108,57	174,79	96,96	64,06	81,32	77,74	
104,61	153,54	96,63	58,52	83,28	76,44	
97,77	113,23	111,85	75,90	99,04	70,52	
96,22	114,26	93,25	61,85	96,97	84,57	
106,01	119,42	94,90	91,18	106,06	139,53	
101,70	128,51	127,12	83,01	107,52	140,85	
91,49	111,91	92,81	95,75	91,83	130,07	
106,81	110,64	80,07	89,87	93,49	153,59	
87,56	125,68	90,00	78,84	87,91	101,86	
106,67	128,21	110,23	80,93	124,82	119,30	
105,78	136,42	99,77	81,63	106,57	161,86	
124,92	158,04	99,27	83,94	111,68	116,79	
75,71	148,58	121,17	83,94		124,09	
99,37		79,56			108,76	
<b>Mittelwert (%)</b>	100,00	132,22	100,00	112,55	97,48	77,99
<b>STD (%)</b>	11,62	19,68	13,44	29,59	13,66	11,86

Tabelle 16: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phlorizin nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte sind auf die jeweiligen Kontrollen bezogen und in % dargestellt.

	Kontrolle	NaHED 100 µM	Kontrolle (NaHED 100 µM + EtOH)	NaHED 100 µM + PT 1 µM	NaHED 100 µM + PT 10 µM	NaHED 100 µM + PT 100 µM
Einzelwerte (%)						
97,77	113,23	93,00	99,46	95,15	80,07	
96,22	114,26	98,38	124,24	109,69	101,08	
106,01	119,42	108,62	127,47	120,47	90,30	
101,70	128,51	110,25	136,84	91,97	100,02	
91,49	111,91	80,33	131,02	95,29	92,80	
106,81	110,64	109,42	100,28	103,60	91,36	
124,92	158,04	111,82	104,32	76,36	83,86	
75,71	148,58	102,95	77,43	89,32	87,95	
99,37	134,95	85,23	102,43	108,68	89,93	
105,20	110,78	104,51	106,60	94,10	83,68	
95,17	116,32	85,76	86,25	94,10	86,67	
99,63	124,09	109,72	114,58	100,00	91,67	
108,04	111,25	92,50	127,92	120,83	77,92	
103,22	145,02	96,25	101,66	89,17	101,66	
88,75	137,30	111,25	75,07	88,37	109,14	
112,72	108,48	101,66	100,83	119,11	80,06	
79,86	132,86	110,80	86,17	86,70	88,46	
107,42	113,18	87,53	99,80	76,09	82,61	
103,47	146,06	99,85	76,68	82,02		
102,52	114,20	113,11				
94,01	142,43	87,04				
Mittelwert (%)	100,00	125,79	100,00	104,16	96,66	89,96
STD (%)	10,76	15,44	10,49	18,93	13,41	8,51

Tabelle 17: Rohdaten der Glukoseaufnahme nach 30-minütiger gemeinsamer Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED und Phloretin nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte sind auf die jeweiligen Kontrollen bezogen in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>NaHED</b>	<b>DMSO-Kontrolle</b>	<b>NaHED+PT</b>	<b>EtOH-Kontrolle</b>	<b>NaHED+PZ</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>						
0,92	1,55	1,05	0,89	0,93	1,05	
0,97	1,56	0,99	1,07	1,01	1,13	
1,11	1,48	0,97	1,04	1,05	1,23	
0,95	0,92	1,01	1,15	1,00	1,00	
1,01	0,98	0,97	1,15	1,02	1,01	
1,04	1,05	1,01	1,18	0,98	1,12	
0,83	1,15	0,97	0,87	0,88	0,91	
1,07	0,93	0,97	0,89	1,01	1,01	
1,10	1,11	1,06	0,86	1,11	1,04	
0,95	0,89	1,00	0,99	0,99	0,80	
1,01	0,93	0,95	1,03	1,01	0,76	
1,03	0,99	1,05	0,99	1,00	0,79	
<b>Mittelwert (%)</b>	1,00	1,13	1,00	1,01	1,00	0,99
<b>STD (%)</b>	0,08	0,25	0,04	0,11	0,06	0,15

Tabelle 18: Rohdaten der *GLUT2*-Genexpression nach 15-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

