



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss von Alkamiden auf Mechanismen der
Freisetzung von Serotonin und Dopamin in SH-SY5Y
Zellen“

verfasst von

Mathias Zaunschirm, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

DANKSAGUNG

In erster Linie möchte ich Frau Univ.-Prov.Dr. Veronika Somoza für die Überlassung dieses interessanten Themas danken und für die Möglichkeit meine Masterarbeit an ihrem Institut für Ernährungsphysiologie und physiologische Chemie schreiben zu dürfen.

Großer Dank gebührt auch Barbara Rohm, die mich sehr gewissenhaft und professionell während meiner gesamten Masterarbeit betreut hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen der Arbeitsgruppe des Instituts für die schöne Zeit und das angenehme Arbeitsklima bedanken, besonders aber bei Ann-Katrin Holik, die in meiner Abwesenheit auf meine Zellen geachtet hat und sonst auch sehr hilfsbereit war.

Darüber hinaus bin ich meinen Eltern sehr dankbar, dass sie mir das Studieren ermöglicht haben und mich währenddessen immer unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich noch bei meiner Freundin für ihre Inspiration, Unterstützung und guten Ratschläge bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
A EINLEITUNG	1
1 REGULATION DER NAHRUNGSaufNAHME.....	1
2 SEROTONIN	3
2.1 <i>Synthese und Metabolismus</i>	3
2.2 <i>Vorkommen im Gehirn</i>	5
2.3 <i>Einfluss auf die Nahrungsaufnahme</i>	6
3 DOPAMIN	8
3.1 <i>Synthese und Metabolismus</i>	8
3.2 <i>Vorkommen im Gehirn</i>	9
3.3 <i>Einfluss auf die Nahrungsaufnahme</i>	10
4 EINFLUSS VON CAPSAICIN AUF DIE NAHRUNGSaufNAHME.....	11
B ZIELSETZUNG	15
C MATERIALIEN UND METHODEN	16
1 MATERIALIEN	16
1.1 <i>Geräte</i>	16
1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	17
1.3 <i>Chemikalien</i>	17
1.4 <i>Medien</i>	19
1.5 <i>Kits</i>	20
1.6 <i>Puffer und Lösungen</i>	20
1.7 <i>Primer</i>	21
2 METHODEN	22
2.1 <i>Zellkulturtechnik</i>	22
2.1.1 SH-SY5Y Zelllinie.....	22
2.1.2 Auftauen der Zellen.....	22

2.1.3	Kultivierung und Zellernte.....	23
2.1.4	Auszählen der Zellen	23
2.1.5	Ausstreuen der Zellen	24
2.2	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Serotonin</i>	24
2.3	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Dopamin</i>	27
2.4	<i>Bestimmung der DNA</i>	30
2.5	<i>RNA - Isolierung</i>	30
2.6	<i>cDNA – Synthese</i>	32
2.7	<i>Bestimmung der Genexpression mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)</i>	33
2.8	<i>Calcium - Assay</i>	35
2.9	<i>Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT - Assay</i>	36
D	ERGEBNISSE	38
1	SCREENING VERSCHIEDENER ALKAMIDE BEZÜGLICH DER SEROTONINFREISETZUNG	
	38	
2	ZELLVIABILITÄT	45
3	EINFLUSS VON <i>TRANS</i> -PELLITORIN AUF DIE NEUROTRANSMITTERFREISETZUNG UND KALZIUMMOBILISIERUNG.....	46
3.1	<i>Serotonin – Ausschüttung</i>	47
3.2	<i>Dopamin - Ausschüttung</i>	49
3.3	<i>Intrazelluläre Kalziummobilisierung</i>	51
4	EINFLUSS VON <i>TRANS</i> -PELLITORIN AUF DIE REGULATION AUSGEWÄHLTER SEROTONIN- UND DOPAMINREZEPTOREN UND MÖGLICHER BINDUNGSREZEPTOREN ...	53
4.1	<i>Serotonin-Rezeptoren: 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5HT_{1B}</i>	53
4.2	<i>Dopamin-Rezeptoren: D₁, D₂</i>	55
4.3	<i>Mögliche Bindungsrezeptoren von trans-Pellitorin:</i> TRPV1, TRPA1, CNR1	56
E	DISKUSSION	58
	SCHLUSSBETRACHTUNG	68
F	ZUSAMMENFASSUNG	71
G	ABSTRACT	73
	LITERATURVERZEICHNIS	75

ANHANG	88
--------------	----

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: BIOSYNTHESE VON SEROTONIN	4
ABBILDUNG 2: SEROTONERGES SYTEM IM GEHIRN	5
ABBILDUNG 3: BIOSYNTHESE VON DOPAMIN	8
ABBILDUNG 4: DOPAMINERGES SYSTEM IM GEHIRN	9
ABBILDUNG 5: STRUKTURFORMEL VON CAPSAICIN.....	12
ABBILDUNG 6: GERINGE ZELLDICHTE (LINKS) UND HOHE ZELLDICHTE (RECHTS).....	22
ABBILDUNG 7: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN	38
ABBILDUNG 8: STRUKTURFORMELN DER VERWENDETEN ALKAMIDE	40
ABBILDUNG 9: SCREENING VON ALKAMIDEN AUF DIE SEROTONINFREISETZUNG (1).....	41
ABBILDUNG 10: SCREENING VON ALKAMIDEN AUF DIE SEROTONINFREISETZUNG (2).....	42
ABBILDUNG 11: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG NACH INKUBATION MIT <i>TRANS</i> -PELLITORIN.....	44
ABBILDUNG 12: ZELLPROLIFERATION NACH INKUBATION MIT <i>TRANS</i> -PELLITORIN	45
ABBILDUNG 13: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> -PELLITORIN	47
ABBILDUNG 14: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG: CAPSAICIN VS <i>TRANS</i> -PELLITORIN	48
ABBILDUNG 15: DOPAMINAUSSCHÜTTUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> -PELLITORIN	49
ABBILDUNG 16: DOPAMINAUSCHÜTTUNG: CAPSAICIN VS <i>TRANS</i> -PELLITORIN.....	50
ABBILDUNG 17: KALZIUMMOBILISIERUNG NACH INKUBATION MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> -PELLITORIN	51
ABBILDUNG 18: KALZIUMMOBILISIERUNG: CAPSAICIN VS <i>TRANS</i> -PELLITORIN.....	52
ABBILDUNG 19: REGULATION DER SEROTONINREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN	54
ABBILDUNG 20: REGULATION DER DOPAMINREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN	55
ABBILDUNG 21: REGULATION MÖGLICHER BINDUNGSREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN.....	57

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: VERWENDETE ALKAMIDE FÜR DAS SCREENING.....	39
TABELLE 2: SEROTONINFREISETZUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN	88
TABELLE 3: SCREENING VON ALKAMIDEN AUF DIE SEROTONINFREISETZUNG (1).....	89
TABELLE 4: SCREENING VON ALKAMIDEN AUF DIE SEROTONINFREISETZUNG (2).....	90
TABELLE 5: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG NACH INKUBATION MIT <i>TRANS</i> -PELLITORIN.....	91
TABELLE 6: SEROTONINAUSSCHÜTTUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> -PELLITORIN	92
TABELLE 7: DOPAMINAUSSCHÜTTUNG NACH STIMULIERUNG MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> - PELLITORIN	93
TABELLE 8: KALZIUMMOBILISIERUNG NACH INKUBATION MIT CAPSAICIN ODER <i>TRANS</i> - PELLITORIN	94
TABELLE 9: REGULATION DER SEROTONINREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN	95
TABELLE 10: REGULATION DER DOPAMINREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN	96
TABELLE 11: REGULATION MÖGLICHER BINDUNGSREZEPTOREN NACH STIMULIERUNG MIT 0,1 μ M <i>TRANS</i> -PELLITORIN ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN	97
TABELLE 12: ZELLPROLIFERATION NACH 6 STUNDEN INKUBATION MIT <i>TRANS</i> -PELLITORIN	98

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-HT _{xy}	Serotoninrezeptor
AgRP	Agouti-related protein
AP	Area postrema
CART	Kokain-Amphetamin-reguliertes Transkript
CCK	Cholecystokinin
CNR1	Cannabinoidrezeptor 1
D _x	Dopaminrezeptor
FBS	Fötales Rinderserum
MC4	Melanocortinrezeptor 4
n	biologisches Replikat
NFW	Nukleasefreies Wasser
NPY	Neuropeptid Y
NTS	Nucleus tractus solitarii
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
POMC	Pro-opiomelanocortin
tR	technisches Replikat
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin 1
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1

A Einleitung

1 Regulation der Nahrungsaufnahme

Seit 1980 hat sich die Zahl der an Adipositas erkrankten Menschen weltweit verdoppelt. Übergewicht und Adipositas sind prinzipiell die Folge einer Imbalance zwischen aufgenommener und verbrauchter Energie. Im Jahr 2008 wurden weltweit 1,4 Milliarden übergewichtige Erwachsene (≥ 20 Jahre) geschätzt, von denen über 200 Millionen Männer und beinahe 300 Millionen Frauen an adipös waren. Jährlich sterben mindestens 2,8 Millionen Erwachsene an den Folgen von Übergewicht oder Adipositas, welche Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II und einige Krebserkrankungen darstellen. Eine Möglichkeit, Übergewicht und Adipositas zu reduzieren, stellt eine Reduktion der Energieaufnahme dar (WHO, 2013).

Grundsätzlich ist das Ernährungsverhalten in verschiedenen Ereignissen, wie Snacks und Mahlzeiten, organisiert, die durch mehrere Faktoren beeinflusst werden. Dies sind psychologische Erfahrungen und periphere physiologische Signale. Diese Faktoren informieren das Zentrale Nervensystem über den Energiestatus des Körpers und kontrollieren so den Appetit und folglich die Nahrungsaufnahme des Menschen (Harrold et al., 2012). Bei der Regulation des Ernährungsverhaltens ist das Verhältnis zwischen der homöostatischen und hedonischen Entstehung von Appetit ein wichtiger Aspekt. Die homöostatische Kontrolle des Appetits wird durch den biologischen Bedarf an Nährstoffen vermittelt, um die Energiespeicher des Körpers aufrechtzuerhalten. Im Vergleich dazu wird die hedonische Kontrolle des Appetits durch Belohnung vermittelt. Dieses Belohnungssystem wird eher durch schmackhaftes Essen und sensorischen Genuss aktiviert als durch den biologischen Bedarf des Körpers und erhält so den Trieb der Nahrungsaufnahme aufrecht, was zu einer überhöhten Energieaufnahme führen kann. Wichtig zu erwähnen ist, dass homöostatische und hedonische Kontrolle des Ernährungsverhaltens nicht unabhängig voneinander agieren (Harrold et al., 2012). Die Koordination des Energiegleichgewichts ist ein komplexer Prozess und findet im Zentralen

Nervensystem statt. Das Gehirn integriert zahlreiche Signale, um den Energiebedarf des Körpers zu bestimmen und den Appetit anzupassen. Regionen im Zentralen Nervensystem, die für die Kontrolle des Energiegleichgewichts zuständig sind, sind für viele zirkulierende Hormone und auch für andere Faktoren zugänglich. Diese werden unterteilt in sensorische Erfahrungen und periphere Signale, welche Informationen über die Nahrungsaufnahme und über die Nutzung der Nährstoffe überliefern. Periphere Signale stammen von Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt und werden durch afferente Signale des Nervus vagus zu einem Komplex im Hirnstamm bestehend aus Nucleus tractus solitarii (NTS) und Area postrema (AP) gesendet (Harrold et al., 2012). So wirkt das sättigungsfördernde intestinale Peptid Cholecystokinin (CCK) über Rezeptoren am Nervus vagus indirekt am Hirnstamm. Zudem wurde gezeigt, dass CCK auch über mögliche Rezeptoren im Hypothalamus dessen sättigungsfördernde Wirkung ausübt (Blevins et al., 2000). Vorstufen von Neurotransmittern, wie Serotonin oder Dopamin, können die Blut-Hirn-Schranke passieren und gelangen ins Gehirn (Abbott et al., 2010), wo die Neurotransmitter das Zentrale Nervensystem, unter anderem hinsichtlich der Kontrolle der Nahrungsaufnahme beeinflussen (Breisch et al., 1976; Yang et al., 1997). Mehrere Regionen im Gehirn sind bei der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Primäre Regionen sind der Hypothalamus, die Amygdala und der Nucleus accumbens. Der Hypothalamus, im Speziellen der Nucleus arcuatus, Nucleus paraventricularis, Nucleus hypothalamicus dorsomedialis, der laterale Hypothalamus und der Nucleus hypothalamicus ventromedialis, spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Hunger und Sättigung (Harrold et al., 2012). Der Nucleus arcuatus ist für periphere Signale, die auf den Ernährungsstatus hinweisen, leicht zugänglich. In einer Neuronenpopulation sind die appetitanregenden Neuropeptide Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-related protein (AgRP) co-lokalisiert (Gropp et al., 2005) und in einer anderen angrenzenden Population die appetitzügelnden Neuropeptide Pro-opiomelanocortin (POMC) und Kokain und Amphetamin reguliertes Transkript (CART) (Vrang et al., 1999). Das periphere Hormon Leptin, welches von Adipozyten sezerniert wird, wirkt hauptsächlich über Rezeptoren am Nucleus arcuatus, indem es die appetitanregenden NPY/AgRP Neuronen inhibiert und die appetitreduzierenden POMC/CART Neuronen stimuliert

(Jéquier, 2002). Auch das gastrische Peptid Ghrelin bewirkt über Rezeptoren am Nucleus arcuatus eine Stimulierung des appetitanregenden NPY (Gil-Campos et al., 2006). Der Nucleus paraventricularis erhält Signale von verschiedenen neuronalen Bahnen, die wichtig für eine Regulation der Energieaufnahme sind. Diese beinhalten NPY/AgRP und POMC/CART Neuronen des Nucleus arcuatus und Neuronen des lateralen Hypothalamus, in denen appetitanregendes Orexin lokalisiert ist. Der Nucleus paraventricularis steht auch mit dem Hirnstamm in Verbindung (Williams et al., 2001). Weitere Regionen, die eine Rolle bei der Regulation des Appetits einnehmen sind der Nucleus Accumbens und die Amygdala im Vorderhirn. Diese Areale besitzen ein umfangreiches neuronales System, das begehrende und belohnende Aspekte der Nahrungsaufnahme bearbeitet. Schmackhaftigkeit und Vergnügen sind dabei starke Motivatoren für die Nahrungsaufnahme. Der Nucleus Accumbens besitzt dopaminerge und opioiderge Neuronen, was ihn zu einer Schnittstelle zwischen Motivation und aktuellem Ernährungsverhalten macht (Harrold et al., 2012). Es wurden auch Verbindungen zwischen Nucleus Accumbens und lateralem Hypothalamus entdeckt, was auf ein Zusammenwirken von homöostatischen und hedonischen Regelkreisläufen hinweist (Stratford et al., 1999).

2 Serotonin

2.1 Synthese und Metabolismus

Serotonin, 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ist ein biogenes Monoamin und wird in zwei Schritten synthetisiert. Vorläufer ist die essentielle Aminosäure L-Tryptophan, die durch das Enzym Tryptophanhydroxylase zu L-5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert und anschließend in einem zweiten Schritt durch die L-Aminosäuredecarboxylase zu Serotonin decarboxyliert wird (Abbildung 1).

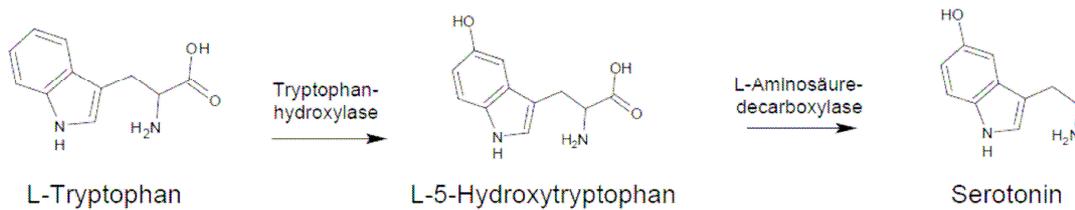


Abbildung 1: Biosynthese von Serotonin

Die Serotoninsynthese findet sofort bei Anwesenheit von Tryptophan statt, wobei Tryptophanhydroxylase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym ist, welches nur im Gehirn, den enterochromaffinen Zellen des Darmepithels und Blutplättchen vorkommt. Im Zentralen Nervensystem wird Serotonin in präsynaptischen Neuronen, wie serotonergen Neuronen, der Zirbeldrüse und catecholaminergen Neuronen, synthetisiert und gelagert. Die Serotoninkonzentration in den Geweben ist von der Syntheserate und dem Metabolismus abhängig (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

Im Zentralen Nervensystem wird Serotonin durch Depolarisierung in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann so an postsynaptische Serotoninrezeptoren, durch die diverse Effekte von Serotonin vermittelt werden, oder an präsynaptische Autorezeptoren binden, die als negatives Feedback ein weiteres Freisetzen von Serotonin in den synaptischen Spalt verhindern (Mohammad-Zadeh et al., 2008). Es sind 7 Serotoninrezeptorfamilien (5-HT₁₋₇) bekannt, wobei einige weiter in Subtypen unterteilt werden (5-HT_{1A/1B/1D/1E/1F}, 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT_{5A/5B}). Fast alle Serotoninrezeptoren sind postsynaptische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über sekundäre Botenstoffe ihre Wirkung ausüben, mit Ausnahme des 5-HT₃-Rezeptors, der einen Kationenkanal darstellt (Sanders-Bush und Nichols, 2012). Eine hohe Konzentration an Serotonin im synaptischen Spalt ist einer der wichtigsten Faktoren, der die Stärke und Dauer der Signalübertragung postsynaptischer Serotoninrezeptoren bestimmt. Der an der präsynaptischen Membran lokalisierte selektive Serotonintransporter (SERT) bewirkt die Aufnahme von Serotonin vom synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron, wo es entweder durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in Speichervesikeln eingelagert oder durch Monoaminoxidase-A (MAO-A) zu 5-Hydroxyindolacetat metabolisiert und über den Urin ausgeschieden wird (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

2.2 Vorkommen im Gehirn

Das Serotonin-System setzt sich aus einer begrenzten Anzahl an Neuronen zusammen, die sehr verzweigte Axone aussenden, welche beinahe alle Regionen des Gehirns innervieren (Abbildung 2). Die Verteilung der serotonergen Neuronen im menschlichen Gehirn ist auf Regionen im Hirnstamm begrenzt, wo sich der Großteil der Neuronen in den Raphekernen (Nuclei raphei) befindet, die sich von der Medulla oblongata bis zum Mittelhirn erstrecken (Charnay und Léger, 2010). Die serotonergen Neuronen werden in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen in die rostrale Gruppe, welche Axone zum Vorderhirn sendet, zum anderen in die caudale Gruppe, welche Axone in den Hirnstamm und das Rückenmark entsendet. Gehirnareale die durch efferente Fasern der rostralen Gruppe besonders stark innerviert werden sind der Hypothalamus, die Basalganglien mit Nucleus accumbens, die Amygdala und die Substantia nigra (Charnay und Léger, 2010).

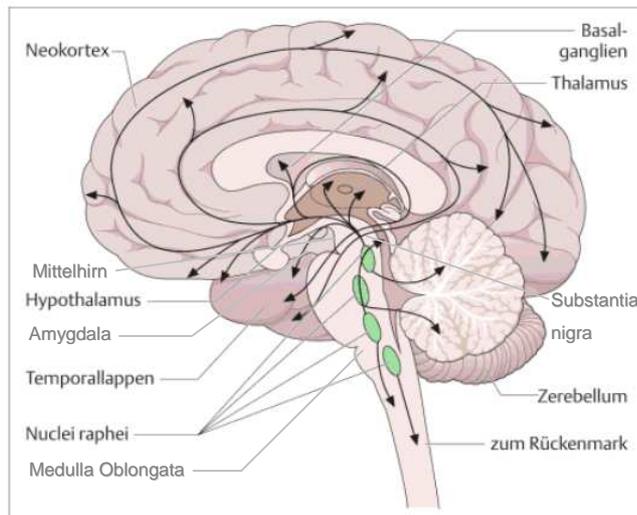


Abbildung 2: Serotonerges System im Gehirn

(mod. nach van Dam und Pruijboom, 2008)

2.3 Einfluss auf die Nahrungsaufnahme

Serotonin besitzt als Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem einige wichtige Funktionen, wie die Regulation der Körpertemperatur, des Schlafzyklus' und des Sexualverhalten, aber auch die Regulation des Appetits (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

Bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts nimmt der Hypothalamus ein wichtige Rolle ein, indem metabolische Signale von peripheren Organen erfasst werden und das Ernährungsverhalten dementsprechend reguliert wird, was unter Beteiligung anderer Gehirnregionen wie dem Hirnstamm oder dem limbischen System geschieht (Yu und Kim, 2012). Es wurde gezeigt, dass Verletzungen im Bereich des lateralen und paraventricularen Hypothalamus (Aravich und Scalafani, 1983) und des Nucleus ventromedialis (Shimizu et al., 1987) zu einer deutlichen Erhöhung der Nahrungsaufnahme und in weiterer Folge zu Adipositas bei Ratten führten.

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Hypothalamus, Serotonin und Nahrungsaufnahme gezeigt werden, nachdem die Aufnahme von schmackhaftem Futter zu einer kurzzeitig erhöhten extrazellulären Konzentration von Serotonin im lateralen Hypothalamus bei Ratten geführt hat (Schwartz et al., 1989). Außerdem führte eine direkte Injektion von Serotonin in den Nucleus paraventricularis des Hypothalamus zu einer verringerten Nahrungsaufnahme bei Ratten (Currie und Coscina, 1996).

Es gibt deutliche Hinweise, dass Änderungen des endogenen Serotonins mit einem veränderten Ernährungsverhalten assoziiert sind (Blundell, 1992).

Frühe Studien zeigten einerseits, dass Ratten nach intraperitonealer Gabe von 5-Hydroxytryptophan, der Vorstufe von Serotonin, eine deutliche Verminderung der Nahrungsaufnahme aufwiesen (Ju und Tsai, 1995), und andererseits, dass eine Inhibierung des limitierenden Enzyms Tryptophanhydroxylase, welches L-Tryptophan zu L-5-Hydroxytryptophan hydroxyliert, durch intraventriculäre Injektion von p-Chlorophenylalanin bei Ratten zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und schließlich zu Hyperphagie führte (Breisch et al., 1976). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Menge an synthetisiertem Serotonin im Zentralen Nervensystem und in weiterer Folge die Verfügbarkeit

im synaptischen Spalt wichtig für die Ausprägung eines normalen Essverhaltens ist.

Diese Hypothese konnte durch die Verabreichung von Fenfluramin an Ratten, das selektiv die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron hemmt, bewiesen werden. Eine orale Applikation bei Ratten führte zu einer deutlichen Verringerung der Nahrungsaufnahme (Jackson et al., 1997). Eine Inhibierung der Serotoninwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt konnte mit einem erhöhten Sättigungsverhalten der Ratten assoziiert werden, indem es zu einer frühzeitigen Beendigung der Nahrungsaufnahme kam und andere Aktivitäten, wie Erholungsphasen, von den Ratten früher begonnen wurden bzw. länger andauerten (Halford und Blundell, 1996; Simanski und Vaidya 1990). Eine Humanstudie, im Rahmen derer D-Fenfluramin verabreicht worden war, zeigte ebenfalls, dass es zu einer deutlichen Körpergewichtsabnahme bei adipösen Probanden kam, welche auf eine geringere Energieaufnahme zurückzuführen war (Drent et al., 1995).

Von den 14 bekannten Serotoninrezeptoren sind nur wenige an der Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt. Eine intraperitoneale Applikation von CP-94,253, einem selektiven 5-HT_{1B}-Rezeptor Agonisten, führte zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Ratten. Dies war auf eine geringere Futtermittelaufnahme und eine schnellere Beendigung dieser zurückzuführen, ohne das normale Sättigungsverhalten negativ zu beeinflussen, was in einem geeigneten Modell gezeigt wurde (Lee et al., 2002). Ebenfalls eine verringerte Nahrungsaufnahme war nach intraperitonealer Gabe des 5-HT_{2A} Rezeptor Agonisten TCB-2 bei Mäusen zu erkennen (Fox et al., 2010). Hingegen hatte eine subkutane Injektion des 5-HT_{1A} Rezeptor Agonisten 8-OH-DPAT eine erhöhte Nahrungsaufnahme bei Mäusen zur Folge, die durch gleichzeitiger Gabe des 5-HT_{1A} Rezeptor Antagonisten WAY 100635 inhibiert werden konnte (Ebenezer und Surujbally, 2007). Des Weiteren steht der Serotoninrezeptor 5-HT_{2C} mit einer Reduktion der Nahrungsaufnahme in Zusammenhang. Eine intraperitoneale Applikation des 5-HT_{2C} Rezeptor Agonisten BVT.X führte bei Ratten zu einer Verringerung der Nahrungsaufnahme, einhergehend mit einer Reduktion des Körpergewichtes (Lam et al., 2008).

Demnach nehmen Serotonin und bestimmte Serotoninrezeptorsubtypen im Zentralen Nervensystem eine wesentliche Rolle bei der Regulation der

Nahrungsaufnahme ein, indem das Sättigungsgefühl moduliert wird (Halford und Blundell, 1996; Drent et al., 1995; Lee et al., 2002; Fox et al., 2010).

3 Dopamin

3.1 Synthese und Metabolismus

Dopamin, 3,4-Dihydroxyphenylethylamin, ist ein biogenes Monoamin und wird im Zentralen Nervensystem in catecholaminergen Neuronen und im Nebennierenmark gebildet. Zuerst wird L-Tyrosin im präsynaptischen Neuron durch das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) zu L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanin) hydroxyliert. In einem weiteren Schritt wird L-DOPA durch die L-Aminosäuredecarboxylase zu Dopamin umgewandelt. Die Hydroxylierung durch das Enzym Tyrosinhydroxylase ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Abbildung 3) (Oak und van Tol, 2008).

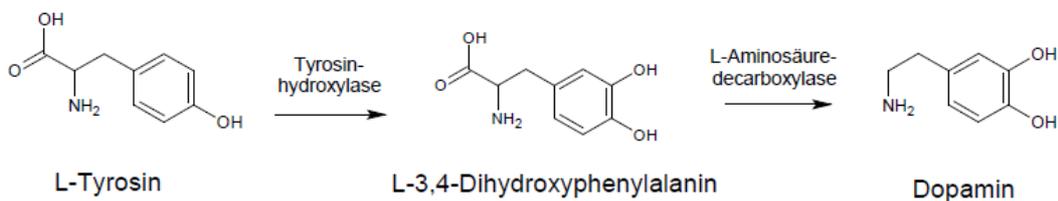


Abbildung 3: Biosynthese von Dopamin

Anschließend wird Dopamin durch den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in Vesikel aufgenommen und gespeichert. Durch Depolarisierung wird Dopamin in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an postsynaptische G-Protein-gekoppelte Dopaminrezeptoren (D_{1-5}), durch die die verschiedenen Effekte von Dopamin vermittelt werden. Nach Aufnahme des Dopamins aus dem synaptischen Spalt durch den Dopamintransporter (DAT), der an der präsynaptischen Membran lokalisiert ist, und anschließender Speicherung in Vesikeln, kommt es zur Beendigung der Signalübertragung. Dopamin, das nicht durch DAT aufgenommen wurde, wird durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO), vorwiegend durch MAO-B, zu DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetat) und

durch COMT (Catechol-O-methyltransferase) weiter zu Homovanillinsäure metabolisiert und über den Urin ausgeschieden (Oak und van Tol, 2008).

