

# Die Serotoninylierung von Transkriptionsfaktoren als Mechanismus in der Leberregeneration und der Pathogenese des Alkoholismus

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
**Diplom-Biochemiker Silke Stahlberg**  
aus Berlin

durchgeführt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



November 2012



1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos  
Institut für Medizinische Genetik, Charité - Universitätsmedizin Berlin,  
Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin
  
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling  
Institut für Angewandte Genetik, Freie Universität Berlin,  
Albrecht-Thaer-Weg 6, D-14195 Berlin

Disputation am 11. Juli 2013



## Inhalt

<b>Inhalt</b> .....	<b>V</b>
<b>I Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Der Alkoholkonsum und seine Wirkung auf die Physiologie der Leber</b> .....	<b>9</b>
1.1 Die pathophysiologischen Auswirkungen des Alkoholkonsums .....	9
1.2 Der Metabolismus und die Metaboliten des Ethanols .....	10
1.3 Die Leberzellproliferation im physiologischen und pathophysiologischen Kontext ...	12
<b>2 Die vielfältigen physiologischen Funktionen biogener Monoamine</b> .....	<b>16</b>
2.1 Biogene Monoamine als Neurotransmitter und Gewebshormone .....	16
2.2 Das serotonerge System .....	16
2.3 Die Dualität des serotonergen Systems.....	17
2.4 Weitere biogene Monoamine .....	19
2.5 Die Signalvermittlung durch biogene Monoamine - Rezeptoren und Transporter ....	22
2.6 Die Familie der Transglutaminasen .....	28
2.7 Die Funktionen der Transglutaminase 2.....	30
2.8 Die Monoaminylierung als posttranslationale Modifikation.....	35
<b>3 Die Glutaminreichen und Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Proteine</b> .....	<b>39</b>
3.1 Physiologische und pathophysiologische Aspekte .....	39
3.2 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB .....	40
3.3 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor SP1 .....	43
3.4 Der Polyglutaminabschnitt-enthaltende Transkriptionsfaktor BRN2 .....	46
3.5 Die Familie der Polyglutamin-bindenden Proteine .....	48
<b>4 Zielsetzung</b> .....	<b>55</b>
<b>II Materialien und Methoden</b> .....	<b>57</b>
<b>1 Materialien</b> .....	<b>57</b>
1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	57
1.2 Radiochemikalien.....	57
1.3 Puffer, Lösungen und Medien .....	57
1.4 Antikörper .....	58
1.5 Oligonukleotide.....	58
1.6 Plasmide.....	59
<b>2 Bakterienstämme und Zelllinien</b> .....	<b>59</b>
2.1 Bakterienstämme.....	59
2.2 Zelllinien.....	60
<b>3 Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>61</b>
3.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren .....	61
3.2 Enzymatische und thermische Manipulation von Nukleinsäuren.....	63
3.3 Bakterienkulturen .....	69

<b>4 Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>70</b>
4.1 Isolierung und Analyse von Proteinen .....	70
4.2 TGM-vermittelte Transamidierung und Analyse von Proteinen.....	73
<b>5 Zellkulturarbeiten</b> .....	<b>76</b>
5.1 Allgemein.....	76
5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	76
5.3 Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen.....	77
5.4 Behandlungen eukaryotischer Zellen/ Herstellung von Zelllysaten.....	77
5.5 Transfektion und Ernte eukaryotischer Zellen .....	78
5.6 Detektion von Serotonin und Serotoninmetaboliten .....	78
5.7 Analyse der eukaryotischen Zellproliferation .....	79
5.8 Monoaminylierung der Proteine eukaryotischer Zellen .....	80
<b>6 Tierphysiologische Studien</b> .....	<b>81</b>
6.1 Mausstämme und Haltungsbedingungen .....	81
6.2 Untersuchung der freiwilligen Selbstverabreichung von Ethanol .....	81
6.3 Schwanzbiopsien .....	82
6.4 Blutentnahme.....	83
<b>7 Statistische Analyse</b> .....	<b>83</b>
<b>III Ergebnisse</b> .....	<b>85</b>
<b>1 Der Einfluss des serotonergen Systems auf Alkoholkonsum und Leberregeneration</b> .....	<b>85</b>
1.1 <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere nehmen erhöhte Mengen an Ethanol zu sich .....	85
1.2 Eine Präkonditionierung vermindert die erhöhte Präferenz der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere zur Ethanolaufnahme nicht.....	86
1.3 <i>Tph1</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere verringern die Gesamtflüssigkeitsaufnahme in der Konditionierungsphase unterschiedlich.....	88
1.4 <i>Tph1</i> <sup>+/+</sup> -Tiere weisen kaum veränderte Präferenzen für süßen, salzigen und sauren Geschmack auf .....	89
1.5 Die Gabe von 5-Hydroxytryptophan verringert die erhöhte Ethanolaufnahme der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere.....	89
1.6 Die Gabe von 5-Hydroxytryptophan reduziert das Körpergewicht von <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tieren	93
1.7 Die erhöhte Ethanolaufnahme ist nicht auf den genetischen Hintergrund der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> - Tiere zurückzuführen.....	94
1.8 Kurzzeitiger Konsum von Ethanol führt bei <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tieren zu keinem signifikant verstärkten Leberschaden .....	97
1.9 Der Einfluss von Monoaminen auf die Proliferation von Leberzelllinien .....	99
<b>2 Der molekulare Hintergrund der erhöhten Ethanolaufnahme und der gestörten Leberregeneration der <i>Tph1</i><sup>-/-</sup>-Tiere</b> .....	<b>104</b>
2.1 Die periphere Serotonindefizienz führt in der Leber zur Deregulation unterschiedlichster Gene .....	104
2.2 Ethanol beeinflusst den Katabolismus von Serotonin in $\beta$ -TC3-Zellen .....	110

2.3 Die Behandlung mit Ethanol und Serotonin verändert die Expression SP1-abhängiger Gene in HepG2 .....	111
2.3 Die Monoaminylierung in verschiedenen Leberzelllinien .....	113
<b>3 Transkriptionsfaktoren als Substrate für die Monoaminylierung.....</b>	<b>11</b>
3.1 BRN2, NonO und SFPQ sind Substrate von TGM2 <i>in vitro</i> .....	116
3.2 BRN2, NonO und SFPQ inkorporieren Histamin mittels TGM2 <i>in vitro</i> .....	117
3.3 Die Monoaminylierung von BRN2 vermindert die Bindung zum PORE-Motiv.....	118
3.4 Die Monoaminylierung von Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Transkriptionsfaktoren verstärkt die Bindung zum Polyglutamin-bindenden Protein 1 .....	120
3.5 Zelllinien unterschiedlicher Gewebe exprimieren Mitglieder der Familie der Polyglutamin-bindenden Proteine.....	121
<b>4 Glutaminreiche Transkriptionsfaktoren als Substrate für die Monoaminylierung .....</b>	<b>122</b>
4.1 Der Glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB ist ein Substrat von TGM2 <i>in vitro</i> .	122
4.2 CREB wird <i>in vitro</i> TGM2-abhängig mit Serotonin und Histamin modifiziert .....	123
4.3 Die Monoaminylierung von CREB vermindert die Phosphorylierung durch PKA.....	124
4.3 Die Phosphorylierung von CREB durch PKA vermindert dessen Polymerisierung durch TGM2. ....	125
<b>IV Diskussion .....</b>	<b>127</b>
<b>1 Das Fehlen von peripherem Serotonin aufgrund einer TPH1-Defizienz führt zu einem erhöhten Alkoholkonsum.....</b>	<b>127</b>
1.1 <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere nehmen verstärkt Ethanol zu sich .....	127
1.2 Die Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan verringert die erhöhte Ethanolaufnahme der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere .....	131
1.3 Die Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan reduziert das Körpergewicht der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere .....	132
1.4 Die erhöhte Ethanolaufnahme der <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere ist nicht auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen .....	133
1.5 <i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> -Tiere weisen Leberschäden auf, welche durch den kurzzeitigen Ethanolkonsum nicht verstärkt werden .....	134
1.6 Der Einfluss verschiedener biogener Monoamine auf die Proliferation unterschiedlicher Hepatocytzelllinien .....	136
<b>2 Der molekulare Hintergrund der erhöhten Ethanolaufnahme und der gestörten Leberregeneration der <i>Tph1</i><sup>-/-</sup>-Tiere.....</b>	<b>138</b>
2.1 Die periphere Serotonindefizienz führt in der Leber zur Deregulation verschiedener Gene des Ethanolmetabolismus und der Leberregeneration.....	138
2.2 Die Behandlung mit Ethanol führt zu einer kompetitiven Hemmung von ALDH2 und damit zu einem verringerten Abbau von 5-Hydroxyindolacetaldehyd.....	146
2.3 Die Behandlung mit Ethanol und Serotonin erhöht die Expression SP1-abhängiger Gene.....	146
2.4 In Leberzellen werden Proteine dopaminyliert.....	148

---

<b>3 Polyglutaminabschnitt-enthaltende Transkriptionsfaktoren sind Substrate für die TGM-vermittelte Monoaminylierung .....</b>	<b>149</b>
3.1 Polyglutaminabschnitte werden spezifisch und längenunabhängig transamidiert...	149
3.2 Die Monoaminylierung von BRN2 reguliert dessen Bindungskapazität an DNA .....	152
3.3 Polyglutamin-bindende Proteine als Regulatoren der Genexpression.....	153
<b>4 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB ist ein Substrat für die TGM-vermittelte Monoaminylierung .....</b>	<b>156</b>
4.1 Glutaminreiche Abschnitte werden TGM-abhängig transamidiert .....	156
4.2 Die Monoaminylierung und Phosphorylierung von CREB beeinflussen das Ausmaß der jeweils anderen Modifikation.....	157
<b>5 Schlussfolgerung und therapeutischer Ausblick.....</b>	<b>159</b>
<b>V Literatur .....</b>	<b>167</b>
<b>VI Anhang .....</b>	<b>195</b>
<b>A Oligonukleotide.....</b>	<b>195</b>
<b>B Expression ausgewählter Gene in der Leber von <i>Tph1</i><sup>+/+</sup>- und <i>Tph1</i><sup>-/-</sup>-Mäusen .....</b>	<b>199</b>
<b>C Effizienzbestimmung der spezifischen Oligonukleotide für die qPCR .....</b>	<b>213</b>
<b>D Zusammenfassung .....</b>	<b>215</b>
<b>E Abstract.....</b>	<b>216</b>
<b>F Danksagung .....</b>	<b>217</b>
<b>G Lebenslauf.....</b>	<b>218</b>
<b>H Publikationen.....</b>	<b>219</b>
<b>I Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>220</b>
<b>J Abkürzungen .....</b>	<b>221</b>

## I Einleitung

### 1 Der Alkoholkonsum und seine Wirkung auf die Physiologie der Leber

#### 1.1 Die pathophysiologischen Auswirkungen des Alkoholkonsums

Weltweit konsumieren etwa zwei Milliarden Menschen Alkohol, ca. 76 Millionen Menschen leiden unter alkoholbedingten Erkrankungen und 2,5 Millionen sterben pro Jahr an den Folgen dieser Erkrankungen [1]. Damit sind schätzungsweise 9,2 % der weltweiten Erkrankungen auf Alkoholmissbrauch zurückzuführen [2]. Im Allgemeinen werden alkoholische Getränke wegen ihrer psychophysischen und stimmungsverändernden Wirkung konsumiert. In westlichen Nationen haben 10 % der erwachsenen Bevölkerung jedoch einen pathophysiologisch erhöhten Konsum von durchschnittlich mehr als 30 g Alkohol am Tag [3].

Der Missbrauch von Alkohol über einen längeren Zeitraum führt zu Organschäden, die sowohl das Zentralnervensystem (ZNS), das endokrine System, als auch das kardiovaskuläre und gastrointestinale System oder auch die Blut- und Knochenbildung betreffen [3,4]. Die am Besten untersuchte Auswirkung des Alkoholkonsums sind die alkoholbedingten Lebererkrankungen, die morphologische Charakteristika wie Fettleber (*Steatosis hepatis*), Hepatitis, Leberfibrose und -zirrhose bis zum Leberkarzinom beinhalten und eine der Hauptursachen der weltweiten Erkrankungen und Todesfälle bilden [5,6]. Bis zu 90 % der Personen, die täglich Alkohol zu sich nehmen, entwickeln durch vermehrte Lipideinlagerungen der Hepatocyten eine Fettleber (Absch. I.1.2), die sich nach Beendigung des Konsums wieder zurückbilden kann. Personen mit einem langanhaltenden Konsum von 20-80 g Alkohol pro Tag entwickeln zu 40 % eine Fettleberentzündung, die innerhalb von sechs Monaten zum Tode führt. Die restlichen Patienten mit einer Fettleber, die weiterhin exzessiv Alkohol zu sich nehmen, laufen zu 15-20 % Gefahr eine Fettleberzirrhose zu bekommen, die durch eine Akkumulation von Kollagen gekennzeichnet ist. Klinische Studien zeigen, dass in den 48 Monaten nach entsprechender Diagnose 30 % der Patienten mit einer Fettleber, 50 % derjenigen mit Leberzirrhose und zwei Drittel der Patienten mit zusätzlicher alkoholischer Hepatitis versterben [7].

Der Beginn und die Entwicklung einer alkoholbedingten Lebererkrankung ist multifaktoriell, wird jedoch durch den oxidativen Einfluss der chronischen Alkoholaufnahme gefördert. Schon Anfang der 1980er Jahre ermittelten Wissenschaftler einen erhöhten Wert an Pentan, ein flüchtiges Produkt der Peroxidierung von Lipiden, in der Atemluft von Ratten, die 14 Wochen lang eine 18 %ige Ethanollösung zu sich nehmen mussten [8]. Weitere Produkte der Lipidperoxidierung sind Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal, die durch ihre elektrophilen Eigenschaften temporär

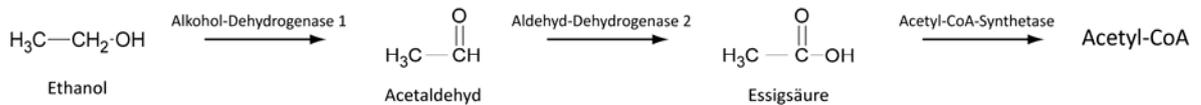
oder permanent mit den nukleophilen Anteilen von Proteinen reagieren können [6]. Zu den Proteinen, die kovalent mit Aldehyden modifiziert und in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, gehören die Hitzeschockproteine (Hsp) 70 und 90, das Leberfettsäure-Bindeprotein (L-FABP), Erk1/2 und eine Protein-Disulfidisomerase. Des Weiteren ist die Menge an L-FABP nach chronischem Ethanolkonsum signifikant verringert, was zu erhöhten Konzentrationen an freien Fettsäuren und damit zu Schäden der Membranen führen kann. Die kovalente Modifizierung mit Acetaldehyd betrifft alle Teile der Leber, wie auch das Gehirn, Darm, Pankreas und Muskel- oder Blutproteine [4]. Obwohl generell alle Proteine modifiziert werden können, scheint es bevorzugte Zielproteine zu geben, zu denen neben den oben genannten Hämoglobin, Albumin, Tubulin, Kollagene, Lipoproteine und Cytochrome gehören.

Bei der Entstehung einer alkoholbedingten Lebererkrankung spielt neben der Lipidperoxidierung weiterhin die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine Rolle, die durch Ethanol und dessen Metaboliten, v.a. Acetaldehyd, induziert werden [4,9], sowie die Aktivierung des angeborenen Immun- und des Komplementsystems, die zur Produktion von entzündungsfördernden Cytokinen, wie dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) führt [10,11]. Außerdem wurde gezeigt, dass die chronische Fütterung mit Ethanol über die Erhöhung der Menge an Fas-Liganden zu einer Aktivierung der Caspase 3 und 8 führt, die als Cystein-Proteasen integrale Bestandteile von apoptotischen Wegen sind [12].

## 1.2 Der Metabolismus und die Metaboliten des Ethanol

Der Abbau von Ethanol verläuft in Säugetieren in einer zweistufigen Reaktion, die durch die hepatischen Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) und Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) realisiert wird [13]. In Säugetieren existieren sechs verschiedene Klassen der ADH, im Menschen werden die Klassen 1-5 exprimiert, während in der Maus die Klassen 1-4 zu finden sind [14]. Mäuse haben ein *Adh*-Gen der Klasse 1 und der Mensch drei *ADH1*-Gene. ALDH wird in Säugetieren in 18 verschiedene Klassen mit insgesamt 37 Mitgliedern eingeteilt, wobei das humane Genom für 19 *ALDH* und etliche Pseudogene kodiert [15]. Hauptsächlich sind am Ethanolabbau die cytosolische ADH1 und die in den Mitochondrien lokalisierte ALDH2 beteiligt. Das erste Zwischenprodukt des Ethanolkatabolismus ist Acetaldehyd, das durch seine Reaktivität an DNA und Proteine bindet und damit den Abbau von Glutathion, die Peroxidation von Lipiden und Schäden an den Mitochondrien fördert, was sich toxisch auf die Hepatocyten auswirkt [16]. Acetaldehyd wird im Anschluss weiter zu Essigsäure umgesetzt, die über die Bildung von Acetyl-CoA in den Citratzyklus eingeschleust werden kann (Abb. 1). Die Essigsäure wird aus der Leber in den Blutkreislauf geschleust, wo sie dann im Herz- und Skelettmuskeln sowie im Gehirn weiter verstoffwechselt

wird. Für Essigsäure selbst ist keine Lebertoxizität bekannt, jedoch fördert sie entzündliche Reaktionen durch eine Hochregulierung entzündungsfördernder Cytokine in Makrophagen [17].

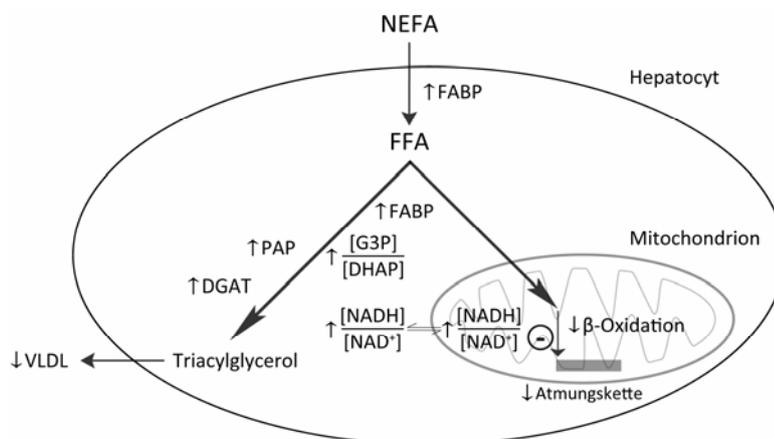


**Abbildung 1: Der Katabolismus von Ethanol im menschlichen Körper.** Ethanol wird in einer zweistufigen Synthese zu Essigsäure abgebaut. Der erste Schritt wird durch Alkohol-Dehydrogenase 1 katalysiert und führt zu der Entstehung von Acetaldehyd, das hauptsächlich für die unangenehmen physiologischen Effekte des Alkoholkonsums verantwortlich ist. Acetaldehyd wird durch Aldehyd-Dehydrogenase 2 in Essigsäure umgewandelt, die als C2-Körper in den Zitratzyklus eingeschleust werden kann. Beide Reaktionen benötigen als Oxidationsmittel Nikotinamadenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ), das dadurch zu  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert wird. Danach wird die Essigsäure mittels Coenzym A (CoA) und Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt.