	Kontrolle	NaHED	DMSO-Kontrolle	NaHED +PT	EtOH-Kontrolle	NaHED +PZ
<b>Einzelwerte (%)</b>						
0,91	0,85	0,93	1,13	0,90	0,94	
1,01	0,85	1,03	1,15	1,10	1,00	
1,09	0,93	1,04	1,10	1,00	0,96	
0,98	1,52	1,01	0,64	1,01	0,68	
1,00	1,50	0,99	0,65	1,00	0,65	
1,02	1,41	1,01	0,67	1,00	0,64	
0,97	0,73	0,94	0,84	0,92	0,84	
1,00	0,82	1,05	0,91	1,07	1,29	
1,03	0,87			1,01		
<b>Mittelwert (%)</b>	1,00	1,05	1,00	0,89	1,00	0,88
<b>STD (%)</b>	0,05	0,32	0,04	0,22	0,06	0,22

Tabelle 19: Rohdaten der GLUT2-Genexpression nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µm) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

	<b>Kontrolle</b>	<b>NaHED</b>	<b>DMSO-Kontrolle</b>	<b>NaHED +PT</b>	<b>EtOH-Kontrolle</b>	<b>NaHED + PZ</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>						
	1,00	0,93	1,01	0,93	0,99	0,79
	1,00	0,85	0,99	0,98	0,97	0,72
	1,00	0,82	1,00	0,99	1,04	0,73
	1,07	1,27	0,96	1,06	1,02	1,12
	0,96	1,29	0,98	1,04	0,99	1,14
	0,97	1,32	1,06	1,05	0,99	1,13
	1,01	0,98	1,12	0,95	1,02	0,67
	1,00	0,95	0,96	1,01	1,01	0,67
	0,99	0,85	0,93	0,94	0,96	0,67
<b>Mittelwert (%)</b>	1,00	1,03	1,00	0,99	1,00	0,85
<b>STD (%)</b>	0,03	0,21	0,06	0,05	0,02	0,21

Tabelle 20: Rohdaten der *GLUT2*-Genexpression nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

	<b>Kontrolle</b>	<b>NaHED</b>	<b>DMSO-Kontrolle</b>	<b>NaHED +PT</b>	<b>EtOH-Kontrolle</b>	<b>NaHED + PZ</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>						
0,96	1,17	1,04	0,92	0,97	1,24	
1,01	1,19	0,81	1,07	0,99	1,33	
1,03	1,42	1,16	1,04	1,04	1,39	
0,94	0,71	1,01	1,01	0,94	1,51	
0,98	0,71	0,99	1,07	0,97	1,62	
1,08	0,73	1,00	1,11	1,09	1,54	
0,98	1,15	0,87	0,80	0,98	1,04	
0,94	1,25	1,02	0,81	1,02	1,05	
1,08	1,32	1,11	0,85	1,01	1,09	
0,98	1,13	0,96	0,50	0,87	1,20	
0,99	1,12	1,03	0,52	1,04	1,21	
1,04	1,20	1,01	0,55	1,09	1,31	
<b>Mittelwert (%)</b>	1,00	1,09	1,00	0,85	1,00	1,29
<b>STD (%)</b>	0,05	0,24	0,09	0,23	0,06	0,19

Tabelle 21: Rohdaten der *SGLT1*-Genexpression nach 15-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugeabe von Phlorizin (50 µm) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

	<b>Kontrolle</b>	<b>NaHED</b>	<b>DMSO-Kontrolle</b>	<b>NaHED + PT</b>	<b>EtOH-Kontrolle</b>	<b>NaHED + PZ</b>
<b>Einzelwerte (%)</b>						
0,98	1,21	0,99	0,94	0,96	0,86	
0,94	1,29	0,98	0,98	0,96	0,84	
1,08	1,08	1,03	0,99	1,08	0,86	
0,90	0,81	0,95	0,68	0,95	1,00	
1,00	0,87	1,01	0,79	0,97	1,03	
1,10	0,91	1,04	0,93	1,08	0,89	
0,95	0,59	0,93	0,50	0,93	0,69	
1,00	0,57	1,02	0,53	1,01	0,72	
1,05	0,62	1,04	0,52	1,06	0,75	
0,85	0,74	0,87	0,63	0,92	0,89	
1,03	0,65	1,01	0,67	0,97	0,94	
1,12	0,82	1,11	0,71	1,11	1,02	
<b>Mittelwert (%)</b>	1,00	0,85	1,00	0,74	1,00	0,87
<b>STD (%)</b>	0,08	0,24	0,06	0,18	0,07	0,11