3.2 Vorkommen im Gehirn

Dopaminerge Neuronen im Mittelhirn produzieren den Großteil an Dopamin im Zentralen Nervensystem. Sie sind anatomisch und funktionell eine heterogene Zellgruppe, die im Zwischenhirn, Mittelhirn und im Riechkolben lokalisiert ist (Chinta und Andersen, 2005). Der überwiegende Anteil der dopaminergen Neuronen befindet sich im Mittelhirn, aus denen verschiedene dopaminerge Systeme hervorgehen (Abbildung 4). Das nigrostriatale System entspringt in der Zona compacta der Substantia nigra und erstreckt sich mit dessen Fasern bis zum dorsalen Striatum. Weitere Systeme sind das mesolimbische und mesokortikale dopaminerge System, die aus dopaminergen Zellen der Area tegmentalis ventralis (ventrales Tegmentum) entspringen. Das mesolimbische dopaminerge System projiziert hauptsächlich zum ventralen Striatum in den Nucleus accumbens, aber auch Septum, Amygdala und Hippocampus werden innerviert. Das mesokortikale dopaminerge System projiziert zu Regionen im präfrontalen Cortex. Wegen der Überschneidungen dieser beiden Systeme werden sie oft als mesokortikolimbisches System zusammengefasst (Chinta und Andersen, 2005).

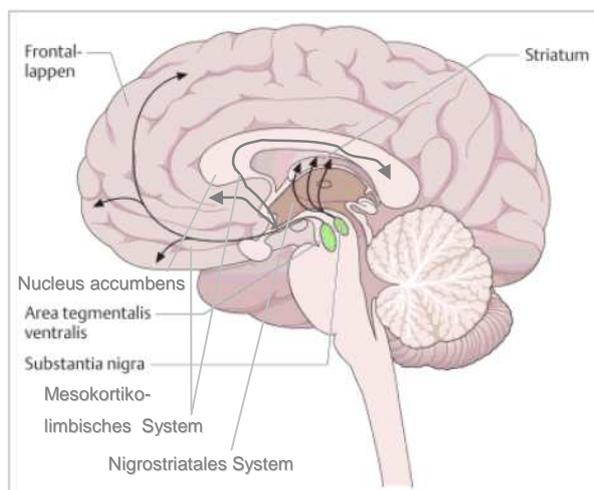


Abbildung 4: Dopaminerges System im Gehirn

(mod. nach van Dam und Pruijboom, 2008)

3.3 Einfluss auf die Nahrungsaufnahme

Dopamin besitzt als Neurotransmitter im Zentralen Nervensystem einige wichtige Funktionen. Das nigrostriatale System ist für die Kontrolle der Motorik verantwortlich, das mesokortikolimbische System spielt eine wichtige Rolle bei Belohnung, Emotionen und Wahrnehmung, dopaminerge Neuronen im Hypothalamus kontrollieren unter anderem die Prolactin-Freisetzung und Dopamin in der Retina ist bei der Licht-Dunkel-Anpassung involviert (Oak und van Tol, 2008).

Jedoch spielt Dopamin auch eine wichtige Rolle bei der Nahrungsaufnahme. Bei der Nahrungsaufnahme von Ratten konnte man einen spontanen Anstieg der Dopaminkonzentration im Hypothalamus im Bereich des Nucleus paraventricularis und des Nucleus hypothalamicus ventromedialis sehen, der nach der Beendigung der Nahrungsaufnahme wieder zum Ausgangslevel vor der Mahlzeit zurückging (Orosco und Nicolaidis, 1992). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine direkte Infusion von Dopamin in den lateralen Hypothalamus von Ratten zu einer deutlichen Reduktion der Nahrungsaufnahme führte, was auf eine Verringerung der aufgenommenen Portionsgröße zurückzuführen war (Yang et al., 1997). Mit einer Verringerung der Nahrungsaufnahme bei Ratten konnten auch die zwei Dopaminrezeptoren D_1 und D_2 , nach subkutaner Applikation verschiedener Agonisten, in Verbindung gebracht werden (Terry et al., 1996). Dies konnte ebenfalls durch subkutane Applikation von Tesofensin bei Ratten durch Hemmung der Wiederaufnahme von Dopamin bekräftigt werden. Unter anderem durch Stimulierung des Dopaminrezeptors D_1 führte das zu einer verringerten Nahrungsaufnahme und zu Gewichtsverlust (Axel et al., 2010).

Neben dem Hypothalamus haben auch Regionen, die eine wichtige Rolle bei Belohnung und Motivation spielen, bedeutende Funktionen bezüglich der Kontrolle der Nahrungsaufnahme. So konnte beim Menschen gezeigt werden, dass Nahrungsaufnahme mit einer Dopaminausschüttung im dorsalen Striatum assoziiert war und die Konzentration von Dopamin mit dem Grad des subjektiven Genusses korrelierte (Small et al., 2003). Weiters konnte gezeigt werden, dass Ratten, die aufgrund inaktivierter Tyrosinhydroxylase kein

Dopamin synthetisieren konnten, wegen fehlender Motivation zu essen, verhungerten (Szczyпка et al., 2001). Andererseits konnte bei adipösen Ratten beobachtet werden, dass in der Area tegmentalis ventralis eine verminderte Dopaminaktivität zu finden war, was mit einer stark gesteigerten Aufnahme von fettreichem Futter assoziiert war (Cordeira et al., 2010). Neben einer verminderten Ausgangskonzentration *in vivo* von extrazellulärem Dopamin im Nucleus accumbens von adipösen Ratten, konnte auch nach *ex vivo* Stimulierung eine abgeschwächte Dopaminfreisetzung im Nucleus accumbens, dorsalen Striatum und präfrontalem Cortex festgestellt werden (Geiger et al., 2008). Außerdem war im dorsalen Striatum der Dopaminrezeptor D₂ bei adipösen im Vergleich zu normalgewichtigen Ratten hinunterreguliert. Ein Knockdown des D₂-Rezeptors im dorsalen Striatum führte des Weiteren zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme bei Ratten (Johnson und Kenny, 2010). Daneben wurden Veränderungen verschiedener Faktoren, wie des Dopamintransporters oder des vesikulären Monoamintransporters, die die Freisetzung von Dopamin beeinflussen, bei Ratten, die zu Übergewicht neigten, gezeigt (Geiger et al., 2008).

Dopamin spielt somit eine wichtige Rolle bei den homöostatischen sowie den hedonischen und motivierenden Regelkreisläufen der Nahrungsaufnahme und eine Störung des Dopaminsystems kann zu einem Fehlverhalten bezüglich der Nahrungsaufnahme führen (Geiger et al., 2008).

4 Einfluss von Capsaicin auf die Nahrungsaufnahme

Capsaicin, *trans*-8-Methyl-N-vanillyl-6-nonensäureamid, (Abbildung 5) ist ein Alkaloid und der mengenmäßig (~70 %) bedeutendste Scharfstoff von Früchten der Gattung *Capsicum*, wie *Capsicum annum* L. (Chili), welche weltweit als Gewürze und Kochzutaten dienen (Barceloux, 2009).

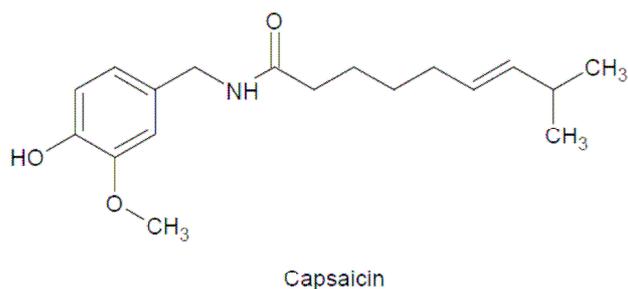


Abbildung 5: Strukturformel von Capsaicin

Capsaicin bindet an den nicht-selektiven, kalziumdurchlässigen Kationenkanal TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1), welcher vor allem in sensorischen Neuronen vorkommt, aber auch im Zentralnervensystem, im Gastrointestinaltrakt, der Epidermis, in glatten Gefäßmuskeln und in bronchialen Epithelzellen zu finden ist. Der TRPV1-Rezeptor wird durch verschiedene Vanilloide ebenso wie durch andere Faktoren wie moderate Hitze ($\geq 43\text{ °C}$) oder niedrigen pH-Wert ($\leq 5,9$) aktiviert (O'Neill et al., 2012). Die Aktivierung des TRPV1-Rezeptor durch Capsaicin führt zu einem intrazellulären Kalziumeinstrom, welcher die Freisetzung von Neurotransmittern stimuliert (O'Neill et al., 2012). Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration spielt eine wesentliche Rolle bei der Neurotransmittausschüttung, indem es die Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und in weiterer Folge die Freisetzung von Neurotransmittern auslöst (Augustine, 2001; Schneggenburger und Neher, 2000). Nach oraler Aufnahme von 5 g Chili (26,6 mg Capsaicin) konnte Capsaicin schon nach 10 Minuten im Plasma von Probanden nachgewiesen werden. Die maximale Plasmakonzentration von Capsaicin betrug 2,5 ng/mL (8 nM) (Chaiyasit et al., 2009). Die Absorption von Capsaicin betrug bei Ratten innerhalb der ersten 3 Stunden im Gastrointestinaltrakt 85 % (Kawada et al., 1984). Des Weiteren wurden bei Ratten nach 15 minütiger inhalativer Aufnahme von Capsaicinoiden (0,57 mg/kg) Capsaicin in einer Konzentration von 61,8 ng/mL (202 nM) im Blut und auch in Leber und Lunge nachgewiesen (Reilly et al., 2002). Außerdem konnten Capsaicinderivate und -metabolite nachweislich die Blut-Hirn-Schranke passieren und im Gehirn von Ratten nachgewiesen werden (Donnerer et al., 1990; Kang und Kim, 1999). Aufgrund der selektiven Bindungseigenschaft von

Capsaicin an den TRPV1 Rezeptor und der damit einhergehenden Effekte hinsichtlich der Schmerzempfindung und der Neurotransmitterausschüttung, findet Capsaicin in verschiedenen klinischen Anwendungsgebieten Nutzen. Daneben wird auch bezüglich möglicher Behandlungen von Adipositas an Capsaicin geforscht (Hayman und Kam, 2008).

Die orale Aufnahme von 1 g Chili (3,6 mg Capsaicinoide; 1,995 mg Capsaicin) im Rahmen einer Humanstudie war mit einem erhöhten Energieverbrauch und gesteigerter Kernkörpertemperatur der Probanden assoziiert (Ludy und Mattes, 2011). Eine Aufnahme von 0,1 g Chili/ kg Körpergewicht (0,01 mg Capsaicin/ kg Chili in der Trockensubstanz) führte zu einer erhöhten Hauttemperatur beim Menschen, was auf eine gesteigerte Thermogenese hindeutet (Hachiya et al., 2007). Außerdem konnte nach Aufnahme von Mahlzeiten, die mit 10 g Chili (30 mg Capsaicin) versetzt worden waren, eine gesteigerte Lipidoxidation und verminderte Lipidakkumulierung beim Menschen gezeigt werden (Yoshioka et al., 1998). Die gesteigerte Thermogenese ging nach intraperitonealer Applikation von 6 mg Capsaicin/kg KG bei Ratten mit einer erhöhten Katecholaminsekretion aus dem Nebennierenmark einher, die durch Gabe von Betablocker inhibiert werden konnte. Dies lässt auf eine Stimulierung der β -Adrenozeptoren durch Capsaicin schließen (Kawada et al., 1986).

Neben den Effekten von Capsaicin auf den Energie- und Lipidstoffwechsel beeinflusst Capsaicin auch die Nahrungsaufnahme. Bei einer Humanstudie konnte mittels einer visuellen analogen Skala gezeigt werden, dass nach Zugabe von 10 g Chili (30 mg Capsaicin) zu einem fettreichen Frühstück sowohl das Verlangen, etwas nach dem Frühstück zu essen, als auch das Hungergefühl vor dem Mittagessen verringert wurde (Yoshioka et al., 1999). Eine Aufnahme von 0,9 g Chili (2,25 mg Capsaicin) in 200 mL Tomatensaft (36,8 μ M) oder in Kapselform 30 Minuten vor jeder Hauptmahlzeit über zwei Tage konnte das Sättigungsgefühl steigern, was mit einer verringerten 24-Stunden-Energieaufnahme einherging (Westerberp-Plantenga et al., 2005). Eine geringere Aufnahme von Fett konnte auch nach einem *ad libitum* Mittagsbuffet festgestellt werden, nachdem Probanden 150 mL Suppe angereichert mit 0,923 g Chili (2,8 mg Capsaicin) 10 Minuten vorher gegessen hatten (Yoshioka et al., 2004). Im Tierversuch führte eine tägliche Injektion von 5 μ l Capsaicin über einen Zeitraum von 10 Tagen in ansteigender Menge (5,

10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 µg Capsaicin) (max. 52 mM) ins Gehirn (lateraler Ventrikel) von Ratten zu einer deutlichen Gewichtsreduktion verglichen mit der Kontrollgruppe (Falchi et al., 2008).

Wie erwähnt führte eine Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin in den synaptischen Spalt ebenfalls zu einer Modulierung der Nahrungsaufnahme:

Ein Mangel der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin führte zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (Breisch et al., 1976; Cordeira et al., 2010), während eine Stimulierung dieser Neurotransmitter eine Reduktion der Nahrungsaufnahme mit einhergehender Gewichtsabnahme zur Folge hatte (Drent et al., 1995; Yang et al., 1997).

Für Capsaicin wurde ein stimulierender Effekt auf die Freisetzung dieser Neurotransmitter im Gehirn gezeigt (Smith et al., 2006; Marinelli et al., 2005). Durch Mikrodialyse bei Ratten konnte gezeigt werden, dass es nach peripherer Gabe von 0,1 mg Capsaicin (6,5 mM) zu einer 3-fachen Erhöhung der extrazellulären Serotoninkonzentrationen in der rostralen ventromedialen Medulla kam, zu der unter anderem ein Teil der Raphekerne zählt, in denen der Großteil an serotonergen Neuronen lokalisiert sind (Smith et al., 2006). Ebenso führte eine Mikroinjektion von 50 µM Capsaicin in die Area tegmentalis ventralis bei Ratten zu einer deutlichen Konzentrationserhöhung des Neurotransmitters Dopamin (+60%) im Nucleus accumbens, welche durch eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors vermittelt wurde (Marinelli et al., 2005). Diese neurotransmitterstimulierenden Effekte von Capsaicin konnten bekräftigt werden, da eine subkutane Applikation von Capsaicin (50 mg/kg) bei Ratten zu einer Erhöhung der Expression des 5-HT_{2A}-Rezeptors und des D₁-Rezeptors im Gehirn zur Folge hatte (Zavitsanou et al., 2010).

Der reduzierende Effekt von Capsaicin auf die Nahrungsaufnahme (Westerterp-Plantenga et al., 2005) könnte somit durch eine Erhöhung der zentralen Serotonin- und Dopaminfreisetzung vermittelt werden (Marinelli et al., 2005; Smith et al., 2006).

B Zielsetzung

Übergewicht und Adipositas stellen ein globales Problem dar. Sie sind die Folge von zu wenig körperlicher Aktivität und erhöhter Energieaufnahme und sind Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II und einige Krebserkrankungen. Eine Möglichkeit, Übergewicht und Adipositas zu reduzieren, stellt eine Reduktion der Energieaufnahme dar (WHO, 2013). Natürliche bioaktive Inhaltsstoffe könnten einen Beitrag dazu leisten (Astrup et al., 2010). Capsaicin, der mengenmäßig (~70 %) bedeutendste Scharfstoff des Chili (Barceloux, 2009), zeigte eine sättigungsfördernde Wirkung, die mit einer verringerten Energieaufnahme einherging (Westerterp-Plantenga et al., 2005). Die appetitreduzierende Wirkung von Capsaicin ist möglicherweise auf eine vermehrte Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin (Drent et al., 1995; Smith et al., 2006) und Dopamin im Gehirn zurückzuführen (Yang et al., 1997; Marinelli et al., 2005). Capsaicin vermittelt diese Wirkung kalziumabhängig über den nicht-selektiven Kationenkanal TRPV1 (O'Neill et al., 2012). Des Weiteren zeigt Capsaicin im Gehirn einen Einfluss auf die Expression von Serotonin- und Dopaminrezeptoren, deren Aktivierung mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Zavitsanou et al., 2010).

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, eine nicht scharf schmeckende Verbindung zu identifizieren, welche eine vergleichbare Stimulierung der Neurotransmitterfreisetzung wie Capsaicin bewirkt und so potentiell ähnliche appetitreduzierende Effekte aufweisen könnte. Dazu wurde ein Screening mit Alkamiden (= N-Alkylamide) bezüglich der Serotoninfreisetzung durchgeführt und anschließend die potenteste Substanz mit Capsaicin verglichen. Schließlich wurde der Effekt dieser Substanz auf die Regulation ausgewählter Serotonin- und Dopaminrezeptoren, die mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert sind, untersucht. Des Weiteren wurde die Genregulation möglicher Bindungsrezeptoren untersucht. Als Zellmodell wurden neuronale SH-SY5Y Zellen ausgewählt, da diese Zelllinie ein etabliertes *in vitro* Modell für dopaminerge Neuronen darstellt (Xie et al., 2010) und Serotoninrezeptoren exprimiert (Kruk et al., 2013).

C Materialien und Methoden

1 Materialien

1.1 Geräte

Gerät, Software	Firma
Autoklav 3870 ML	Tuttnauer
DNA-Platte, NanoQuant™ Platte	Tecan
Inkubator CO2 Binder C150	Binder
Lab dancer S 40	VWR
Magnetrührer VMS-C4	VWR
Manuelle Mehrkanalpipette (10 µl, 100 µl)	Eppendorf Research
Manuelle Kolbenhubpipette (2.5, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	Eppendorf Research
Microprocessor pH Meter	Hanna instruments
Mikroskop invert., IT400 Trino	VWR
Orbitalschüttler, Grant Bio PMS 1000	Grant-bio instruments
Plattenlesegerät, Infinite M200	Tecan
Software, i-control 1.6	Tecan
Statistikprogramm	SigmaPlot, Version 11.0
Sterilwerkbank	Telstar, Biostar Plus
Waage, Pioneer™	OHAUS
Wasserbad mit Wärmethermostat,	VWR
Ecoline-Staredition E 100	
Wasseraufbereitungssystem, Arium 611VF, sartorius stedim	Sartorius
Zählkammer,	Brand
Neubauer improved Bright-line, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	
Zentrifuge, 5415R	Eppendorf
Zentrifuge, 5804R	Eppendorf

1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgegenstand	Firma
Cryoröhrchen mit Innengewinde, Dichtung, 2 mL, steril	Carl Roth
Membranfilter, Nylon, 0,2 µm	VWR
Multi-SafeSeal Tubes, farblos/farbig sortiert, 1,5 mL	Carl Roth
Multi-Sicherheitsreaktionsgefäße, 2 mL	Carl Roth
Pipettenspitzen (2,5, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL)	StarLab Group
SH-SY5Y - Zellen (CRL-2266)	American Type Culture Collection
Zellkulturplatte mit Abdeckplatte, 96 Wells, steril	Greiner bio-one
Zellkulturflaschen (T25, T175), red standard cap, steril	Greiner bio-one
Zellkulturschale (35x10 mm), steril	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL), steril	Starlab
Zentrifugenröhrchen, 13 mL, steril	Sarstedt

1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
2E,4E-Decadiensäure-N-isobutylamid	Symrise AG
2E,4E-Decadiensäure-N-isopropionsäure	Symrise AG
2E,4E-Decadiensäure-N-piperid	Symrise AG
2E,4E-N-Isobutyl-dodeca-2,4-dienamid	Symrise AG
2E,4Z-Decadiensäure-N-isobutylamid	Symrise AG
2E,6Z,8E-Decatriensäure-N-isobutylamid	Symrise AG

2E-Decensäure-N-isobutylamid	Symrise AG
5-(1-dodeceny)-1, 3-Benzodioxol	Symrise AG
Akasolv	Carl Roth
Capsaicin	Sigma Aldrich
D-(+)-Glucose, wasserfrei p.a.	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO), für die Zellbiologie (≥ 99,5 %)	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat, ≥ 99,5 % p. a., wasserfrei	Carl Roth
Ethanol 96 %	Merck
Ethanol 96 %, vergällt	Carl Roth
Flüssiger Stickstoff	Linde Gas
Fötale Rinderserum (FBS)	Life Technologies
Hanks' Balanced Salt solution (HBSS)	Sigma Aldrich
HEPES Pufferan, ≥ 99,5 %	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid, ≥ 99,5 % p. a.	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, ≥ 99 % p. a.	Carl Roth
Kalziumchlorid Dihydrat, ≥ 99 % p. a	Carl Roth
L-Glutamin - Lösung, 200 mM, sterilfiltriert	Sigma Aldrich
Magnesiumsulfat, getrocknet, reinst	Carl Roth
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma Aldrich
MTT Formazan, Pulver	Sigma Aldrich
Natriumchlorid, mind 99,8 %	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich
Natriumpyruvat - Lösung, 100 mM, sterilfiltriert	Sigma Aldrich
N-Dodecanoyl-N-Methylglycin Natrium Salz * Sarkosyl NL (N-Lauroylsarcosin Natrium Salz), für die Molekularbiologie (≥ 99,5 %)	Sigma Aldrich
Nutrient Mixture F-12 Ham Medium	Sigma Aldrich

Penicillin-Streptomycin (10000 Einheiten Pen. + 10 mg Streptom. Per mL in 0.9 % NaCl), steril	Sigma Aldrich
Salzsäure, mind. 37 %	Sigma Aldrich
SYBR Green MasterMix (Fast Master Mix)	Life Technology
Trypanblau Lösung (0,4 % in Natriumchlorid)	Sigma Aldrich
Trypsin EDTA Lösung (1x) (0,5 g Trypsin + 0,2 g EDTA, 4 Na / L), steril filtriert	Sigma Aldrich

1.4 Medien

Das normale Wachstumsmedium für die SH-SY5Y Zellen bestand aus gleichen Teilen Nutrient Mixture F-12 Ham (F 12 Ham) Medium und Minimum Essential Medium Eagle (MEM) Medium plus Zusätzen:

Nutrient Mixture F-12 Ham	Minimum Essential Medium Eagle
+ 50 % MEM	+ 50 % F 12 Ham
+ 10 % FBS	+ 10 % FBS
+ 1 % Pyruvat	+ 2 % Glutamin
+ 1 % PenStrep	+ 1 % PenStrep

Es wurden drei Arten von Medien mit unterschiedlichen Gehalten an fötalem Rinderserum (FBS) verwendet:

- 1) Auftaumedium: + 20 % FBS
- 2) Normales Wachstumsmedium: + 10 % FBS
- 3) Inkubationsmedium: + 1 % FBS

1.5 Kits

Kit	Firma
Dopamin ELISA	DLD Diagnostika GmbH
Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit	Life Technologies, Invitrogen
High Capacity cDNA	Life Technologies, Applied Biosystems
Reverse Transkription Kit	
PeqGold Total RNA Kit	Peqlab
Serotonin ELISA	DLD Diagnostika GmbH

1.6 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 10 x PBS

Substanz	Menge [g]
Natriumchlorid	99,9324
Dinatriumhydrogenphosphat	14,1960
Kaliumchlorid	2,5347
Kaliumdihydrogenphosphat	2,4496

Der Puffer wurde auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit ddH₂O auf 1 L aufgefüllt und membranfiltriert.

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 1 x PBS

10 x PBS wurde mit ddH₂O 1:10 verdünnt und autoklaviert.

Bei den folgenden Versuchen wurde 1 x PBS verwendet.

Krebs-Ringer-HEPES-Puffer

Substanz	Menge [g]
Natriumchlorid	7,48
Kaliumchlorid	0,14
Kaliumdihydrogenphosphat	0,16

Kalziumchlorid	0,35
Magnesiumsulfat	0,156
Natriumhydrogencarbonat	2,18
Glukose	1,8
HEPES	2,383

Der Puffer wurde auf den gewünschten pH-Wert (5,0 bzw. 6,2) eingestellt und membranfiltriert.

Lysepuffer (1 %)

1,0 g N-Lauroylsarcosinat wurde mit 1 x PBS auf 100 mL aufgefüllt.

MTT working solution

5,0 mg MTT Formazan / mL PBS wurden gelöst, membranfiltriert und anschließend 1:6 mit serumfreiem Medium verdünnt.

1.7 Primer

Alle Primer wurden mit der Software Primer3Plus designt und synthetisiert von VBC Biotech, Wien.

Gen	Produktlänge (bp)	Forward primer	Reverse primer
5HT2A	144	GTTGCTTACTCGCCGATGATA	TGCCAAGATCACTTACACACAAA
5HT1A	108	TCATCGTGGCTCTTGTTCTG	CGGGGTTAAGCAGAGAGTTG
5HT1B	109	CTGGTGTGGGTCTTCTCCAT	AGAGGATGTGGTCCGGTGTTT
D2	211	CCACTACA ACTACTATGCCACAC	GAATTTCCACTCACCTACCACC
D1	166	CCATCACACAAAACGGTCAG	GTGTGTTGAAAAGCAGCAGA
TRPV1	100	CCGGTGGTGCTTCAGGGTGG	GCGCTTGACGCCCTCACAGT
TRPA1	116	GCAGCCAGTTATGGGCGTAT	TTTGCTGCCAGATGGAGAGG
CNR1	115	GCTGCCTAAATCCACTCTGC	TGGACATGAAATGGCAGAAA
TBP	130	CCCGAAACGCCGAATATAATCC	GACTGTTCTTCACTCTTGGCTC

2 Methoden

2.1 Zellkulturtechnik

2.1.1 SH-SY5Y Zelllinie

Die SK-N-SH Zelllinie wurde 1970 nach einer Knochenmarksbiopsie an einem vierjährigen Mädchen, das an einem Neuroblastom erkrankt war, in Kultur genommen. Diese Zelllinie wies zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen auf, ähnlich Neuroblasten und Epithelgewebe. Der neuroblastenähnliche Zelltyp wurde dreimal subklont in SH-SY, SH-SY5 und schließlich in SH-SY5Y (Biedler et al., 1978). SH-SY5Y Zellen besitzen eine Sättigungsdichte von mehr als 1×10^6 Zellen/cm², haben eine Verdoppelungszeit von 48 Stunden, wachsen in Clustern, weisen viele, feine Zellfortsätze auf (Abbildung 6) und zeigen moderate Level von Dopamin-beta-hydroxylase Aktivität (ATCC®,2013).