Es hat sich gezeigt, dass neben soziokulturellen Faktoren zu 50-60 % genetische Faktoren zur Entwicklung eines Alkoholismus beitragen [18]. Diese Faktoren sind neben Mutationen im zentralnervösen Belohnungssystem größtenteils in Polymorphismen zu finden, die Gene des Ethanolmetabolismus betreffen [19]. Dabei sind hauptsächlich *ALDH2* und daneben *ADH1-3* und Cytochrom CYP2E1 betroffen, wie Studien mit asiatischen Populationen zeigen, die überwiegend das Allel *ALDH2\*2* besitzen. Dieses Allel weist eine Punktmutation auf, die auf Proteinebene zu einem Aminosäureaustausch (Glu > Lys) führt und damit das Enzym inaktiviert. Europäische Populationen weisen zu 95 % das Allel *ALDH2\*1* auf. Individuen mit *ALDH2\*2* zeigen nach Ethanolkonsum einen erhöhten Spiegel an Acetaldehyd im Blut, der zu dysphorischen Effekten wie Errötung, Anstieg der Pulsrate, Hypotonie, Kopfschmerz und Übelkeit und damit zu einer Aversion gegen den Alkoholkonsum führt [20,21]. Studien mit Versuchstieren haben gezeigt, dass die siRNA-vermittelte *Aldh2*-Reduktion die freiwillige Ethanolaufnahme um 50-60 % senkt [22,23]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Alkoholiker mit *ALDH2\*2* ein größeres Risiko haben eine alkoholbedingten Lebererkrankung zu bekommen [24]. Eine weitere gut untersuchte Polymorphie ist die Genvariante *ADH1B\*2*, die eine hundertfach erhöhte Aktivität gegenüber *ADH1B\*1* zeigt und ebenfalls gegen Alkoholismus schützt [25,26]. Menschen mit *ADH1B\*2* weisen keinen erhöhten Wert an Acetaldehyd im Blut auf. Jedoch haben Ratten, welche die Genvariante des analogen Enzyms exprimieren, einen Anstieg der hepatischen ADH-Aktivität um 90 %, nach Ethanolgabe einen fünffach erhöhten Wert von Acetaldehyd im Blut und zeigen eine um die Hälfte reduzierte Ethanolaufnahme [27]. Die kombinierte Expression von *ADH1B\*2* und *ALDH2\*2* in Versuchstieren führte ebenfalls zu einem Rückgang der freiwilligen Ethanolaufnahme um 60 % [13].

Neben der toxischen Wirkung des Acetaldehyds, die auch die typischen „Katersymptome“ hervorruft, führen beide Schritte des Abbaus von Ethanol in der Zelle zu einem erhöhten Level der reduzierten Form des Nikotinamadenin dinukleotids ( $\text{NADH}$ ) (Abb. 2). Dieser Anstieg führt durch

erhöhte Konzentrationen von Glycerol-3-Phosphaten zu einer Stimulation der Triglyceridsynthese aus freien Fettsäuren (FFA) und einer Inhibition der Lypolyse [1,28]. Außerdem verursachen die gesteigerten NADH-Mengen eine Inhibition der  $\beta$ -Oxidation und Störung verschiedener Citratzyklusprozesse, welche vermutlich auf eine veränderte Aktivität der Atmungskette und genauer des Komplexes I (NADH-Dehydrogenase) und der Ubiquinone zurückzuführen sind [29]. Die daraus resultierende Akkumulation der Triglyceride, aber auch Phospholipide und Cholesterol, in den Hepatocytten führt zur Einlagerung der Lipide in Vesikeln und damit zur Ausbildung einer Fettleber (Absch. I.1.1). Zusätzlich dazu führt der gesteigerte NADH-Spiegel zu einer Reduktion des Pyruvats, was zu einem Anstieg von Laktat führt, wodurch die Kollagensynthese in Myofibroblasten stimuliert und eine Zirrhose induziert wird.



**Abbildung 2: Die biochemischen Effekte von Ethanol auf den Fettsäuremetabolismus.** Der oxidative Abbau von Ethanol führt in den Hepatocytten zu einem erhöhten Spiegel der reduzierten Form des Nikotinamadenindinukleotids (NADH) gegenüber der oxidierten Form  $\text{NAD}^+$ . Dieser bewirkt zum einen in den Mitochondrien eine Inhibition der  $\beta$ -Oxidation und der Atmungskette. Zum anderen erhöht sich im Cytosol die Ratio von Glycerol-3-Phosphat (G3P) zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), was eine verstärkte Veresterung von freien Fettsäuren (FFA) zu Triacylglycerol zur Folge hat. Als Konsequenz wird von der Leber weniger *very-low-density* Lipoprotein (VLDL) sekretiert, was wiederum die hepatischen Triglyceridlevel erhöhen kann. Weiterhin könnte Ethanol über eine Aktivierung oder Erhöhung der Phosphatidat-Phosphohydrolase (PAP)- und Diacylglycerol-Acyltransferase (DGAT)-Spiegel, die beide Schlüsselenzyme in der Triglyceridsynthese darstellen, einen Einfluss auf die Erhöhung der Triglyceridlevel nehmen. Der Konsum von Ethanol erhöht außerdem die Menge des Fettsäure-bindenden Proteins (FABP), das die Veresterung von FFA fördert. Nicht-veresterte FFA (NEFA). Nach [29].

### 1.3 Die Leberzellproliferation im physiologischen und pathophysiologischen Kontext

Die Leber ist durch ihre zentrale Rolle bei der Synthese, Speicherung und Umverteilung von Nährstoffen wie Kohlenhydraten, Fetten und verschiedener Vitamine eines der wichtigsten Organe des Metabolismus [30,31]. Zusätzlich kommt der Leber eine entgiftende Funktion zu, die mit einer metabolischen Umformung von hydrophoben Substanzen zu hydrophilen, ausscheidbaren Molekülen einhergeht. Zu diesen Substanzen gehören Gallenfarbstoffe und Steroidhormone, aber auch Xenobiotika und Medikamente, Drogen oder Pestizide, die über die Galle und

die Blase ausgeschwemmt werden können. Die Leber besteht zu 80 % aus den parenchymalen Zellen (Hepatocyten), die den Großteil der genannten Aufgaben übernehmen [32]. Die nicht-parenchymalen Zelltypen (NPC) der Leber sind Endothelzellen, Kupfferzellen und Ito-Zellen, wobei letztere auch als hepatische Sternzellen (HSC) bezeichnet werden [33,34]. Kupfferzellen gehören zur Gruppe der Makrophagen und machen 20 % der NPC aus. 30 % der NPC sind HSC, die der Fett- und Vitamin A-Speicherung dienen und die Retinoidhomöostase regulieren [35]. Hepatocyten sind langlebig und überwiegend in der G<sub>0</sub>-Phase arretiert [36]. Als Reaktion auf Infektionen oder toxische Schäden behalten sie jedoch die Fähigkeit zur Proliferation bei. So aktivieren 95 % der Hepatocyten zeitnah nach einer partiellen Hepatektomie synchronisiert den Wiedereintritt in den Zellzyklus und können dabei bis zu 80 Replikationsrunden erreichen [37–39]. Die vor dem Verlust vorhandene Lebermasse wird so innerhalb von 5-7 Tagen nach der Entfernung wieder hergestellt [40].

Die Leberregeneration erfordert zahlreiche Wachstumsfaktoren, zu denen der *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), der *Epidermal Growth Factor* (EGF), mehrere *Transforming Growth Factors* (TGF), Glukagon, Insulin und der *Insulin-like Growth Factor* (IGF) gehören [31]. HGF, EGF und TGF $\alpha$  stimulieren dabei die DNA-Synthese, das Fortschreiten des Zellzyklus und die Proliferation der Hepatocyten [33]. EGF und TGF $\alpha$  sind zu 35 % homolog und binden beide den EGF-Rezeptor (EGFR), während HGF den HGF-Rezeptor (MET) bindet. TGF $\alpha$  wirkt hauptsächlich über einen autokrinen Mechanismus, der durch EGF oder TGF $\alpha$  selbst stimuliert wird. EGF ist ein endokriner Faktor, der von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet wird. HGF wird nicht von Hepatocyten selbst produziert, jedoch von anderen Leberzelltypen, wie Endothelzellen, HSC und Kupfferzellen [41].

Neben der Proliferation haben die Wachstumsfaktoren EGF, HGF und TGF $\alpha$  auch einen Einfluss auf die Angiogenese und die Morphologie, Differenzierung und die Beweglichkeit der Zellen. Bevor die Hepatocyten auf Proliferationssignale reagieren, müssen sie aktiviert werden [42]. Der Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein Beispiel eines Aktivators, der zum Wiedereintritt in den Zellzyklus führt und die Zellen für die genannten Wachstumsfaktoren sensibilisiert [43]. TNF stimuliert in der Leber verschiedene Signalwege, die zur Aktivierung von NF $\kappa$ B, sowie auch ERK- und JNK-Kinasen führen. Auch Cytokin-unabhängige Signale, wie die Behandlung mit freien Aminosäuren nach einer Protein-defizienten Ernährung oder mit Kollagenase, die Zell-Zell-Kontakte zerstört, beschleunigt den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und die Antwort auf bestimmte Wachstumsfaktoren [44,45]. Die Aktivierung der Hepatocyten durch Protein-defiziente Ernährung wird von der Expression der Gene *p53*, *Jun* und *Myc* begleitet, während *H-Ras* erst später begleitend zur DNA-Synthese exprimiert wird. Dieses steht teilweise im Kontrast zu der Beobachtung, dass nach einer partiellen Hepatektomie *Fos*, *Jun*, und *Myc* gefolgt von *p53* und *H-Ras* exprimiert werden [46]. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass der Verlust der Signal-

weiterleitung durch die Integrin-abhängige Kinase die Hepatocytenproliferation und Leberregeneration verstärkt [47].

In einem Modell zur Untersuchung der Leberregeneration in Abwesenheit von Cytokinen, bei welchem primäre Hepatocyten des Mausstammes C57BL/6N auf einer Kollagenschicht kultiviert werden, zeigt sich eine verminderte Expression von metabolischen Genen und parallel dazu eine gesteigerte Expression von Genen, die über MAPK-Signalwege reguliert werden [40]. Diese letzteren Gene weisen ein gehäuftes Auftreten von DNA-Bindestellen der Transkriptionsfaktoren (TF) ETF (*TEA domain family member 2*), E2F1 (E2F TF 1) und SP1 (*Specificity Protein 1*) auf, die wiederum über MAPK-Signalwege aktiviert werden. Zusätzlich dazu gibt es eine zeitabhängige Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 und eine erhöhte DNA-Synthese in den Zellen. Übereinstimmend mit den *in vitro*-Ergebnissen zeigen auch Hepatocyten von mit Chloroform behandelten Mäusen eine Phosphorylierung von ERK1/2, eine gesteigerte Expression von *E2f1*, erhöhte nukleäre Vorkommen von ETF und SP1 und eine damit verbundene veränderte Genexpression von ETF-, E2F1- und SP1-Zielgenen.

Die Regulation des hepatischen Wachstums in der G<sub>1</sub>-Phase erfolgt über TGF $\alpha$ , das über einen autokrinen Mechanismus die Replikation der Hepatocyten stimuliert, während TGF $\beta$ 1 als parakriner Inhibitor fungiert, der die DNA-Synthese der Zellen bzw. den Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase blockiert [45]. Die Stimulation durch TGF $\alpha$  ist dabei effektiver als die durch EGF. Daher sind die Hepatocyten zum Teil abhängig von den NPC der Leber, welche die Hauptquelle der Wachstumsfaktoren Interleukin (IL) 6, TNF, HGF und dem Heparin-bindenden EGF darstellen [48]. Neben TGF $\alpha$  wird auch HGF für den Übergang aus der G<sub>1</sub>- in die S-Phase benötigt. Genauere *in vivo*-Analysen waren bisher nicht möglich, da sowohl *Hgf*-, als auch *Egfr*-defiziente Tiere nicht lebensfähig sind. EGFR bindet sowohl TGF $\alpha$  als auch EGF. *Tgfa*-defiziente Tiere sind lebensfähig und haben keine Defekte der Leberregeneration, was über die mögliche Kompensation weiterer EGFR-Liganden erklärt werden könnte [49]. Neben den genannten Wachstumsfaktoren sind auch Regulatoren des Zellzyklus entscheidend für die Proliferation der Hepatocyten. So wird der Übergang der G<sub>1</sub>- in die S-Phase durch die Anreicherung von Cyclin E in Bezug auf Cyclin D1 bestimmt. BCL2 kann diesen Übergang und damit den Zellzyklus in der sich regenerierenden Leber verlangsamen [50]. Analog dazu führt eine verminderte Menge an SKP2, der Komponente einer Ubiquitinligase, zu einer Akkumulierung von Cyclin E und dem Zellzyklusinhibitor p27/KIP1, was zu einer Inhibition der Mitose, jedoch nicht der DNA-Replikation in Hepatocyten führt, wie Daten von *Skp2*-defizienten Mäusen zeigen [51,52].

Obwohl Hepatocyten die erste und wichtigste Quelle an proliferierenden Zellen zur Gewebereparatur darstellen, gibt es in der Leber auch eine Reserve an Stammzellen, die bei Bedarf

aktiviert und in unterschiedliche Zelltypen des Verdauungstraktes differenzieren können [53]. Diese als ovale Zellen oder hepatitische Vorläuferzellen (HPC) bezeichneten Stammzellen befinden sich in den terminalen Gallengängen und werden nur dann aktiv, wenn die Regeneration der Hepatocyten inhibiert oder erschöpft ist [32,39]. Die HPC werden z.B. in späten Stadien der Leberzirrhose aktiviert, wenn durch die beeinträchtigte Expression und Induktion von Cyclin D1 und p21 der Zellzyklus der Hepatocyten während der G<sub>1</sub>-Phase inhibiert wird [54,55]. Weiterhin wurde gezeigt, dass in einer Vielzahl von Lebererkrankungen HPC aktiviert werden und deren Anzahl im Gewebe mit der Schwere der Krankheit korreliert [56,57]. Damit übereinstimmend ist die Replikationsfähigkeit von Hepatocyten bei zirrhotischen Stadien verschiedener Lebererkrankungen herabgesetzt, was mit einer Verkürzung der Telomere einhergeht [58]. Neben dieser Seneszenz der Zellen spielt allerdings auch die chronische Entzündung der Leber, die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren und reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies eine Rolle. Eine alkoholbedingte oder fettinduzierte präzirrhotische Leber zeigt keine Aktivierung der HPC [31]. Hingegen konnten in 37 % der untersuchten zirrhotischen Lebern und in 25 % der alkoholbedingten ausgebildeten Fettlebern HPC gefunden werden. In Patienten mit alkoholischer Hepatitis findet man im Vergleich zur gesunden Leber oder einer chronischen Hepatitis C eine erhöhte Expression der HPC-Marker EPCAM, Prominin 1 und Keratin 7 [59]. Außerdem zeigen Hepato- und Cholangiokarzinome eine erhöhte Anzahl von Zellen, die die spezifischen Marker der HSC zeigen [60]. Auch Stammzellen des Knochenmarks können zu Hepatocyten und HSC transdifferenzieren, dieses Ereignis ist jedoch selten und ineffektiv [39]. Interessanterweise ist die Proliferation der HPC eng mit HSC assoziiert, was darauf hindeutet, dass diese NPC das Wachstum der HPC durch Zell-Zell-Kontakte und v.a. die Sekretierung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen fördert [61]. Weiterhin ist schon längere Zeit bekannt, dass Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) ein potentes Mitogen ist und übereinstimmend mit dieser Wirkung hat es zusammen mit EGF auch einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation von Hepatocyten [62,63]. *In vivo*-Studien haben gezeigt, dass 5-HT nach einer partiellen Hepatektomie entscheidend für die Leberregeneration ist und diese Wirkung zum Teil über die 5-HT-Rezeptoren 2A und 2B vermittelt wird [19].

In der fibrotischen Leber gibt es eine erhöhte Expression des *Connective tissue growth factor* (CTGF) durch Hepatocyten, die durch eine verstärkte Aktivität von TGF $\beta$  hervorgerufen wird [64]. In diesem Zusammenhang bewirkt das hepatoprotektive Adipokin Adiponektin eine negative Regulation von CTGF, die über den Adiponektinrezeptor 2 (ADIPOR2) und den *Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$*  (PPAR $\alpha$ ) vermittelt wird. Eine Behandlung von primären Hepatocyten mit Adiponektin führt außerdem zu einer reduzierten Phosphorylierung der TGF $\alpha$ -Effektoren SMAD2 und SMAD3. Im Allgemeinen reduziert Adiponektin Entzündungsreaktionen

und die Fettspeicherung in der Leber und verstärkt außerdem die Fibrinolyse [54]. Auch in der Fettleber finden sich verstärkt Entzündungen und erhöhte Mengen an TGF $\beta$  und CTFG, die durch die stimulatorische Wirkung auf die Synthese der extrazellulären Matrix und durch die Aktivierung von HSC die Ausbildung einer Fibrose fördert [66]. *In vivo*-Studien bestätigen die Rolle der Cytokine CTGF und TGF $\beta$  bei der Entwicklung von fibrotischen Geweben. So führt die intra-peritoneale Gabe beider Cytokine zu einer Fibrose der Leber und Niere in einem murinen Fibrosemodell [67], während der *Knockdown* von CTFG die Ausbildung einer Leberfibrose verhindert [68]. HSC werden in der Leber als Hauptquelle der Kollagensynthese betrachtet [69]. Nach der Schädigung der Leber werden HSC aktiviert und in Myofibroblasten transformiert, die kein Retinol und dafür verstärkt Kollagene exprimieren [34]. Durch diesen fördernden Einfluss auf die Bildung der extrazellulären Matrix und die Sekretion von TGF $\beta$  fördern die HSC die Ausbildung einer Fibrose.