Tabelle 22: Rohdaten der *SGLT1*-Genexpression nach 30-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µM) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

	Kontrolle	NaHED	DMSO-Kontrolle	NaHED +PT	EtOH-Kontrolle	NaHED + PZ
	1,03	0,86	0,92	0,93	1,00	0,87
	0,95	0,87	1,03	0,96	1,00	0,91
	1,02	0,99	1,05	0,95	0,90	0,92
	0,93	0,88	0,93	0,80	0,98	1,30
<b>Einzelwerte (%)</b>	<b>1,01</b>	<b>0,94</b>	<b>1,03</b>	<b>0,87</b>	<b>1,11</b>	<b>1,32</b>
	1,06	1,01	1,04	0,93	0,93	1,45
	0,94	0,86	0,92	0,71	1,01	0,73
	0,99	0,96	1,02	0,74	1,06	0,78
	1,07	1,06	1,06	0,73	1,00	0,81
	0,97	0,95	0,97	0,78	1,02	1,07
	1,01	0,97	1,03	0,85	0,98	1,06
	1,02	0,99	1,01	0,89	1,10	—
<b>Mittelwert (%)</b>	<b>1,00</b>	<b>0,94</b>	<b>1,00</b>	<b>0,84</b>	<b>1,00</b>	<b>1,03</b>
<b>STD (%)</b>	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>	<b>0,05</b>	<b>0,09</b>	<b>0,06</b>	<b>0,23</b>

Tabelle 23: Rohdaten der *SGLT1*-Genexpression nach 60-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (100 µM) mit oder ohne Zugabe von Phlorizin (50 µm) und Phloretin (50 µM); Werte sind auf das geometrische Mittel der Referenzgene bezogen und werden - angegeben in % - auf die jeweiligen Kontrollen bezogen.

Tabelle 24: Rohdaten des Serotonin-ELISA nach 5-minütiger Behandlung der Caco-2-Zellen mit NaHED (0,1-100 µM) nach Anwendung des Nalimov-Ausreißertests; Werte wurden anhand des DNA-Gehalts der Proben normalisiert und sind auf die jeweiligen Kontrollen bezogen, in % dargestellt.

	<b>Kontrolle</b>	<b>0,1 µM</b>	<b>1 µM</b>	<b>10 µM</b>	<b>100 µM</b>
	100,00	81,95	76,82	134,34	112,66
	101,96	32,19	85,44	95,06	93,38
	98,04	74,48	19,71	20,35	28,37
	76,06	138,38	38,17	35,70	33,65
	123,94	63,71	85,55	24,28	14,92
	117,21	70,74	70,98	23,02	8,72
	82,79	164,97	47,54	95,97	18,60
	70,73	159,94	51,20	110,26	17,22
	129,27	81,18	137,75	105,36	66,98
	100,00	104,22	129,13	18,14	19,97
	83,65	91,50			
	116,35				
			42,06		
			12,40		
			37,05		
			19,96		
			54,41		
			96,32		
			59,50		
			101,85		
			74,31		
			88,73		
			106,35		
<b>Mittelwert (%)</b>	100	96,66	74,23	71,59	51,16
<b>SEM (%)</b>	5,50	12,56	11,94	15,01	7,57

## **LEBENSLAUF**

### **Ausbildungsweg:**

seit März 2013

Masterstudium der Ernährungswissenschaften mit Schwerpunkt Lebensmittelqualität und -sicherheit, Universität Wien

September 2008 - Februar 2012

Bachelorstudium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien; Abschluss mit ausgezeichnetem Erfolg

September 2000 - Juni 2008

Bundesrealgymnasium Schuhmeierplatz, 1160 Wien; Matura mit ausgezeichnetem Erfolg

September 1996 - Juni 2000

Volksschule Karl Toldt-Weg, 1140 Wien

### **Studienbegleitende Tätigkeiten:**

August 2013

Praktikum am Institut für Milchhygiene, Milchtechnologie und Lebensmittelwissenschaft, Veterinärmedizinische Universität Wien

Juni 2013

Praktikantin bei Staud's, 1160 Wien

Jänner und September 2012

Praktikum in der Lebensmitteluntersuchungsanstalt der Stadt Wien ( MA 38)

Juli und August 2008 und 2009

Mitarbeit an Forschungsprojekten am Konrad-Lorenz-Institut der Österreichischen Akademie der Wissenschaften, 1160 Wien