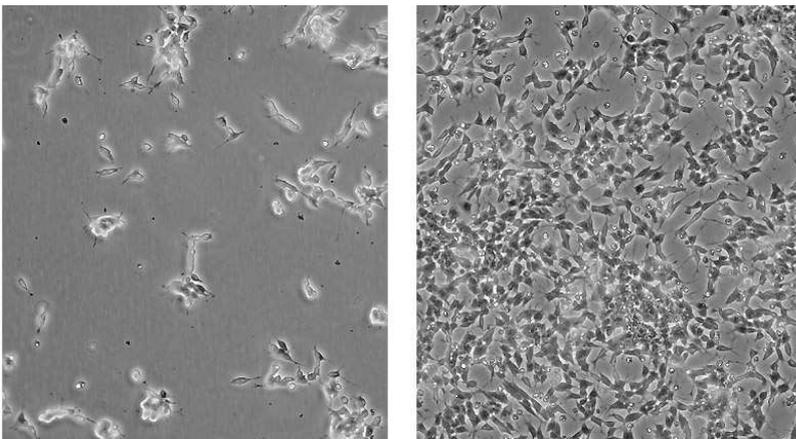


Abbildung 6: Geringe Zelldichte (links) und hohe Zelldichte (rechts)

(mod. nach ATCC®, 2013)

2.1.2 Auftauen der Zellen

Kryoröhrchen mit enthaltenen SH-SY5Y Zellen, die in Flüssigstickstoff gelagert wurden, wurden bei 37°C im Wasserbad zügig aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wurde die Zellsuspension in ein 15 mL-Zentrifugenöhrchen mit 9 mL Wachstumsmedium überführt, um toxische Effekte des DMSO, das zur Verhinderung von Kristallbildung in einer Endkonzentration von 10 % beigegeben wurde, zu minimieren. Nach anschließendem Zentrifugieren bei

Raumtemperatur (25 °C) und 115 x g 7 Minuten lang, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das gebildete Zellpellet in 5 mL Auftaumedium (+20 % FBS) resuspendiert und schließlich in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Das 15 mL-Röhrchen wurde mit 5 mL Auftaumedium (+20% FBS) nachgespült und das Medium in die Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Um den Zellen nach dem Auftauen das Heranwachsen zu erleichtern wurde ein Mediumwechsel mit Auftaumedium vorgenommen. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-85% erreicht haben, konnten sie in eine T175-Zellkulturflasche überführt werden (Kapitel C 2.1.3f).

2.1.3 Kultivierung und Zellernte

Die Zellen wurden mit 5 mL PBS gewaschen, um Mediumsrückstände zu entfernen und anschließend mit 2,5 mL Trypsin, welches tierische Proteasen enthält, vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer Einwirkzeit von zwei Minuten wurde die Reaktion mit 7,5 mL Wachstumsmedium abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit einer 10 mL Glaspipette in der Zellkulturflasche grob und nach Überführen der Zellsuspension in ein 50 mL-Röhrchen mit einer 1 mL-Pipette von Eppendorf fein vereinzelt.

Für eine Weiterkultivierung der Zellen wurden 2,5 mL der Zellsuspension in die T175-Zellkulturflasche rückgeführt, 40–50mL Wachstumsmedium hinzugefügt und bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator kultiviert. Das Passagieren musste bei dieser Menge rückgeführter Zellsuspension alle 4-5 Tage durchgeführt werden, um eine Überkonfluenz der Zellen, die ein Absterben und eine Differenzierung dieser zur Folge hätte, zu vermeiden. Jede Passage führt zu einer Erhöhung des Alters der Zellen. Die Zellen wurden nur von Passage 13 - 22 für die Versuchsdurchführung herangezogen.

2.1.4 Auszählen der Zellen

Die Bestimmung der absoluten und relativen Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer® Zählkammer. Dazu wurden 20 µL der Zellsuspension mit 180 µL

Trypanblau verdünnt (1:10) und unter das Deckglas in eine der beiden Zählkammern pipettiert. Der Farbstoff Trypanblau kann in tote Zellen, aufgrund der geschädigten Membraneigenschaften, eindringen und somit erscheinen diese unter dem Lichtmikroskop als blau eingefärbte Zellen, während lebende Zellen ungefärbt sind. Zur Zellzahlbestimmung wurde der Durchschnitt der vier Großquadrate, die wiederum in je 16 Kleinquadrate unterteilt sind, herangezogen, wobei jeweils zwei Grenzlinien der Eckquadrate bei der Zellzählung nicht berücksichtigt wurden.

$$\text{Relative Zellzahl} = \frac{\text{Ø Zellzahl/Großquadrat} \cdot \text{Verdünnungsfaktor (10)}}{\text{Zählkammerfaktor (10}^4\text{)}}$$

Der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus dem Verhältnis von Zellsuspension zu Trypanblau = 1:10 (Verdünnungsfaktor 10).

Der Zählkammerfaktor berechnet sich aus der Fläche eines jeden Eckquadrats (0,01 cm²) multipliziert mit der Zählkammertiefe (0,01 cm) = 0,0001 ml (Zählkammerfaktor 10000)

2.1.5 Ausstreuen der Zellen

Für die nachfolgenden Versuche wurde eine definierte Zellzahl entweder in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 35 mm oder 96-Well-Platten ausgestreut. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator 1-2 Tage, je nach Zellzahl / Well, kultiviert.

2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Serotonin

Prinzip

Dieser hochsensitive Enzymimmunoassay von DLD Diagnostika GmbH dient zur quantitativen Bestimmung von derivatisiertem Serotonin in niedrigkonzentrierten Proben. Zunächst erfolgt während eines Acylierungsschrittes die Derivatisierung von Serotonin durch Zugabe von Acylierungspuffer und Acylierungsreagenz zum stabileren N-Acylserotonin.

Während der eigentlichen Testdurchführung des ELISA konkurrieren die Antigene um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Nachdem die Reaktion ein Gleichgewicht erreicht hat, wird durch einen Waschschrift der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex entfernt und der gebundene Komplex mittels Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats (POD) nachgewiesen und durch Umsetzung von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Durch die TMB/POD-Reaktion kommt es zu einer Farbänderung und anschließend, nach Abstoppen des Enzyms mit Schwefelsäure, wird bei 450 nm die Absorption in einem Photometer gemessen. Das Verhältnis zwischen der Konzentration des Serotonins in der Probe und der Signalstärke ist umgekehrt proportional (DLD, 2012).

Probenvorbereitung

Es wurden zwölf Zellkulturschalen (35 mm) mit je $1,25 \cdot 10^6$ Zellen ausgestreut und zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Nachfolgende Schritte mussten unter Vermeidung direkten Sonnenlichtes durchgeführt werden, da die Testsubstanzen und das gebildete Serotonin photolabil waren.

Nach der Kultivierung wurde die zu testende Substanz in Ethanol (96 %) gelöst und eine Konzentration von 10 mM eingestellt. Anschließend wurde die 10 mM Lösung in Krebs-Ringer-HEPES Puffer (pH 6,2), der 0,1 % Ascorbinsäure zur Vermeidung von oxidativen Prozessen enthielt, auf 10 µM verdünnt und eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt (10 µM, 1 µM, 0.1 µM, 0.01 µM, 0.001 µM) wobei die Kontrolle (Puffer mit je 0,1 % Ethanol und Ascorbinsäure) keine Testsubstanz enthielt.

Nach Ansetzen der Verdünnungen wurden die Zellen mit jeder Konzentration der Testsubstanz und der Kontrolle stimuliert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 300 µL PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten mit 300 µL der jeweiligen zu testenden Konzentration und einer Kontrolle im Doppelansatz inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 300 µL Überstand abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Schließlich wurden die Zellen erneut mit 300 µL PBS gewaschen und nachdem alle

Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert wurden, mit 300 µL Lysepuffer versetzt und so wie die Reaktionsgefäße mit den Überständen bei -20 °C gelagert. Die lysierten Zellen wurden zur Bestimmung der DNA herangezogen (Kapitel 2.4).

Testdurchführung

Zuerst mussten die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut werden.

Anschließend wurde eine 1:5 Verdünnung jeder Probe mit Krebs-Ringer-HEPES Puffer (0,1 % Ascorbinsäure, ph 6,2) durchgeführt und die unverdünnten Proben für etwaige Wiederholung der Messung wieder bei -20 °C eingefroren.

Die Probenvorbereitung für den Acylierungsschritt und die Durchführung des eigentlichen Tests wurden nach Arbeitsanleitung des Herstellers, DLD Diagnostika GmbH, durchgeführt. Dazu wurden je 25 µL Acylierungspuffer in alle Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert, je 20 µL der verdünnten Standards, der Kontrolle und der Testsubstanz zugefügt und schließlich je 10 µL des Acylierungsreagenzes dazugegeben. Nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler wurden je 25 µL des Deaktivators dazupipettiert und anschließend mit Haftklebefolie abgedeckt 3 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden je 50 µL auf die Mikrotiterplatte überführt und weitere 15 - 20 Stunden im Kühlschrank bei 2 - 8 °C mit Haftklebefolie abgedeckt inkubiert. Danach wurden alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit ca. 300 µL Waschpuffer viermal gewaschen, je 100 µL Enzymkonjugat dazugegeben und weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde wieder viermal mit Waschpuffer gewaschen und je 100 µL Substrat in die Vertiefungen pipettiert. Nach ca. 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler wurde die Farbreaktion mit je 100 µL Stopplösung abgestoppt. Die Extinction wurde bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm an einem Plattenlesegerät der Firma Tecan gemessen.

Auswertung

Die mittleren Extinktionswerte der Standards wurden gegen die entsprechenden logarithmierten Konzentrationen aufgetragen und die Konzentrationen der Proben nach entsprechender Funktionsgleichung berechnet (logistische Regressionskurve mit 4 Parametern):

$$f(x) = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + \left(\frac{x}{EC50}\right)^{-Hillslope}}$$

Die erhaltenen Konzentrationen [pg/Probe] wurden, unter Berücksichtigung der 1:5 Verdünnung, auf die entsprechenden DNA - Gehalte und schließlich auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Unterschiede der verschiedenen Behandlungen zur Kontrolle wurden in Prozent dargestellt.

2.3 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für Dopamin

Prinzip

Dieser Enzymimmunoassay von DLD Diagnostika GmbH dient zur quantitativen Bestimmung von Dopamin. Zunächst erfolgt mit einem *cis*-Diol-spezifischen Boronat-Affinitätsgel die Extraktion, Acylierung und enzymatische Umwandlung vom in der Probe vorhandenen Dopamin in N-Acyl-3Methoxytryptamin.

Während der eigentlichen Testdurchführung des ELISA konkurrieren das acylierte Dopamin aus der Probe und das an die Festphase gebundene Dopamin um eine definierte Anzahl von Antikörper-Bindungsstellen. Nachdem die Reaktion ein Gleichgewicht erreicht hat, wird durch einen Waschschriff der nicht-gebundene Antigen-Antikörper-Komplex entfernt und der gebundene Komplex mittels eines Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugats (POD) nachgewiesen und durch Umsetzung von Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt. Durch die TMB/POD-Reaktion kommt es zu einer Farbänderung und anschließend, nach Abstoppen der Reaktion, wird bei 450 nm die Absorption in einem Photometer gemessen. Das Verhältnis zwischen der Konzentration des Dopamins in der Probe und der Signalstärke ist umgekehrt proportional (DLD, 2011).

Probenvorbereitung

Es wurden zwölf Zellkulturschalen (35 mm) mit je $1,25 \cdot 10^6$ Zellen ausgestreut und zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt kultiviert.

Nachfolgende Schritte mussten unter Vermeidung direkten Sonnenlichtes durchgeführt werden, da die Testsubstanzen photolabil waren.

Nach der Kultivierung wurde die zu testende Substanz in Ethanol (96 %) gelöst und eine Konzentration von 10 mM eingestellt. Anschließend wurde die 10 mM Lösung in Krebs-Ringer-HEPES Puffer (pH 7,4), der 0,1 % Ascorbinsäure zur Vermeidung von oxidativen Prozessen enthielt, auf 10 µM verdünnt und eine dezimale Verdünnungsreihe erstellt (10 µM, 1 µM, 0,1 µM) wobei die Kontrolle (Puffer mit je 0,1 % Ethanol und Ascorbinsäure) keine Testsubstanz enthielt.

Nach Ansetzen der Verdünnungen wurden die Zellen mit jeder Konzentration der Testsubstanz und der Kontrolle stimuliert. Zuerst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 300 µL PBS gewaschen und anschließend 3 Minuten mit 350 µL der jeweiligen zu testenden Konzentration und einer Kontrolle im Doppelansatz inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 300 µL Überstand abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, in welches zuvor schon 30 µL 1 N Salzsäure vorgelegt wurde. Schließlich wurden die Zellen erneut mit 300 µL PBS gewaschen und, nachdem alle Konzentrationen der Testsubstanz inkubiert wurden, mit 300 µL Lysepuffer versetzt und -20 °C gelagert. Die lysierten Zellen wurden zur Bestimmung der DNA herangezogen (Kapitel 2.4).

Testdurchführung

Die Probenvorbereitung für die Extraktion, Acylierung und enzymatische Umwandlung von Dopamin und die Durchführung des eigentlichen Tests wurden nach Arbeitsanleitung des Herstellers, DLD Diagnostika GmbH, durchgeführt. Dazu wurden je 20 µL Standards, 20 µL der Kontrollen und 300 µL der Testsubstanz in die Vertiefungen der Extraktionsplatte pipettiert, je 50 µL Extraktionspuffer dazugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurde die Platte ausgeleert, mit je 1 mL Waschpuffer versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Platte wieder entleert und je

150 µL Acylierungspuffer und je 50 µL Acylierungsreagenz hinzugefügt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte wieder ausgeleert, mit je 1 mL Waschpuffer versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach Wiederholung des vorherigen Waschschrilles wurden je 200 µL Salzsäure zur Elution der Katecholamine in die Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde danach mit Haftklebefolie abgedeckt und 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 10 µL eines Enzymmixes in die Mikrotiterplatte pipettiert und je 50 µL Überstand von den Standards, den Kontrollen und der Testsubstanz von der Extraktionsplatte dazugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Danach wurden je 50 µL Dopamin-Antiserum hinzugefügt und 12-20 Stunden bei 2-8 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde viermal mit ca. 250 µL Waschpuffer gewaschen und dann je 100 µL Konjugat dazupipettiert. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation wurde der vorherige Waschschrill wiederholt und dann je 100 µL Substrat hinzugefügt. Nach ca. 15-20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler wurde die Farbreaktion mit je 100 µL Stopplösung abgestoppt

Die Extinction wurde bei 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm an einem Plattenlesegerät der Firma Tecan gemessen.

Auswertung

Die mittleren Extinktionswerte der Standards wurden gegen die entsprechenden logarithmierten Konzentrationen aufgetragen und die Konzentrationen der Proben nach entsprechender Funktionsgleichung berechnet:

$$f(x) = -k * \ln(x) + d$$

Die erhaltenen Konzentrationen [ng/mL] wurden auf die entsprechenden DNA – Gehalte und schließlich auf die unbehandelte Kontrolle bezogen. Die Unterschiede der verschiedenen Behandlungen zur Kontrolle wurden in Prozent dargestellt.

2.4 Bestimmung der DNA

Die zuvor mit 300 μL Lysepuffer lysierten Zellen mussten bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Die Zugabe des anionischen Puffers bewirkt eine Auflösung der Zellmembran und des Zellkerns, was die Bestimmung der DNA ermöglicht. Das Zelllysate (300 μL) wurde mit 1,5 mL PBS verdünnt und 1000 μL durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Kolbenhubpipette vermischt, um eine gleichmäßige Verteilung der DNA in der Zellkulturschale zu erreichen. Die Bestimmung der doppelsträngigen DNA wurde mit der NanoQuant-Platte von Tecan in Vierfachbestimmung durchgeführt. Als Blank diente PBS. Es wurden 2 μL Probe invers auf die Platte pipettiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Absorption bei 260 nm diente zur Berechnung der Konzentration [$\text{ng}/\mu\text{L}$] und das Verhältnis der beiden Wellenlängen diente zur Berechnung der Reinheit, um Verunreinigungen durch Proteine zu erkennen und lag zwischen 1,7 und 2,0.

2.5 RNA - Isolierung

Prinzip

Die RNA-Isolierung wurde mit dem PqGold Total RNA Kit laut Herstellerangaben durchgeführt und beruht auf den selektiven und reversiblen Bindungseigenschaften von PerfectBind Säulen mit Silikamembranen.

Die aufzubereitenden Zellen werden zunächst mit RNA - Lysepuffer versetzt und das Lysat anschließend auf eine DNA - Removing Säule geladen. Der Säulendurchfluss wird mit Ethanol versetzt und auf eine PerfectBind RNA - Säule geladen. Der Säulendurchfluss wird verworfen und nach mehrmaligem Waschen mit zwei verschiedenen Waschpuffern und anschließendem Trocknen, wird die RNA mit RNase - freiem Wasser eluiert (PqLab, 2013).

Probenvorbereitung

Es wurden für die RNA-Isolierung zehn Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm) mit je $2,5 \cdot 10^6$ Zellen in 2,5 mL Wachstumsmedium ausgestreut und einen Tag im Inkubator (35°C , $5\%\text{CO}_2$) kultiviert.

Nach Kultivierung wurden die Zellen mit 100 nM der zu testenden Substanz in 2 mL Inkubationsmedium 15 min, 30 min, 1 h, 3 h und 6 h inkubiert.

Dafür wurde die Probe vorher in Ethanol gelöst und schließlich im Inkubationsmedium (+1 % FBS) in einer finalen Konzentration von 100 nM eingestellt. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurde eine Lösungsmittelkontrolle (0,1 % Ethanol) ohne Testsubstanz mitgeführt.

Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 2 mL Inkubationsmedium versetzt und für die entsprechenden Zeiten inkubiert.

Testdurchführung

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde den Zellen schnell das Medium abgenommen, mit 350 µL eiskaltem PBS gewaschen und rasch mit 350 µL RNA Lysepuffer T, peqGold Total RNA Kit - Peqlab, verestzt.

Die Isolierung der RNA wurde mit dem peqGold Total RNA Kit laut Herstellerangaben, Peqlab, durchgeführt, wobei kein optionaler DNase - Verdau durchgeführt wurde. Dazu wurde das Lysat auf eine DNA - Removing Säule geladen, eine Minute bei 12000 x g zentrifugiert und anschließend der Säulendurchfluss in einem neuen Reaktionsgefäß mit 350 µL 70%igen Ethanol versetzt. Danach wurde die Probe auf eine PerfectBind RNA - Säule geladen und eine Minute bei 10000 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden 500 µL RNA Waschpuffer I auf die PerfectBind RNA - Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen, die PerfectBind RNA - Säule mit 600 µL RNA Waschpuffer II beladen und 15 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung dieses Waschschrilles und Verwerfen des Säulendurchflusses wurde die PerfectBind RNA - Säule durch 2-minütige Zentrifugation bei 10000 x g getrocknet. Schließlich wurden auf die getrocknete Säule 70 µL steriles RNase - freies destilliertes Wasser pipettiert und die RNA durch Zentrifugieren (1 Minute, 5000 x g) eluiert.

Messen der RNA - Konzentration

Nach Aufreinigung der RNA wurde deren Konzentration und Reinheit bestimmt. Die Messung der Absorption erfolgte bei 260 nm und 280 nm mit Hilfe der NanoQuant-Platte an einem Plattenlesegerät (Tecan). Als Blank fungierte RNase-freies Wasser. Dazu wurden 2 µL der RNA-Lösung invers auf die Platte pipettiert, gemessen und die RNA - Konzentrationen in ng / µL erhalten.

Das Verhältnis reiner Nukleinsäuren wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen, um Kontaminationen durch Proteine zu erkennen. Es wurden ausschließlich Proben verwendet, bei denen beide Verhältnisse zwischen 1,5 und 2,2 lagen, entsprechend einer RNA-Reinheit von 90 – 100 %. Es wurde auch das Verhältnis bei 230/260 nm gemessen, um Kontaminationen durch beispielsweise Phenol ausschließen zu können.

Die so aufgereinigte RNA kann in Nuklease-freiem Wasser bei -80 °C mindestens ein Jahr aufbewahrt werden.

2.6 cDNA – Synthese

Prinzip

Für den Nachweis spezifischer mRNA mittels einer qRT-PCR (Kapitel C 2.7) muss die isolierte RNA (Kapitel C 2.5) zuerst mittels einer Reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Testdurchführung

Die Reverse Transkriptase-Polymerase-Reaktion wurde laut Herstellerangaben mit Hilfe des High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit von Life Technologies - Applied Biosystems durchgeführt. Die erhaltenen RNA-Konzentrationen in ng / µL (Kapitel C 2.5) wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf einen RNA-Gehalt von 2 µg / 10 µL Probe eingestellt.

Der Reaktionsansatz für 2x RT Master Mix wurde laut Herstellerangaben hergestellt und setzt sich wie folgt zusammen:

Komponente	Volumen/Reaktion [µL]
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP MIX	0,8
10x RT Random Primers	2,0
Reverse Transcriptase	1,0
Rnase Inhibitor	1,0
NFW	3,2
Reaktionsvolumen	10,0

Je 10 µL 2x RT Master Mix mit 10 µL verdünnter RNA-Probe wurden gemischt und anschließend unter folgenden Reaktionsbedingungen im Thermocycler die Reverse Transkription durchgeführt:

Schritt 1	25 °C	10 min
Schritt 2	37 °C	120 min
Schritt 3	85 °C	5 min
Schritt 4	4 °C	∞

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.7 Bestimmung der Genexpression mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Prinzip

Die PCR dient zur Amplifikation der DNA und wird in einen Zyklus von drei Phasen unterteilt. Zunächst werden bei der Denaturierung durch Erhitzung die DNA-Stränge aufgetrennt. Im nächsten Schritt, der Hybridisierung, kommt es durch Senkung der Temperatur zur Anlagerung der Primer an die DNA-Stränge und im letzten Schritt kommt es durch Polymerasen bei erhöhter Temperatur zu Verlängerung der DNA-Stränge. Nach jedem Zyklus dieser drei Schritte wird die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt (Roche, 2013).

Um spezifische mRNA nachzuweisen, wurden bestimmte Genabschnitte der synthetisierten cDNA (Kapitel C 2.6) mit einer qRT-PCR amplifiziert. Als Maß für die Startmenge an cDNA in der Probe dient der Ct - Wert (= Crossing Point), der der Anzahl der nötigen PCR-Zyklen entspricht, bei dem ein konstantes Fluoreszenzniveau erreicht wurde. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignals wird durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bestimmt, der nur an doppelsträngige DNA, die exponentiell bei der PCR amplifiziert wird, bindet. Bei der Berechnung der Genregulation werden die Ergebnisse unter Berücksichtigung der Effizienz und des Ct-Wertes auf die Werte eines nicht regulierten Referenzgens (TBP) normalisiert (= relative Quantifizierung) (Pfaffel, 2004).

Testdurchführung

Die cDNA und alle verwendeten Substanzen wurden auf Eis aufgetaut und die darauffolgende Probenvorbereitung für die qRT-PCR wurde ebenso auf Eis durchgeführt.

Die cDNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser 1:10 bzw 1:5 verdünnt. Der Reaktionsansatz für eine Reaktion setzte sich wie folgt zusammen.

Komponente	Volumen [µL]	Endkonzentration
Fast Master Mix	5,5	1 x
NFW	3,96	
Forward Primer	0,22	200 nM
Reverse Primer	0,22	200 nM
Probe	1,1	
Reaktionsvolumen	11,0	

Im Dreifachansatz wurden je 10 µL des Reaktionsansatzes auf die PCR-Platte aufgetragen. Als Negativkontrolle, die ebenfalls im Dreifachansatz bestimmt wurde, wurde Nuclease-freies Wasser statt Probe zugegeben. Nach Auftragen der Proben wurde die Platte versiegelt, 30 Sekunden die Proben kurz zentrifugiert und anschließend die qRT-PCR unter folgenden Bedingungen für 45 Zyklen gestartet:

Phase 1	95 °C	20 sek	} 45 Zyklen
Phase 2	95 °C	3 sek	
	60 °C	30 sek	
Phase 3	95 °C	15 sek	
	60 °C	60 sek	
	95 °C	15 sek	

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Die Ergebnisse wurden als x-fache Änderung zur Kontrolle (=1) dargestellt.

2.8 Calcium - Assay

Prinzip

Das Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit von Invitrogen beruht auf der Messung eines fluoreszierenden Kalziumindikators, Fluo-4 Direct, der es ermöglicht intrazelluläre Kalziumsignale, vermittelt durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, ligandenbindende und spannungsabhängige Ionenkanäle, zu messen (Life Technologies, 2013).

Testdurchführung

Es wurden 75 000 Zellen pro Well mit je 100 μL Medium in einer 96-Well-Platte ausgestreut und zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 -Gehalt kultiviert. Die Testsubstanz wurde dreifach konzentriert in Ethanol gelöst und anschließend in einem HBSS/HEPES – Gemisch (1:50) in einer Konzentration von 10 μM eingestellt. Ausgehend von 10 μM wurde eine dezimale Verdünnungsreihe bis 10 nM erstellt.

Der Versuch wurde laut Herstellerprotokoll mit geringen Modifikationen durchgeführt.

Eine Flasche des Fluo-4 Direct Calcium Reagenzes wurde laut Protokoll in 10 mL mitgeliefertem Puffer gelöst, jedoch anschließend zu je 2,5 mL aliquotiert, bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und erst bei Versuchsdurchführung frisch mit Probenicid (Endkonzentration 5 mM) versetzt und 1:1 mit HBSS/HEPES verdünnt (= 1x Fluo-4 Direct loading buffer).

Die Zellen wurden nach der Kultivierung zentrifugiert (800 rpm, 1 min), danach das Medium abgenommen und mit einer Multikanalpipette je 100 μL der hergestellten 1x Fluo-4 Direct Reagenz Ladelösung hinzugegeben.

Nach 30-minütiger Inkubation im Inkubator (37°C, 5% CO_2) und anschließender 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde der intrazelluläre Kalziumeinstrom, nach Stimulierung der Zellen durch die zu testenden Substanzen, mittels Fluoreszenzmessung im Dreifachansatz an einem Plattenlesegerät (Tecan) ermittelt. Als Lösungsmittelkontrolle diente HBSS/HEPES mit 0,1 % Ethanol versetzt.