## 2 Die vielfältigen physiologischen Funktionen biogener Monoamine

### 2.1 Biogene Monoamine als Neurotransmitter und Gewebshormone

Biogene Monoamine erfüllen sowohl als Neurotransmitter, als auch als Gewebshormone zahlreiche Aufgaben und sind an der Regulation zahlreicher grundlegender Körperfunktionen beteiligt, welche die Regulation des Schlafes, Fortpflanzung, Appetit, Körpertemperatur, metabolische Vorgänge bis zu kognitive Funktionen, Gemütszustände und Verhalten einschließen [70–73]. Biogene Monoamine sind Derivate von Aminosäuren und werden in kurzen Synthesewegen aus diesen mittels der L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) gebildet. Zu den biogenen Aminen, die aus aromatischen Aminosäuren synthetisiert werden, gehören 5-HT, Melatonin, Histamin (HA), die Katecholamine Dopamin (DA), Noradrenalin (NE) und Adrenalin, Thyronamin und auch Spurenamine wie  $\beta$ -Phenylethylamine, Tyramin und Tryptamin. Biogene Amine, die von nicht aromatischen Aminosäuren stammen, sind u.a.  $\beta$ -Alanin, Aminoaceton,  $\gamma$ -Aminobuttersäure oder Ethanolamin. Neben der direkten Wirkung als Hormone sind biogene Monoamine häufig Vorstufen für die Synthese von Alkaloiden, Hormonen, Coenzymen, Vitaminen oder Phospholipiden [74,75].

### 2.2 Das serotonerge System

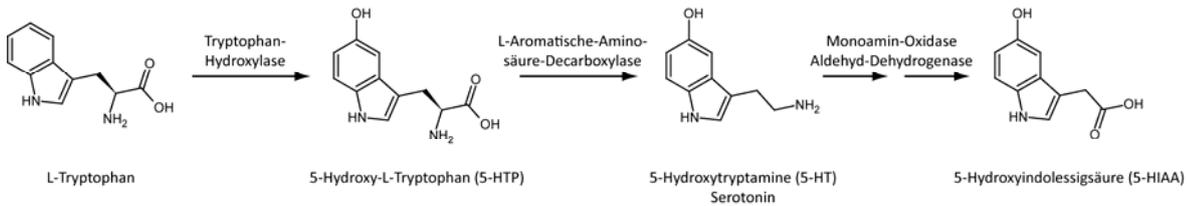
Das biogene Monoamin 5-HT übernimmt im Körper vielfältige Funktionen. Zentralnervös wirkt 5-HT als klassischer Neurotransmitter, während es in der Peripherie des Körpers als Gewebshormon oder auch Wachstumsfaktor v.a. während der frühen Embryonalentwicklung fungiert

[76,77]. Über die 5-HT-Sekretion der Raphe-Kerne des Mittelhirns und Neuronen des Hirnstamms werden die zirkadianen und neuroendokrinen Rhythmen gesteuert, die wiederum den Schlaf, den Appetit oder die Reproduktion lenken [70,78]. Außerdem nimmt 5-HT hier Einfluss auf Stimmungszustände, Erinnerung, Lernen, kognitive und motorische Funktionen. Störungen der serotonergen Neurotransmission führen zu psychischen Krankheiten, wie Depression, bipolare Erkrankungen, Angstzustände, aggressives und suizidales Verhalten oder Autismus [79–81]. Aber auch Migräne- und Suchterkrankungen sind auf Beeinträchtigungen des serotonergen Systems zurückzuführen [82]. Außerhalb des ZNS wird 5-HT hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen des Zwölffingerdarms synthetisiert und in den Thrombocyten gespeichert [19,83]. 5 % des 5-HT verbleibt frei im Serum, wodurch es schnell direkt an den Wirkort gelangen kann. Das aus dem Darm stammende 5-HT macht 95 % des gesamten 5-HT des Körpers aus [78]. Zusätzlich sind Niere, Lunge, Endothelzellen der pulmonären Gefäße, sowie die vaskuläre glatte Muskulatur in der Lage Tryptophan zu 5-HT umzusetzen [84,85]. Das periphere 5-HT ist an der Blutgerinnung, Immunantworten, Darmtätigkeit, Insulinausschüttung und an der Regulation des Lipid- und Glukosestoffwechsels beteiligt [86–88]. Außerdem spielt 5-HT eine entscheidende Rolle bei der Modulation des Blutdruckes [89]. Diese Funktion gab 5-HT bei der Entdeckung auch den Namen als Substanz des Serums, die den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und damit den Blutdruck bestimmt [85]. Es hat sich weiterhin gezeigt, dass peripheres 5-HT die Knochenmasse reguliert, indem es die Proliferation von Osteoblasten und damit die Knochenbildung inhibiert [78].

Neben den direkten Wirkungen des Tryptophanderivats 5-HT wird das Molekül auch in der Epiphyse und der Retina u.a. durch die N-Acetylserotonin-O-Transferase zu Melatonin umgesetzt, das im Suprachiasmatischen Nukleus des Hypothalamus den Schlaf-Wach-Rhythmus reguliert [90]. Außerdem kann Tryptophan auch direkt durch die AADC decarboxyliert werden [91]. Das Produkt Tryptamin dient als Ausgangsstoff diverser Pflanzenstoffe und kann als Neuromodulator wirken.

### **2.3 Die Dualität des serotonergen Systems**

Die Biosynthese von 5-HT verläuft in einer zweistufigen Reaktion (Abb. 3). Im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion wird die Aminosäure Tryptophan von der Tryptophan-Hydroxylase (TPH) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) umgesetzt [84]. Der zweite Schritt der Synthese wird von AADC katalysiert und resultiert in 5-HT [71]. Der Abbau des 5-HT verläuft wiederum in einer zweistufigen Reaktion, bei der Monoamin-Oxidase (MAO) A bzw. MAO B und ALDH2 das 5-HT zu 5-Hydroxyacetaldehyd (5-HIAL) und schließlich zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) umsetzen [92]. MAO A hat jedoch die höhere Affinität zu 5-HT und wird deshalb als das hauptsächlich am Abbau beteiligte Enzym betrachtet [93]. 5-HIAA wird über die Niere ausgeschieden und dient der indirekten Bestimmung der 5-HT-Konzentration im Organismus.



**Abbildung 3: Die Biosynthese und der anschließende Abbau von Serotonin.** Serotonin (5-HT) wird in einer zweistufigen Synthese aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan synthetisiert. Der erste Schritt wird durch Tryptophan-Hydroxylase (TPH) unter Verwendung des Kofaktors Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) katalysiert. Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) setzt 5-HTP unter Abspaltung von  $CO_2$  zu 5-HT um. Der Abbau von 5-HT erfolgt ebenfalls in einer zweistufigen Reaktion. Dabei setzt Monoamin-Oxidase (MAO) unter Bildung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid 5-HT zu 5-Hydroxyindolaldehyd (5-HIAL) um. Die Nachfolgereaktion wird durch Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) unter Verwendung von  $NAD^+$  katalysiert und resultiert in dem Abbauprodukt 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA).

Im Körper existieren zwei Isoformen der TPH, von der die Isoform TPH1 in der Peripherie und dort vorwiegend im Darm, Epiphyse, aber auch in der Milz, Thymus und Mastzellen exprimiert wird [84,94]. Die Isoform TPH2 wird überwiegend im serotonergen Rapheneuronen des Hirnstamms exprimiert, findet sich jedoch auch im Hoden [77]. Durch das Vorhandensein zweier TPH-Isoformen inner- und außerhalb des ZNS und der Tatsache, dass 5-HT nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, entsteht eine Trennung der zentralnervösen und peripheren 5-HT-Pools und damit eine Dualität des serotonergen Systems. In Vertebraten existieren die Gene für beide Isoformen seit 500-550 Mio. Jahren. *TPH1* liegt beim Menschen auf Chromosom 11 und bei der Maus auf Chromosom 7 [83,95]. *TPH2* liegt auf dem humanen Chromosom 12 und dem murinen Chromosom 10. TPH1 und TPH2 sind zu 71 % identisch, unterscheiden sich jedoch stark in der N-terminalen regulatorischen Domäne.

*Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben abhängig vom betrachteten Gewebe und der Detektionsart eine 90-99 %ige Reduktion der peripheren 5-HT-Spiegel, die auch die Epiphyse einschließt, jedoch unveränderte 5-HT-Spiegel im Gehirn [72,83,96]. Die Tiere sind ohne Supplementierung lebensfähig und fruchtbar, entwickeln sich normal und erscheinen unter SPF-Bedingungen (*spezifisch pathogen frei*) gesund und unauffällig [83,95]. Jedoch zeigen sich phänotypische Abweichungen. So haben *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse verlängerte Blutungszeiten durch eine beeinträchtigte Thrombocytenadhäsion und eine gestörte Insulinsekretion und damit einen diabetischen Phänotyp. Außerdem haben *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere ein höheres Gewicht als Wildtypiere des selben Stammes, was auf eine erhöhte Futteraufnahme zurückzuführen ist [86,87]. Die *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen eine makrocytische Anämie, die mit einer ineffektiven Erythropoese einhergeht. Dieses führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Erythrocyten für eine Phagocytose durch Makrophagen und einer Halbierung der Lebenszeit *in vivo* [76]. *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere haben ein vergrößertes Herz, was zu einer Kardiomyopathie führt und zeigen eine verschlechterte Osteoklastogenese [72,97]. Weiterhin zeigt sich nach einer partiellen

Hepatektomie in den Tieren ohne peripheres 5-HT eine verschlechterte Regenerationsfähigkeit der Leber [19].

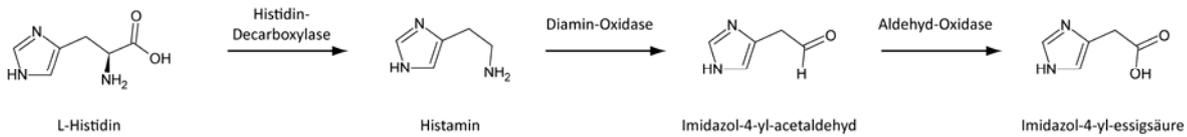
*Tph2<sup>-/-</sup>*-Mäuse sind lebensfähig und haben im adulten Stadium keine erhöhte Lethalität [80]. Abgesehen von einem verringerten Körpergewicht zeigen *Tph2<sup>-/-</sup>*-Tiere keine Entwicklungsdefekte oder veränderte Gehirnstrukturen. Es hat sich gezeigt, dass das Fehlen eines zentralnervösen serotonergen Systems dazu führt, dass männliche *Tph2<sup>-/-</sup>*-Tiere bei der Paarung keine eindeutige Geschlechterpräferenz aufweisen [98]. *Tph2<sup>-/-</sup>*-Tiere haben um 70-97 % verringerte 5-HT-Spiegel im Gehirn, wobei die Spiegel anderer Neurotransmitter unverändert vorliegen [99]. Die 5-HT-Menge in der Peripherie ist in den Tieren ebenfalls unverändert. Trotzdem zeigen *Tph2<sup>-/-</sup>*-Tiere nur geringe Verhaltensabweichungen, die sich in einer leicht verstärkten Angst ausdrücken. Zusätzlich haben die Tiere verlängerte Schlafphasen, eine gestörte Atmung, eine veränderte Körpertemperatur und niedrigeren Blutdruck als Wildtyptiere. Weiterhin hat sich gezeigt, dass *Tph2<sup>-/-</sup>*-Tiere eine 50 %ige Lethalität während der ersten vier Lebenswochen aufweisen, die auf eine gestörte Brutpflege durch die Muttertiere zurückzuführen ist [100].

## 2.4 Weitere biogene Monoamine

Auch HA und die Katecholamine DA, NE und Adrenalin übernehmen vielfältige Funktionen innerhalb und außerhalb des ZNS. HA wird aus Histidin mittels der Histidin-Decarboxylase gebildet [101]. Der Abbau wird über die Enzyme Diamin-Oxidase und Histamin-Methyltransferase realisiert (Abb. 4) [102]. Das zentralnervöse HA wird in den histaminergen Neuronen des hinteren Hypothalamus gebildet und in den Zellsomata und Axonen gespeichert [103]. Eine weitere Quelle bildet das HA aus Mastzellen, welche die Blut-Hirn-Schranke überwinden können. Im ZNS ist HA an diversen Gehirnfunktionen beteiligt, wobei es in wechselseitige Interaktion mit anderen Neurotransmittersystemen tritt [103]. HA ist hierbei an der Regulation des Appetits, des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Körpertemperatur, von Aktivitätsmustern und in Lern- und Gedächtnisprozessen involviert. Außerdem scheint auch ein Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und Entzündungen von Neuronen zu bestehen [104].

Außerhalb des ZNS spielt HA eine wichtige Rolle im Immunsystem, wo es v.a. in Mastzellen und Eosinophilen Zellen an der Abwehr von Parasiten und damit auch an dem Krankheitsbild von Allergien und am anaphylaktischen Schock beteiligt ist. Neben den Mastzellen, die HA in cytosolischen Granula speichern und nach Stimulierung durch Exocytose freigeben, sind die Enterochromaffinen Zellen des Magens, Basophile Zellen und Thrombocyten Quellen der HA-Synthese in der Peripherie [101]. Weiterhin findet sich HA im Darm, Lunge, Bindegewebe und in der Haut [102,103]. Weitere Funktionen des HA außerhalb des ZNS ist der Einfluss auf die Herzrate, den

Blutdruck, die Kontraktionen des Uterus, die Stimulation der Sekretion der Magensäure, Übelkeit und die Aktivierung der glatten Gefäßmuskulatur des Darms und der Atmungsorgane.



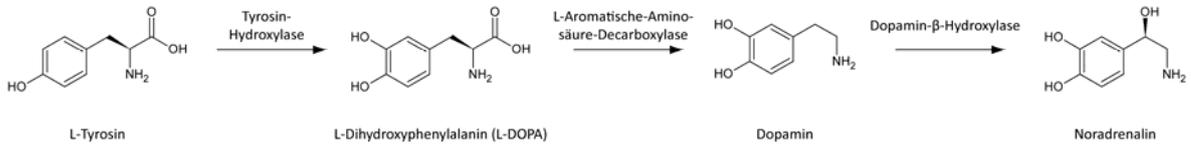
**Abbildung 4: Die Biosynthese des biogenen Monoamins Histamin und dessen anschließender Abbau in der Peripherie.** Histamin wird mittels Histidin-Decarboxylase aus der Aminosäure Histidin unter Abspaltung eines  $\text{CO}_2$ -Moleküls synthetisiert. In der Peripherie erfolgt der Abbau des Histamins über Diamin-Oxidasen und Aldehyd-Oxidasen und die gezeigten Zwischenstufen. Die Imidazolylessigsäure kann nach Ribosylierung über die Nieren ausgeschieden werden. Im Zentralnervensystem wird Histamin überwiegend durch N-Methylierung inaktiviert (nicht gezeigt). Die Methylierung wird durch die Histamin-N-Methyltransferase katalysiert und resultiert in N-Methylhistamin. Dieses wird in mehreren Schritten mittels MAO, Diamin-Oxidasen und Aldehyd-Oxidasen oxidativ zu N-Methylimidazolylessigsäure umgesetzt.

Die Katecholamine DA, NE und Adrenalin werden allesamt aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert (Abb. 5). Tyrosin wird durch Tyrosin-Hydroxylase zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) umgewandelt, das von DOPA-Decarboxylase zu DA umgesetzt wird [105]. Im Gehirn erfüllt DA vielfältige Aufgaben als Neurotransmitter, wobei es motorische und endokrine Funktionen, Emotionen, Antrieb, Aufmerksamkeit, das Belohnungssystem, Lernprozesse und den Appetit kontrolliert [106,107]. Generell wirkt DA im ZNS dadurch, dass es relativ langsam die schnelle Neurotransmission durch Glutamat und GABA moduliert.

In der Peripherie beeinflusst DA die Geruchswahrnehmung, das Immunsystem, kardiovaskuläre Funktionen, wie den Blutdruck, die Sekretion verschiedener Hormone, die Erektion und Ejakulation des Mannes, Nierenfunktionen und die Beweglichkeit des Darms. Hormone, deren Ausschüttung von DA beeinflusst wird, sind u.a. Prolaktin, Endothelin, Renin, Oxytoxin, Proopomelanocortin, Vasopressin und auch andere Katecholamine [108,109]. In der Tat stammt ein Großteil des DA, das nicht zu NE umgesetzt wird, aus der Peripherie. Es wird dort im Verdauungstrakt und der Niere synthetisiert, wo es autokrin und parakrin wirkt und z.B. die Natriumausscheidung der Niere oder die Säuresekretion des Magens reguliert [110,111]. Pathophysiologisch ist DA an Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington (HD), Schizophrenie, dem Tourettesyndrom und Hyperprolaktinämie beteiligt, wobei Agonisten und Antagonisten des DA-Rezeptors und der Vorläufer der DA-Biosynthese L-DOPA erfolgreich zur Milderung dieser Erkrankungen eingesetzt werden [112].

Des Weiteren kann DA durch die DA- $\beta$ -Hydroxylase zu NE umgesetzt werden [113]. Die Synthese von NE findet vorwiegend in den postganglionären Neuronen des Sympathikus statt, die verschiedene Organe innervieren, aber auch im Nebennierenmark. Noradrenerge Neuronen finden sich auch in weiten Teilen des ZNS, wobei sie aus dem *Locus coeruleus* des Hirnstammes hervorgehen. Adrenalin wird durch N-Methylierung von NE über die katalytische Aktivität der Methyl-

Transferase synthetisiert. Die Umwandlung von NE zu Adrenalin wird durch Kortison gefördert, findet in den adrenergen Neuronen des ZNS und in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks statt, von wo es in den Blutkreislauf abgegeben wird [114].



**Abbildung 5: Die Biosynthese der Katecholamine Dopamin und Noradrenalin aus L-Tyrosin.** Dopamin wird in einer zweistufigen Synthese aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert. Der erste Schritt wird durch die Tyrosin-Hydroxylase unter Verwendung des Kofaktors  $BH_4$  katalysiert und führt zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). AADC setzt L-DOPA unter Abspaltung von  $CO_2$  zu Dopamin um. In einem weiteren Schritt wird Dopamin durch Hydroxylierung mittels der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase und dem Kofaktor Ascorbinsäure zu Noradrenalin. Noradrenalin kann unter Verwendung von S-Adenosylmethionin mittels des Enzyms Noradrenalin-N-Methyl-Transferase in Adrenalin umgewandelt werden (nicht gezeigt).