Dazu wurden automatisch 50 µL der Testsubstanz mit einem Injektor, integriert im Plattenlesegerät, direkt in das zu messende Well injiziert und alle zwei Sekunden die Fluoreszenz über eine Zeitspanne von 80 Sekunden bei einer Extinktion von 490 nm und einer Emission von 520 nm gemessen. Der Injektor wurde zwischen den Messungen der unterschiedlich konzentrierten Testsubstanz mit bidestilliertem Wasser durchgespült.

Auswertung

Mit den erhaltenen Werten wurde, nach Normalisierung auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0, die Fläche unter der Kurve berechnet und anschließend auf die Kontrolle bezogen, sodass die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle in Prozent dargestellt werden konnten.

2.9 Bestimmung der Zellviabilität mittels MTT - Assay

Prinzip

Der MTT-Assay ist ein *in vitro* Zytotoxizitätstest basierend auf der Reduktion des wasserlöslichen, gelblichen MTT Tetrazoliumsalzes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid) zu einem blau-violetten Formazan durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenase. Die Aktivität des mitochondrialen Enzyms dient als Maß für die Lebensfähigkeit bzw. das Zellwachstum behandelter Zellen in Vergleich zu unbehandelten und kann so Aufschluss über mögliche Toxizität eines Stoffes geben (Fotakis, 2006).

Testdurchführung

Es wurden 83 000 Zellen pro Well in einer 96-Well-Platte in je 100 µL Medium ausgestreut und einen Tag im Inkubator (37°C, 5% CO₂) kultiviert.

Nach der Kultivierung wurde die Testsubstanz in Ethanol gelöst (10 mM) und eine dezimale Verdünnungsreihe in Ethanol so erstellt, dass anschließend die Verdünnungsreihe im Inkubationsmedium (+1 % FBS) eine Endkonzentration von 10 µM bis 1 nM hatte. Als Negativkontrolle diente Medium (1 % FBS) mit Ethanol (0,1 %). Das Wachstumsmedium wurde abgenommen, je 66 µL

Medium mit Testsubstanz im Vierfachansatz hinzugegeben und 6 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO₂).

Nach der Inkubation wurde die Platte kurz zentrifugiert (4 min, 800 rpm), das Medium abgenommen, je 100 µL MTT Arbeitslösung (Arbeitslösung: 5,0 mg MTT Formazan / mL PBS gelöst, membranfiltriert und anschließend 1:6 mit serumfreiem Medium verdünnt) hinzugegeben und ca. 80 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (4 min, 800 rpm) wurde die MTT Arbeitslösung vorsichtig abgesaugt und mit je 150 µL DMSO die blau-violetten Farbkristalle aus den Zellen herausgelöst.

Die Extinktion wurde mit einem Plattenlesegerät der Firma Tecan bei 570 nm (Referenzwellenlänge 650 nm), nach vorherigem orbital-Schüttelmodus (60 Sekunden), gemessen.

Die erhaltenen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen, sodass die Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle in Prozent dargestellt werden konnten.

D Ergebnisse

1 Screening verschiedener Alkamide bezüglich der Serotoninfreisetzung

Zunächst erfolgte eine Exposition von SH-SY5Y Zellen mit Capsaicin (Abbildung 5), das mit einer vermehrten Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin (Smith et al., 2006) und Dopamin assoziiert ist (Marinelli et al., 2005).

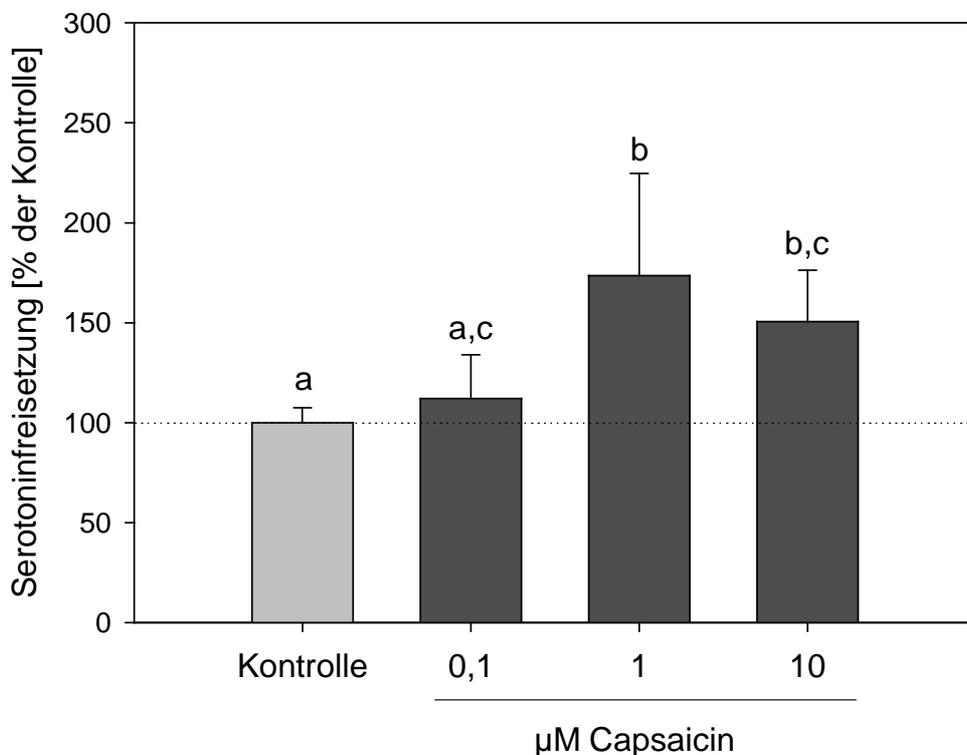


Abbildung 7: Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-5, tR=2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA ($p < 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p = 0,05$) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Abbildung 7 zeigt, dass eine 5-minütige Stimulierung von SH-SY5Y Zellen mit 1 μM Capsaicin zu einer signifikanten Erhöhung der Serotoninfreisetzung um $73 \pm 51 \%$ ($p < 0,001$) und nach Inkubation mit 10 μM Capsaicin zu einer Steigerung um $50 \pm 26 \%$ ($p = 0,003$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle führte. Des Weiteren steigerte eine Stimulierung mit 1 μM Capsaicin die Serotoninausschüttung um 61% ($p < 0,001$) verglichen mit 0,1 μM Capsaicin.

Für das Screening wurden verschiedenen Alkamide (Tabelle 1, Abbildung 8), die Capsaicin strukturell ähnlich sind, hinsichtlich der Wirkung auf die Serotoninausschüttung in SH-SY5Y Zellen untersucht und anschließend die potenteste Substanz mit Capsaicin bezüglich Serotoninfreisetzung, Dopaminfreisetzung und Kalziummobilisierung verglichen.

Tabelle 1: Verwendete Alkamide für das Screening

Alkamid	Trivialname
2E,4E-Decadiensäure-N-isobutylamid	<i>trans</i> -Pellitorin
2E,4Z-Decadiensäure-N-isobutylamid	<i>cis</i> -Pellitorin
2E,4E-N-Isobutyldodeca-2,4-dienamid	<i>trans</i> -C12-Pellitorin
2E-Decensäure-N-isobutylamid	Dihydropellitorin
2E,4E-Decadiensäure-N-piperid	Achilleamid
2E,6Z,8E-Decatriensäure-N-isobutylamid	Spilanthol
5-(1-dodeceny)-1, 3-Benzodioxol	Pipatalin
2E,4E-Decadiensäure-N-isopropionsäure	G6744

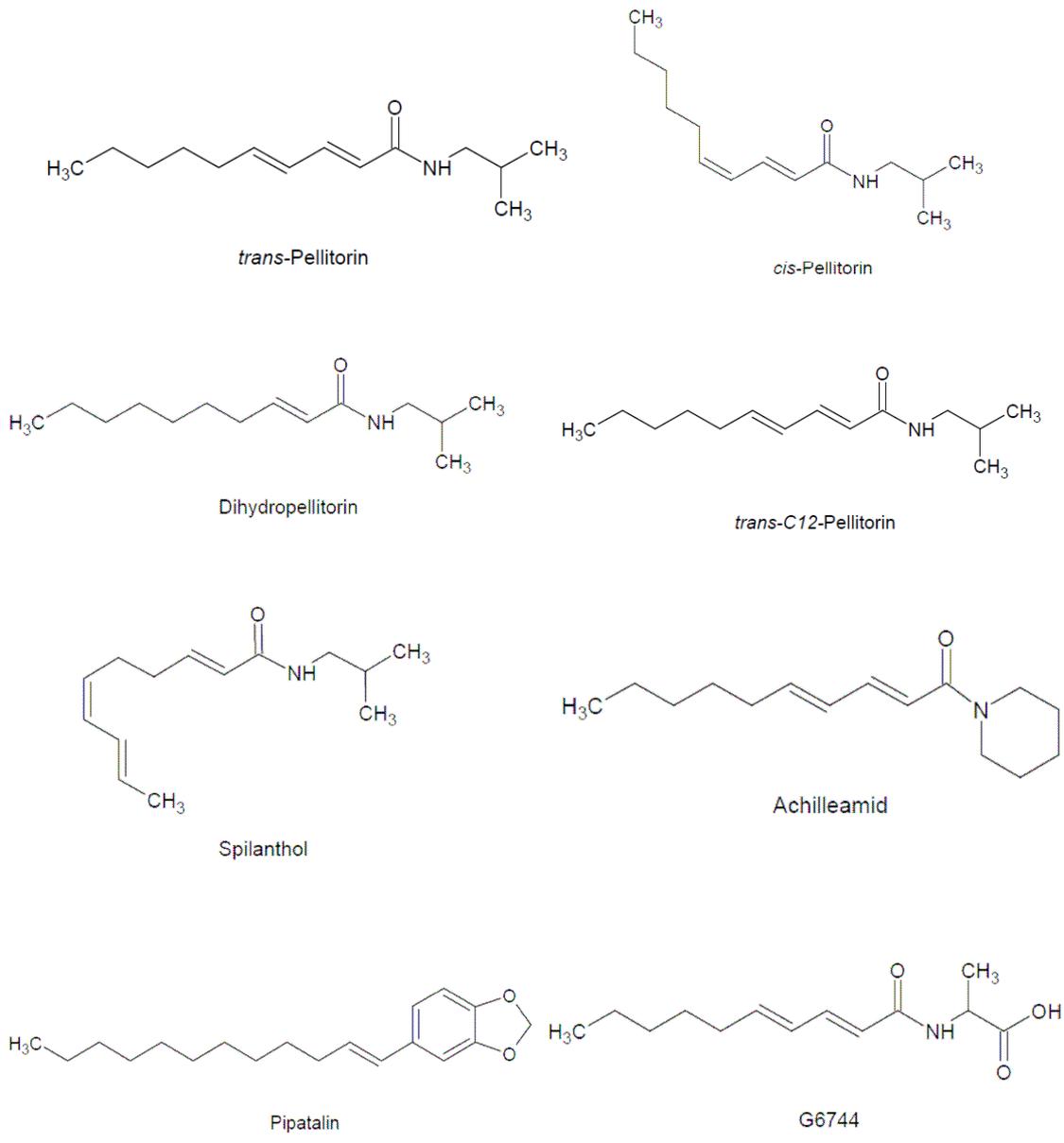


Abbildung 8: Strukturformeln der verwendeten Alkamide

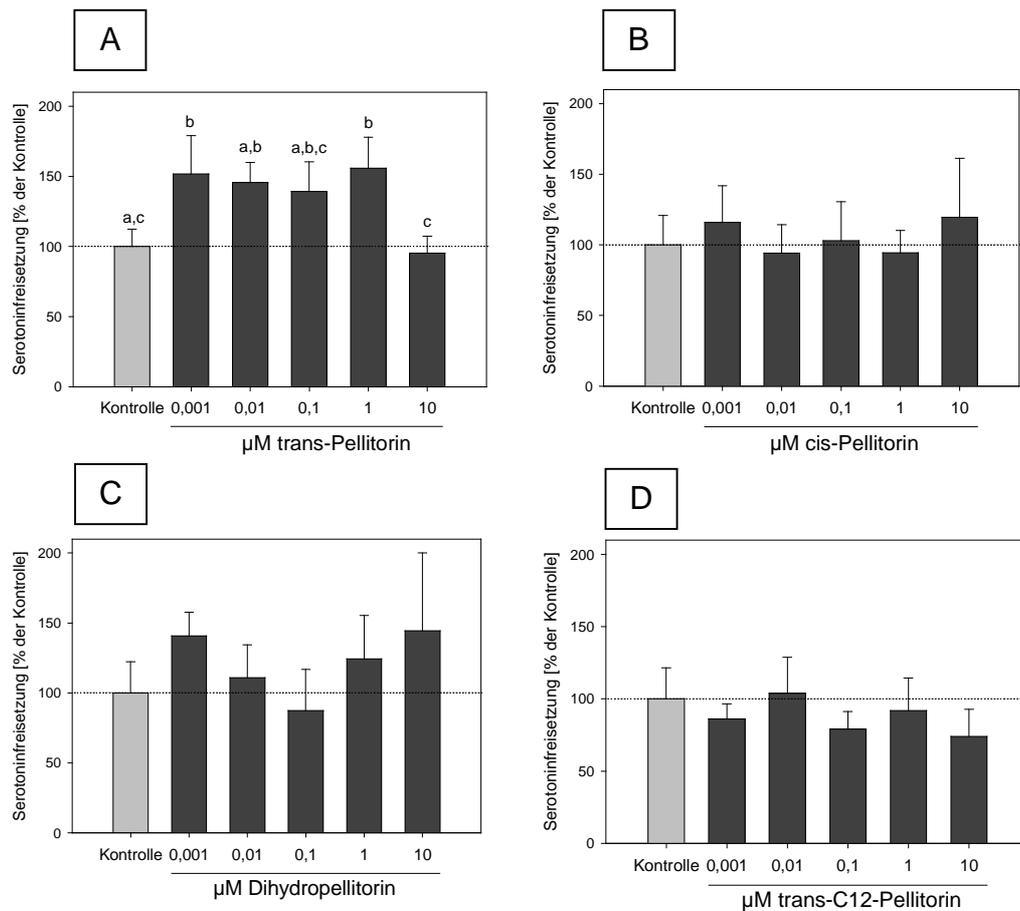


Abbildung 9: Screening von Alkamiden auf die Serotoninfreisetzung (1)

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit verschiedenen Alkamiden (A = *trans*-Pellitorin, B = *cis*-Pellitorin, C = Dihydropellitorin, D = *trans*-C12-Pellitorin) in den Konzentrationen 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=2, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA (A: p=0,003; B: p=0,665; C: p=0,201; D: p=0,259) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test (p=0,05) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Abbildung 9 zeigt den Einfluss verschiedener Alkamide nach 5-minütiger Stimulierung auf die Serotoninfreisetzung in SH-SY5Y Zellen.

Abbildung 9(A) zeigt nach Inkubation mit *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,001 µM und 1 µM eine deutliche Erhöhung der Serotoninfreisetzung um 52 ± 27 % (p=0,003) bzw. um 56 ± 22 % (p=0,003) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Des Weiteren war die Serotoninausschüttung in den Konzentrationen

0,001 μM , 0,01 μM und 1 μM mit + 56% ($p=0,002$), + 50% ($p=0,004$) und + 60% ($p=0,002$) signifikant höher als bei 10 μM .

Schließlich ist aus Abbildung 9 ist zu erkennen, dass eine Inkubation mit den Alkamiden *cis*-Pellitorin (B), Dihydropellitorin (C), *trans*-C12-Pellitorin (D) zu keiner signifikanten Änderung bzw. Erhöhung der Serotoninfreisetzung führte.

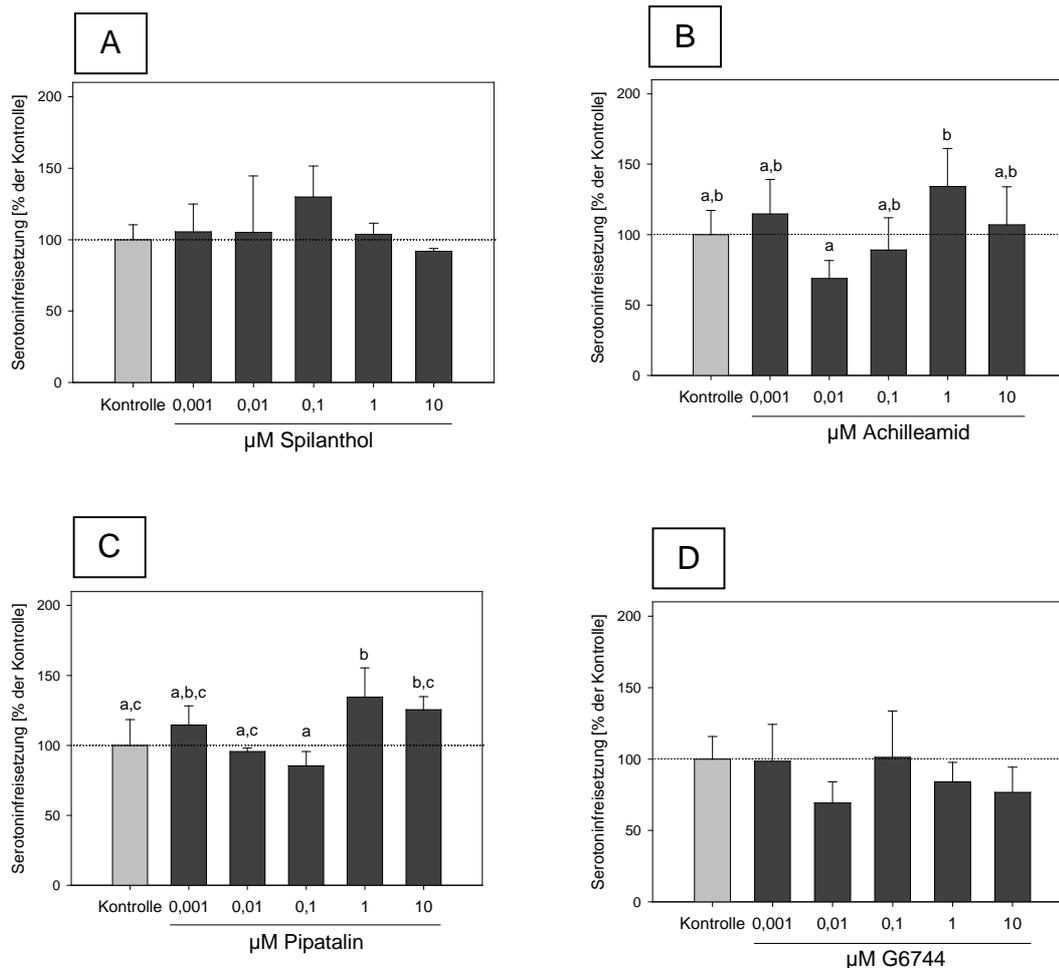


Abbildung 10: Screening von Alkamiden auf die Serotoninfreisetzung (2)

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit verschiedenen Alkamiden (A = Spilanthol, B = Achilleamid, C = Pipatalin, D = G6744) in den Konzentrationen 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. $n=2$, $tR=1-2$. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA (A: $p=0,297$; B: $p=0,031$; C: $p\leq 0,001$; D: $p=0,196$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Abbildung 10 zeigt den Einfluss weiterer Alkamide nach 5-minütiger Stimulierung auf die Serotoninfreisetzung in SH-SY5Y Zellen.

Nach einer Stimulierung mit Achilleamid (Abbildung 10(B)) war nur zwischen den Konzentrationen 0,01 μM (69%) und 1 μM (134%) ein signifikanter Unterschied ($p=0,002$) bezüglich der Serotoninausschüttung ersichtlich, jedoch gab es keinen Unterschied zur Kontrolle.

Aus Abbildung 10(C) geht hervor, dass 1 μM Pipatalin eine Steigerung der Serotoninausschüttung um $34 \pm 21 \%$ ($p=0,003$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle bewirkte. Außerdem stimulierte Pipatalin in der Konzentration von 1 μM die Serotoninproduktion um 39 % ($p=0,001$) bzw. 49 % ($p<0,001$) stärker verglichen mit den Konzentrationen 0,01 μM bzw. 0,1 μM . Auch 10 μM Pipatalin führte zu einer höheren Serotoninfreisetzung (+40%) als 0,1 μM ($p<0,001$).

Schließlich ist aus Abbildung 10 ist zu erkennen, dass eine Inkubation mit den Alkamiden Spilanthol (A) und 6744 (D) zu keiner signifikanten Änderung bzw. Erhöhung der Serotoninfreisetzung führte.

Aus dem durchgeführten Screening der Alkamide auf die Serotoninausschüttung ging hervor, dass *trans*-Pellitorin den größten Effekt auf die Neurotransmitterfreisetzung ausübte. Dieses Ergebnis wurde durch Erhöhung der Replikate von n = 2 auf n = 6 validiert (Abbildung 11).

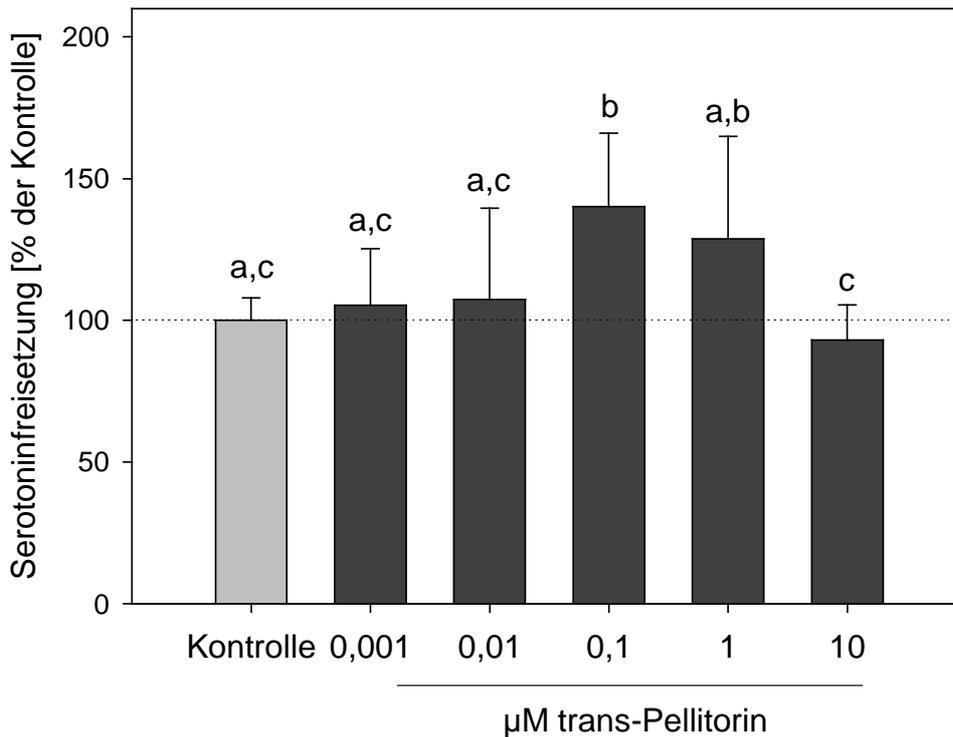


Abbildung 11: Serotoninausschüttung nach Inkubation mit *trans*-Pellitorin

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=6, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p = 0,05$) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Abbildung 11 zeigt eine signifikante Steigerung der Serotoninausschüttung nach Inkubation mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin um mehr als 40 ± 26 % ($p < 0,001$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Weiters führte eine Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin zu einer signifikant höheren Serotoninfreisetzung als mit

0,001 μM , 0,01 μM und 10 μM *trans*-Pellitorin, nämlich um 35 % ($p=0,002$), 33 % ($p<0,003$) bzw. 47 % ($p<0,001$). Auch war bei Behandlung mit 1 μM *trans*-Pellitorin eine signifikante Erhöhung der Serotoninausschüttung um 36 % ($p=0,002$) im Vergleich zu 10 μM zu erkennen.

2 Zellviabilität

Um eine mögliche Zytotoxizität des Alkamides *trans*-Pellitorin auf SH-SY5Y Zellen auszuschließen, wurde die Zellaktivität mittels eines MTT-Tests nach 6 Stunden Inkubation mit *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen von 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM untersucht.

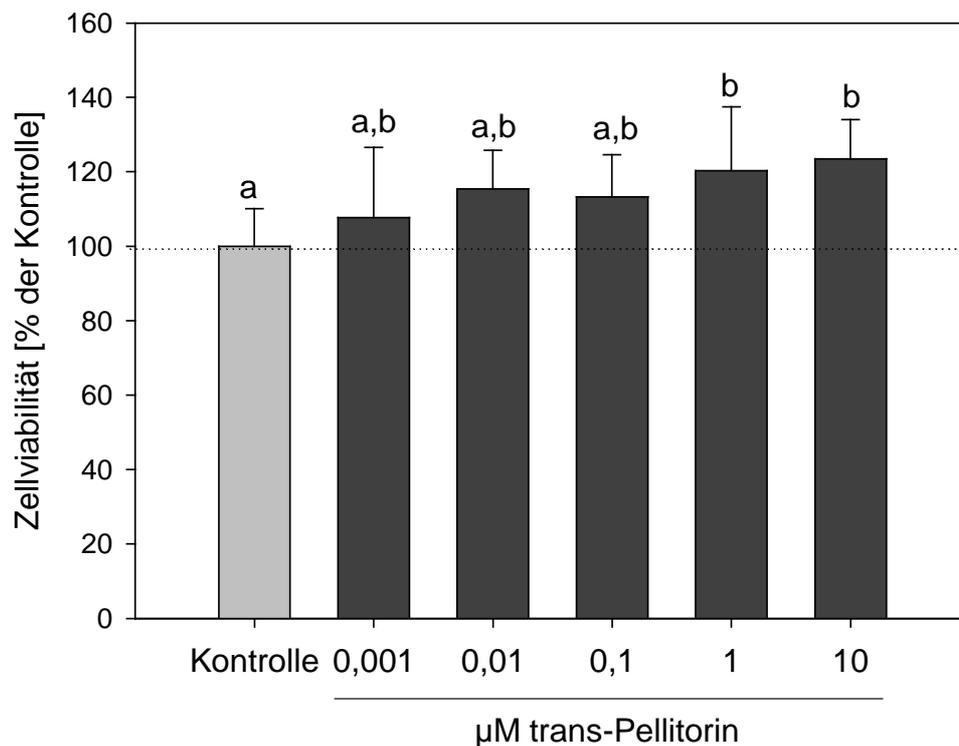


Abbildung 12: Zellproliferation nach Inkubation mit *trans*-Pellitorin

Zellproliferation nach 6 Stunden Inkubation mit *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM und 10 μM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. $n=3$, $tR=2-4$. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellem ANOVA ($p=0,002$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) getestet und mit den Buchstaben a und b gekennzeichnet.

Nach Inkubation mit 1 μM und 10 μM *trans*-Pellitorin war eine um $20 \pm 17 \%$ ($p < 0,001$) bzw. $23 \pm 10 \%$ ($p < 0,001$) erhöhte Zellaktivität, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, zu erkennen (Abbildung 12). Weiters unterschied sich die Zellaktivität nach Inkubation mit 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM *trans*-Pellitorin nicht von der unbehandelten Zellen.

Auch eine 24 Stunden Inkubation von HUVEC Zellen mit *trans*-Pellitorin bis zu einer Konzentration von 30 μM führte zu keiner Beeinträchtigung der Zellviabilität (Ku et al., 2013)

Abschließend ist zu erwähnen, dass *trans*-Pellitorin in allen Konzentrationen zu keiner verminderten metabolischen Zellaktivität respektive zu einer verminderten Zellzahl, verglichen zur unbehandelten Kontrolle, führte. Somit ist eine zytotoxische Wirkung von *trans*-Pellitorin in den getesteten Konzentrationen bei einer Inkubation von bis zu 6 Stunden in SH-SY5Y Zellen auszuschließen.

Auch eine zytotoxische Wirkung von Capsaicin in wild-typ SH-SY5Y Zellen wurde schon zuvor für den Konzentrationsbereich von 1 nM bis 10 μM ausgeschlossen (Lam et al., 2007).

3 Einfluss von *trans*-Pellitorin auf die Neurotransmitterfreisetzung und Kalziummobilisierung

Nachdem sich *trans*-Pellitorin als potentestes Alkamid der hier getesteten Alkamide herausgestellt hat, wurden die Ergebnisse von *trans*-Pellitorin bezüglich der Serotonin-, Dopaminfreisetzung und Kalziummobilisierung mit den entsprechenden Ergebnissen von Capsaicin verglichen.

3.1 Serotonin – Ausschüttung

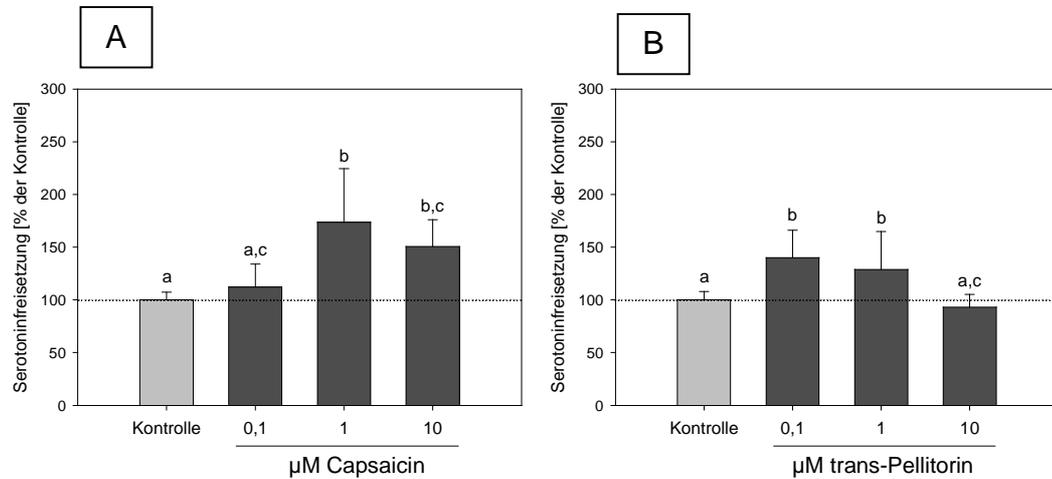


Abbildung 13: Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin (A) oder *trans*-Pellitorin (B) in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-6, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA (A,B: $p \leq 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Abbildung 13(A) zeigt nach 5-minütiger Inkubation mit 1 µM Capsaicin eine signifikante Erhöhung der Serotoninfreisetzung um $73 \% \pm 51$ ($p < 0,001$) und nach Inkubation mit 10 µM Capsaicin eine Steigerung um $50 \pm 26 \%$ ($p=0,003$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Weiters steigerte eine Inkubation mit 1 µM Capsaicin die Serotoninausschüttung um 61% verglichen mit 0,1 µM Capsaicin ($p < 0,001$).

Abbildung 13(B) zeigt nach Inkubation mit *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,1 µM und 1 µM eine erhöhte Serotoninausschüttung um $40 \pm 26 \%$ ($p < 0,001$) bzw. $29 \pm 36 \%$ ($p=0,007$) bezogen auf die Kontrolle.

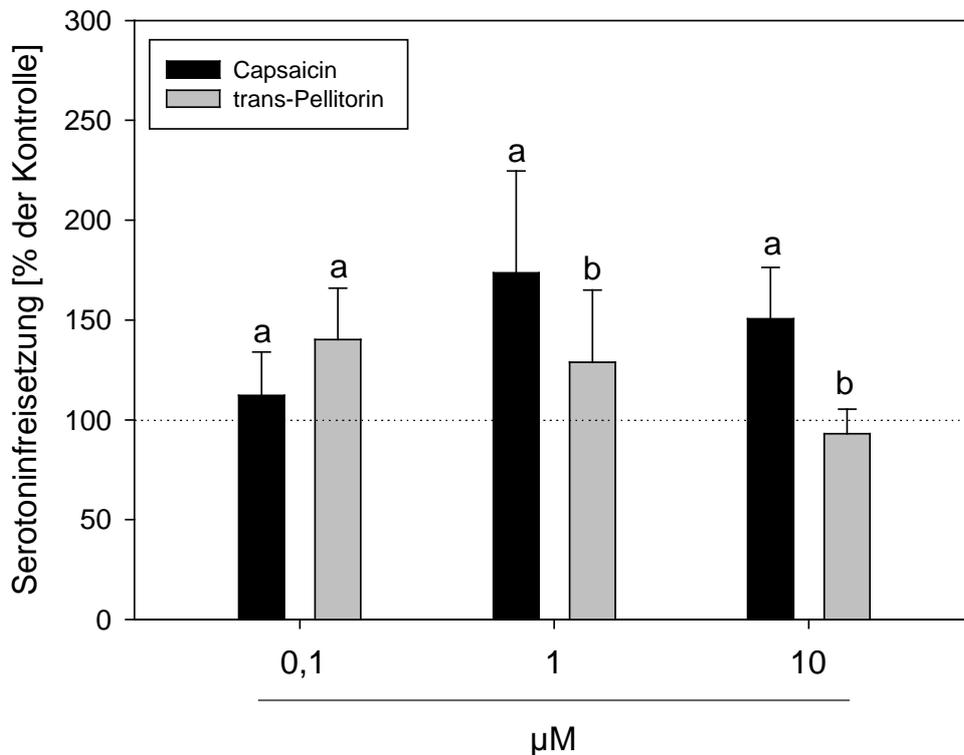


Abbildung 14: Serotoninausschüttung: Capsaicin vs *trans*-Pellitorin

Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (=100%) (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-6, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in den verschiedenen Konzentrationen wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p = 0,05$) getestet und mit den Buchstaben a und b gekennzeichnet.

In Abbildung 14 ist zu erkennen, dass Capsaicin in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM eine um 45 % ($p = 0,004$) bzw. 57 % ($p = 0,001$) höhere Serotoninausschüttung bewirkte als *trans*-Pellitorin in den jeweiligen Konzentrationen. Eine Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin bewirkte jedoch mit im Mittel 140 % eine ähnliche Serotoninfreisetzung wie mit 0,1 µM Capsaicin (112%).

3.2 Dopamin - Ausschüttung

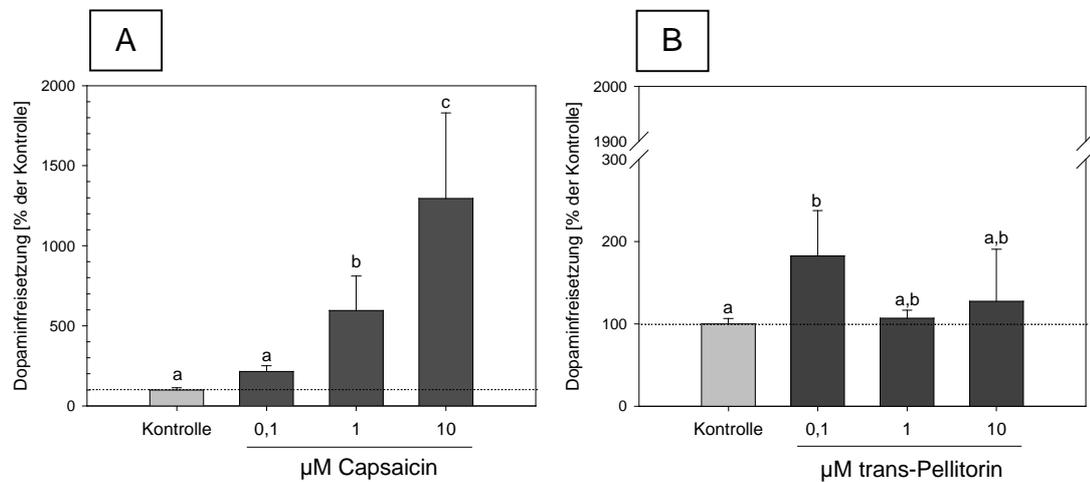


Abbildung 15: Dopaminausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder trans-Pellitorin

Dopaminausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin (A) oder *trans*-Pellitorin (B) in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-10, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA (A: $p \leq 0,001$; B: $p = 0,032$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p = 0,05$) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

Nach Inkubation mit 1 µM Capsaicin ist in Abbildung 15(A) eine um 494 ± 216 % ($p < 0,001$) erhöhte Dopaminausschüttung verglichen zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen und eine Inkubation mit 10 µM Capsaicin führte zu einer Erhöhung um 1196 ± 535 % ($p < 0,001$). Außerdem steigerte 1 µM Capsaicin die Dopaminfreisetzung um 374 % im Vergleich zu 0,1 µM Capsaicin ($p = 0,002$). Verglichen mit 0,1 µM und 1 µM führte eine Stimulierung mit 10 µM Capsaicin zu einer Erhöhung um 1075 % ($p < 0,001$) bzw. 701 % ($p < 0,001$).

Aus Abbildung 15(B) geht hervor, dass eine 3-minütige Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin zu einer signifikanten Erhöhung der Dopaminausschüttung um 83 ± 55 % ($p = 0,008$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle führte, die sich nicht von der Dopaminausschüttung nach Behandlung mit 1 µM oder 10 µM *trans*-Pellitorin unterschied.

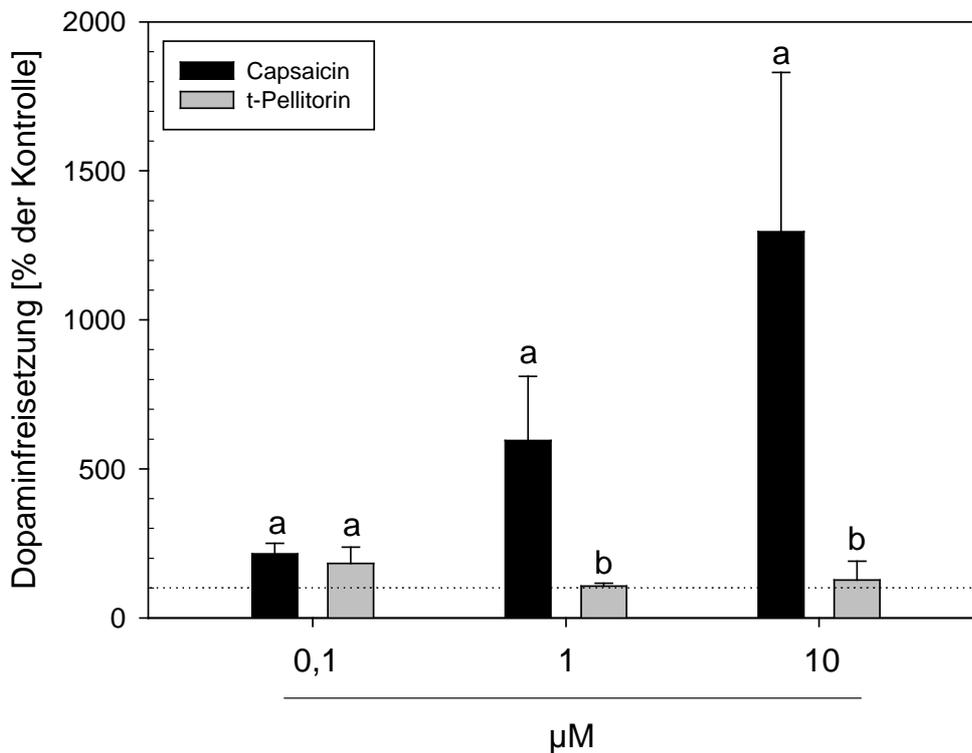


Abbildung 16: Dopaminausschüttung: Capsaicin vs *trans*-Pellitorin

Dopaminausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (=100%) (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-8, tR=1-2. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in den verschiedenen Konzentrationen wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA ($p \leq 0,001$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test ($p=0,05$) getestet und mit den Buchstaben a und b gekennzeichnet.

Im direkten Vergleich bezüglich der Effekte von Capsaicin und *trans*-Pellitorin auf die Dopaminfreisetzung zeigt Abbildung 16, dass Capsaicin in den Konzentrationen 1 µM und 10 µM die Freisetzung dieses Neurotransmitters um 487 % ($p < 0,001$) bzw. um 1169 % ($p < 0,001$) mehr erhöhte als *trans*-Pellitorin in den entsprechenden Konzentrationen. In der Konzentration von 0,1 µM zeigte *trans*-Pellitorin mit einer Dopaminausschüttung von im Mittel 183 %, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, jedoch vergleichbare Effekte auf die Neurotransmitterfreisetzung wie Capsaicin.

3.3 Intrazelluläre Kalziummobilisierung

Neurotransmitterausschüttung wird durch intrazellulären Kalziumeinstrom vermittelt (Schneppenburger und Neher, 2000). Aus diesem Grund wurde die intrazelluläre Kalziummobilisierung von Capsaicin und *trans*-Pellitorin gemessen, um zu untersuchen, ob deren Signalwege kalziumvermittelt sind.

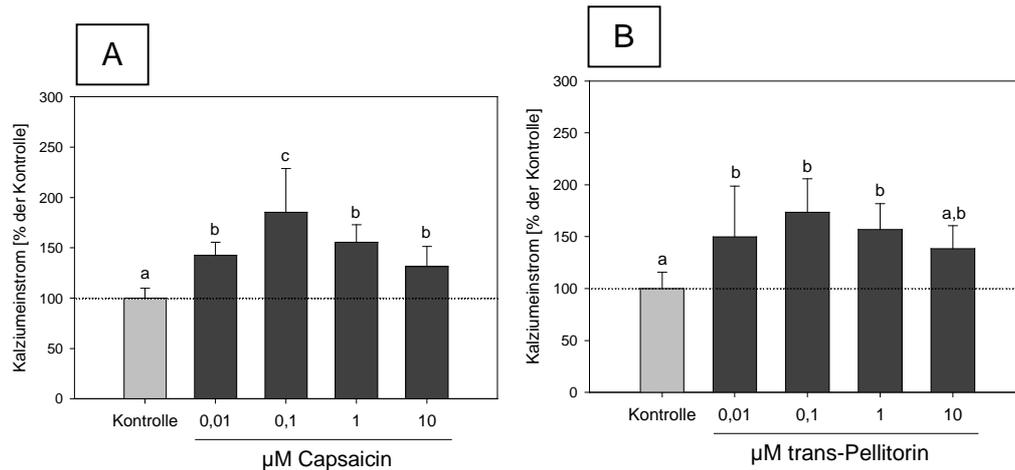


Abbildung 17: Kalziummobilisierung nach Inkubation mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin

Intrazelluläre Kalziummobilisierung nach Stimulierung mit Capsaicin (A) oder *trans*-Pellitorin (B) in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind als mittlere Fläche unter der Kurve in Prozent zur Kontrolle (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-5, tR=1-3. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und zur Kontrolle wurden mit einer einfaktoriellen ANOVA (A: p<0,001; B: p=0,002) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test (p=0,05) getestet und mit den Buchstaben a, b und c gekennzeichnet.

In den Konzentration 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM bewirkte Capsaicin eine Steigerung der intrazellulären Kalziummobilisierung um 42 ± 13 % (p<0,001), 85 ± 43 % (p<0,001), 55 ± 17 % (p<0,001) bzw. 31 ± 20 % (p=0,002) im Vergleich zur Kontrolle, wobei sich der Effekt von 0,1 µM Capsaicin zusätzlich signifikant von den Konzentrationen 0,01 µM (p<0,001), 1 µM (p=0,005) und 10 µM (p<0,001) Capsaicin unterschied (Abbildung 17(A)). In Abbildung 17(B) ist zu erkennen, dass *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM und 1 µM die intrazellulären Kalziummobilisierung signifikant um 50 ± 49 % (p=0,004), 74 ± 32 % (p<0,001) bzw. 57 ± 25 % (p=0,002) bezogen auf die unbehandelte Kontrolle erhöhte.

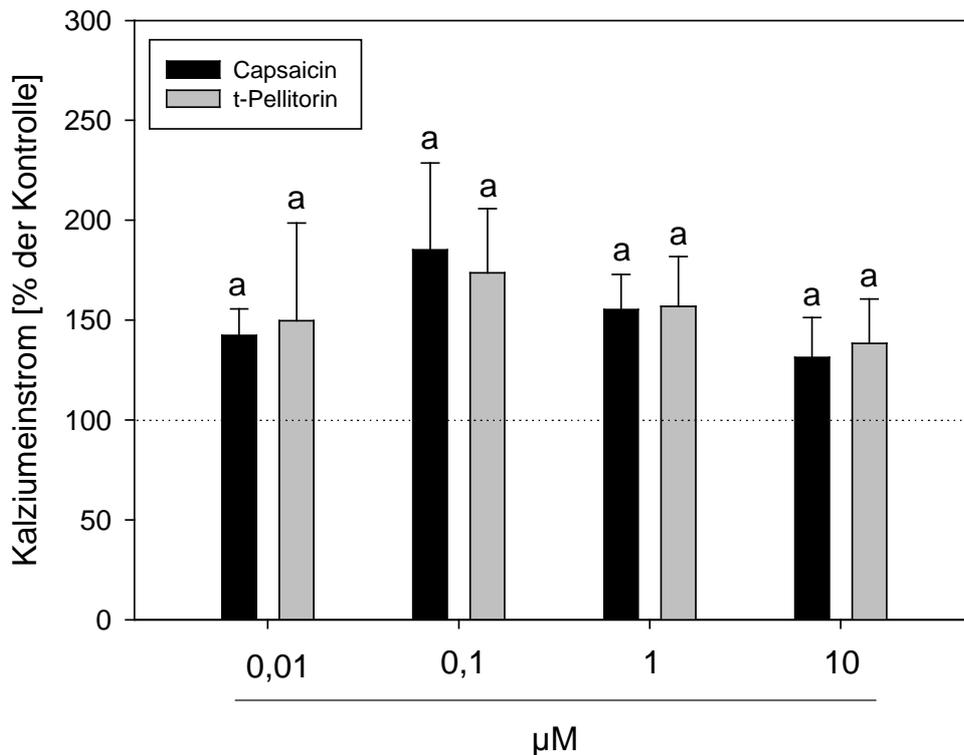


Abbildung 18: Kalziummobilisierung: Capsaicin vs *trans*-Pellitorin

Intrazelluläre Kalziummobilisierung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind als mittlere Fläche unter der Kurve in Prozent zur Kontrolle (=100%) (Puffer mit 0,1 % Ethanol) mit Standardabweichung dargestellt. n=3-5, tR=1-3. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen in den verschiedenen Konzentrationen wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA (p=0,951) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test (p=0,05) getestet und mit dem Buchstaben a gekennzeichnet.

Im direkten Vergleich bezüglich der Effekte von Capsaicin und *trans*-Pellitorin auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung (Abbildung 18) ist ersichtlich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Substanzen in den getesteten Konzentrationen vorhanden sind. Capsaicin und *trans*-Pellitorin zeigten in der Konzentration von 0,1 µM den stärksten Effekt auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung mit im Mittel + 85 % bzw. + 74 %.

4 Einfluss von *trans*-Pellitorin auf die Regulation ausgewählter Serotonin- und Dopaminrezeptoren und möglicher Bindungsrezeptoren

Ein Vergleich der Effekte von *trans*-Pellitorin auf die Serotoninausschüttung und Dopaminfreisetzung mit denen von Capsaicin in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM zeigte, dass *trans*-Pellitorin in der Konzentration von 0,1 µM eine vergleichbare Erhöhung der Neurotransmitterausschüttung wie Capsaicin bewirkte. Zudem war der stimulierende Effekt von *trans*-Pellitorin in dieser Konzentration signifikant höher verglichen zur Kontrolle. In folgenden Versuchen wurde deshalb *trans*-Pellitorin in der Konzentration von 0,1 µM eingesetzt, um Auswirkungen auf die Regulation ausgewählter Neurotransmitterrezeptoren und möglicher Bindungsrezeptoren zu untersuchen.

4.1 Serotonin-Rezeptoren: 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5HT_{1B}

Die Wirkung von *trans*-Pellitorin auf die Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B} wurde untersucht, da eine Aktivierung dieser Rezeptorsubtypen unter anderem mit Änderungen der Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Fox et al., 2010; Ebenezer und Surujbally, 2007; Lee et al., 2002).

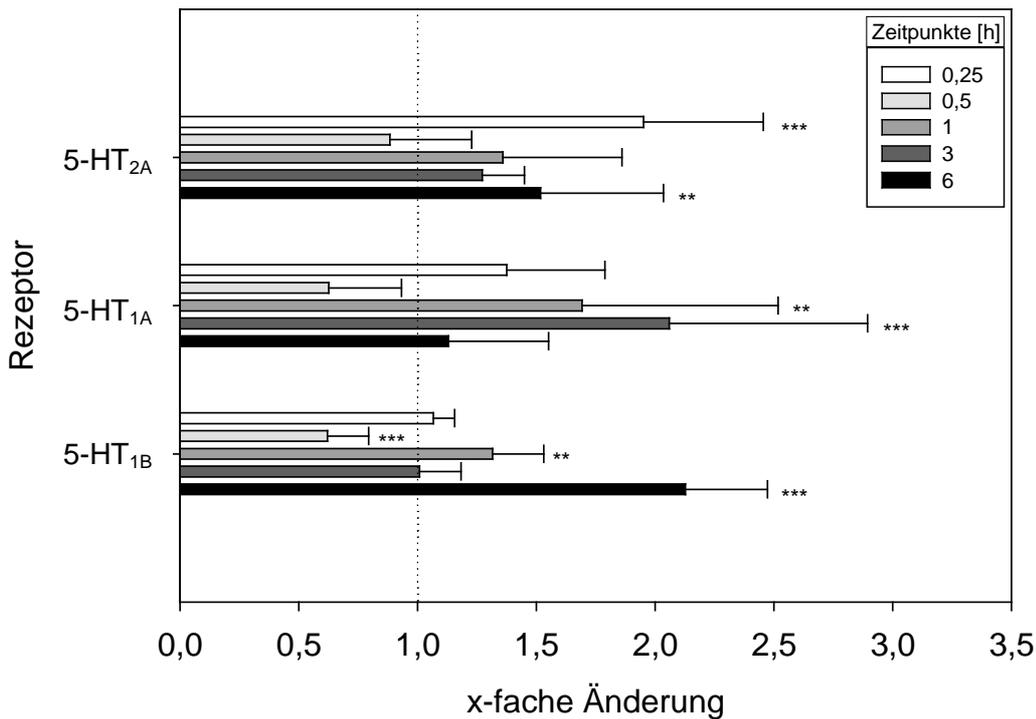


Abbildung 19: Regulation der Serotoninrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin

Genexpression der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B} nach Inkubation mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind als mittlere x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle (=1) mit Standardabweichung dargestellt. n=3, tR=1-3. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationszeitpunkten und der Kontrolle wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA (5-HT_{2A}: p=0,003; 5-HT_{1A}: p=0,002; 5-HT_{1B}: p<0,001) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test getestet (p=0,05) (***: p≤0,001, **: p<0,05, *: p<0,01).

Aus Abbildung 19 ist ersichtlich, wie sich die Genregulation der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} und 5-HT_{1B}, nach Inkubation mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin nach unterschiedlichen Messungszeiten, änderte.

Nach 15 Minuten Inkubation mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin kam es zu einer Hinaufregulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors um das 2 ± 0,5-Fache (p<0,001) verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Auch nach sechs Stunden Inkubation war eine Hinaufregulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors um das 1,5 ± 0,5-Fache (p=0,006) zu erkennen.

Nach einer Stunde und drei Stunden kam es beim 5-HT_{1A}-Rezeptor zu einer Hinaufregulation um das 1,7 ± 0,8-Fache (p=0,007) bzw. 2,1 ± 0,8-Fache (p<0,001).

Der 5-HT_{1B}-Rezeptor wurde einerseits nach 30 Minuten Inkubation um das $0,6 \pm 0,2$ -Fache ($p < 0,001$) hinunterreguliert, nach einer Stunde und sechs Stunden Inkubation andererseits um das $1,3 \pm 0,2$ -Fache ($p = 0,002$) bzw. $2,1 \pm 0,3$ -Fache ($p < 0,001$) signifikant hinaufreguliert.

4.2 Dopamin-Rezeptoren: D₁, D₂

Der Effekt von *trans*-Pellitorin auf die Regulation der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ wurde untersucht, da diese Subtypen mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert sind (Terry et al., 1996).

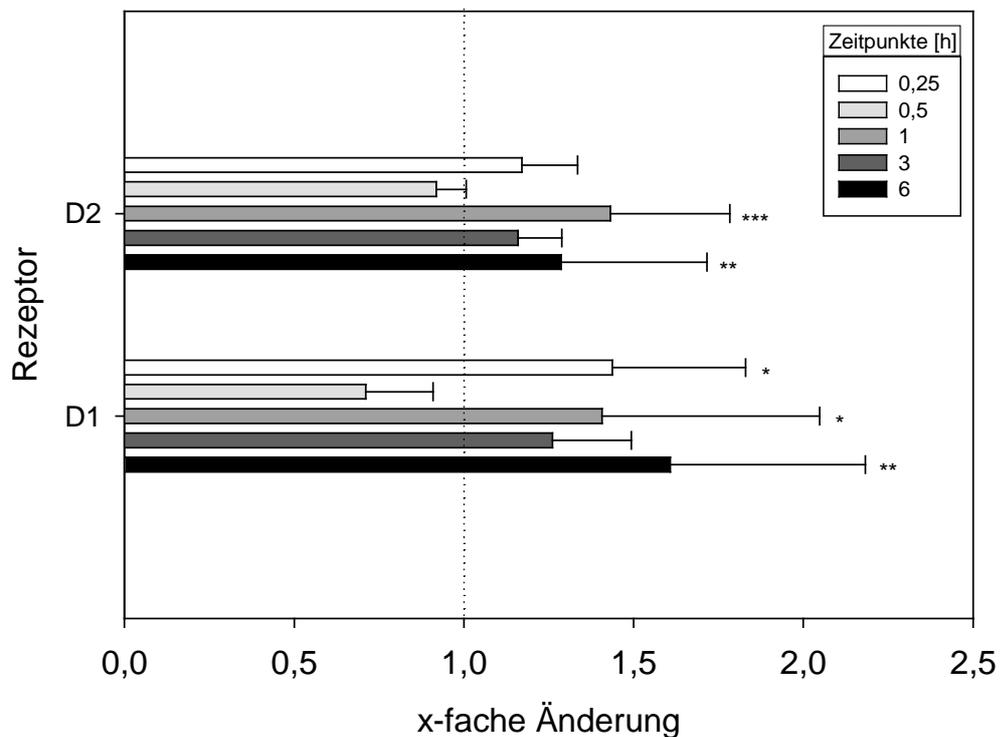


Abbildung 20: Regulation der Dopaminrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin

Änderungen der Regulation der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ nach Inkubation mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind als mittlere x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle (=1) mit Standardabweichung dargestellt. $n=3$, $tR=2-3$. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationszeitpunkten und der Kontrolle wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA (D_2 : $p=0,027$; D_1 : $p=0,016$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test getestet ($p=0,05$) (***: $p \leq 0,001$, **: $p < 0,05$; *: $p < 0,01$).