Im Allgemeinen ist das adrenerge System zur Erhöhung der Leistungsfähigkeit bei psychischer und physischer Belastung ausgelegt. Es vermittelt daher alle notwendigen physiologischen Effekte, die für den sogenannten Flucht- und Angriffsreflex benötigt werden. Dazu gehören v.a. die Steigerung des Blutdrucks und der Herzfrequenz, aber auch die Mobilisierung von Energie durch eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels und der Atemfrequenz und eine verbesserte Aufmerksamkeit durch die Wirkung von NE im ZNS [115]. Dieses geschieht über eine verbesserte Aktivität der glutaminergen Neuronen im präfrontalen Kortex, wodurch eine verbesserte kognitive Leistung erreicht wird.

Des Weiteren steigert NE die Aggregation der Thrombocyten und supprimiert die Insulinsekretion durch die Inselzellen des Pankreas [116,117]. Der Abbau von NE und Adrenalin wird je nach Zelltyp entweder über die Methylierung durch Katechol-O-Methyltransferase oder die Desaminierung durch MAO eingeleitet. Generell werden 60 % der im Blutstrom zirkulierenden Katecholamine von der Leber und Niere aufgenommen [111]. Hierbei handelt es sich größtenteils um DA und Adrenalin, die von der Nebenniere ausgeschüttet wird. NE wird nach der Ausschüttung zu 90 % von den Neuronen, aus welchen es stammt, wieder aufgenommen. Interessanterweise sind Tyrosin-Hydroxylase- und DA- $\beta$ -Hydroxylase-defiziente Mäuse im Gegensatz zu TPH-defizienten Tieren nicht lebensfähig und sterben während der frühen Embryogenese. Eine Supplementierung mit Dihydroxyphenylserin, welches eine NE-Synthese ohne DA- $\beta$ -Hydroxylase erlaubt, führt zur Geburt lebender Tiere, welche aber nur wenige Wochen überleben. Tyrosin-Hydroxylase-defiziente Tiere überleben nur, wenn die Tyrosin-Hydroxylasefunktion in den noradrenergen Zellen wieder hergestellt wird [77].

## 2.5 Die Signalvermittlung durch biogene Monoamine - Rezeptoren und Transporter

### 2.5.1 Die Familie der Serotoninrezeptoren

Für 5-HT sind 16 verschiedene 5-HT-Rezeptoren (5HTR) bekannt, die je nach Struktur oder Funktionen in sieben verschiedene Klassen eingeteilt werden [77]. Alle bekannten 5HTR sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), mit Ausnahme von 5HTR3, der einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal darstellt [93]. Die 5HTR werden in diversen Geweben exprimiert, die vom Darm bis zum ZNS reichen und endokrine, kardiovaskuläre oder immunologische Gewebe einschließen [73]. Im Gehirn existieren alle bekannten Subtypen, obwohl *5HTR4* hauptsächlich im Darm und *5HTR2B* in Herz und Magen exprimiert wird [72].

Im ZNS ist 5HTR1A an aggressiven und sozialen Verhaltensweisen beteiligt. Umso geringer die Expression oder Affinität der Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen u.a. dem limbischen System ist, desto stärker fällt das aggressive Verhalten aus. Eine hohe Dichte an 5HTR1B steuert wiederum aggressivem Verhalten entgegen. Dies zeigt sich v.a. im Kontext von Frustrationen, sozialem oder alkoholbedingtem impulsiven Verhalten, was mit verschiedenen humanen Populationen bestätigt werden konnte [118]. 5HTR3A-C werden ebenfalls mit alkohol- und kokainbedingter Aggression in Verbindung gebracht [93]. 5HTR2A stimuliert im ZNS die Sekretion des Adrenocorticoïden Hormons (ACTH), von Corticosteron, Oxytocin, Renin und Prolaktin [119]. Zusätzlich reguliert 5HTR1A auch die Sekretion von ACTH und eine Aktivierung führt zu einer Abnahme des Blutdrucks und der Herzrate und zu verstärkten Reflexantworten [120,121]. Die Aktivierung von 5HTR2C inhibiert dopaminerge und adrenerge Neuronen im frontalen Cortex und dieser Rezeptorsubtyp scheint außerdem an der Regulation des Appetits beteiligt zu sein [122,123]. 5HTR4 ist bei der Alzheimererkrankung von Interesse, da er die Gedächtnis- und Lernfähigkeit verbessert und die Prozessierung des Amyloidvorläuferproteins beeinflusst [124]. 5HTR6 ist an der Kontrolle des zentralen cholinergen Systems beteiligt und damit ebenfalls ein Ansatzpunkt für die Behandlung von kognitiven Dysfunktionen, wie der Alzheimererkrankung. Weiterhin scheint er an der Regulation der Appetits und Körpergewichts beteiligt zu sein. Der 5HTR7 ist an der Wärmeregulation und an der Ausbildung von Affektstörungen beteiligt.

*5HTR1D* wird im Herzen exprimiert und moduliert dort die Ausschüttung von 5-HT. Weiterhin spielt er eine Rolle im Immunsystem und bei der Entstehung von Migräne [125]. Die Aktivierung der Klasse der 5HTR2 hat generell einen mitogenen Effekt auf eine Vielzahl von Zelltypen, zu denen z.B. vaskuläre und glatte Gefäßmuskelzellen, Trophoblasten, Osteoblasten und Kardiomyocyten gehören. 5HTR1C und 5HTR2A vermitteln beide mitogene Effekte in Fibroblasten [19]. 5HTR2B ist an der Entwicklung des Herzens und des enterischen Nervensystems beteiligt.

Das Lebergewebe exprimiert zahlreiche 5HTR, welche 5HTR1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 3A und 3B einschließen. An der Regeneration der Leber scheinen v.a. 5HTR2A und 2B direkt beteiligt zu sein, da die Expression beider Rezeptoren nach einer partiellen Hepatektomie um das drei- bis vierfache ansteigt. Weiterhin führen Antagonisten beider genannter Rezeptorsubtypen zu einer verschlechterten Regeneration, während Antagonisten von 5HTR2C oder 5HTR3 keinen Einfluss haben. 5HTR2B reguliert neben der Leberregeneration die Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur. Peripher sind 5HTR3A-C an der Regulation der Darmmotilität, Übelkeit und Erbrechen beteiligt [126]. 5HTR4 ist v.a. in der Darmschleimhaut zu finden und fördert hier die Darmbeweglichkeit und mildert viszerale Schmerzen. Eine physiologische Funktion der beiden 5HTR5 ist bisher nicht bekannt [121].

5HTR welche GPCR sind, vermitteln die Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine, die stimulierend ( $G_q/G_s$ ) oder inhibierend ( $G_i/G_o$ ) wirken können. Die  $G_s$ -gekoppelten 5HTR (5HTR4, 6 und 7) vermitteln die Aktivierung über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle [121]. 5HTR1A, 1B, 1D und vermutlich auch 1E und 1F inhibieren die Adenylcyclase und damit die Bildung von cAMP. 5HTR2A, 2B, 2C aktivieren Phospholipase C (PLC), was zu einer Mobilisierung von  $Ca^{2+}$  führt. Die Funktionsweise der 5HTR5 ist noch nicht eindeutig geklärt. 5HTR3 finden sich auf Neuronen, wo sie nach Aktivierung als nicht-selektive Kationenkanäle fungieren und eine schnelle Depolarisierung realisieren [127].

### 2.5.2 Die Rezeptoren weiterer biogener Monoamine

Auch die weiteren betrachteten biogenen Monoamine entfalten ihre Wirkung zu einem großen Teil über membranständige spezifische Rezeptoren. Bisher sind vier verschiedene HA-Rezeptoren (HAR1-4) identifiziert worden, die alle GPCR sind und in verschiedenen Geweben exprimiert werden [102]. Alle Rezeptortypen übernehmen spezifische Funktionen im ZNS, wo sie postsynaptisch aktiviert werden [103]. HAR1 und HAR2 sind an der HA-vermittelten exzitatorischen Signalweiterleitung und an Erregungszuständen, Aufmerksamkeit und kognitiven Funktionen beteiligt [128]. Der HAR3 ist in diesem Kontext der am besten untersuchte inhibitorische HAR und ein etabliertes Zielobjekt zur Behandlung verschiedener neuronaler Erkrankungen wie kognitive Beeinträchtigungen, Schizophrenie, Epilepsie, Schlafstörungen und neuropathische Schmerzen. Der HAR3 ist ein Auto- und Heterorezeptor, der die Aktivität histaminerger Neuronen und damit das histaminerge System kontrolliert [129]. Der HAR4 hingegen scheint eine integrative Rolle bei der Verknüpfung des ZNS und des Immunsystems zu haben und ist für motorische Funktionen und Angstzustände verantwortlich [130,131]. Neben seinem Vorkommen im Gehirn ist HAR4 hauptsächlich auf Immunzellen, wie Mastzellen, Eosinophilen und Dendritischen Zellen, und in assoziierten Geweben wie Milz, Thymus, Dickdarm, Blut und Knochenmark zu finden [132]. Der

HAR4 spielt v.a. eine Rolle im Immunsystem und bei Entzündungsprozessen und hilft durch seine kürzliche Entdeckung bei der Entwicklung neuer Medikamente. Der HAR1 ist  $G_q$ - und der HAR2  $G_s$ -Protein-gekoppelt, wodurch sie auf den cAMP-Spiegel bzw. Inositolphosphat- und  $Ca^{2+}$ -Spiegel wirken (Absch. I.2.3.1) [102]. Die Signalweiterleitung der HAR3 und HAR4 wird über  $G_{i/o}$ -Proteine realisiert, wodurch es zu einer verminderten Aktivierung der PKA und cAMP-gekoppelten Genexpression kommt.

Für DA existieren fünf humane spezifische Rezeptoren (DAR1-5), die allesamt GPCR sind. DA zeigt für die verschiedenen DAR sehr unterschiedliche Affinitäten, die vom nanomolaren bis zum mikromolaren Bereich reichen [106]. Die DAR1-ähnlichen DAR1 und DAR5 sind  $G_{s/olf}$ - und die DAR2-ähnlichen DAR2, DAR3 und DAR4 sind  $G_{i/o}$ -gekoppelt. Daneben können DAR auch an  $G_{\alpha q}$  oder  $G_{\beta \gamma}$  koppeln, damit PLC oder direkt  $Ca^{2+}$ -Kanäle aktivieren und die intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegel erhöhen. In der Peripherie existieren alle Subtypen in Niere, Nebenniere, sympathischen Ganglien, im Gastrointestinaltrakt, Blutgefäßen und im Herz. Übereinstimmend mit den bekannten Funktionen des DA zeigen *Dar1*<sup>-/-</sup>-Tiere einen erhöhten systolischen, wie auch diastolischen Blutdruck. *Dar2*<sup>-/-</sup>-Tiere eröffnen den selben Phänotyp, der jedoch von einer erhöhten Aktivität der  $\alpha$ -adrenergen und Endothelin B-Rezeptoren begleitet wurde. Auch *Dar3*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen einen Renin-bedingten Bluthochdruck. Im Gehirn werden alle Rezeptorsubtypen exprimiert, wobei DAR1 und DAR2 in hohen Mengen und hoher Dichte vorkommt, DAR3-DAR5 in geringen Mengen und in wenigen Gehirnregionen [106]. DAR1, 2 und DAR4 finden sich außerdem in der Retina und DAR2 in hohen Mengen in der Hypophyse.

Die Wirkung von NE und auch Adrenalin wird über  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren vermittelt, die allesamt GPCR mit sieben Transmembrandomänen, sowie einem extrazellulären Aminoterminus und einem cytosolischen Carboxyterminus sind [113].  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren werden in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren unterschieden, von denen noch weitere Subtypen existieren. Vom  $\alpha_1$ -Adrenorezeptor existieren drei Subtypen, die  $G_q$ -gekoppelt sind und sowohl im ZNS, als auch auf glatten Muskelzellen vorkommen. Dort hat der Rezeptor eine vasokonstriktive Wirkung, die über die Aktivierung von PLC mit anschließender Freisetzung von IP3 und DAG sowie Erhöhung des  $Ca^{2+}$ -Spiegels vermittelt wird [133].  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren wirken hauptsächlich über  $G_{i/o}$  und senken damit die Aktivität der Adenylylzyklase. Die  $G_{\beta \gamma}$ -Untereinheiten dieses Rezeptortyps können direkt die Aktivität von Ionenkanälen modulieren und damit die Exocytose von Transmitter-gefüllten Vesikeln inhibieren [134]. Der  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor wird vorwiegend im Herz exprimiert und begrenzt dort die Freisetzung von NE im Ruhezustand, wodurch er eine kardioprotektive Funktion ausübt [135]. Der  $\alpha_{2B}$ -Adrenorezeptor findet sich auf der glatten Gefäßmuskulatur, wo er durch eine Vasokonstriktion der Arterien Blutdruck steigernd wirkt. Außerdem wirkt dieser Subtyp entscheidend bei der Embryonalentwicklung mit, wobei er u.a. für die

Angiogenese der Plazenta und die Entwicklung der Lunge verantwortlich ist [136]. Der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor vermittelt auf den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks die Adrenalin-Homöostase, in dem er die Adrenalin-Exocytose hemmt. Die Agonisten der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren werden pharmakologisch weitreichend eingesetzt und führen systemisch zu einer Verringerung des adrenergen und noradrenergen Tonus, zu einer Senkung des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Bei chirurgischen Eingriffen wirken sie sedierend und erniedrigen die benötigte Konzentration inhalativer Anästhetika [113]. Des Weiteren werden Antagonisten der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor wegen ihres antipsychotischen und antidepressiven Effekts verwendet.

$\beta$ -adrenerge Rezeptoren lassen sich in drei Subtypen einteilen, die direkt oder durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und damit den Blutdruck regulieren [133]. Die Wirkung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren wird durch die Kopplung an  $G_s$  über die Erhöhung des cytosolischen cAMP-Spiegels vermittelt. Neben der Vasokonstriktion modulieren diese Rezeptoren auch die Kontraktion des Herzmuskels und des Uterus, die Resorption der Knochenmasse und die Regulation der Lipolyse und der Thermogenese des Fettgewebes [137,138].

### 2.5.3 Die membranständigen Transporter biogener Monoamine

Die Wirkungsweise biogener Monoamine wurde jahrzehntelang als ausschließlich rezeptorvermittelt angesehen [77]. Es wurde davon ausgegangen, dass hydrophile Biomoleküle nicht in der Lage sind die Plasmamembran mittels Diffusion zu durchqueren und nur über membranständige meist G-Protein-gekoppelte Rezeptoren agieren. Jedoch zeigten sich physiologische Effekte, die nicht über die Aktivierung membranständiger Rezeptoren erklärt werden können, aber von Monoamintransportern und intrazellulären Monoaminkonzentrationen abhängig sind, was auf einen neuartigen Mechanismus der Wirkung von Monoaminen hindeutete (Absch. I.2.4).

Zur Speicherung, Realisierung intrazellulärer Aufgaben und zur Entfernung der Neurotransmitter am synaptischen Spalt nach der Signalweiterleitung durch Neuronen werden Monoamintransporter benötigt. Diese Transportmoleküle schleusen spezifisch oder auch unspezifisch die biogenen Monoamine in das Cytoplasma, wo sie verwendet, abgebaut oder mittels weiterer Transportmoleküle in Vesikel gespeichert werden können [139]. Die Lokalisation an der Plasmamembran ist dabei nicht statisch, sondern wird über eine Vielzahl verschiedener Stimuli und Signalwege reguliert [140–142].

Die Neurotransmittertransporter der SLC6-Familie sind  $\text{Na}^{2+}$ - und  $\text{Cl}^-$ -abhängige Transporter, die spezifisch für ein bestimmtes Substrat sind [142]. Neben Transportern für die Neurotransmitter Betain, GABA, Glycin und Prolin gibt es spezifische Transporter der biogenen Monoamine 5-HT,

DA und NE, welche diese ungerichtet über die Plasmamembran befördern [143]. Die erste physiologische Funktion bei der dieser Transport beobachtet wurde, war die Beendigung der Neurotransmission am synaptischen Spalt [111]. Im Gehirn sind diese Transporter an sympathischen dopaminergen und serotonergen Synapsen lokalisiert. Ein bestimmter Monoamintransporter ist dabei exklusiv auf der Neuronenspezies zu finden, welche diesen Neurotransmitter auch synthetisiert [143]. Jedoch ist das Vorkommen der Monoamintransporter nicht auf das ZNS beschränkt.

So ist der 5-HT-Transporter (SERT, SLC6A4) in der Peripherie auf Neuronen des enterischen Nervensystems, der Magenschleimhaut und Thrombocyten lokalisiert, wodurch er die Aufnahme und Speicherung des aus den enterochromaffinen Zellen stammenden 5-HT ermöglicht [86,144]. SERT-defiziente Tiere haben gesteigerte Leptinplasmaspiegel und eine verringerte Nahrungsaufnahme, was auf eine niedrigere Insulinsensitivität von peripheren Geweben zurückgeführt werden kann [145]. Des Weiteren zeigt sich während der Embryonalentwicklung eine Expression von *SERT*, womit neben der rezeptorabhängigen Wirkung des 5-HT auch intrazelluläres 5-HT an Differenzierungsvorgängen und der Achsenbildung beteiligt ist [146,147].

Der DA-Transporter (DAT, SLC6A3) wird in verschiedenen Zelltypen des Verdauungstraktes, wie denen der Fundusdrüse und der Schleimhaut des Magens oder den Endothelzellen der Venen und den dukталen Zellen des Pankreas, exprimiert, wo er an der Regulation der pankreatischen Sekretion und der Darmbeweglichkeit beteiligt ist [148]. Verschiedene Drogen entfalten ihre Wirkung durch den DAT [149]. Kokain wirkt durch seine Bindung an die Substratbindestelle als kompetitiver Inhibitor und Amphetamine verursachen eine DAT-vermittelte DA-Ausschüttung.

Der NE-Transporter (NET, SLC6A2) ist in der Peripherie auf noradrenergen Neuronen, in chromaffinen Zellen der adrenalen Medulla, Trophoblasten der Plazenta und endothelialen Zellen der Lunge zu finden. NET transportiert ebenfalls Adrenalin, hat jedoch eine doppelt so hohe Effizienz bei der Beförderung von NE [111]. Es sind drei humane Isoformen des DAT bekannt, dessen Funktionalität bisher unbekannt ist, welche jedoch zu trunkierten Formen des Transporters führen [150,151]. Beim NET beeinflusst das alternative Spleißen die Anzahl der Exone in der carboxyterminalen Domäne, was den Reifungsprozess und den Transport des NET zur Plasmamembran steuert. Daneben existieren zahlreiche SNP in der SLC6-Familie, die zu einer veränderten Struktur, Funktion oder Regulation des entsprechenden Transporters führt (Absch. I.2.3.4) [152].

Neben den spezifischen Monoamintransportern gibt es auch organische Kationentransporter (OCT), die außer den biogenen Monoaminen auch Choline, Koenzyme, Medikamente und Xenobiotika transportieren [142]. Während Monoamintransporter der SLC6-Familie ein Haupt-

substrat und daneben nur strukturell sehr ähnliche Moleküle akzeptieren, transportieren OCT eine Vielzahl an strukturell diversen Moleküle, zu denen v.a. organische Kationen aber auch schwache Basen und nicht geladene Substanzen zählen [141]. OCT gehören zur SLC22-Familie, die wiederum einer strukturell homologen Superfamilie von Transportern mit insgesamt 18 Familien zugeordnet wird. Es gibt innerhalb der SLC22-Familie drei OCT, von denen OCT1 (SLC22A1) hauptsächlich in der Leber exprimiert ist, OCT2 (SLC22A2) in der Niere und im Gehirn und OCT3 (SLC22A3) ist in zahlreichen Geweben von der Leber, über Herz, Lunge, Niere, Plazenta bis zum Skelettmuskel und Gehirn zu finden [142]. OCT1 und OCT3 spielen damit eine wichtige Rolle bei der Entgiftung des Körpers durch die Leber, da sie die Aufnahme von bei physiologischen pH-Wert positiv geladenen Substanzen durch Hepatocyten vermitteln und damit deren Abbau und die Eliminierung ermöglichen [153]. Der Transport der verschiedenen Substrate ist ungerichtet und die treibende Kraft für den Transport ist ausschließlich der elektrochemische Gradient der transportierten Kationen [154,155].

SLC22A4/5 werden auch als Zwitterion-/Kationentransporter bzw. OCTN1/2 bezeichnet. Sie werden u.a. in Niere, Skelettmuskel, Herz, Plazenta und Prostata exprimiert. Die OCTN sind untereinander stärker konserviert als die OCT und transportieren ihre Substrate im Uni- oder Kotransport mit Carnitin/ $\text{Na}^+$  oder  $\text{H}^+$ -Ionen, wobei sie unabhängig von einem  $\text{Na}^+$ -Gradienten oder Membranpotential sind [156]. Alle OCT und OCTN enthalten auf einer intrazellulären Schleife zwischen der sechsten und siebten Helix Konsensussequenzen für PKA- und PKC-abhängige Phosphorylierungen, die kurzzeitig die Aktivität der Transporter regulieren können [157].

Auch der polyspezifische Nucleosidtransporter PMAT (Plasmamembran-Monoamintransporter, SLC29A4) ist in der Lage Monoamine und bevorzugt 5-HT zu befördern [158]. Das Hauptsubstrat des PMAT ist Adenosin, dessen Transport an einen Protonengradienten gekoppelt ist. PMAT wird ubiquitär exprimiert, wobei besonders hohe Expressionslevel in Herz, Gehirn und Myocyten zu finden sind. PMAT scheint im Gehirn die Neurotransmission zu modulieren, indem er 5-HT befördert. Außerdem reguliert PMAT durch den 5-HT-Transport die Entwicklung und Funktion des Herzens [159,160].

Neben den an der Plasmamembran lokalisierten Transportern, gibt es noch zwei vesikuläre Monoamintransporter (VMAT), die die Speicherung der Monoamine in Vesikeln bis zu einer Konzentration von 500 mM realisieren [140]. VMAT verwenden den elektrochemischen Gradienten an der vesikulären Membran im Antiport und stellen zusammen mit dem vesikulären Transporter des Acetylcholins eine eigene Genfamilie dar [161]. Die VMAT weisen keine Sequenzhomologie zu den anderen Monoamintransportern auf. Trotzdem haben VMAT1 (SLC18A1) und VMAT2 (SLC18A2) eine Topologie, die den Transportern der Plasmamembran sehr ähnlich ist. Sie

besitzen 12 Transmembrandomänen, einen cytosolischen Amino- und Carboxyterminus und eine große intralumenale Schleife zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne [143]. *VMAT2* wird in allen monoaminergen Neuronen des ZNS exprimiert, während *VMAT1* ausschließlich auf chromaffinen Zellen und im endokrinen System vertreten ist. Weiterhin findet sich *VMAT2* in Zellen des Pankreas' und Magens, in Mastzellen, Dendritischen und Basophilen Zellen und in Thrombocyten [162].

#### **2.5.4 Der Serotonintransporter und -rezeptor 1B als genetische Faktoren zur Prädisposition für Alkoholismus**

Interessanterweise ist einer der genetischen Risikofaktoren für eine Erkrankung an Alkoholismus ein Allel von *SERT* [82]. In europäischen Populationen existieren zwei Varianten des *SERT*-Allels [70,163,164]. Zum einen die Kurze Variante mit 12 Kopien eines 22 bp langen Elements im Promotorbereich des Gens und eine lange Variante mit 14 Wiederholungen dieses Elements. Das kurze Allel führt zu verringerten Mengen an mRNA und damit auch zu einer Verminderung auf Proteinebene [164]. Individuen, die verminderte Level an *SERT* mRNA aufweisen, haben ein höheres Risiko einer lebenslangen Alkoholabhängigkeit [165,166].

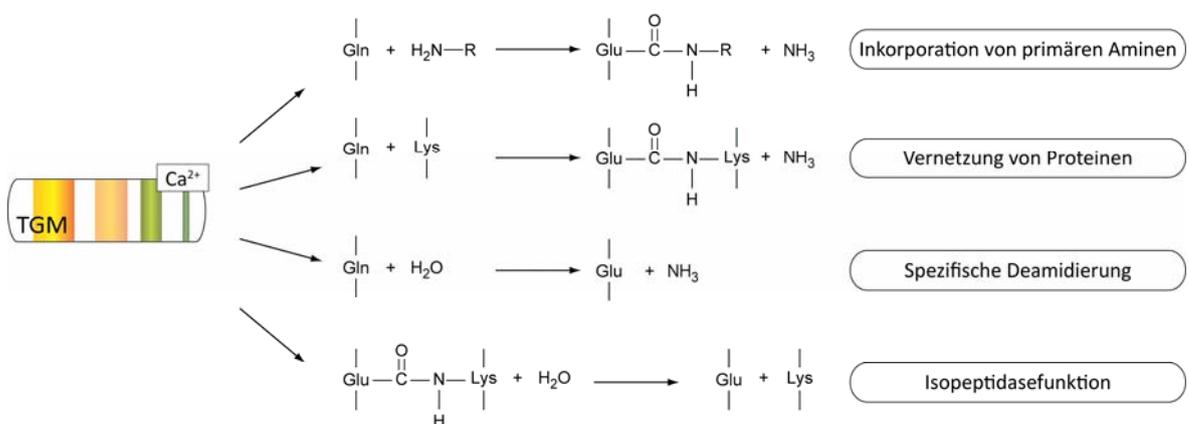
Für *5HTR1B* gibt es ebenfalls eine positive Korrelation mit Alkoholismus [167]. Jedoch besteht der Zusammenhang mit der Mutation G861C in der kodierenden Region nur für die Gruppe von humanen Alkoholikern, welche die inaktive Form der *ALDH2* exprimieren (Absch. I.1.2) [167]. Für den Polymorphismus A161T in der Promotorregion von *5HTR1B* konnte in einer chinesischen Population ein positiver Zusammenhang zu einer Alkoholabhängigkeit und auch dem Beginn des Alkoholismus gefunden werden [2]. *5htr1b*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen einen erhöhten Ethanolkonsum und eine gesteigerte Impulsivität und Aggressivität [168,169]. Dieses Verhalten konnte durch *5HTR1B*-Agonisten signifikant herabgesetzt werden [170–172].

#### **2.6 Die Familie der Transglutaminasen**

Im humanen Genom sind neun verschiedene Transglutaminasen (TGM) kodiert, von denen acht eine Transamidierungsaktivität aufweisen und nur Erythrocytenbande 4.2 katalytisch inaktiv ist [173]. TGM1-7 und Faktor XIIIa werden in verschiedenen, spezifischen Geweben exprimiert und kommen dort in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor. Eine Ausnahme bilden TGM2 und TGM7, die ubiquitär exprimiert werden. Alle humanen TGM zeigen eine hochkonservierte Sequenz und damit auch eine ähnliche Sekundärstruktur, die zu einer konservierten Tertiärstruktur bestehend aus vier Domänen führt [174,175]. TGM gehören zur Familie der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen, deren  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transamidasefunktion die Inkorporation von primären Aminen in Glutaminreste, die Vernetzung über eine Epsilongamma-Glutamyllysin-

Isopeptidbindung und die Acetylierung beinhaltet (Abb. 6) [176]. Außerdem katalysieren TGM Veresterungen und Hydrolysen, zu denen die Deamidierung von Aminogruppen und eine Isopeptidasefunktion gehören. Trotz des gemeinsamen katalytischen Mechanismus zeigen verschiedene Mitglieder der TGM-Familie bestimmte, nicht-redundante Substratspezifitäten, die über unterschiedliche Affinitäten und auch Spezifitäten zu bestimmten Glutamin- und Lysinresten realisiert werden [77,173,177,178].

Faktor XIIIa kommt u.a. in Thrombocyten, Astrocyten und Chondrocyten vor und ist dort an der Blutgerinnung und am Knochenwachstum beteiligt [179]. TGM1 wird in Keratinocyten, Epithel- und Endothelzellen und im Gehirn exprimiert und ist zusammen mit TGM3 und TGM5 für die Verhornung von Zellschichten der Haut zuständig [177,180]. TGM3 findet sich im Plattenepithel und im Gehirn, während TGM5 in allen Geweben außer dem ZNS und lymphatischen System vorhanden ist. TGM1, TGM3, TGM5 und Faktor XIIIa sind Zymogene und müssen daher proteolytisch aktiviert werden. TGM4 ist bisher exklusiv in der Prostata beschrieben und dort an der Koagulation der Samenflüssigkeit beteiligt. In Nagetieren wirkt TGM4 außerdem an der Ausbildung des Vaginalpfropfens mit. Die Funktionen von TGM6-7 sind bisher nicht bekannt. Während TGM7 ubiquitär exprimiert wird, ist die Gewebeexpression von TGM6 unbekannt. Erythrocytenbande 4.2 ist zwar katalytisch inaktiv, fungiert aber in der Membran als Strukturprotein und vermittelt deren Stabilität und Integrität.



**Abbildung 6: Eine Auswahl Calcium-vermittelter Reaktionen der Familie der Transglutaminasen.** Transglutaminasen (TGM) vermitteln Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-abhängig unterschiedliche Reaktionen mit ihrer Transamidasefunktion. Das katalytische Zentrum der TGM enthält eine katalytische Triade mit einem Cysteinrest (C277), der mit einem proteingebundenen Glutamin (Gln) ein Thioesterzwischenprodukt bildet, das wiederum mit einem passenden Nukleophil reagieren kann. Wenn das Nukleophil ein primäres Monoamin ist, dann resultiert die Reaktion in der Monoaminylierung des Proteins. Stellt das Nukleophil die Aminogruppe eines proteingebundenen Lysins (Lys) dar, kommt es zur Vernetzung zweier Proteine. Diese Amidbindung kann durch die Isopeptidasefunktion der TGM auch wieder unter Verwendung von Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) gespalten werden, was zu einem Glutamat (Glu)- und einem Lys-Rest führt. Wenn das Nukleophil ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül ist, kommt es zu einer Deamidierung eines spezifischen Gln- zu einem Glu-Rest. Modifiziert nach [176].

Evolutionär sind TGM stark konserviert und Orthologe existieren in zahlreichen Organismen bis zu den Invertebraten, wobei außerhalb der Vertebraten nur eine Isoform des Enzyms vorkommt [180]. In Prokaryoten, als auch in Archaeen und einzelligen Eukaryoten finden sich laut Sequenzanalysen Homologe der Papain-ähnlichen TGM, die jedoch noch nicht näher auf ihre Funktionalität hin untersucht sind [181]. Außerdem finden sich TGM unter den bakteriellen Toxinen, zu denen z.B. das Neurotoxin aus *Bordetella bronchiseptica* oder der Cytotoxische Faktor aus *Escherichia coli* (*E. coli*) gehören. Diese TGM katalysieren hauptsächlich Deamidierungen, haben jedoch auch eine Transamidierungsfunktion [182].

Alle TGM der Säugetiere haben eine monomere Struktur. Eine Ausnahme bilden FXIIIa und TGM4, die im Plasma als A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Heterotetramer bzw. Homodimer vorliegen. Weiterhin muss die Transamidierungsfunktion aller TGM durch Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktiviert werden. Am Beispiel der TGM2 und TGM3 konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Ca<sup>2+</sup>-Ionen eine konformationelle Veränderung induziert, die zur Öffnung eines Kanals führt, der die Zugänglichkeit des Substrats zur Bindungstasche kontrolliert [183,184]. Sequenzvergleiche und experimentelle Daten haben gezeigt, dass die humanen TGM eine unterschiedliche Anzahl an Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen aufweisen [185]. Die S2-Stelle findet sich in allen TGM und bestimmt in FXIIIa und TGM4 alleine über die Transamidaseaktivität der Enzyme. TGM1 hat eine S1- und S2-Bindestelle, während die anderen TGM über mehrere Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen verfügen, die eine feinere Regulation der Aktivität ermöglichen. TGM3 hat die Bindungsstellen S1-S3, TGM5 und TGM7 haben S1, S2, S4 und S5 und TGM2 und TGM6 haben jeweils sechs Bindungsstellen. Bisher wurden die Motive für die Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstellen der TGM-Familie nur hier gefunden und ihre evolutionäre Konservierung zeigt die Wichtigkeit dieser Domäne für die Enzymfunktion.

## 2.7 Die Funktionen der Transglutaminase 2

Von der Familie der TGM ist die TGM2 das Mitglied mit der höchsten Verbreitung und den meisten Funktionen. TGM2 kann sowohl in der extrazellulären Matrix und innerhalb der Zelle assoziiert an die Plasmamembran (ca. 20 %), im Cytosol, den Mitochondrien, Endosomen und im Nukleus (ca. 5-7 %) vorkommen, wobei die subzelluläre Lokalisation einen wichtigen Einfluss auf die Funktion des Enzyms und die umgesetzten Proteinsubstrate hat [186–188]. TGM2 hat neben der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Aktivität als Transamidase und der Vernetzung von Proteinen auch eine Isopeptidase-, GTPase-, Disulfid-Isomerase- und Kinase-Funktion (Abb. 7) [189]. Abhängig von der zellulären Umgebung kann TGM2 entgegengesetzte Effekte auf Zellwachstum, Apoptose und Differenzierungsprozesse haben. So agiert TGM2 bei niedrigen, cytoplasmatischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen von 10-20 nM als GTPase und vermittelt die Signalweiterleitung durch Phospholipase Cδ und somit das Zellwachstum [187]. Wenn die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf 700-800 nM ansteigt, ändert

sich mit der Konformation der TGM2 ihre Aktivität hin zur Polymer-bildenden Transamidierung, was proapoptotische Prozesse fördert und Zellwachstum inhibiert [176]. Aber auch reduzierende Reagenzien oder Sphingosylphosphocholin aktivieren die Transamidaseaktivität der TGM2 und inhibieren die anderen katalytischen Funktionen des Enzyms [190].

Im Kontext der Apoptose wurde gezeigt, dass TGM2 direkt mit Mitochondrien interagieren und damit Zellen durch einen geänderten Redoxstatus für die Apoptose sensibilisieren kann [191]. Während der Endphase der Apoptose führt der massive Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  zu einer weitreichenden Polymerisierung von Proteinen durch TGM2, wodurch die Zellstruktur stabilisiert wird. Damit wird die Phagozytose erleichtert und durch den verminderten Austritt von schädlichen Zellkomponenten entzündliche Prozesse minimiert [192]. Jedoch gibt es auch widersprüchliche Beobachtungen hinsichtlich der TGM2 und apoptotischen Vorgängen. So wurde gezeigt, dass TGM2 über die Vernetzung der Caspase 3 auch als Inhibitor der Apoptose wirken kann [193].

Manche Zelltypen, wie endotheliale und glatte Gefäßmuskelzellen, zeigen eine hohe konstitutive Expression der TGM2, während bei anderen Zellen die Expression der TGM2 erst über verschiedene Signalwege induziert wird [194]. Die regulatorische Region des Gens zeigt spezifische Bindestellen für Retinolsäurerezeptoren, TGF $\beta$ , NF $\kappa$ B und AP. Übereinstimmend mit diesen regulatorischen Elementen wird die TGM2-Expression *in vivo* über Retinoide und eine gewebespezifische Expression reguliert und durch verschiedene Signale, die zur Apoptose führen, induziert.

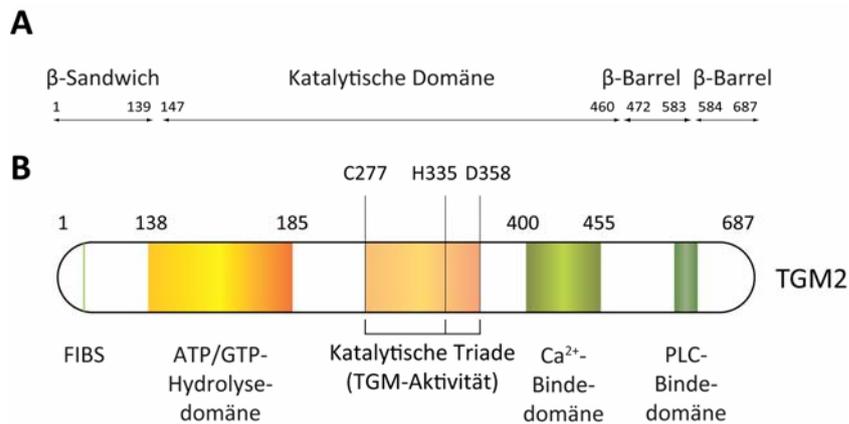
Im Nukleus reguliert TGM2 hauptsächlich die Genexpression verschiedenster Gene durch direkte Interaktion oder über posttranslationale Modifikation von TF oder transkriptionsassoziierten Proteinen, wodurch das Überleben und Wachstum von Zellen, Differenzierungsprozesse und Apoptose gesteuert werden. Zu diesen TF gehören das Retinoblastom-Protein (RB), E2F1, HIF und SP1 [176,195]. Das RB-Protein wird stark abhängig von der Behandlung und Zelltyp durch die nukleäre TGM2 entweder stark polymerisiert, was zur Apoptose führt und die Degradierung von E2F1 beschleunigt. Eine Phosphorylierung von RB stabilisiert den TF und verhindert die Degradierung des Strukturproteins und von E2F1 und damit die Arretierung des Zellzyklus. In Neuronen wird TGM2 unter hypoxischen Bedingungen in Zellkultur und im *in vivo*-Modell in den Nukleus transloziert, wo es HIF1b bindet und die Hochregulierung der Gene der proapoptotischen Faktoren der BCL2-Familie wie BNIP3 und NOXA vermindert und damit neuronale Zellen vor dem Zelltod durch z.B. Ischämie oder Schlaganfall schützt [196–199].