Abbildung 20 zeigt den Einfluss von 0,1 μ M *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten auf die Regulation der Genexpression der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂.

Es ist zu erkennen, dass der D₂-Rezeptor zu den Inkubationszeitpunkten einer Stunde und sechs Stunden signifikant um das $1,4 \pm 0,4$ -Fache ($p < 0,001$) bzw. das $1,3 \pm 0,4$ -Fache ($p = 0,008$) verglichen zur unbehandelten Kontrolle hinaufreguliert wurde.

Der D₁-Rezeptor wurde nach 15 Minuten und einer Stunde jeweils um das $1,4 \pm 0,4$ -Fache ($p = 0,021$) bzw. $1,4 \pm 0,6$ -Fache ($p = 0,031$) und nach sechs Stunden um das $1,6 \pm 0,6$ -Fache ($p = 0,003$) hinaufreguliert.

4.3 Mögliche Bindungsrezeptoren von *trans*-Pellitorin: TRPV1, TRPA1, CNR1

Capsaicin vermittelt die neurotransmitterstimulierende Wirkung über Bindung an den TRPV1-Rezeptor, ein nicht-selektiver Kationenkanal (Marinelli et al., 2005). Auch eine Aktivierung des TRPA1-Rezeptors durch Komponenten von *Piper nigrum* führte zu erhöhtem Kalziumeinstrom (Okumura et al., 2010) und die Aktivierung des Cannabinoidrezeptors 1 (CNR1) ist mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert (Ravinet-Trillou et al., 2003).

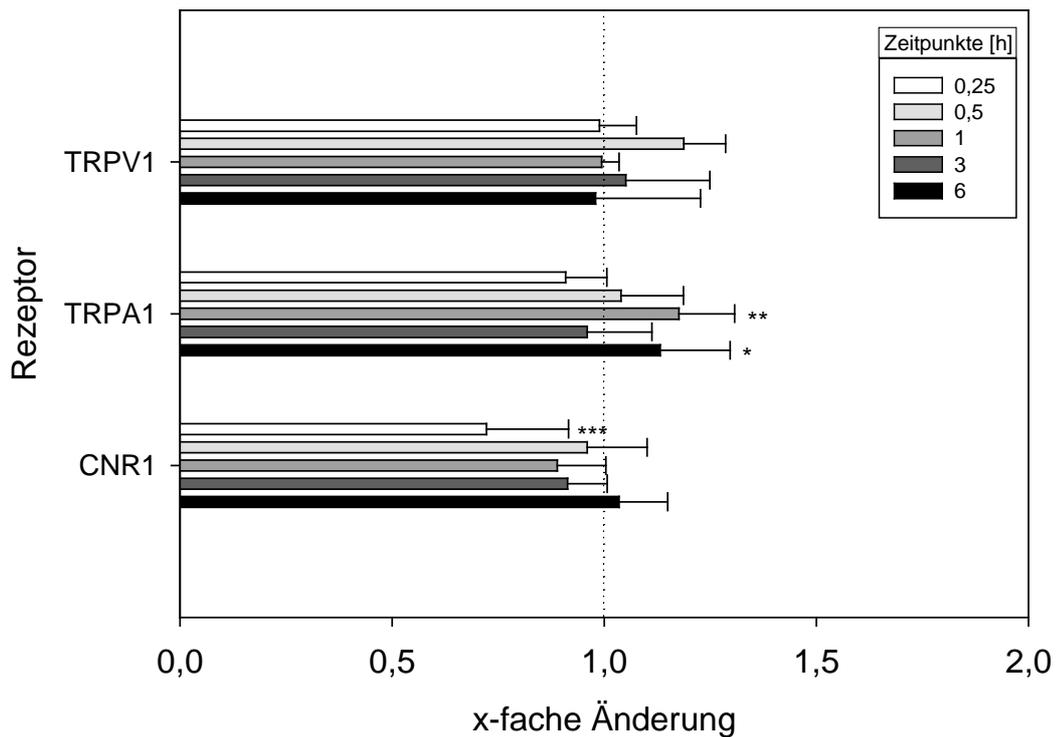


Abbildung 21: Regulation möglicher Bindungsrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin

Änderungen der Regulation möglicher Bindungsrezeptoren (TRPV1, TRPA1, CNR1) nach Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten in SH-SY5Y Zellen. Die Ergebnisse sind als mittlere x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle (=1) mit Standardabweichung dargestellt. $n=3$, $tR=2-3$. Signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationszeitpunkten und der Kontrolle wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA (TRPV1: $p=0,168$; TRPA1: $p=0,009$; CNR1: $p=0,006$) mit anschließendem Holm-Sidak post hoc-Test getestet ($p=0,05$) (***: $p\leq 0,001$, **: $p<0,05$, *: $p<0,01$).

In Abbildung 21 ist die Genregulation möglicher Bindungsrezeptoren nach Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt.

Zu allen fünf Inkubationszeitpunkten hatte 0,1 μM *trans*-Pellitorin keinen signifikanten Einfluss auf eine Änderung der Regulation des TRPV1-Rezeptors. Eine Hinaufregulation war beim TRPA1-Rezeptor nach einer Stunde und sechs Stunden Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin um das $1,2 \pm 0,1$ -Fache ($p=0,004$) bzw. $1,1 \pm 0,2$ -Fache ($p=0,027$) zu erkennen.

Der CNR1-Rezeptor wurde nach 15 Minuten Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin um das $0,7 \pm 0,2$ -Fache ($p<0,001$) hinunterreguliert.

E Diskussion

Capsaicin, der mengenmäßig bedeutenste Scharfstoff des *Capsicum annum L.* (Chili) (Barceloux, 2009), führt zu einer Stimulierung der Neurotransmitterfreisetzung im Gehirn. Capsaicin hatte nach peripherer Injektion bei Ratten eine dreifache Erhöhung des Neurotransmitters Serotonin im Gehirn (rostrale ventromediale Medulla) zur Folge (Smith et al., 2006). Des Weiteren konnte eine Steigerung der Dopaminfreisetzung (+60 %) im Nucleus accumbens bei Ratten nach Mikroinjektion von 50 μM Capsaicin in die Area tegmentalis ventralis beobachtet werden und die Impulsfrequenz dopaminerger Neuronen wurde *in vitro* am stärksten durch Stimulierung mit 10 μM Capsaicin gesteigert (Marinelli et al., 2005). Dieser stimulierende Effekt von Capsaicin auf die Ausschüttung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin konnte in dieser Arbeit *in vitro* in SH-SY5Y Zellen bestätigt werden:

Die Stimulierung mit 1 μM Capsaicin bewirkte die größte Steigerung der Serotoninausschüttung um 73 ± 51 % verglichen zur Kontrolle, aber auch eine Stimulierung mit 10 μM Capsaicin bewirkte eine Erhöhung der Serotoninausschüttung um 50 ± 26 %. Der sättigungsfördernde Effekt von Capsaicin und die damit einhergehende Verminderung der Nahrungsaufnahme (Westerterp-Plantenga et al., 2005) könnte, vermittelt durch Serotonin (Smith et al., 2006), auf eine Änderung appetitfördernder und appetitreduzierender Neuropeptide im Hypothalamus zurückzuführen sein.

So führte einerseits eine intraperitoneale Gabe von Capsaicin bei Ratten zu einer verminderten Expression appetitanregender NPY Neuronen im Nucleus arcuatus und Nucleus paraventricularis und andererseits zu einer erhöhten Expression appetitreduzierender CCK Neuronen im Nucleus paraventricularis (Lee et al., 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Serotoninkonzentration durch Fenfluramin zu einer Verringerung der Konzentration von NPY in Arealen des Hypothalamus und folglich zur verminderten Nahrungsaufnahme bei Ratten führte (Rogers et al., 1991). Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen Serotonin und CCK gesehen werden, da eine Applikation des CCK-A Rezeptor Antagonisten Devazepid die Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Ratten, ausgelöst durch Fenfluramin,

eine Substanz die die Serotoninkonzentration im synptischen Spalt erhöht, verminderte (Cooper et al., 1992).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening mit verschiedenen Alkamiden in einem Konzentrationsbereich von 0,001 μM bis 10 μM in SH-SY5Y Zellen durchgeführt, um ihr Potential auf die Ausschüttung des sättigungsregulierenden Neurotransmitters Serotonin zu untersuchen. Den größten Effekt auf die Serotoninausschüttung mit mit einer Steigerung von bis zu $+56 \pm 22 \%$ zur unbehandelten Kontrolle erzielte *trans*-Pellitorin (2E,4E-Decadiensäure-N-isobutylamid), welches ein natürlich vorkommendes Alkamid ist, und unter anderem in den Früchten von *Piper chaba* (Zhang et al., 2008), *Piper sarmentosum* (Hussain et al., 2011) und *Piper nigrum* (schwarzer Pfeffer) vorkommt (Rho et al., 2007).

Eine Validierung der Versuche bestätigte die fördernde Wirkung von *trans*-Pellitorin auf die Serotoninfreisetzung in SH-SY5Y Zellen. Die Exposition der SH-SY5Y Zellen mit *trans*-Pellitorin in der Konzentration von 0,1 μM führte zur stärksten Erhöhung der Serotoninfreisetzung um mehr als $40 \pm 26 \%$ verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Der Neurotransmitter Serotonin ist mit der Regulation der Nahrungsaufnahme assoziiert. So führte Serotoninmangel bei Ratten zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (Breisch et al., 1976). Zudem führte eine Erhöhung der Serotoninkonzentration durch D-Fenfluramin bei adipösen Personen zu einer deutlichen Gewichtsabnahme, infolge einer verringerten Nahrungsaufnahme (Drent et al., 1995). Somit könnte *trans*-Pellitorin, ähnlich wie Capsaicin, eine sättigungsfördernde Wirkung durch Erhöhung der Serotoninfreisetzung bewirken. Ebenso wie ein Serotoninmangel hat auch ein Dopaminmangel bei adipösen Ratten eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zur Folge (Cordeira et al., 2010) und eine direkte Infusion von Dopamin in den lateralen Hypothalamus von Ratten führte zu einer deutlichen Reduktion der Nahrungsaufnahme (Yang et al., 1997). Capsaicin bewirkte bezüglich der Dopaminausschüttung eine dosisabhängige Steigerung mit einer Erhöhung um $1196 \pm 535 \%$ bei einer Konzentration von 10 μM verglichen zur unbehandelten Kontrolle. *Trans*-Pellitorin wurde ebenso auf die Freisetzung des Neurotransmitters Dopamin in SH-SY5Y Zellen untersucht, dessen Stimulierung mit einer verminderten Nahrungsaufnahme assoziiert ist

(Kuo, 2003). Eine maximale Stimulierung der SH-SY5Y Zellen im getesteten Konzentrationsbereich mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin führte zu einer Steigerung der Dopaminfreisetzung um 83 ± 55 % verglichen zur Kontrolle.

Des Weiteren wurden Effekte von Capsaicin und *trans*-Pellitorin auf die intrazelluläre Kalziummobilisierung gezeigt, die eine zentrale Rolle bei der Neurotransmitterausschüttung spielt. Kalzium löst eine Fusion synaptischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran und in weiterer Folge die Freisetzung von Neurotransmittern aus (Augustine, 2001; Schneggenburger und Neher, 2000). Capsaicin bewirkt eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Kalziumeinstrom über Aktivierung des TRPV1-Rezeptors, möglicherweise durch Phosphorylierung des nachgeschalteten Signalfaktors Ca^{2+} /Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II (Han et al., 2012). Ein zweiter Weg der Kalziumfreisetzung durch Capsaicin stellt die Stimulierung intrazellulärer Ryanodin-sensitiver Kalziumspeicher dar (Eun et al., 2001).

Eine Stimulierung mit 0,1 μM Capsaicin bewirkte die größte Erhöhung der Kalziummobilisierung mit $+85 \pm 43$ %, ebenso wie *trans*-Pellitorin mit $+74 \pm 32$ % verglichen zu den unbehandelten Kontrollen. Dieses Ergebnis stimmt mit denen einer anderen *in vitro* Studie überein, bei der die Behandlung von Capsaicin und Nonivamid, ein Capsaicin Analog, ebenfalls zu einer erhöhten Kalziummobilisierung in SH-SY5Y Zellen führte (Rohm et al., 2013). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass *trans*-Pellitorin neben einer Steigerung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Aktivierung nicht-selektiver Kationenkanäle, auch eine Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Ryanodin-sensitiven Kalziumspeichern bewirkt (Eun et al., 2001).

Die Hauptintention dieser Arbeit war, eine Substanz zu finden, die auf ähnliche Weise wie Capsaicin die Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin stimuliert, und jedoch nicht so scharf schmeckt. Die Ergebnisse bezüglich der Serotonin- und Dopaminausschüttung und der intrazellulären Kalziummobilisierung von Capsaicin und *trans*-Pellitorin wurden miteinander verglichen. Dieser Vergleich ergab, dass Capsaicin in den Konzentrationen 1 μM und 10 μM ein stärkeres Stimulans in Bezug auf Serotoninfreisetzung (173 ± 51 % bzw. 150 ± 26 %) und Dopaminfreisetzung (594 ± 216 % bzw.

1296 ± 535 %) verglichen mit *trans*-Pellitorin ist. Jedoch erzielte *trans*-Pellitorin in der Konzentration 0,1 µM hinsichtlich der Serotonin- und Dopaminausschüttung mit 140 ± 26 % bzw. 183 ± 55 % vergleichbare Effekte wie Capsaicin (112 ± 22 % bzw. 221 ± 35 %).

Aufgrund dessen wurde in der Konzentration von 0,1 µM der Effekt von *trans*-Pellitorin auf die Expression ausgewählter Rezeptorsubtypen von Serotonin (5HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}) und Dopamin (D₂, D₁) untersucht, die über neuronale Signalwege mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert sind.

Der 5-HT_{2C}-Rezeptor, der mit einer Reduktion der Nahrungsaufnahme bei Ratten assoziiert ist (Lam et al., 2008), wurde in den neuronalen SH-SY5Y Zellen nicht exprimiert und wurde deshalb in dieser Arbeit nicht auf eine mögliche Beeinflussung untersucht.

Ein Einfluss von 0,1 µM *trans*-Pellitorin auf die Genexpression des 5-HT_{2A}-Rezeptors konnte nach 15 Minuten und sechs Stunden nachgewiesen werden. Es kam zu einer Hinaufregulation um das 2 ± 0,5-Fache bzw. das 1,5 ± 0,5-Fache verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Eine intraperitoneale Injektion von TCB-2, ein 5-HT_{2A}-Rezeptor Agonist, zeigte, dass der 5-HT_{2A}-Rezeptor, unter anderem, mit einer verminderten Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Fox et al., 2010). Dieses Ergebnis konnte in einer weiteren Studie bekräftigt werden, bei der DOI (2,5-Dimethoxy-4-iodamphetamin), ein 5-HT_{2A/2C}-Rezeptor Agonist, zu einer Inhibierung des appetitanregenden Effekts von Neuropeptid Y (NPY) nach Injektion beider Substanzen in den Nucleus paraventricularis des Hypothalamus führte, was eine verringerte Nahrungsaufnahme bei Mäusen zur Folge hatte (Currie et al., 2002). Eine subkutane Applikation von Capsaicin bei Ratten führte zu einer erhöhten Expression des 5-HT_{2A}-Rezeptors in Teilen des Gehirns (Zavitsanou et al., 2010), was zu einer verminderten Expression appetitanregender NPY Neuronen führte und eine Reduktion der Nahrungsaufnahme zur Folge hatte (Lee et al., 2004; Currie et al., 2002). Des Weiteren konnte ein inhibierender Effekt von Serotonin und DOI auf das appetitanregende Peptid Ghrelin nachgewiesen werden, indem Serotonin bzw. der Agonist jeweils vor Ghrelin in den Nucleus paraventricularis injiziert wurden, was in beiden Fällen zu einer verminderten Nahrungsaufnahme bei Mäusen führte (Currie et al., 2010).

Ebenso steht auch der 5-HT_{1A}-Rezeptor mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme in Zusammenhang. In einer Konzentration von 0,1 µM bewirkte *trans*-Pellitorin nach einer Stunde und drei Stunden Inkubation einen hinaufregulierenden Effekt um das $1,7 \pm 0,8$ -Fache bzw. $2 \pm 0,8$ -Fache auf die Genexpression.

Einerseits war bei Mäusen nach subkutaner Gabe von 8-OH-DPAT, einem 5-HT_{1A}-Rezeptor Agonisten, eine dosisabhängige Steigerung der Nahrungsaufnahme zu erkennen. Durch gleichzeitige Gabe des Agonisten und WAY 100635, einem 5-HT_{1A}-Rezeptor Antagonisten, war eine Blockierung des hyperphagen Effekts zu erkennen (Ebenezer und Surujbally, 2007). Andererseits führte Serotonin über den 5-HT_{1A}-Rezeptor zu einer Hyperpolarisierung von murinen Orexin Neuronen (Muraki et al., 2004), was einen inhibierenden Effekt auf des appetitfördernde Neuropeptid Orexin im lateralen Hypothalamus zur Folge haben könnte (Sakurai et al., 1998).

Schließlich konnte ein Effekt in der vorliegenden Arbeit von 0,1 µM *trans*-Pellitorin auf die Regulation der Genexpression des 5-HT_{1B}-Rezeptors gezeigt werden. Nach 30 Minuten Inkubation wurde der Rezeptor um das $0,6 \pm 0,2$ -Fache hinunterreguliert und nach einer Stunde und sechs Stunden Inkubation um das $1,3 \pm 0,2$ -Fache bzw. $2,1 \pm 0,3$ -Fache hinaufreguliert.

Eine Stimulierung des 5-HT_{1B}-Rezeptor mit dem Agonisten CP-94,253 führte zu einer deutlichen Verminderung der Nahrungsaufnahme bei Ratten, ohne das natürliche Fressverhalten zu stören (Lee et al., 2002). Diese appetitzügelnde Wirkung, vermittelt durch Aktivierung des 5-HT_{1B}-Rezeptors, wurde ebenfalls bei Mäusen nach intraperitonealer Applikation von D-Fenfluramin bekräftigt. Der Mechanismus über den D-Fenfluramin via des 5-HT_{1B}-Rezeptors die hypophage Wirkung vermittelt, könnte das Melanocortinsystem sein, denn D-Fenfluramin und der 5-HT_{1B}-Rezeptor Agonist CP-94,253 verloren ihre Wirkung bei Melanocortinrezeptor 4 (MC4) knockout Mäusen. Des Weiteren konnte ein inhibierender Effekt des 5-HT_{1B}-Rezeptors auf AgRP-Neuronen im Nucleus arcuatus gezeigt werden, die den appetitanregenden MC4-Rezeptor Antagonisten AgRP produzieren (Heisler et al., 2006).

Trans-Pellitorin könnte somit durch Erhöhung der Serotoninausschüttung im Gehirn sättigungsfördernd wirken und zu einer Reduktion der

Nahrungsaufnahme führen, indem es möglicherweise über Aktivierung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A} und 5-HT_{1B} in Arealen des Hypothalamus zu einer Inhibierung appetitfördernder Neuropeptide, wie NPY und AgRP, führt.

Ebenfalls im Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme steht der Dopaminrezeptor D₂ (Terry et al., 1996), dessen Genexpression nach Stimulierung der SH-SY5Y-Zellen eine bzw. sechs Stunden mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin um das 1,4 ± 0,4-Fache bzw. das 1,3 ± 0,4-Fache verglichen zur Kontrolle hinaufreguliert wurde. Bei adipösen Ratten war im dorsalen Striatum der D₂-Rezeptor hinunterreguliert, verglichen mit normalen Ratten. Ein knockdown des D₂-Rezeptors im dorsalen Striatum führte zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme (Johnson und Kenny, 2010). Dies geht mit Ergebnissen einer Humanstudie einher, die die Verfügbarkeit des D₂-Rezeptors im dorsalen striatum, welches bei Belohnung und Motivation eine wichtige Rolle spielt, in Proportion zum BMI adipöser Probanden zeigte. Je höher der BMI der Probanden, desto geringer war die Verfügbarkeit des D₂-Rezeptors im dorsalen striatum (Wang et al., 2001). Ebenfalls eine geringere Verfügbarkeit an D₂-Rezeptoren im dorsalen striatum wurde bei Suchtverhalten, wie Alkohol- oder Nikotinabhängigkeit, festgestellt (Hietala et al., 1994; Fehr et al., 2008), was bedeuten könnte, dass Adipositas auf ein suchartiges Essverhalten, bedingt durch einen Mangel an D₂-Rezeptoren im dorsalen striatum, zurückzuführen wäre. Außerdem zeigten adipöse im Vergleich zu normalgewichtigen Personen mit einem genetischen Polymorphismus, der mit geringerer Verfügbarkeit des D₂-Rezeptors assoziiert ist, eine verminderte Aktivität des dorsalen striatum als Reaktion auf belohnende Reize, wie Bilder wohlschmeckender Speisen. Dies könnte die erhöhte Nahrungsaufnahme bei adipösen Personen als eine mögliche Kompensation der verminderten Belohnung, die normalerweise durch Essen ausgelöst wird, erklären (Stice et al., 2008).

Schließlich wurde eine Hinaufregulation der Expression des Dopaminrezeptors D₁, der wie der D₂-Rezeptor mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Terry et al., 1996), nach 15 Minuten, einer Stunde und sechs Stunden Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin um das 1,4 ± 0,4-Fache, 1,4 ±

0,6-Fache bzw. $1,6 \pm 0,6$ -Fache gezeigt. Gewichtsreduktion und verminderte Nahrungs-aufnahme bei adipösen Ratten nach chronischer subkutaner Applikation von Tesofensin, einem dreifach Monoamin-Wiederaufnahme-Hemmer, wurden unter anderem durch Beteiligung des D₁-Rezeptors vermittelt (Axel et al., 2010).

Eine Beteiligung beider Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ an einer Reduktion der Nahrungsaufnahme wurde nach gleichzeitiger intraperitonealer Gabe eines D₁ und D₂ Agonisten (SKF + QNP) bei Ratten gezeigt, wobei deren gewichtsreduzierende und appetitzügelnde Wirkung nur in Kombination auftrat. Eine zusätzliche intracerebroventriculäre Injektion eines NPY antisenses konnte die Wirkung der Agonisten verstärken, was auf eine D₁-,D₂-Rezeptor und NPY vermittelte Verringerung der Nahrungsaufnahme schließen lässt (Kuo, 2003).

Neben dem Einfluss von *trans*-Pellitorin auf das serotonerge System und die damit verbundene Beeinflussung der Nahrungsaufnahme, könnte eine Stimulierung der Dopaminfreisetzung im zentralen Nervensystem durch *trans*-Pellitorin sowohl das Belohnungssystem via Aktivierung des Dopaminrezeptors D₂ als auch das Sättigungszentrum via Aktivierung beider Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ durch Inhibierung appetitanregender Neuropeptide beeinflussen, was mit einer Verringerung der Nahrungsaufnahme assoziiert ist.

Um erste Hinweise auf einen zugrundeliegenden Signalweg zu bekommen, wurde der Effekt von *trans*-Pellitorin auf die möglichen Bindungsrezeptoren TRPV1, TRPA1 und CNR1 untersucht. Durch Aktivierung der Rezeptoren TRPV1 und TRPA1 kommt es kalziumvermittelt zur Neurotransmitterfreisetzung (Marinelli et al., 2005; Okumura et al., 2010). Des Weiteren spielt eine Aktivierung des CNR1-Rezeptors durch das Endocannabinoid Anandamid, eine dem Capsaicin strukturell ähnliche Substanz, eine Rolle bei der Nahrungsaufnahme (Williams und Kirkham, 1999). Zusätzlich ist Anandamid ein Agonist des TRPV1-Rezeptors, dessen Affinität zum Rezeptor jedoch schwächer ist als von Capsaicin (Ross, 2003). Aus diesen Gründen wurde der Einfluss von 0,1 µM *trans*-Pellitorin auf die Genregulation dieser ausgewählten Rezeptoren *in vitro* in SH-SH5Y Zellen untersucht.

Capsaicin vermittelt dessen Wirkung über Bindung an den nicht-selektiven Kationenkanal TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) (O'Neill et al., 2012). Frühere *in vitro* Studien zeigten, dass eine Aktivierung des kalziumdurchlässigen TRPV1-Rezeptors durch Capsaicin zu erhöhtem Kalziumeinstrom führte, was eine Stimulierung der Neurotransmitterausschüttung zur Folge hatte (Lam et al., 2007, Marinelli et al., 2005). Dies wurde auch in einer neueren *in vitro* Studie in SH-SY5Y Zellen bestätigt, bei der durch Zugabe des selektiven TRPV1 Inhibitors Butylcyclohexanol der dopamin- und serotoninstimulierende Effekt von Capsaicin signifikant verringert werden konnte. Außerdem wurde nachgewiesen, dass Nonivamid, ein synthetisches Capsaicin Analog, kalziumabhängig zu einer vergleichbaren Steigerung der Serotonin- und Dopaminfreisetzung wie Capsaicin in SH-SY5Y führte (Rohm et al., 2013). Trotz struktureller Ähnlichkeit mit Capsaicin zeigte eine Inkubation mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin keinen Einfluss auf die Genregulation des TRPV1-Rezeptors, was einen TRPV1-Rezeptor vermittelten Signalweg unwahrscheinlich macht. Dies wäre durchaus möglich, da Nonivamid ebenfalls TRPV1-Rezeptor unabhängig die Serotonin- und Dopaminfreisetzung in SH-SY5Y Zellen stimulierte (Rohm et al., 2013).

Hingegen konnte ein hinaufregulierender Effekt von 0,1 μ M *trans*-Pellitorin nach einer und sechs Stunden Inkubation auf die Genexpression des TRPA1-Rezeptors um das $1,2 \pm 0,1$ -Fache bzw. $1,1 \pm 0,2$ -Fache festgestellt werden. Der kalziumdurchlässige Kationenkanal TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) ist in Haarzellen, Neuronen der Spinalganglien und trigeminalen Neuronen zu finden (Pedersen et al., 2005). Er wird unter anderem durch Allicin, scharf schmeckender Inhaltsstoff des Knoblauchs (Macpherson et al., 2005), Allylisothiocyanat, scharfer Inhaltsstoffe von Senfölen (Jordt et al., 2004) oder auch durch das nicht scharf schmeckende Capsaicin-Analog Capsiat aktiviert (Shintaku et al., 2012). Des Weiteren wurde auch ein erhöhter Kalziumeinstrom in TRPA1-Rezeptor exprimierenden HEK-Zellen durch N-Isobutyl-(2E,4E)-tetradeca-2,4,-diamid gezeigt, ein Inhaltsstoff des schwarzen Pfeffers, der *trans*-Pellitorin strukturell sehr ähnlich ist (Okumura et al., 2010). Diese Ergebnisse geben Aufschluss über mögliche Bindungseigenschaften von *trans*-Pellitorin, da diese Ergebnisse mit der hier

gezeigten Hinaufregulation der Genexpression des TRPA1-Rezeptors und der erhöhten Kalziummobilisierung durch *trans*-Pellitorin einhergehen.

Trans-Pellitorin zeigte weiters einen Effekt auf die Genregulation des Cannabinoidrezeptors 1 (CNR1). Nach 15 Minuten zeigte eine Stimulierung mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin eine Hinunterregulation der Genexpression des CNR1-Rezeptors um das $0,7 \pm 0,2$ -Fache. Der G-Protein-gekoppelte CNR1-Rezeptor wird hauptsächlich im Zentralen Nervensystem, wie Riechkolben, Hippocampus, Amygdala, Basalganglien, Nuclei des Thalamus und des Hirnstamms, Hypothalamus, aber auch im peripheren Gewebe, wie Fettgewebe, Leber, Skelettmuskel, Pankreas, exprimiert (Bermudez-Silva et al., 2010). Der CNR1-Rezeptor spielt eine wesentliche Rolle bei der Nahrungsaufnahme. Nach subkutaner Gabe des Endocannabinoids Anandamid und oraler Gabe des exogenen Cannabinoids Delta-9-tetrahydrocannabinol konnte bei Ratten eine gesteigerte Nahrungsaufnahme beobachtet werden, welche nach subkutaner Applikation des CNR1-Rezeptor Antagonisten SR141716 vermindert wurde (Williams und Kirkham, 1999; Williams und Kirkham, 2002). Die Involvierung des CNR1-Rezeptors bei der Nahrungsaufnahme konnte bekräftigt werden, da eine orale Gabe des CNR1-Rezeptor Antagonisten SR141716 bei CNR1-Rezeptor knockout Mäusen zu keiner Reduktion der Nahrungsaufnahme führte (Ravinet-Trillou et al., 2003). Die Hinunterregulation der Genexpression des CNR1-Rezeptors könnte eine mögliche antagonistische Rolle für *trans*-Pellitorin bedeuten und so einen Beitrag zur Reduktion der Nahrungsaufnahme leisten.

Hinsichtlich der Pharmakokinetik von *trans*-Pellitorin konnte eine Studie nach oraler Gabe von 500 mg/kg eines Extraktes ($m_{\text{Pellitorin}} = 52,10 \text{ mg/g}$, $c_{\text{Pellitorin}} = 23 \text{ mM}$) der Pflanze *Piper sarmentosum* im Plasma von Ratten nach acht Stunden eine maximale Konzentration von 34,8 ng/mL *trans*-Pellitorin (0,155 μM) zeigen. Außerdem wurde sechs Stunden nach Gabe des Extraktes Pellitorin in diversen Organen wie, Darm, Leber, Lunge, Nieren und Herz, nachgewiesen (Hussain et al., 2011).

Wird bei *trans*-Pellitorin, aufgrund struktureller Ähnlichkeit, angenommen, dass es wie Capsaicin die Blut-Hirn-Schranke passieren kann (Donnerer et al., 1990; Kang und Kim, 1999), dann könnte *trans*-Pellitorin nach oraler Aufnahme, resultierend in einer Endkonzentration von 0,1 μM im Blut, die Freisetzung der

Neurotransmitter Serotonin und Dopamin im Gehirn stimulieren. Um eine Endkonzentration von 0,1 μM *trans*-Pellitorin im Plasma zu erreichen müsste 16,7 mg *trans*-Pellitorin/kg KG aufgenommen werden, basierend auf den pharmakokinetischen Erkenntnissen bei Ratten, dass die Aufnahme einer Dosis von 26,05 mg Pellitorin/kg KG zu einer Plasmakonzentration von 0,155 μM führte (Hussain et al., 2011).

Schlussbetrachtung

Übergewicht und Adipositas sind prinzipiell die Folge einer Imbalance zwischen aufgenommener und verbrauchter Energie. Beide Erkrankungen stellen weltweit ein großes Problem dar. Sie gelten als Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ II und einige Krebserkrankungen. Eine Möglichkeit Übergewicht und Adipositas zu reduzieren stellt eine Reduktion der Energieaufnahme dar (WHO, 2013).

Die Hauptintention dieser Arbeit war, eine Substanz zu finden, die auf ähnliche Weise wie Capsaicin die Freisetzung der sättigungsregulierenden Neurotransmitter Serotonin und Dopamin stimuliert, ohne jedoch scharf zu schmecken, was den Einsatz von Capsaicin limitiert. Die stimulierende Wirkung von Capsaicin im Gehirn auf die Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin (Smith et al., 2006) und Dopamin (Marinelli et al., 2005), vermittelt durch intrazelluläre Kalziumeinstrom (Lam et al., 2007) konnte *in vitro* in SH-SY5Y Zellen bestätigt werden.

Eine Stimulierung mit 1 μM und 10 μM Capsaicin führte zu einer deutlichen Erhöhung der Serotoninausschüttung um 73 ± 51 % bzw. 50 ± 26 % verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Bezüglich der Dopaminausschüttung bewirkte Capsaicin eine dosisabhängige Steigerung um bis zu 1196 ± 525 % in einer Konzentration von 10 μM . In allen getesteten Konzentrationen (0,1 μM , 1 μM , 10 μM) führte Capsaicin zu einer erhöhten Kalziummobilisierung verglichen zur Kontrolle.

Ein Mangel der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin führte zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme (Breisch et al., 1976; Cordeira et al., 2010), während eine Stimulierung dieser Neurotransmitter eine Reduktion der Nahrungsaufnahme mit einhergehender Gewichtsabnahme zur Folge hatte (Drent et al., 1995; Yang et al., 1997).

Capsaicin zeigte appetitreduzierende Effekte, die mit einer verminderten Energieaufnahme einhergingen (Yoshioka et al., 1999; Westerterp-Plantenga et al., 2005). Diese sättigungsfördernde Wirkung von Capsaicin ist mit einer Beeinflussung appetitfördernder und appetitreduzierender Neuropeptide im

Hypothalamus assoziiert (Lee et al., 2004). Eine Erhöhung der Expression des 5-HT_{2A}-Rezeptors und des D₁-Rezeptors im Gehirn nach Capsaicin-Applikation (Zavitsanou et al., 2010), deren Aktivierung zu einer Reduzierung der Nahrungsaufnahme führt (Fox et al., 2010; Kuo, 2003), konnte dies bekräftigen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte ein Screening von verschiedenen Alkamiden bezüglich Serotoninfreisetzung in SH-SY5Y Zellen, dass *trans*-Pellitorin den größten Effekt aufweisen konnte. Ein Vergleich von *trans*-Pellitorin mit Capsaicin hinsichtlich der Serotonin- und Dopaminausschüttung in SH-SY5Y Zellen ergab, dass Capsaicin generell ein stärkeres Stimulans bezüglich der Neurotransmitterausschüttung darstellt. In der Konzentration von 0,1 µM jedoch konnte *trans*-Pellitorin bei der Serotoninfreisetzung (140 ± 26 %) und Dopaminfreisetzung (183 ± 55 %) vergleichbare Effekte wie Capsaicin (112 ± 22 % bzw. 221 ± 35 %) erzielen.

Aufgrund dessen wurde in dieser Konzentration der Effekt von *trans*-Pellitorin auf die Expression ausgewählter Rezeptorsubtypen von Serotonin und Dopamin, die über neuronale Signalwege mit einer Beeinflussung der Nahrungsaufnahme assoziiert sind, in SH-SY5Y Zellen untersucht. *Trans*-Pellitorin konnte in der Konzentration von 0,1 µM eine Beeinflussung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} und der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ zeigen.

Eine Aktivierung dieser Rezeptoren ist mit einer verminderten Nahrungsaufnahme assoziiert (Fox et al., 2010; Ebenezer und Surujbally, 2007; Lee et al., 2002; Terry et al., 1996), die via Reduktion appetitanregender Neuropeptide wie NPY, Orexin, AgRP oder Ghrelin vermittelt wird (Currie et al., 2002; Currie et al., 2010; Muraki et al., 2004). Somit könnte *trans*-Pellitorin die homöostatische Regelung der Nahrungsaufnahme beeinflussen. Außerdem könnte *trans*-Pellitorin durch eine Aktivierung des D₂-Rezeptors in das Belohnungssystem eingreifen, da eine geringere Verfügbarkeit des D₂-Rezeptors mit Suchtverhalten (Hietala et al., 1994; Fehr et al., 2008) und überhöhter Nahrungsaufnahme bei adipösen Personen assoziiert ist (Stice et al., 2008).

Trans-Pellitorin könnte dessen Wirkung über Bindung an den TRPA1-Rezeptor vermitteln, im Gegensatz zu Capsaicin, das über Bindung an den TRPV1-Rezeptor zu einer Erhöhung der Neurotransmitterausschüttung führt (Marinelli et al., 2005). Vergleichbar mit Nonivamid, einem strukturellen Analog von Capsaicin, das ebenso über einen TRPV1-Rezeptor unabhängigen Signalweg zu einer Steigerung der Serotonin- und Dopaminfreisetzung in SH-SY5Y Zellen führte (Rohm et al., 2013). Zusätzlich könnte *trans*-Pellitorin als möglicher CNR1-Rezeptor Antagonist zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme beitragen (Ravinet-Trillou et al., 2003).

Zusammenfassend stimulierte das, unter anderem, im schwarzen Pfeffer natürlich vorkommende, nicht scharf schmeckende Alkamid *trans*-Pellitorin (Obst et al., 2013; Rho et al., 2007) möglicherweise TRPA1-Rezeptor vermittelt und kalziumabhängig die Serotonin- und Dopaminfreisetzung in SH-SY5Y Zellen und erzielte in der Konzentration von 0,1 μ M vergleichbare Effekte wie Capsaicin. Ähnliche appetitreduzierende Effekte wie Capsaicin (Westerterp-Plantenga et al., 2005) könnte *trans*-Pellitorin durch Aktivierung der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} und der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂ bewirken, deren Aktivierung mit einer verminderten Nahrungsaufnahme assoziiert ist (Fox et al., 2010; Ebenezer und Surujbally, 2007; Lee et al., 2002; Terry et al., 1996).

Um genauere Aufschlüsse über die Wirkungsmechanismen von *trans*-Pellitorin zu bekommen, sollten weitere mechanistische Studien mit selektiven Agonisten und Antagonisten in Co-Inkubation mit *trans*-Pellitorin hinsichtlich der Aktivierung von TRPA1- und CNR1-Rezeptor bzw. Serotonin- und Dopaminrezeptoren *in vitro* durchgeführt werden. In weiterer Folge sollte der Effekt von *trans*-Pellitorin auf die Freisetzung appetitregulierender Neuropeptide, wie NPY oder Ghrelin, untersucht werden, um die sättigungsfördernde Wirkung bestätigen zu können. Abschließend sollten *in vivo* Studien zur Verifizierung des sättigungsfördernden und appetitreduzierenden Effekts von *trans*-Pellitorin durchgeführt werden.

F Zusammenfassung

Übergewicht stellt ein globales Problem dar und ist, unter anderem, auf eine zu hohe Energieaufnahme zurückzuführen (WHO, 2013). Capsaicin erhöht kalziumabhängig durch Aktivierung des TRPV1-Rezeptors die Ausschüttung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin (Lam et al., 2007; Marinelli et al., 2005; Smith et al., 2006). Eine Stimulierung dieser Neurotransmitter bewirkt eine Reduktion der Nahrungsaufnahme, was eine Gewichtsabnahme zur Folge hatte (Drent et al., 1995; Yang et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die neurotransmitterstimulierenden Effekte von Capsaicin *in vitro* in neuronalen SH-SY5Y Zellen bestätigt und eine weniger scharfe und strukturell ähnliche Substanz mit vergleichbaren Effekten gesucht. Ausgewählte Alkamide wurden getestet und das potenteste Alkamid hinsichtlich der Neurotransmitterausschüttung mit Capsaicin verglichen. Weiters wurde der Einfluss auf die Genregulation ausgewählter Serotonin- und Dopaminrezeptoren untersucht, deren Aktivierung mit einer verminderten Nahrungsaufnahme assoziiert ist. Schließlich wurden Effekte auf mögliche Bindungsrezeptoren untersucht, um einen ersten Hinweis auf den zugrundeliegenden Signalweg zu bekommen.

Capsaicin führte in der Konzentration von 1 μM zu einer maximalen Erhöhung der Serotoninausschüttung um 73 ± 51 % und 10 μM zu einer maximalen Steigerung der Dopaminausschüttung um 1196 ± 535 % verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Das potenteste Alkamid, *trans*-Pellitorin, führte in der Konzentration von 0,1 μM zur größten Erhöhung der Serotoninfreisetzung um 40 ± 26 % und zu einer Erhöhung der Dopaminfreisetzung um 83 ± 55 % verglichen zur unbehandelten Kontrolle. Die Effekte von *trans*-Pellitorin in der Konzentration von 0,1 μM hinsichtlich der Ausschüttung von Serotonin (140 ± 26 %) und Dopamin (183 ± 55 %) waren vergleichbar mit denen von Capsaicin (112 ± 22 % bzw. 221 ± 35 %). Außerdem führte ein Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin zu einer zeitabhängigen Regulation der Serotoninrezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} und der Dopaminrezeptoren D₁ und D₂. Des Weiteren führte eine Inkubation mit 0,1 μM *trans*-Pellitorin zu einer Erhöhung der Expression des TRPA1-Rezeptors und zu einer Verminderung des CNR1-

Rezeptors in neuronalen SH-SY5Y-Zellen. Jedoch wurde kein Effekt auf die Genexpression des TRPV1-Rezeptors nachgewiesen.

Eine Inkubation mit *trans*-Pellitorin führte, möglicherweise kalziumabhängig über Aktivierung des TRPA1-Rezeptors, zu einer vermehrten Freisetzung der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin in neuronalen SH-SY5Y Zellen. In der Konzentration 0,1 μM erzielte *trans*-Pellitorin ähnliche Wirkungen wie Capsaicin. In anschließenden Studien sollte geklärt werden, ob *trans*-Pellitorin, unter anderem, durch Aktivierung der sättigungsvermittelnden Serotonin- und Dopaminrezeptoren vergleichbare appetitreduzierende Effekte bei Menschen bewirkt.

G Abstract

Overweight is a worldwide problem, which is, among others, a result of an overconsumption of energy (WHO, 2013). Capsaicin increases, Ca^{2+} -dependently via activation of the TRPV1-receptor, the release of the neurotransmitters serotonin and dopamine (Lam et al., 2007; Marinelli et al., 2005; Smith et al., 2006). A stimulation of these neurotransmitters is associated with reduced food intake, resulting in weight loss (Drent et al., 1995; Yang et al., 1997).

This thesis aimed to confirm the neurotransmitter-stimulating effect of capsaicin *in vitro* in neuronal SH-SY5Y cells and to identify a less pungent structural related compound, with effects comparable with those of capsaicin. Selected natural alkamides were screened and the most effective compound was compared to capsaicin regarding its potency to stimulate neurotransmitter release. In addition, the effect on serotonin and dopamine receptor gene expression, whose activation is associated with a decrease in food intake, was examined. Finally, the impact on possible target receptors was studied in order to get an insight on the underlying signalling pathway.

Capsaicin most potently increased the release of serotonin at a concentration of 1 μM by 73 ± 51 % and the release of dopamine at a concentration of 10 μM by 1196 ± 535 % compared to non-treated control cells. The most effective alkamide was *trans*-pellitorine, which increased at a concentration of 0.1 μM the release of serotonin by 40 ± 26 % and the release of dopamine by 83 ± 55 % compared to non-treated control cells. The effects of *trans*-pellitorine at the most potent concentration of 0.1 μM on serotonin (140 ± 26 %) and dopamine (183 ± 55 %) release were comparable to those of capsaicin (112 ± 22 % or 221 ± 35 %). In addition, incubation with 0.1 μM *trans*-pellitorine also led to a time-dependent regulation of the serotonin receptors 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and the dopamine receptors D₁ and D₂. Moreover, incubation with 0.1 μM *trans*-pellitorine increased the expression of the TRPA1 mRNA and reduced the expression of the CNR1 mRNA in neuronal SH-SY5Y cells. No effect on TRPV1 gene expression was detected.

Incubation with *trans*-pellitorine increased, possibly via a TRPA1-mediated, Ca²⁺-dependent mechanism, the release of the neurotransmitter serotonin and dopamine in neuronal SH-SY5Y cells.

A concentration of 0.1 μM *trans*-pellitorine had similar effects regarding neurotransmitter release like capsaicin. In further studies it should be investigated, if *trans*-pellitorine may unfold anorectic effects, among others, via activation of satiety-mediating serotonin and dopamine receptors in humans.

LITERATURVERZEICHNIS

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37: 13-25.

American Type Culture Collection (ATCC): CRL-2266™ Product Description. Internet: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2266&Template=cellBiology> (Stand: 15.01.2013).

Aravich PF, Sclafani A. Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* 1983; 97(6): 970-983.

Astrup A, Kristensen M, Gregersen NT, Belza A, Lorenzen JK, Due A, Larsen TM. Can bioactive foods affect obesity? *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2010; 1190: 25-41.

Augustine GJ. How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11(3): 320-326.

Axel AM, Mikkelsen JD, Hansen HH. Tesofensine, a Novel Triple Monoamine Reuptake Inhibitor, Induces Appetite Suppression by Indirect Stimulation of α -1 Adrenoceptor and Dopamine D1 Receptor Pathways in the Diet-Induced Obese Rat. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1464-1476.

Barceloux DG. Pepper and capsaicin (Capsicum and Piper species). *Dis Mon.* 2009; 55(6): 380-390.

Bermudez-Silva FJ, Viveros MP, McPartland JM, Rodriguez de Fonseca F. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2010; 95: 375-382.

Berridge MJ. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 1998; 21: 13-26.

Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res* 1978; 38: 3751-3757.

Blevins JE, Stanley BG, Reidelberger RD. Brain regions where cholecystokinin suppresses feeding in rats. *Brain Res.* 2000; 860: 1-10.

Blundell JE. Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 155-159.

Breisch ST, Zelman FP, Hoebel BG. Hyperphagia and obesity following serotonin depletion by intraventricular p-chlorophenylalanine. *Science* 1976; 192(4237): 382-5.

Chaiyasit K, Khovidhunkit W, Wittayalerpanya S. Pharmacokinetic and the effect of capsaicin in *Capsicum frutescens* on decreasing plasma glucose level. *J Med Assoc Thai.* 2009; 92: 108-113.

Charnay Y, Léger L. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 2010; 12: 471-487.

Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 37: 942-946.

Cooper SJ, Dourish CT, Clifton PG. CCK antagonists and CCK-monoamine interactions in the control of satiety. *Am J Clin Nutr.* 1992; 55: 291-295.

Cordeira JW, Frank L, Sena-Esteves M, Pothos EN, Rios M. Brain-derived neurotrophic factor regulates hedonic feeding by acting on the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci* 2010; 30(7): 2533-2541.

Currie PJ, Coiro CD, Niyomchai T, Lira A, Farahmand F. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine: Receptor-specific inhibition of NPY-stimulated eating and energy metabolism. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002; 71: 709-716.

Currie PJ, Coscina DV. Metergoline potentiates natural feeding and antagonizes the anorectic action of medial hypothalamic 5-hydroxytryptamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1996; 53(4): 1023-1028.

Currie PJ, John CS, Nicholson ML, Chapman CD, Loera KE. Hypothalamic paraventricular 5-hydroxytryptamine inhibits the effects of ghrelin on eating and energy substrate utilization. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 97: 152-155.

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbh: Instructions for Use - Dopamine ELISA, 2011. Internet: <http://www.dld-diagnostika.de/> (Stand: 15.01.2013).

DLD Gesellschaft für Diagnostika und medizinische Geräte mbh: Instructions for Use - Serotonin Sensitive ELISA, 2010. Internet: <http://www.dld-diagnostika.de/> (Stand: 15.01.2013).

Donnerer J, Amann R, Schuligoi R, Lembeck F. Absorption and metabolism of capsaicinoids following intragastric administration in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1990; 342: 357-361.

Drent ML, Zelissen PM, Koppeschaar HP, Nieuwenhuyzen Kruseman AC, Lutterman JA, van der Veen EA. The effect of dexfenfluramine on eating habits in a Dutch ambulatory android overweight population with an overconsumption of snacks. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19: 299-304.

Ebenezer IS, Surujbally A. The effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) on food intake in non-deprived C57BL6 mice. *European Journal of Pharmacology* 2007; 559: 184-188.

Eun SY, Jung SJ, Park YK, Kwak J, Kim SJ, Kim J. Effects of capsaicin on Ca(2+) release from the intracellular Ca(2+) stores in the dorsal root ganglion cells of adult rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 285(5): 1114-1120.

Falchi M, Bertelli A, Ferrara F, Galazzo R, Galazzo S, Gharib C, Dib B. Intracerebroventricular capsaicin influences body weight increasing of rats. *Brain Research Bulletin* 2008; 77: 253-256.

Fehr C, Yakushev I, Hohmann N, Buchholz HG, Landvogt C, Deckers H, Eberhardt A, Kläger M, Smolka MN, Scheurich A, Dielentheis T, Schmidt LG, Rösch F, Bartenstein P, Gründer G, Schreckenberger M. Association of low striatal dopamine d2 receptor availability with nicotine dependence similar to that seen with other drugs of abuse. *Am J Psychiatry* 2008; 165: 507-514.

Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* 2006; 160: 171-177.

Fox MA, French HT, LaPorte JL, Blackler AR, Murphy DL. The serotonin 5-HT_{2A} receptor agonist TCB-2: a behavioral and neurophysiological analysis. *Psychopharmacology* 2010; 212: 13-23.

Geiger BM, Behr GG, Frank LE, Caldera-Siu A, Beinfeld MC, Kokkotou EG, Pothos EN. Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats. *FASEB J* 2008; 22(8): 2740-2746.

Gil-Campos M, Aguilera CM, Cañete R, Gil A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr.* 2006; 96: 201-226.

Gropp E, Shanabrough M, Borok E, Xu AW, Janoschek R, Buch T, Plum L, Balthasar N, Hampel B, Waisman A, Barsh GS, Horvath TL, Brüning JC. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci.* 2005; 8: 1289-1291.

Hachiya S, Kawabata F, Ohnuki K, Inoue N, Yoneda H, Yazawa S, Fushiki T. Effects of CH-19 Sweet, a non-pungent cultivar of red pepper, on sympathetic nervous activity, body temperature, heart rate, and blood pressure in humans. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2007; 71(3): 671-676.

Halford JC, Blundell JE. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54(4): 745-51.

Han EH, Kim HG, Choi JH, Jang YJ, Lee SS, Kwon KI, Kim E, Noh K, Jeong TC, Hwang YP, Chung YC, Kang W, Jeong HG. Capsaicin induces CYP3A4 expression via pregnane X receptor and CCAAT/enhancer-binding protein β activation. *Mol Nutr Food Res.* 2012; 56(5): 797-809.

Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JCG. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* 2012; 63: 3-17.

Hayman M, Kam PCA. Capsaicin: A review of its pharmacology and clinical applications. *Current Anaesthesia & Critical Care* 2008;19: 338-343.

Heisler LK, Cowley MA, Tecott LH, Fan W, Low MJ, Smart JL, Rubinstein M, Tatro JB, Marcus JN, Holstege H, Lee CE, Cone RD, Elmquist JK. Activation of central melanocortin pathways by fenfluramine. *Science* 2002; 297: 609-611.

Heisler LK, Jobst EE, Sutton GM, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, Liu HY, Zigman JM, Balthasar N, Kishi T, Lee CE, Aschkenasi CJ, Zhang CY, Yu J, Boss O, Mountjoy KG, Clifton PG, Lowell BB, Friedman JM, Horvath T, Butler AA, Elmquist JK, Cowley MA. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron* 2006; 51: 239-249.

Hietala J, West C, Syvälahti E, Någren K, Lehtikoinen P, Sonninen P, Ruotsalainen U. Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology* 1994;116: 285-290.

Hussain K, Ismail Z, Sadikun A, Ibrahim P. Bioactive Markers Based Pharmacokinetic Evaluation of Extracts of a Traditional Medicinal Plant, *Piper sarmentosum*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 1-7.

Jackson HC, Needham AM, Hutchins LJ, Mazurkiewicz SE, Heal DJ. Comparison of the effects of sibutramine and other monoamine reuptake inhibitors on food intake in the rat. *British Journal of Pharmacology* 1997; 121: 1758-1762.

Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; 967: 379-388.

Johnson PM, Kenny PJ. Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats. *Nat Neurosci*. 2010; 13: 635-641.

Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 2004; 427: 260-265.

Ju CY, Tsai CT. Serotonergic mechanisms involved in the suppression of feeding by 5-HTP in rats. *Chin J Physiol* 1995; 38(4): 235-240.

Kang YS, Kim JM. Permeability of a capsaicin derivative, [14C]DA-5018 to blood-brain barrier corrected with HPLC method. *Arch Pharm Res*. 1999; 22: 165-172.

Kawada T, Suzuki T, Takahashi M, Iwai K. Gastrointestinal absorption and metabolism of capsaicin and dihydrocapsaicin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 72: 449-456.

Kawada T, Watanabe T, Takaishi T, Tanaka T, Iwai K. Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on

oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986 ; 183: 250-256.

Kruk JS, Vasefi MS, Liu H, Heikkila JJ, Beazely MA. 5-HT(1A) receptors transactivate the platelet-derived growth factor receptor type beta in neuronal cells. *Cell Signal.* 2013; 25: 133-143.

Ku SK, Lee IC, Kim JA, Bae JS. Antithrombotic activities of pellitorine in vitro and in vivo. *Fitoterapia.* 2013; 91: 1-8.