Der Einfluss auf SP1 ist im Kontext der transkriptionellen Kontrolle durch TGM2 am weitreichendsten untersucht. Es wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität von SP1 in humanen 293T-Zellen nach der Vernetzung durch TGM2 erhöht ist, was auf eine gesteigerte

Aktivität durch Dimer- oder Trimerbildung zurückgeführt wird [200]. Im Gegensatz dazu wird durch Behandlung mit FFA oder Ethanol SP1 stark polymerisiert und inaktiviert, was in Hepatocyten zu einer verminderten Expression von Met, dem Hauptrezeptor von HGF führt [187]. FFA erhöhen in Hepatocyten über einen ER-Kinase-abhängigen Signalweg die Menge an nukleärer TGM2 und die Aktivität von NFκB, während durch Ethanol die im Nukleus befindliche TGM2-Menge über Retinoidsignalwege erhöht wird [201]. Die Transkription von *TGM2* wird dabei über eine Interaktion von SP1 mit frisch synthetisierten RA-Rezeptoren induziert [202]. Auch in Patienten mit nicht-alkoholinduzierter Steatohepatitis wurden erhöhte Level von TGM2 und polymerisiertes SP1 in den hepatischen Nuklei gefunden [203]. Weiterhin interagiert TGM2 in mehreren Zelllinien mit JUN, was die Bindung des JUN/FOS-Komplexes an die AP1-Bindesequenz des Promotors der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP9) stört und zur verminderten Expression des Gens führt [204].

Neben der transkriptionellen Kontrolle der TGM2 über die direkte Interaktion mit TF wurde gezeigt, dass das Enzym auch indirekte Kontrolle über transkriptionelle Prozesse hat. So führt die Vernetzung der Phosphatase PPA2α zu deren Degradierung und diese Inaktivierung wiederum zur verstärkten Phosphorylierung von CREB und damit zur erhöhten Expression von MMP2 [204]. Der spezifische, irreversible TGM2-Inhibitor KCC009 kann hierbei die Phosphorylierung und Aktivierung von CREB verhindern. Weiterhin wirkt TGM2, vermutlich über die Stimulierung der Adenylat-Cyclase, verstärkend auf die Produktion von cAMP und aktiviert dadurch CREB in der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y [205]. Außerdem werden Glutamine verschiedener Histonproteine von TGM2 mit dem Monoamin Monodansylcadaverin modifiziert, wobei das Modifikationsmuster abhängig von der Salzkonzentration und der schrittweisen Entfaltung der DNA ist [206]. Im Verlauf der Apoptose werden alle Histonkernproteine durch TGM2 kovalent vernetzt und damit die Kondensierung des Chromatins eingeleitet [207]. Außerdem können alle Histonproteine inkl. H1 *in vitro* durch TGM2 phosphoryliert werden, was zusammen genommen für eine Rolle der TGM2 in der *in vivo*-Regulation der Chromatinstruktur spricht.

Die Translokation der TGM2 in den Nukleus wird vermutlich über Importin-α3 realisiert, das *in vitro* und *in vivo* an das Enzym bindet [208]. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass in Ethanol-behandelten Hepatocyten, die vermehrt TGM2 im Kern aufweisen, die Expression von Importin-α3 verstärkt statt findet [209]. Das Kernlokalisierungssignal ist bisher nicht eindeutig identifiziert worden [187,208,210]. Neben dem Transportprotein Importin-α3 kann TGM2 noch andere Proteine wie NFκB, VEGFR2 und den eukaryotischen Translationinitiationsfaktor 5A binden und gemeinsam im Komplex in den Nukleus translozieren [211–213]. TGM2 besitzt außerdem ein mögliches, nicht verifiziertes Kernexportsignal, das von Exportin-1 gebunden werden kann [187].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der 687 aa umfassenden Transglutaminase 2.** (A) TGM2 setzt sich strukturell aus vier unterschiedlichen Domänen zusammen. Die katalytische Kerndomäne wird N-Terminal von einem  $\beta$ -Sandwich und C-Terminal von zwei  $\beta$ -Barrel flankiert. Die Ausdehnung der jeweiligen Domäne ist den Zahlen über den Doppelpfeilen zu entnehmen, welche die Position der jeweiligen Aminosäure (aa) wiedergeben. Die strukturellen Domänen basieren auf Sequenzhomologien mit Faktor XIIIa. (B) Die funktionellen Domänen der TGM2 sind zum einen die Fibronectin- und Integrinbindestelle (FIBS), die sich von aa 1-7 erstreckt. Der katalytische Teil setzt sich aus der ATP/GTP-Hydrolysedomäne und der Domäne mit TGM-Aktivität zusammen, die über eine katalytische Triade bestehend aus Cystein (C), Histidin (H) und Aspartat (D) realisiert wird. Neben der katalytischen Triade sind W241, C335 und Y518 für die Transamidierungsaktivität notwendig, da sie den Übergangszustand der Reaktion stabilisieren. C-terminal befinden sich eine mutmaßliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomäne, die sich aus der Strukturhomologie zu Faktor XIIIa ergibt, und eine Phospholipase C (PLC)-Bindedomäne von aa 665-672. Modifiziert nach [176].

Neben den intrazellulären Funktionen wird TGM2 auch externalisiert und vermittelt dann  $\text{Ca}^{2+}$ -induziert die nicht-kovalente Interaktion von Integrinen, Syndecan-4 und Fibronectin oder vernetzt weitere Proteine der extrazellulären Matrix [176]. Dazu gehören direkte Interaktionen mit Mikrofilamenten, intermediären Filamenten und Mikrotubuli, aber auch die indirekte Einflussnahme z.B. über die Retinolsäure-induzierte Transamidierung von RHOA, die über mehrere Phosphorylierungsereignisse zur Phosphorylierung von Vimentin und damit zur erhöhten Zelladhäsion führt [214]. Neben der Zelladhäsion ist TGM2 direkt an der Wundheilung und Angiogenese beteiligt, womit dem Enzym auch eine Rolle in metastasierenden Krebszellen zukommt [215]. TGM2 ist häufig in primären und sich entwickelnden Tumoren herunterreguliert, während die Expression der TGM2 in sekundären, metastasierenden Tumoren erhöht ist [177,216]. Weiterhin assembliert, remodelliert und stabilisiert TGM2 die extrazelluläre Matrix in verschiedenen Geweben. Das sekretierte Enzym ist an verschiedenen Signalwegen beteiligt, indem es über Bindung oder kovalente Modifikationen mehrere Wachstumsfaktorrezeptoren reguliert, aber auch Wachstumsfaktoren wie z.B. TGF $\beta$  aktiviert, was zur transkriptionellen Regulation von Genen der extrazellulären Matrix und TGM2 selbst führt [217–219].

Pathophysiologisch wird TGM2 mit der Autoimmunerkrankung Zöliakie (Glutenunverträglichkeit) in Zusammenhang gebracht, die durch eine chronische Entzündung der Dünndarmschleimhaut gekennzeichnet ist [220,221]. Auch bei der rheumatoiden Arthritis führt TGM2 zu entzündlichen

Prozessen indem es den inhibitorischen Faktor I $\kappa$ B $\alpha$  polymerisiert, wodurch NF $\kappa$ B freigesetzt, aktiviert und damit vermutlich die Proliferation von Synoviocyten gefördert wird [222]. Außerdem könnte TGM entscheidend bei der Entwicklung von Fibrosen in Organen wie der Lunge, Leber und Niere mitwirken [223–226]. In der sich regenerierenden Leber findet sich vermehrt TGM2 im Nukleus [226]. Außerdem zeigt sich nach einer partiellen Hepatektomie eine erhöhte Inkorporation von Polyaminen in Proteine.

Diese protektive Rolle der TGM2 zeigt sich auch in TGM2-defizienten Mäusen des Stammes C57BL/6, die nach Behandlung mit dem Hepatotoxin Tetrachlormethan im Vergleich zu Kontrolltieren vermehrt starben, was auf eine erhöhte Entzündungsreaktion und Akkumulation der extrazellulären Matrix zurückzuführen ist [227]. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass die Apoptose der Hepatocyten aus *Tgm2*<sup>-/-</sup>-Tieren des gemischten Stammes SVJ129-C57BL/6 gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert ist, wenn diese mit Ethanol oder dem anti-FAS-Antikörper Jo2 behandelt werden [209]. Der proapoptotische Effekt wird hier von der Vernetzung des TF SP1 begleitet, die in einer Herunterregulierung von mitogen wirkenden Proteinen resultiert. Allerdings gibt es auch eine frühere Studie, die gegenteilige Effekte in Bezug auf eine Apoptose zeigt [228]. In dieser Studie wurden jedoch Mäuse mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und höhere Dosen Jo2 verwendet, das in Mäusen mit C57BL/6 genetischem Hintergrund ab 0,3  $\mu$ g/g Körpergewicht lethal wirkt und damit verfälschend gewirkt haben könnte. Die selbe Dosis Jo2 zeigte später eine massive Lebernekrose in *Tgm2*<sup>+/+</sup>- und *Tgm2*<sup>-/-</sup>-Tieren dieses Mausstammes [209]. In einem weiteren Modell für Leberschäden wurde gezeigt, dass *Tgm2*<sup>-/-</sup>-Tiere des Stammes C57BL/6 unempfindlicher gegenüber der induzierten Bildung von Mallory-Körpern und der damit verbundenen Hypertrophie sind, obwohl sie zu den *Tgm2*<sup>+/+</sup>-Tieren vergleichbare Leberschäden aufwiesen [229]. Die TGM2-defizienten Mäuse zeigten zusätzlich eine hepatische Gallenstauung, eine vermehrte Bildung von Gallensteinen, eine erhöhte Proliferation des Gallengangepithels und eine Gelbsucht.

Sowohl in HD als auch bei der Alzheimererkrankung findet man erhöhte Level und Aktivität der TGM2 [176]. Die neurodegenerative Erkrankung HD ist durch die Akkumulation aggregierter Huntingtinproteine im Nukleus von Neuronen und deren Zelltod gekennzeichnet. TGM2 könnte hier eine entscheidende Rolle beim Verlauf der Krankheit und bei der Bildung der Aggregate spielen. Die Kreuzung von *Tgm2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit dem HD-Mausmodell R6/1 führt zu einem geringeren Zelltod und verbesserter Leistung der Motorneuronen, aber zu einer vermehrter Aggregatbildung, was gegen die Beteiligung der Aggregate am Zellsterben spricht [230]. Die erhöhte Bildung von Aggregaten kann zum Teil über den Verlust des regulatorischen Einflusses von TGM2 auf die Reifung von Autophagosomen erklärt werden [231]. Der Einfluss von TGM2 auf die Pathogenese von HD könnte deshalb auch auf eine transkriptionelle Dysregulation und dadurch

beeinträchtigte Energiehomeostase zurückzuführen sein [232]. Im Gehirn von Alzheimerpatienten tritt eine alternative Spleißform der TGM2 auf, die keine GDP/GTP-Bindestelle aufweist und eine erhöhte Vernetzungsaktivität besitzt [233]. Diese erhöhte Aktivität scheint die Bildung der neurofibrillären Bündel und damit den neuronalen Zelltod zu fördern [176]. Diese Beobachtung wird dadurch gestützt, dass TGM2 *in vitro* direkt mikrotubuli-bindende Proteine inkl. TAU und das  $\beta$ -Amyloid-Peptid binden und vernetzen kann [234–236]. Des Weiteren vermittelt TGM2 die Bildung von Oligomeren des Angiotensin II-Rezeptors Typ 2, was entscheidend zur Neurodegeneration und Pathologie der Krankheit beiträgt [237,238].

## 2.8 Die Monoaminylierung als posttranslationale Modifikation

Die kovalente Inkorporation von Aminen in Proteine ist schon seit Jahrzehnten bekannt, seitdem die erste TGM als Enzym isoliert und identifiziert wurde, das diese Reaktion in der Leber katalysiert [239]. Wenig später wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit dieser Reaktion im Kontext mit verschiedenen Proteinen und zum einen Polyaminen, wie Putrescin, Cadaverin und Spermin, zum anderen mit Aminosäuren und -amiden und auch mit biogenen Monoaminen, die Gegenstand dieser Arbeit sind, wie Histamin, Noradrenalin und Serotonin gezeigt und spezifiziert [240]. Anschließend wurde neben Casein, Pepsin,  $\beta$ -Lactoglobulin auch Insulin als Aminakzeptor der TGM-abhängigen Transamidierung identifiziert [241]. Außerdem wurde Anfang der 1960er Jahre gezeigt, dass Histamin *in vivo* kovalent in Leberproteine von Lipopolysaccharid-behandelten Mäusen inkorporiert wird und die Inkorporationsrate durch die Behandlung mit dem Impfstoff gegen *Haemophilus pertussis* bis auf die 15fache Menge erhöht werden kann [242,243]. In den 1970er entdeckte man zusätzlich zur Histamininkorporation die *in vivo*-Transamidierung von murinen Gehirnproteinen mit 5-HT, DA und NE [244,245]. Die Idee einer physiologischen Funktion der Amininkorporation durch TGM entwickelte sich erst langsam in den 1980er Jahren, als entdeckt wurde, dass Fibroblasten Polyamin-konjugierte Proteine sekretieren, in Lymphocyten intrazelluläre Proteine mit verschiedenen Polyaminen umgesetzt werden können, Oocyten und Embryonen des Seeigels eine Inkorporation von Putrescin und Lysin und außerdem murine Mastocyten nach Stimulierung eine Histamininkorporation zeigen [246–249].

Die in den letzten Jahren am Besten untersuchte und in mehreren physiologischen Zusammenhängen bekannte Monoamininkorporation, ist die kovalente Modifizierung mit Serotonin. Diese als Serotonylierung bezeichnete funktionelle posttranslationelle Modifikation wurde erstmals im Kontext der Thrombocytenaggregation gefunden, bei der die kleinen GTPasen RAB4 und RHOA TGM-abhängig serotonyliert werden. Die Modifikation führt zur konstitutiven Aktivierung der Signalproteine und dadurch zur Ausschüttung der  $\alpha$ -Granula durch die Zellen [86]. Dieser Mechanismus wird nicht über die 5-HT-Rezeptorbindung vermittelt, sondern kommt durch

intrazelluläres 5-HT zustande, das über den SERT aufgenommen wird. Es gibt jedoch einen synergistischen Effekt, der bewirkt, dass über die Rezeptorbindung intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisiert wird, das wiederum die Transamidasefunktion der TGM aktiviert. Diese Arbeit wurde mit *Tph1*-defizienten Mäusen durchgeführt, die kein 5-HT in der Peripherie aufweisen und durch verlängerte Blutungszeiten nach der Schwanzbiopsie auffielen. Interessanterweise führt die erhöhte 5-HT-Konzentration und die resultierende Serotonylierung von RAB4 in Thrombocyten zu einer begünstigten Bindung der kleinen GTPase an den SERT, was eine Abnahme der Transporterdichte in der Plasmamembran zur Folge hat [250]. In diesem Zusammenhang konnte außerdem gezeigt werden, dass auf einer Subpopulation der Thrombocyten gerinnungsfördernde Oberflächenproteine, wie z.B. Faktor V, Fibronectin oder der Willebrandfaktor serotonyliert werden und diese Modifikation die Gerinnungsaktivität durch Bindung an Fibrinogen und Thrombospondin steigert [250–253]. Eine weitere extrazelluläre Transamidierung von Proteinen mit 5-HT konnte bei den neuronalen Gliomazellen C6 gezeigt werden [254]. Die Serotonylierung von Fibronectin und weiteren Oberflächenproteinen induzierte eine Aggregation der Zellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix.

Der (patho-)physiologische Kontext in dem die Serotonylierung sehr gut untersucht ist, ist die pulmonäre Hyperplasie (PH), die mit einer Verengung und einem Umbau der Lungengefäße einhergeht, was schließlich zu einem erhöhten Blutdruck in den pulmonären Arterien und zur Einengung des rechten Herzventrikels führt [255]. Es wurde gezeigt, dass 5-HT einen mitogenen Effekt auf die pulmonären, vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (SMC) hat, der intrazellulär über den SERT vermittelt wird. Der kontrahierende Einfluss wird hier über 5HTR1B/1D und 5HTR2A initiiert. Die primäre PH ist eine spezielle Form der PH, die durch eine Hyperplasie der pulmonären, arteriellen SMC (PA-SMC) gekennzeichnet ist [256]. Dieses verstärkte Wachstum lässt sich neben Mutationen im *Bone Morphogenetic Protein*-Rezeptor II auf eine erhöhte Expression von *SERT* und einer damit erhöhten Aufnahme von 5-HT in die Zellen zurückführen [257].

Des Weiteren führt ausschließlich die Stimulation mit 5-HT zu einem verstärkten Wachstum der PA-SMC, andere Wachstumsfaktoren haben in diesem Zusammenhang keinen Einfluss [258]. Inhibitoren von SERT heben den mitogenen Effekt auf, was für eine ausschließlich intrazelluläre Wirkung des 5-HT spricht. Außerdem kann im Tiermodell mit induzierter PH durch den SERT-Inhibitor Fluoxetin die Induktion der Krankheit verhindert und rückgängig gemacht werden [259]. Es zeigte sich, dass der mitogene Effekt des 5-HT auf die PA-SMC über die Aktivierung des RHOA/RHO Kinase-Signalwegs vermittelt wird und die  $\text{Ca}^{2+}$ - und TGM2-abhängige Serotonylierung von RHOA an der langfristigen Aktivierung beteiligt ist [260]. Des Weiteren führt die Serotonylierung von RHOA zu einem verstärkten Abbau des Proteins durch das Proteasom und damit zu einer Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase AKT [261]. Im Kontext der Proliferation und

Migration von PA-SMC konnte außerdem die Serotonylierung von Fibronectin gezeigt werden, was wiederum einen positiven Einfluss auf die Modifikation weiterer Proteine in den Zellen zur Folge hatte [262].

Durch die Verwendung eines Pentylaminderivates konnten  $\alpha$ -Aktin,  $\beta$ -Aktin,  $\gamma$ -Aktin, Filamin A und die schwere Kette von Myosin als weitere arterielle Proteinsubstrate der TGM identifiziert werden [85]. Weiterhin zeigte sich eine Serotonylierung des  $\alpha$ -Aktins, welche die arterielle isometrische Kontraktion förderte. Die Arbeiten werden durch den Befund gestützt, dass auch periphere Arterien ein serotonerges System besitzen, das sich durch die Expression von TPH1, MAO A und SERT auszeichnet und wodurch die Zellen in der Lage sind 5-HT zu synthetisieren, metabolisieren, aufzunehmen und auszuschütten [263]. Des Weiteren führt die Ausschüttung von 5-HT zu einer Steigerung der durch NE induzierten arteriellen Kontraktion. Interessanterweise wurde neben 5-HT kürzlich auch NE als ein biogenes Monoamin identifiziert, das als kovalente Modifikation an Proteinen aus Gewebelysaten der Aorta und der *Vena Carva* auftritt [264]. Zudem kolokalisiert NE mit  $\alpha$ -Aktin in aus diesen Geweben stammenden SMC und die Zellen sind in der Lage Biotin-NE aufzunehmen. Die Inhibition der TGM2 resultierte analog zu 5-HT in einer fehlenden Induktion nach NE-Stimulus und in einer verringerten Kontraktion nach Stimulation mit KCl.

Zusätzlich zu den physiologischen Funktionen im vaskulären System und bei der Thrombocytenggregation konnte gezeigt werden, dass intrazelluläres 5-HT an der Insulinausschüttung beteiligt ist [87]. In  $\beta$ -Zellen des Pankreas' werden die kleinen GTPasen RAB3A and RAB27A serotonyliert, dadurch konstitutiv aktiviert und die Exocytose des Insulins verstärkt. Das serotonylierte RAB3A unterliegt dann analog zu anderen kleinen GTPasen einem proteasomalen Abbau. Diese Befunde wurden mit *Tph1*-defizienten Mäusen erstellt, die einen diabetischen Phänotyp aufweisen, der durch die pharmakologische Wiederherstellung der 5-HT-Level aufgehoben werden kann. Übereinstimmend mit dem TGM-abhängigen Phänotyp der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen auch *Tgm2*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen Diabetestyp auf, der als MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) bezeichnet wird [176]. Im Menschen konnte bisher eine Punktmutation in *TGM2* im Zusammenhang mit MODY gefunden werden, die zu einem Basenaustausch im katalytischen Zentrum des Enzyms führt [265].

Ein intrazellulärer, proliferationssteigernder Effekt von 5-HT konnte in verschiedenen Prostatakrebszelllinien in Kultur und bei einem aus der Prostata stammenden Xenotransplantat in Mäusen beobachtet werden [266]. In der Tat ist schon lange bekannt, dass 5-HT eine regulatorische Rolle in der Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuronen spielt und im Gehirn v.a. an der frühen Entwicklung des monoaminergen Systems des Kortex und der kortikalen Reifung und

Plastizität beteiligt ist. Auch die Differenzierung von Glutamat-enthaltenden Neuronen wird von 5-HT gefördert [267].

Diese Differenzierungsprozesse könnten zum Teil auf dem intrazellulären Mechanismus der Transamidierung beruhen. Es hat sich gezeigt, dass bei der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y die Induktion der Differenzierung durch *All-trans*-Retinolsäure (RA) durch eine erhöhte Expression und Aktivierung von TGM und der Transamidierung von RHOA begleitet wird [268]. Die transamidierte RHOA reguliert hierbei die Reorganisation des Cytoskeletts und aktiviert die Kinasen ERK1/2 und die p38 $\gamma$  MAP-Kinasen. Ebenso führt die Behandlung von Zellen der Promyelozytenleukämie mit RA zu einer terminalen Differenzierung der leukämischen Zellen in neutrophile Granulozyten [269]. Dies geht mit einer massiven Veränderung der Genexpression einher und mit einer Induktion von *TGM2*, die selbst an der Expression mehrerer RA-regulierter Gene beteiligt ist.

In der korticalen Zelllinie A1A1v konnte die konstitutive Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 durch Seronylierung gezeigt werden, die TGM-abhängig in un- und ausdifferenzierten Zellen vorkommt [270]. Hierbei ist die 5HTR2A-gekoppelte Aktivierung von PLC mit einem Ca<sup>2+</sup>-Anstieg und einer Calmodulin-Aktivierung Voraussetzung für die Transamidierung von RAC1 [271]. Auch während der Differenzierung von Megakaryocyten zu Thrombocyten kommt es zu einem Anstieg der SERT-Expression und der Umverteilung des Transporters, was auf eine intrazelluläre Funktion von 5-HT hindeutet [272]. Der SERT wird außerdem während der Differenzierung von Osteoklasten hochreguliert, der SERT-Inhibitor Fluoxetin reduziert hierbei die Differenzierungsrate der Zellen, wobei die Aktivierung von NF $\kappa$ B vermindert und die Level des inhibitorischen Proteins I $\kappa$ B $\alpha$  erhöht werden [273].

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass Proteine unterschiedlichster Gewebe einer TGM-abhängigen Transamidierung unterliegen und neben 5-HT vermutlich *in vivo* auch weitere Monoamine, wie auch Polyamine als Amindonorsubstrat dienen können. Kleine GTPasen sind inzwischen als Proteinsubstrate der TGM etabliert, daneben finden sich jedoch auch weitere Proteine, wie Struktur- und Oberflächenproteine. Die veränderte Genexpression im Kontext von Änderungen der Expressionslevel von *TGM2* und der intrazellulären Konzentrationen von 5-HT deuten auf eine Monoaminylierung von TF und transkriptionsassoziierten Faktoren hin. Potenziell könnten alle glutaminenthaltenden Proteine verschiedener Klassen über diese neuartige posttranslationelle Modifikation funktionell reguliert werden, da sich gezeigt hat, dass auch die  $\alpha$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen und Phospholipase A2 (PLA2) einer Monoaminylierung unterliegen und die Modifikation der PLA2 deren Aktivität um 60 % erhöht [178].

### 3 Die Glutaminreichen und Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Proteine

#### 3.1 Physiologische und pathophysiologische Aspekte

Es ist bereits seit Jahrzehnten bekannt, dass glutaminreiche Domänen und Polyglutaminabschnitte oftmals Bestandteil von regulatorischen Proteindomänen und hier v.a. von zahlreichen TF und transkriptionsassoziierten Proteinen und Cofaktoren sind [274]. Dass der Polyglutaminabschnitt selbst diese regulatorische Funktion vermittelt wurde erstmal 1994 postuliert, als gezeigt wurde, dass glutaminreiche und homopolymere Glutaminabschnitte zwischen zehn und 40 Aminosäureresten (aa) in der Lage sind die Transkription eines Reportergens längenabhängig zu aktivieren [275]. Der glutaminreiche Abschnitt ist neben sauren, prolinreichen und serin-/threoninreichen Abschnitten ein Subtyp von regulatorischen Domänen, der gehäuft in TF zu finden ist. TF mit glutamin- und prolinreichen Domänen agieren hierbei häufig von einer proximalen Promotorregion in Verbindung mit einem *Enhancer*-Element, während TF mit sauren und serin-/threoninreichen Abschnitten von proximalen und distalen Regionen unabhängig von zusätzlichen *Enhancern* wirken [276].

Polyglutaminabschnitte finden sich in transkriptionsassoziierten Proteinen, wie z.B. im Transkriptionsinitiationsfaktor TFIID/TATA-bindenden Protein, im Glucocorticoidrezeptor, dem Octamerbindenden POU-Domäne-enthaltenden TF und dem CREB-bindenden Protein (CBP) und scheinen v.a. bei den an der Genregulation beteiligten Proteinen Teil der regulatorischen Domäne zu sein [277]. Es wird vermutet, dass dieses Sequenzmodul eine polare *Zipper*-Struktur ausbildet, welche die Bindung zwischen verschiedenen TF vermitteln könnte, was bei einer pathologischen Verlängerung des Polyglutaminabschnitts eine unspezifische, erhöhte Affinität zur Folge haben würde [278]. Gesichert ist die Erkenntnis, dass der glutaminreiche Abschnitt von OCT2 Bestandteil der Transaktivierungsdomäne ist, die mit dem prolinreichen Abschnitt oder dem selben Abschnitt des TF synergistisch zusammenwirken kann [279–281]. Weiterhin wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität des neuronalen TF BRN2 durch Interaktion mit dem Polyglutaminbindenden Protein 1 (PQBP1) reprimiert wird [277,282]. PQBP1 wurde neben fünf weiteren PQBP als Protein identifiziert, das die Polyglutaminabschnitt-enthaltende Domäne von BRN2 binden kann [274]. Diese Bindung und deren Einfluss auf die Aktivität von BRN2 deutet auf eine Reihe von TF/PQBP-Interaktionen, welche die Funktionalität der glutaminreichen, regulatorischen Domänen der TF vermitteln könnte (Absch. 1.3.3. und 1.3.4.1).

Erkennungstudien mit Antikörpern zeigen, dass der Polyglutaminabschnitt in transkriptionsassoziierten Proteinen strukturell sehr ähnlich zu dem Abschnitt der Gene ist, die durch ihre verlängerten CAG-Wiederholungen Krankheiten auslösen [283]. Diese pathologischen Verlängerungen des Polyglutaminabschnitts in sonst nicht funktionell verwandten Proteinen führt zur

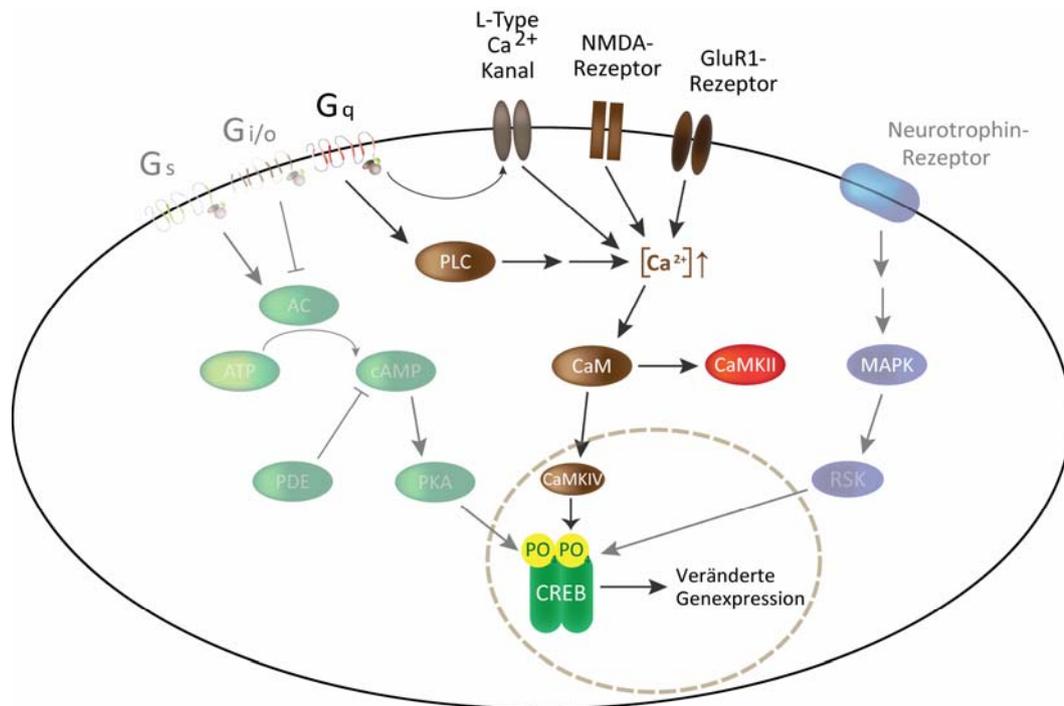
neuronalen Degeneration und verursacht vier bisher bekannte Erkrankungen, darunter HD und Spinozerebelläre Ataxien [283,284]. Das Krankheitsbild ist durch eine Translokation des mutierten Proteins in den Nukleus gekennzeichnet, wo es intranukleäre Aggregate oder Einschlusskörper bildet. Diese Aggregate beinhalten zusätzlich für die Funktion der Zelle entscheidende Proteine, dessen Inaktivierung dann zum Zelltod der Neuronen führen. In den Aggregaten finden sich neben Chaperonen auch Ubiquitin-bindende Proteine wie Ubiquiline, Tollip und p62 und zum anderen transkriptionsassoziierte Faktoren [284,285]. Außerdem ist bekannt, dass der transkriptionelle Kofaktor TAF<sub>II</sub>130 bevorzugt an verlängerte Glutaminbereiche bindet und damit nicht für die Interaktion mit dem *cAMP response element*-bindenden Protein zur Verfügung steht, wodurch die physiologische, transkriptionelle Funktion des TF inaktiviert wird [286]. Es wurde gezeigt, dass der TF NF-Y in einem HD-Mausmodell eine verminderte Bindung an die Promotorregion von HSP70 zeigt und außerdem der TF BRN2 stark vermindert vorliegt, was die Dysfunktion des Hypothalamus in den Tieren erklären könnte (Absch. I.3.3).

Es sind weiterhin Fälle bekannt, in denen eine Verlängerung des Polyglutaminabschnitts im TF selbst zu neurodegenerativen Erkrankungen führt. So wurde in einem Patienten mit einzigartigen neurologischen Symptomen bestehend aus Ataxie und intellektueller Einschränkung eine *de novo*-Verlängerung des Polyglutaminabschnitts im TATA-bindenden Protein (TBP) gefunden [287]. In diesem Zusammenhang wurde eine neuartige Form der Spinozerebellären Ataxie entdeckt, die durch eine Verlängerung des Polyglutaminabschnitts in TBP auf 47-55 Reste gekennzeichnet ist [288]. Außerdem wird die Kennedy Krankheit, die eine spinobulbäre Muskelatrophie ist, durch verlängerte CAG-Wiederholungen im Androgenrezeptorgen hervorgerufen, wie das Screening eines Patientenkollektivs zeigte [289].

### 3.2 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB

Das *cAMP response element* (CRE)-bindende Protein (CREB) ist ein ausschließlich aktivierender TF, der auf eine Vielzahl von Stimuli, wie Peptidhormone, Wachstumsfaktoren oder neuronale Aktivität anspricht [290]. Alle diese Stimuli führen zu einer Aktivierung unterschiedlicher Proteinkinasen (PK), wie z.B. PKA, PKC, mitogen-aktivierter PK (MAPK), Glykogen-Synthase-Kinase III, Casein-Kinase II oder Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) und damit klassischerweise zur Phosphorylierung des Serinrestes 133 (Ser133), was Voraussetzung für die CREB-vermittelte Transkription durch Interaktion mit CBP ist (Abb. 8) [291–293]. CBP dient als verbindendes Element zur RNA-Polymerase II (Pol II) und modifiziert außerdem die umgebende Chromatinstruktur über seine intrinsische Histonacetyl-Transferaseaktivität [294,295]. Daneben gibt es weitere Aminosäurereste oder Bindepartner von CREB, deren Phosphorylierung oder Rekrutierung sich modulierend auf die transkriptionelle Aktivität und Spezifität des TF auswirkt

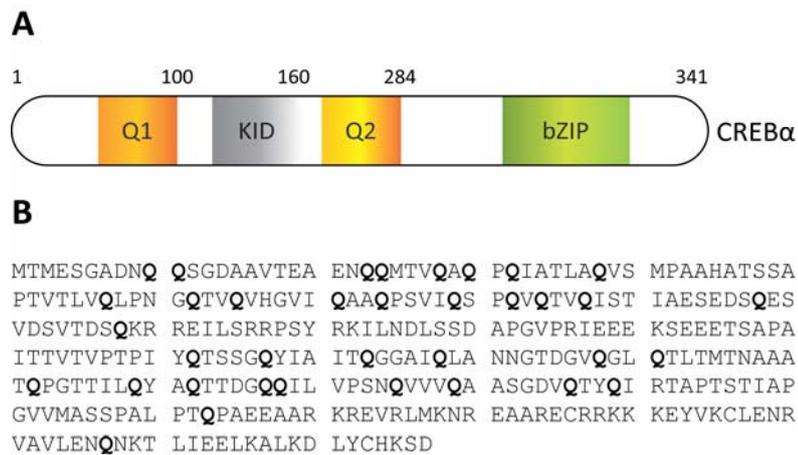
[296]. Neben dem zuerst entdeckten Signalweg der Aktivierung von CREB über cAMP und PKA kann der TF auch über  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden [297,298]. Die PK, die durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert werden und CREB *in vitro*  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig phosphorylieren können sind z.B. CaMKI, II und IV [299–301].



**Abbildung 8: Übersicht über die diversen Signalwege, die zu einer Aktivierung des CRE-bindenden Proteins führen.** Das CRE-bindenden Protein (CREB) wird klassischerweise über die Phosphorylierung ( $\text{PO}_4$ ) des Serinrestes 133 aktiviert, wodurch eine Dimerisierung und Interaktion mit dem CREB-bindenden Protein ermöglicht wird, das als verbindendes Element zur RNA-Polymerase II fungiert. Die Stimuli führen direkt oder indirekt zu einer Aktivierung unterschiedlicher Protein-Kinasen (PK), wie z.B. PKA, PKC, mitogenaktivierter PK (MAPK),  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK), die dann die Phosphorylierung von CREB realisieren. CREB kann damit sowohl über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und die dazugehörigen G-Proteine ( $G_s$ ,  $G_i/o$  und  $G_q$ ) reguliert werden, was zu einer Aktivierung der Adenylat-Cyclase (AC) und damit zu einem erhöhten cAMP-Spiegel und einer Aktivierung der PKA oder über eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der PKC oder CAMK führt. Die Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann außerdem durch weitere  $\text{Ca}^{2+}$ -gesteuerte Kanäle wie dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-, Glutamatrezeptor 1 (GluR1) oder andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkanäle erfolgen. Des Weiteren stimulieren Mitogene wie Neurotrophin über MAPK die Aktivierung von CREB. Modifiziert nach [302].

Für CaMKIV wurde eine funktionelle Rolle in der CREB-Aktivierung gezeigt, die mit einer Translokation der PK in den Kern und der Aktivierung der CRE- und CREB-gesteuerten Genexpression einhergeht [300,301,303]. Neben den CaMK kann auch der RAS/MAPK-Signalweg, der die Effekte von Wachstumsfaktorrezeptor-Tyrosin-Kinasen vermittelt, die Phosphorylierung von CREB über verschiedene ribosomale S6-Kinasen realisieren [304–307]. Außerdem gibt es bestimmte  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Isoformen der Adenylat-Cyclase, die über die Generierung von cAMP PKA aktivieren, welche dann wiederum CREB phosphoryliert [308]. Neben der Phosphorylierung von CREB scheinen auch weitere posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung, Glykosylierung und auch Ubiquitylierung und Sumoylierung eine Rolle in der Modulierung der CREB-Aktivität zu spielen [309–311].