Kuo DY. Further evidence for the mediation of both subtypes of dopamine D1/D2 receptors and cerebral neuropeptide Y (NPY) in amphetamine-induced appetite suppression. *Behavioural Brain Research* 2003; 147: 149-155.

Lam PM, Hainsworth AH, Smith GD, Owen DE, Davies J, Lambert DG. Activation of recombinant human TRPV1 receptors expressed in SH-SY5Y human neuroblastoma cells increases $[Ca^{2+}]_i$, initiates neurotransmitter release and promotes delayed cell death. *J Neurochem.* 2007; 102: 801-811.

Lam DD, Przydzial MJ, Ridley SH, Yeo GS, Rochford JJ, O'Rahilly S, Heisler LK. Serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist promotes hypophagia via downstream activation of melanocortin 4 receptors. *Endocrinology* 2008; 149: 1323-1328.

Lee MD, Kennett GA, Dourish CT, Clifton PG. 5-HT_{1B} receptors modulate components of satiety in the rat: behavioural and pharmacological analyses of the selective serotonin_{1B} agonist CP-94,253. *Psychopharmacology* 2002; 164: 49-60.

Lee IS, Nam YS, Lee CH, Chung DW, Yoon YS, Kim JS, Yi SJ, Pai T, Lee HS. Expressional changes of neuropeptide Y and cholecystinin in the arcuate and paraventricular nuclei after capsaicin administration. *J Nutr Sci Vitaminol* 2004; 50: 144-148.

Life Technologies (Invitrogen): Manual - Fluo-4 Direct Calcium Assay Kit, 2009.
Internet: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp10471.pdf> (Stand:
04.02.2013).

Ludy MJ, Mattes RD. The effects of hedonically acceptable red pepper doses on thermogenesis and appetite. *Physiology & Behavior* 2011; 102: 251-258.

Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S, Patapoutian A. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Current Biology* 2005; 15: 929-934.

Marinelli S, Pascucci T, Bernardi G, Puglisi-Allegra S, Mercuri N. Activation of TRPV1 in the VTA excites dopaminergic neurons and increases chemical- and noxious-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 2005; 30(5): 864-870.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 2008; 31: 187-199.

Muraki Y, Yamanaka A, Tsujino N, Kilduff TS, Goto K, Sakurai T. Serotonergic Regulation of the Orexin/Hypocretin Neurons through the 5-HT_{1A} Receptor. *The Journal of Neuroscience* 2004; 24: 7159 –7166.

Oak JN, van Tol HHM. Dopamine System. In: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (Offermanns S, Rosenthal W), Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2008: 437-439.

Obst K, Paetz S, Backes M, Reichelt KV, Ley JP, Engel KH. Evaluation of unsaturated alkanolic acid amides as maskers of epigallocatechin gallate astringency. *J Agric Food Chem.* 2013; 61(18): 4242-4249.

Okumura Y, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, Watanabe T. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74: 1068-1072.

O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the Mystery of Capsaicin: A Tool to Understand and Treat Pain. *Pharmacol Rev* 2012, 64: 939-971.

Orosco M, Nicolaidis S. Spontaneous feeding-related monoaminergic changes in the rostromedial hypothalamus revealed by microdialysis. *Physiol Behav* 1992; 52(5): 1015-1019.

Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: An overview. *Cell Calcium* 2005; 38: 233-252.

Peqlab Biotechnology GmbH: Instruction Manual - peqGold Total RNA Kit.

Internet: http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-02_m.pdf (Stand: 29.01.2013).

Pfaffel MW. Real-Time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004: 92-95.

Ravinet-Trillou C, Arnone M, Delgorge C, Gonalons N, Keane P, Maffrand JP, Soubrie P. Anti-obesity effect of SR141716, a CB1 receptor antagonist, in diet-induced obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003; 284: 345-353.

Reilly CA, Crouch DJ, Yost GS, Fatah AA. Determination of capsaicin, nonivamide, and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol*. 2002; 26: 313-319.

Rho MC, Lee SW, Park HR, Choi JH, Kang JY, Kim K, Lee HS, Kim YK. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. *Phytochemistry* 2007; 68: 899-903.

Roche Molecular Systems Inc: How Roche PCR works. Internet: <http://molecular.roche.com/About/pcr/Pages/PCRProcess.aspx> (Stand: 22.05.2013)

Rogers P, McKibbin PE, Williams G. Acute fenfluramine administration reduces neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of the rat: possible implications for the anorectic effect of fenfluramine. *Peptides*. 1991; 12(2): 251-5.

Rohm B, Holik AK, Somoza MM, Pignitter M, Zaunschirm M, Ley JP, Krammer GE, Somoza V. Nonivamide, a capsaicin analog, increases dopamine and serotonin release in SH-SY5Y cells via a TRPV1-independent pathway. *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57(11): 2008-2018.

Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology* 2003; 140: 790-801.

Sanders-Bush E, Nichols CD. Serotonin Receptors and Neurotransmission. *Primer on the Autonomic Nervous System* 2012; 3: 83-86.

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585.

Schneggenburger R, Neher E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*. 2000; 406(6798): 889-893.

Schwartz DH, McClane S, Hernandez L, Hoebel BG. Feeding increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus of the rat as measured by microdialysis. *Brain Res* 1989; 479(2): 349-54.

Shimizu N, Oomura Y, Plata-Salamán CR, Morimoto M. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res* 1987; 416(1): 153-6.

Simansky KJ, Vaidya AH. Behavioral mechanisms for the anorectic action of the serotonin (5-HT) uptake inhibitor sertraline in rats: comparison with directly acting 5-HT agonists. *Brain Res Bull* 1990; 25(6): 953-60.

Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *NeuroImage* 2003; 19: 1709:1715.

Smith VA, Beyer CE, Brandt MR. Neurochemical changes in the RVM associated with peripheral inflammatory pain stimuli. *Brain Research* 2006; 1095: 65-72.

Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by Taq1A A1 allele. *Science* 2008; 322: 449-452.

Stratford TR, Kelley AE, Simansky KJ. Blockade of GABAA receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats. *Brain Res.* 1999; 825: 199-203.

Szczycka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD. Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 2001; 30(3): 819-828.

Terry P, Gilbert DB, Cooper SJ. Dopamine Receptor Subtype Agonists and Feeding Behavior. *Obesity Research* 1995; 3: 515-523.

Van Dam B, Pruijboom L. Schmerz als Kompensation – There is no pain without gain. In: *Angewandte Physiologie 4 - Schmerzen verstehen und beeinflussen* (van den Berg F), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008; 204-205.

Vrang N, Larsen PJ, Clausen JT, Kristensen P. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. *J Neurosci.* 1999; 19: 1-8.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N, Fowler JS. Brain dopamine and obesity. *Lancet* 2001; 357: 354-357.

Westerp-Plantega MS, Smeets A, Lejeune MPG. Sensory and gastrointestinal satiety effects of capsaicin on food intake. *International Journal of Obesity* 2005; 29: 682-688.

Williams CM, Kirkham TC. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology* 1999; 143: 315-317.

Williams CM, Kirkham TC. Reversal of Δ^9 -THC hyperphagia by SR141716 and naloxone but not dexfenfluramine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2002; 71: 333-340.

Williams G, Bing C, Cai XJ, Harrold JA, King PJ, Liu XH. The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav.* 2001; 74: 683-701.

World Health Organization (WHO): Obesity and overweight – Fact sheet N°311. Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> (Stand: 11.08.2013)

Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J.* 2010; 123: 1086-1092.

Yang ZJ, Meguid MM, Chai JK, Chen C, Oler A. Bilateral Hypothalamic Dopamine Infusion in Male Zucker Rat Suppresses Feeding Due to Reduced Meal Size. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997; 58(3): 631-635.

Yoshioka M, Imanaga M, Ueyama H, Yamane M, Kubo Y, Boivin A, St-Amand J, Tanaka H, Kiyonaga. Maximum tolerable dose of red pepper decreases fat intake independently of spicy sensation in the mouth. *British Journal of Nutrition* 2004; 91: 991-995.

Yoshioka M, St-Pierre S, Drapeau V, Dionne I, Doucet E, Suzuki M, Tremblay A. Effects of red pepper on appetite and energy intake. *British Journal of Nutrition* 1999; 82: 115-123.

Yoshioka M, St-Pierre S, Suzuki M, Tremblay A. Effects of red pepper added to high-fat and high-carbohydrate meals on energy metabolism and substrate utilization in Japanese women. *British Journal of Nutrition* 1998; 80: 503-510.

Yu JH, Kim MS. Molecular Mechanisms of Appetite Regulation. *Diabetes Metab J* 2012; 36(6): 391-398.

Zavitsanou K, Dalton VS, Wang H, Newson P, Chahl LA. Receptor changes in brain tissue of rats treated as neonates with capsaicin. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2010; 39: 248-255.

Zhang H, Matsuda H, Nakamura S, Yoshikawa M. Effects of amide constituents from pepper on adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18: 3272-3277.

ANHANG

Alle Werte wurden mit Hilfe des Nalimov-Tests mit folgender Formel auf Ausreißer untersucht:

$$q = \left| \frac{x_1 - \bar{x}}{s} \right| \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

\bar{x} ...Mittelwert

s ...Standardabweichung

n ...Anzahl der Werte

Tabelle 2: Serotoninfreisetzung nach Stimulierung mit Capsaicin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=3-5, tR=2.

Substanz	Kontrolle	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M
Capsaicin	92,5	105,0	163,4	142,2
	107,5	71,3	205,9	122,6
	88,3	142,0	141,2	153,8
	111,7	112,7	158,4	127,9
	96,1	126,4	122,3	191,7
	103,9	111,8	113,9	165,3
	93,1	116,0	252,5	
	106,9		231,4	
	96,2			
	103,8			
MW	100,0	112,2	173,6	150,6
STD	7,8	21,7	51,0	25,6

Tabelle 3: Screening von Alkamiden auf die Serotoninfreisetzung (1)

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=2, tR=1-2.

Substanz	Kontrolle	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
trans-Pellitorin	112,3	124,9	130,1	157,0	176,5	96,1
	87,7	131,3	155,0	110,8	158,1	107,1
	100,0	172,4	136,9	135,7		82,8
		178,1	160,0	153,5	132,7	
MW	100,0	151,7	145,5	139,3	155,8	95,3
STD	12,3	27,4	14,3	21,1	22,0	12,1
cis-Pellitorin	125,1	149,3	67,5	65,5	76,0	161,6
	74,9	91,1	93,0	104,4	113,4	73,3
	105,5	99,9	101,4	131,7	88,7	95,6
	94,5	122,8	115,2	110,4	99,2	147,2
MW	100,0	115,8	94,3	103,0	94,3	119,4
STD	21,0	26,0	20,1	27,6	15,9	41,8
Dihydro-pellitorin	73,4		130,7	109,9	156,7	103,5
	126,6	128,2	129,4		108,8	207,9
	105,4	134,7	101,7	54,0	143,1	121,9
	94,6	159,8	82,1	98,3	88,8	
MW	100,0	140,9	111,0	87,4	124,3	144,5
STD	22,2	16,7	23,4	29,5	31,1	55,7
trans-C12-Pellitorin	121,6	97,2	107,5	68,0	62,1	55,3
	78,4	74,9	76,8	69,7	90,9	90,5
		92,5	95,4	85,3	116,2	61,0
	100,0	80,6	136,0	93,3	98,9	89,7
MW	100,0	86,3	103,9	79,1	92,0	74,1
STD	21,6	10,3	24,8	12,3	22,6	18,6

Tabelle 4: Screening von Alkamiden auf die Serotoninfreisetzung (2)

Substanz	Kontrolle	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
Spilanthol	93,8	89,0	78,4	102,8	97,3	91,1
	106,2	88,6	70,1	121,8	108,6	89,9
	88,8	122,0	115,0	147,6	97,4	94,3
	111,2	122,7	156,7	147,2	112,0	
MW	100,0	105,6	105,1	129,8	103,8	91,8
STD	10,5	19,3	39,6	21,7	7,6	2,2
Achilleamid	82,7	92,2	71,3	66,7	120,1	145,1
	117,3	145,1		112,3	171,6	106,2
	112,0	98,2	55,1		134,8	84,5
	88,0	123,4	80,2	88,5	110,5	92,2
MW	100,0	114,7	68,9	89,2	134,3	107,0
STD	17,2	24,4	12,7	22,8	26,8	26,9
Pipatalin	121,4	111,1	96,5	73,6	117,3	134,1
	78,6	132,3	93,4	97,3	123,7	130,7
	92,5	99,2	93,8	89,8	131,2	124,3
	107,5	115,7	98,7	80,5	164,8	112,9
MW	100,0	114,6	95,6	85,3	134,3	125,5
STD	18,5	13,7	2,5	10,4	21,2	9,3
G6744	81,3	109,0	53,8	115,8	93,3	87,1
	118,7	126,0	89,1	140,1	97,2	75,3
	105,0	65,5	64,5	71,5	68,1	52,5
	95,0	94,2	70,2	77,7	77,8	92,2
MW	100,0	98,7	69,4	101,3	84,1	76,7
STD	15,8	25,6	14,8	32,5	13,6	17,7

Tabelle 5: Serotoninausschüttung nach Inkubation mit *trans*-Pellitorin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=6, tR=1-2.

Substanz	Kontrolle	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
trans-Pellitorin	112,3	124,9	130,1	157,0	176,5	96,1
	87,7	131,3	155,0	110,8	158,1	107,1
	100,0		136,9	135,7		82,8
			160,0	153,5	132,7	
	96,8	70,4	66,4	147,6	160,9	
	103,2	83,2	78,6	169,9	168,7	
	107,9	117,3	120,1		142,9	75,4
	92,1	110,8	76,5	126,3	120,7	107,9
	97,8	114,1	104,5	100,3	81,5	97,6
	102,2	116,7	87,8	174,8	92,6	104,0
	90,7	86,0	79,8	107,3	73,8	78,2
109,3	97,9	92,9	158,6	108,3	88,1	
MW	100,0	105,3	107,4	140,2	128,8	93,0
STD	7,9	19,9	32,2	25,9	36,1	12,4

Tabelle 6: Serotoninausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=3-6, tR=1-2.

Substanz	Kontrolle	0,1 µM	1 µM	10 µM
Capsaicin	92,5	105,0	163,4	142,2
	107,5	71,3	205,9	122,6
	88,3	142,0	141,2	153,8
	111,7	112,7	158,4	127,9
	96,1	126,4	122,3	191,7
	103,9	111,8	113,9	165,3
	93,1	116,0	252,5	
	106,9		231,4	
	96,2			
	103,8			
MW	100,0	112,2	173,6	150,6
STD	7,8	21,7	51,0	25,6
<i>trans</i>-Pellitorin	112,3	157,0	176,5	96,1
	87,7	110,8	158,1	107,1
	100,0	135,7		82,8
		153,5	132,7	
	96,8	147,6	160,9	
	103,2	169,9	168,7	
	107,9		142,9	75,4
	92,1	126,3	120,7	107,9
	97,8	100,3	81,5	97,6
	102,2	174,8	92,6	104,0
	90,7	107,3	73,8	78,2
109,3	158,6	108,3	88,1	
MW	100,0	140,2	128,8	93,0
STD	7,9	25,9	36,1	12,4

Tabelle 7: Dopaminausschüttung nach Stimulierung mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=3-10, tR=1-2.

Substanz	Kontrolle	0,1 µM	1 µM	10 µM
Capsaicin	92,9	232,9	492,3	986,6
	107,1	166,2	519,4	868,2
	84,4	219,3	626,9	2059,1
	115,6	224,3	639,9	1769,9
	88,8	262,5	975,5	1375,7
	111,2		912,6	715,3
	84,8		364,9	
	115,2		284,0	
	111,7		677,5	
	88,3		818,1	
	86,6		442,6	
	113,4		331,9	
	93,6		490,2	
	106,4		919,2	
	105,0		467,3	
	95,0		549,2	
96,5				
103,5				
95,5				
104,5				
MW	100,0	221,0	594,5	1295,8
STD	10,6	34,9	215,7	534,7
trans-Pellitorin	92,6	151,9	103,3	107,8
	107,4	101,8		84,4
	100,0	182,6		89,2
		172,9	99,7	69,4
	104,7	240,9	102,7	219,8
	95,3	246,1	121,4	193,3
MW	100,0	182,7	106,8	127,3
STD	6,2	54,8	9,9	63,1

Tabelle 8: Kalziummobilisierung nach Inkubation mit Capsaicin oder *trans*-Pellitorin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=3-5, tR=1-3

Substanz	Kontrolle	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
Capsaicin	94,8	143,2	240,3	138,7	104,6
	105,2	149,1	223,6	154,9	107,4
	106,0	126,4	197,9	170,6	134,6
	102,2	156,0	145,0	142,7	151,9
	79,6	150,8	116,9	173,5	109,1
	90,1	149,4	169,9	145,4	118,5
	117,2	121,7	213,4	147,1	162,6
	104,9		126,2	181,6	125,3
	92,5		243,2	163,4	154,0
	114,6		178,5	123,2	141,7
	92,9		213,8	167,2	134,2
	93,8		152,9		
	106,2				
	98,5				
	101,5				
MW	100,0	142,4	185,1	155,3	131,3
STD	9,7	13,1	43,4	17,6	20,0
<i>trans</i>-Pellitorin	77,4	104,6	165,5	155,1	173,7
		162,3	225,0	193,6	150,5
	122,6	195,4	187,4	131,1	
	111,8	191,6	211,9	189,2	128,8
	88,2	156,4	177,1	135,5	
		220,9	167,5	147,6	147,8
	108,5	95,4	138,4		142,9
	102,0	79,4	167,3		109,0
	89,5	141,7	122,9	145,9	116,0
MW	100,0	149,7	173,7	156,9	138,4
STD	15,7	48,9	32,1	24,9	22,2

Tabelle 9: Regulation der Serotoninrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

n=3, tR=1-3. (K= Kontrolle, P= Behandlung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin)

Rezeptor	0,25 h		0,5 h		1 h		3 h		6 h	
	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P
5HT-2A	1,2	1,5	1,0	0,7	1,1	0,9	1,0	1,0	1,2	1,7
	0,8	2,5	1,0	0,7	0,9	0,9	1,0	1,2	0,8	1,1
	0,9	2,8	1,0	1,1	1,0	1,4	0,9	1,5	1,0	1,1
	1,1	1,7	1,0	1,5	1,0	2,1	1,1	1,2	1,0	1,9
	1,3	2,1	0,9	1,2	1,1	2,1	1,0	1,5	1,1	2,4
	0,7	1,9	1,1	0,7	0,9	1,0	1,0	1,2	0,9	2,0
		1,6	1,0	0,5		1,0		1,3		1,0
		1,5		0,6		1,4				1,0
MW	1,0	2,0	1,0	0,9	1,0	1,4	1,0	1,3	1,0	1,5
STD	0,2	0,5	0,1	0,3	0,1	0,5	0,1	0,2	0,2	0,5
5HT-1A	1,0	2,0	1,1	1,0	0,9	3,5	1,2	3,3	1,0	1,1
	1,0	1,4	0,9	1,1	1,1	1,3	0,8	1,5	1,0	0,7
	0,9	0,8	1,0	0,6	1,1	2,1	1,0	2,4	0,8	0,5
	1,1	1,6	1,0	0,6	0,9	1,1	1,0	1,4	1,2	1,5
	1,1	1,2	0,9	0,5	0,9	2,3	1,0	1,2	1,0	1,7
	0,9	1,3	1,1	0,2	1,1	1,9	1,1	1,2	1,0	1,5
				0,7		1,2	0,9	2,6		1,0
				0,2		0,9		2,9		1,1
MW	1,0	1,4	1,0	0,6	1,0	1,7	1,0	2,1	1,0	1,1
STD	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1	0,8	0,1	0,8	0,1	0,4
5HT-1B	1,1	1,1	1,1	0,9	1,0	1,6	1,0	1,3	1,0	2,0
	0,9	1,2	0,9	0,7	1,0	1,3	1,0	1,1	1,0	2,1
	0,9	1,1	1,0	0,7	1,0	1,0	0,8	1,2	0,9	2,5
	1,1	1,1	1,0	0,5	1,0	1,2	1,2	0,8	1,1	2,3
	1,1	1,0	0,9	0,5	1,0	1,6	1,0	0,9	1,0	2,6
	0,9	1,0	1,1	0,8	1,0	1,2	1,0	1,1	1,0	1,7
				0,4				0,9		1,8
				0,5				0,8		
MW	1,0	1,1	1,0	0,6	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	2,1
STD	0,1	0,1	0,1	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,0	0,3

Tabelle 10: Regulation der Dopaminrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

n=3, tR=2-3. (K= Kontrolle, P= Behandlung mit 0,1 μ M *trans*-Pellitorin)

Rezeptor	0.25 h		0.5 h		1 h		3 h		6 h	
	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P
D2	1,0	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	0,9
	0,9	1,0	1,0	0,8	1,0	1,0	1,0	1,3	0,9	0,9
	1,0	1,0	0,9	0,8	1,0	1,2	1,0	1,1	1,1	0,9
	1,0	1,3	1,1	0,9	1,0	1,4	1,0	1,1	1,0	2,0
	1,0	1,3	0,9	1,0	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0	1,7
	1,0	1,3	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,7
	1,1	1,4		0,9		2,0		1,2	1,0	1,2
	0,9	1,2		0,9		1,9		1,2		1,0
	1,1	1,0		1,0		1,5		1,3		1,2
MW	1,0	1,2	1,0	0,9	1,0	1,4	1,0	1,2	1,0	1,3
STD	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,1	0,4
D1	1,0	1,9	1,2	1,0	0,8	1,3	1,0	1,3	0,9	2,4
	1,0	1,6	0,8	0,7	1,2	0,6	1,0	0,9	1,1	2,4
	1,1	1,0	1,0	0,5	1,2	0,6	1,0	1,4	1,0	1,4
	0,9	1,9	1,0	0,7	0,8	1,6	1,0	1,2	1,0	1,5
	0,9	1,4	0,9	0,9	1,2	2,3	1,0	1,0	1,1	1,4
	1,1	1,9	1,1	0,7	0,8	2,3	1,0	1,6	0,9	1,1
		1,1	0,9	0,5		0,9	1,2	1,4		1,0
		1,0				1,2				
		1,2				1,8				
MW	1,0	1,4	1,0	0,7	1,0	1,4	1,0	1,3	1,0	1,6
STD	0,1	0,4	0,1	0,2	0,2	0,6	0,1	0,2	0,1	0,6

Tabelle 11: Regulation möglicher Bindungsrezeptoren nach Stimulierung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin zu verschiedenen Zeitpunkten

Die Ergebnisse sind als x-fache Änderung zur unbehandelten Kontrolle dargestellt.

n=3, tR=2-3. (K= Kontrolle, P= Behandlung mit 0,1 µM *trans*-Pellitorin)

Rezeptor	0,25 h		0,5 h		1 h		3 h		6 h	
TRPV1	K	P	K	P	K	P	K	P	K	P
	1,0	1,1	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1
	1,0	1,1	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2
	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,2
	1,0	1,0	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,2
	1,0	0,9	1,0	1,3	1,0	0,9	1,0	1,2	1,0	1,1
		1,0		1,1		1,0		0,8		0,6
		0,9		1,1		1,1		0,8		0,7
		0,9		1,1				0,8		0,7
MW	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
STD	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2
TRPA1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0	1,1
	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1
	1,0	1,1	1,0	0,9	1,0	1,2	1,0	0,8	1,0	1,2
	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,4	1,0	1,1	1,0	1,3
	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,3	1,0	1,1	1,0	1,3
	1,0	0,8	1,0	1,3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,0	1,3
		0,8		0,9		1,0		0,8		0,9
		0,8		0,9		1,0		0,8		0,9
		0,8		1,0		1,1		0,8		0,9
	MW	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0
STD	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2
CNR1	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0	1,0
	1,0	0,9	1,0	0,8	1,0	0,8	1,0	0,9	1,0	1,0
	1,0	1,1	0,9	1,0	1,0	0,9	1,0	1,0	1,0	1,0
	1,0	0,6	1,1	1,0	1,0	0,8	1,0	0,9	1,0	1,1
	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0	1,2
	1,0	0,8	1,0	1,2	1,0	0,9	1,0	1,1	1,0	1,2
		0,6		0,9		0,8		0,8		0,9
		0,6		0,8		1,0		0,9		1,0
		0,6		1,1		1,1				
	MW	1,0	0,7	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,0
STD	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1

Tabelle 12: Zellproliferation nach 6 Stunden Inkubation mit *trans*-Pellitorin

Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle dargestellt. n=3-10, tR=2-4.

Substanz	Kontrolle	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
trans- Pellitorin	88,1	115,8	128,9	95,8	100,9	
	86,2	116,8	111,7	113,1	112,1	126,0
	112,3	112,1	112,5	106,8	116,5	136,2
	113,5	121,4	129,0	121,2	132,7	127,9
	94,4	108,8	115,5	124,1	132,9	122,3
	110,6	138,2	126,8	106,3	134,6	116,3
	94,3	132,6		119,9	139,4	139,3
	100,6	97,6	124,4	117,0	124,4	131,0
	109,4	85,0	109,1		102,1	113,0
	91,2	78,1	98,8			
	92,3	99,7	106,8	97,9	89,8	116,6
	107,1	86,8	106,6	130,3	138,0	106,2
	MW	100,0	107,7	115,5	113,2	120,3
STD	10,1	18,8	10,3	11,4	17,1	10,6

LEBENS LAUF

Vorname: Mathias
Nachname: Zaunschirm
Akademischer Grad: Master of Science

Studienverlauf

- 2010 - 2013 Masterstudium Ernährungswissenschaften,
Schwerpunkt: Lebensmittelqualität und
Lebensmittelsicherheit, Universität Wien,
Titel der Masterarbeit:
*„Einfluss von Alkamiden auf Mechanismen der
Freisetzung von Serotonin und Dopamin in
SH-SY5Y Zellen“*
- 2006 - 2010 Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften,
Universität Wien, Titel der Bakkalaureatsarbeit:
*„Die Entwicklung der Transfettsäuren in
Lebensmitteln in den letzten zwei Dekaden“*

Wissenschaftliche Publikationen

- 2013 Rohm B, Holik AK, Somoza MM, Pignitter M,
Zaunschirm M, Ley JP, Krammer GE, Somoza V.
Nonivamide, a capsaicin analog, increases
dopamine and serotonin release in SH-SY5Y cells
via a TRPV1-independent pathway. Mol Nutr Food
Res 2013; 57: 2008-2018.
- Rohm B, **Zaunschirm M**, Widder S, Ley JP,
Krammer GE, Somoza V. Neurotransmitter-
releasing potency of structural capsaicin-analogs in
SH-SY5Y cells. Proceedings of the 10th Wartburg
Symposium 2013 (eingereicht).
- 2010 Veitl VFM, **Zaunschirm M**. After infant nutrition:
What's going wrong? (Poster)
3. Kongress der European Academy of Paediatric
Societies, Kopenhagen