CREB setzt sich aus zwei N-terminalen glutaminreichen Domänen (Q1 und Q2) zusammen, die eine Kinase-induzierbare Domäne (KID) flankieren und gemeinsam den regulatorischen Bereich des Proteins bilden. Der C-Terminus enthält die DNA-bindende Domäne, die aus einem basischen Leucinzipper (bZIP) besteht (Abb. 9) [312]. Neben der KID-Domäne, welche die Interaktion zu CBP und die signalinduzierte Aktivierung von CREB vermittelt, ist weiterhin die Q2-Domäne essentiell für die basale Aktivität des TF [313]. Sie interagiert mit Komponenten der Pol II-Maschinerie, wie TFIIB und TAF<sub>II</sub>130/135, die Untereinheiten von TFIID sind [314,315].



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der 341 aa langen Isoform CREB $\alpha$ .** (A) CREB $\alpha$  besteht aus einer N-terminalen Kinase-induzierbaren Domäne (KID), die von zwei glutaminreichen Domänen (Q1 und Q2) flankiert wird und zusammen den regulatorischen Bereich des Proteins bilden. Der C-Terminus enthält die DNA-bindende Domäne, welche aus einem basischen Leucinzipper (bZIP) besteht. Die Zahlen geben die Positionen der aa an. Modifiziert nach [290,296] (B) Primärsequenz von CREB $\alpha$  in der die Glutaminreste (Q) hervorgehoben sind. Durch die Häufung der Q-Reste lassen sich deutlich die Q-reichen Domänen Q1 und Q2 erkennen. Dazwischen liegt KID mit zahlreichen Serin- (S) und Threonin-Resten (T). bZIP ist durch die basischen aa Lysin (K) und Arginin (R) und die Leucinreste (L) gekennzeichnet. Quelle: NP\_604391.1 (Refseq Protein ID)

Mutationen im LQTL-Motiv der Q2-Domäne heben die Bindung zu TAF<sub>II</sub>130/135 und die damit verbundenen transkriptionelle Aktivität auf [316,317]. Die Q2-Domäne ist außerdem zusätzlich zur bZIP-Domäne essentiell für die Bindung des Zielpromotors, da Mutationen in dieser Region die Verweildauer verkürzen und die Aktivierung des Zielgens stark beeinträchtigen [318]. Der Austausch der Q2-Domäne gegen die glutaminreiche B-Domäne von SP1 aktiviert die Genexpression wieder. Die Q1-Domäne trägt ebenfalls, wenn auch schwach, zur transkriptionellen Aktivierung bei [319,320]. Die zentrale Region des humanen TAF<sub>II</sub>130/135 enthält selbst vier glutaminreiche Domänen (Q1-Q4), von denen hauptsächlich Q1 und Q2 mit dem N-terminalen Teil von CREB interagieren [321]. Neben den verschiedenen Isoformen von CREB gibt es auch weitere CRE-bindende TF, wie CREM oder ATF1, die wiederum in mehreren Isoformen vorkommen, in spezifischen Geweben exprimiert werden und sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken können [290]. Interessanterweise haben die reprimierenden Formen der CREM keine glutamin-

reichen Domänen. Von CREB existieren drei Isoformen, die gleichmäßig in allen Geweben exprimiert werden [322,323]. CREB $\alpha$  ist mit 341 aa die längste Isoform, CREB $\Delta$  besteht aus 327 aa, wobei 14 aa am C-Terminus der Q1-Domäne fehlen. CREB $\beta$  fehlen im Vergleich zu den anderen beiden Isoformen 40 aa am N-terminalen Bereich, was einen Großteil der Q1-Domäne ausmacht. Außerdem gibt es weitere, seltenere Spleißformen, die gewebsspezifisch vorkommen [324,325].

CREB ist an zahlreichen physiologischen und metabolischen Prozessen beteiligt. So ist der TF für die Reifung aller T-Zelllinien, aber auch für Lern- und Gedächtnisfunktionen unabdingbar [326,327]. CREB ist durch die transkriptionelle Kontrolle des *brain-derived* neurotrophischen Faktors an der Entwicklung und Plastizität von Neuronen beteiligt [328,329]. Weiterhin spielt der TF eine Rolle bei der Regulierung des zirkadianen Rhythmus im Hypothalamus [297,330]. Auch während der Spermatogenese werden bestimmte Isoformen von CREB exprimiert [331]. CREB steuert weiterhin durch das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die Glukoneogenese [332]. Weitere zahlreiche metabolische Proteine, TF, Neurotransmitter und -peptide, DNA-Reparatur-, Struktur- und Transportproteine stehen unter der direkten oder indirekten Kontrolle von CREB [333]. Die Abwesenheit von CREB führt u.a. zu Kleinwuchs und Kardiomyopathien [334,335], was zum Teil durch seine Bindung an die Zellzyklus regulierenden Gene Cyclin D1 und Cyclin A zu erklären ist [336,337].

### 3.3 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor SP1

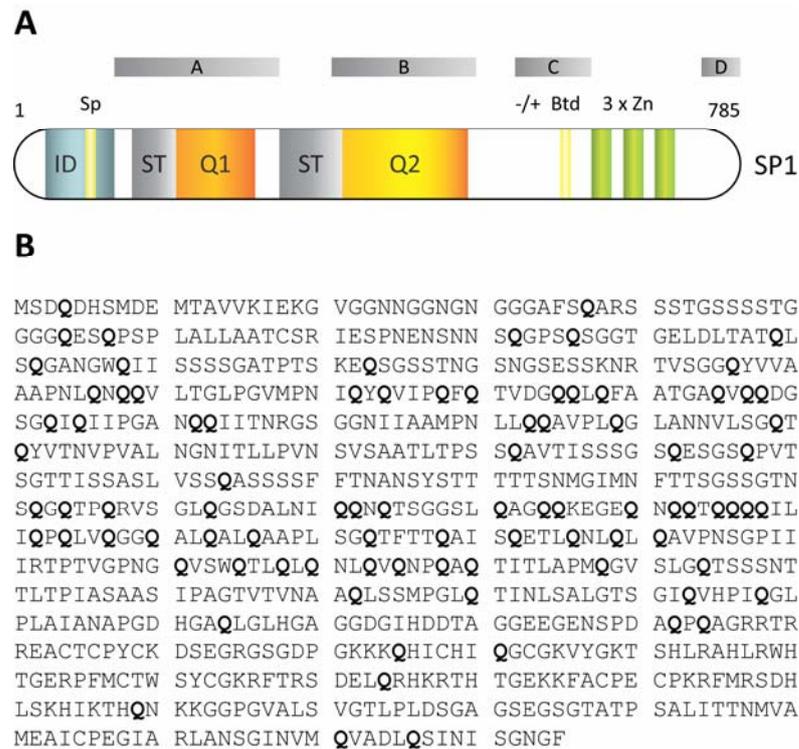
SP1 ist ein TF, der ubiquitär exprimiert wird und an der Regulation zahlreicher Gene diverser zellulärer Prozesse beteiligt ist [338]. SP1 gehört zur Familie der SP/KLF (Krüppel-like Faktor) TF, welche die SP1-Familie und die KLF-Familie einschließt, dessen Mitglieder allesamt eine hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD) besitzen [339,340]. Diese DBD besteht aus drei benachbarten C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingern, die im Falle der SP1-Familie bevorzugt GC-reiche Sequenzen, aber teilweise auch GT-reiche Sequenzen binden (Abb. 10). Die 20 verschiedenen SP/KLF TF konkurrieren um die Bindungsstellen unterschiedlicher Promotoren, dementsprechend kann nicht alleine ausgehend von der SP1-Menge in einem bestimmten Gewebe auf das Genexpressionsmuster geschlossen werden [341]. SP3 besitzt eine starke Homologie zu SP1 und bindet häufig parallel an Promotoren mit mehreren GC-Boxen, wodurch die Aktivierung von SP1 herabgesetzt wird. SP1 ist generell ein aktivierender TF, jedoch existieren auch SP1-ähnliche TF, die reprimierend auf Promotoren mit GC-Boxen wirken.

SP1 besitzt zwei glutaminreiche regulatorische Transaktivierungsdomänen, die direkt mit TBP und dem TBP-assoziierten Faktor 4 (TAF4) interagieren, aber auch die Bildung von aktivierenden Homooligomeren ermöglichen [342–344]. Durch die Rekrutierung von TBP/TAFIID stimuliert SP1

die Initiation der Transkription und wirkt auch an Promotoren ohne TATA-Box aktivierend [345]. Auch der transkriptionsassoziierte Komplex TAF<sub>II</sub>130/135 ist für die SP1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung notwendig [321]. Die zentrale Region des humanen TAF<sub>II</sub>130/135 enthält selbst vier glutaminreiche Domänen (Q1-Q4), von denen Q1 fast ausschließlich mit der Domäne B von SP1 interagiert, während die Domäne A des TF Kontakt mit allen vier Q-Domänen hat. Daneben gibt es noch eine C-terminale Domäne D in SP1, die ebenfalls für die synergistische Wirkung der SP1-Monomere notwendig ist.

SP1 wird weiterhin über verschiedene posttranslationale Modifikationen, aber auch durch die Interaktion mit Proteinen, wie Tumorsuppressor- und Onkogenen reguliert [338]. So gibt es eine Vielzahl von Kinasen, wie PKA, PKC, ERK, JNK, p38 und CDK2, die durch die Phosphorylierung von SP1 größtenteils die DNA-Bindung verstärken, aber auch indirekt die SP1-Proteinlevel erhöhen können. Daneben wird SP1 auch glykosyliert und acetyliert, wodurch die transkriptionelle Aktivität reprimiert wird.

SP1 interagiert direkt mit verschiedenen anderen TF, wie p53, p73, E2F1, SMAD2-4 und JUN/FOS und übt zusammen mit diesen die transkriptionelle Regulation unterschiedlichster Gene aus. p53, JUN und die Mitglieder der SMAD-Familie wirken dabei aktivierend auf SP1. Aber auch der indirekte Einfluss von TGF $\beta$ , p107, RB, CamKII und IV und PKC kann transaktivierend auf den TF wirken. SP1 reguliert hierbei die basale Transkription zahlreicher Haushaltsgene des intermediären Metabolismus, sowie verschiedene Aspekte des Zellwachstums, der Apoptose und Angiogenese und damit auch der Tumorgenese [346]. Übereinstimmend damit kann man in Krebsarten unterschiedlicher Gewebe erhöhte Level von SP1 und SP3 detektieren, darunter Tumore der Brust, Leber, Schilddrüse, Magen und Lunge [347]. SP1 kann je nach Stimulus aktivierend oder reprimierend auf die Proliferation wirken. So aktiviert die Expression des SP1-abhängigen Gens der Dihydrofolat-Reduktase das Zellwachstum, während die Expression von p21WAF1/CIP1 inhibierend wirkt [338]. Die Aktivierung der Gene von Cyclin E, CDK2, E2F1 und MYC fördert den Eintritt der Zellen in die S-Phase. Die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Inhibitoren p15INK4B, p16INK4A, p18INK4C, p19INK4D, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 und p57KIP2 resultiert hingegen in der Arretierung der Zellen im Zellzyklus. Durch die Rekrutierung der Histon-Deacetylase 1 und der DNA-Methyl-Transferase 1 kann SP1 außerdem auf epigenetischer Ebene reprimierend auf verschiedene Promotoren wirken [348,349].

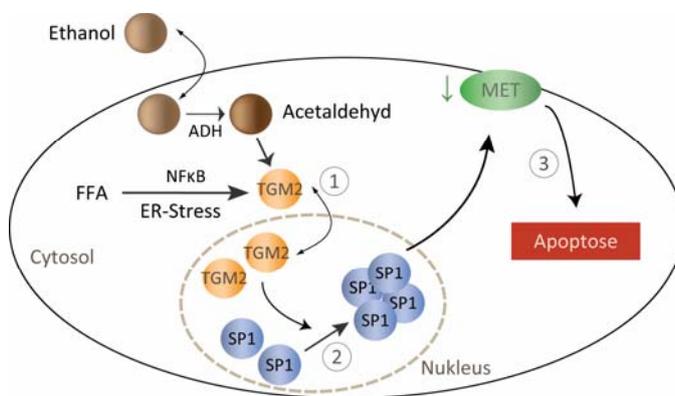


**Abbildung 10: Schematische Darstellung des humanen Transkriptionsfaktor SP1. (A)** Schematische Darstellung der 785 aa langen Isoform A des humanen TF SP1, der in seinem N-terminalen regulatorischen Abschnitt eine inhibitorische Domäne (ID), eine Sp-Box (Sp), zwei S-/T-reiche Domänen und zwei Q-reiche Domänen (Q1 und Q2) besitzt. Der C-Terminus enthält einen stark geladenen Abschnitt (-/+), eine *Buttonhead*-Box (Btd) und die DNA-bindende Domäne, die aus drei Zinkfingern (Zn) des C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Typs besteht. Die grauen Kästen geben die Domänen A-D wieder, die in die transkriptionelle Aktivierung involviert sind und mit zahlreichen Kofaktoren interagieren können. Modifiziert nach [338]. **(B)** Primärsequenz von SP1 in der die Q-Reste hervorgehoben sind. Durch die Häufung der Q-Reste lassen sich deutlich die Q-reichen Domänen Q1 und Q2 erkennen. Jeweils davor liegen die ST-reichen Domänen. Die Zinkfinger der DNA-bindenden Domäne sind durch Cystein- (C) und Histidinreste (H) gekennzeichnet. Quelle: NP\_612482.2 (Refseq Protein ID).

Pathophysiologisch ist SP1 neben seinem Einfluss auf die Tumorgenese durch die Wechselwirkung mit MYC und p53 auch an Symptomen der neurodegenerative Erkrankung HD beteiligt (Absch. I.3.1). Das mutierte Huntingtin stört die Interaktion von SP1 mit TAF4, wodurch z.B. die Expression von *DAR2* reprimiert wird [350]. In Hepatocyten resultiert die Behandlung mit Ethanol oder FFA in einer TGM2-abhängigen Polymerisierung von SP1, was zu einer Inaktivierung des TF und damit zu einer starken Abnahme der *MET*-Expression führt (Abb. 11) [187].

*MET* ist der Hauptrezeptor des HGF und die fehlende Aktivierung hat eine Caspase-unabhängige Apoptose der Leberzellen zur Folge, die auch im Tiermodell und in Patienten mit alkoholischer und nicht-alkoholischer Steatohepatitis beobachtet werden konnte (Absch. I.1.3). Die Behandlung mit Alkohol erhöht dabei die Expression von *TGM2* und die Transamidierungsaktivität von TGM2. Diese Aktivierung ist zumindest teilweise RA-abhängig, da RA die Expression von TGM2 über die Bindung von RA-Rezeptoren an SP1 verstärkt [202]. Jedoch zeigt sich nach RA-Behandlung von verschiedenen murinen Kardiomyoblasten eine Interaktion von TGM2 mit JUN, was die Bindung

des AP1-Komplexes an den MMP9-Promotor verhindert. Die Bildung eines Komplexes von JUN/FOS zu AP1 wird jedoch in Ethanol-behandelten Hepatocyten nicht gestört, was auf Unterschiede in diesen Systemen hindeutet [204,209]. FFA hingegen erhöhen den Stress des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und führen dadurch zu einer PKR-like ER-Kinase-abhängigen Aktivierung von NFκB und nukleärer TGM2 [201]. In fibrotischen Erkrankungen, wie systemischer Sklerose, die durch eine verstärkte Expression der extrazellulären Matrix und des profibrotischen Proteins CTGF gekennzeichnet sind, hat sich gezeigt, dass die Expression von CTGF TGFβ-unabhängig durch SP1 aktiviert wird [351]. Die verstärkte Bindung des TF bei der Erkrankung wird dabei durch eine erhöhte Phosphorylierung von SP1 hervorgerufen.



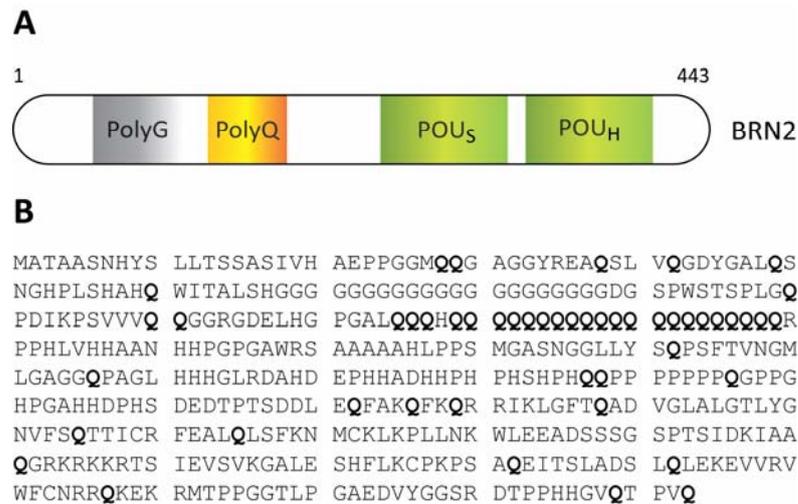
**Abbildung 11: Der Einfluss von Ethanol und freien Fettsäuren auf Hepatocyten.**

Ethanol gelangt durch freie Diffusion in die Zellen. Im Cytosol wird Ethanol in einem ersten Schritt durch Alkohol-Dehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd umgesetzt. Acetaldehyd und freie Fettsäuren (FFA) führen direkt oder über eine Stressreaktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und NFκB zu einer Translokation der TGM2 in den Nucleus (1). Diese Translokation und eine parallele Aktivierung initiiert eine TGM2-vermittelte Polymerisierung des TF SP1 im Nucleus (2). Die Vernetzung

von SP1 resultiert in einer Abnahme der SP1-abhängigen Transkription, die den Hepatocytenwachstumsfaktorrezeptor MET einschließt. Das Fehlen von MET verursacht eine Caspase-unabhängige Apoptose der Hepatocyten (3), die im Fall von Ethanol zu einer alkoholischen Steatohepatitis (ASH) und bei übermäßigem Fettkonsum zu einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH) führen kann. Modifiziert nach [187].

### 3.4 Der Polyglutaminabschnitt-enthaltende Transkriptionsfaktor BRN2

Von der Familie der POU-Domäne-enthaltenden TF sind zahlreiche Vertreter in Säugetieren zu finden, in welchen sich die TF in sechs Klassen einteilen lassen. Die POU-Domäne-enthaltenden TF können sowohl in zahlreichen Geweben, wie auch zellspezifisch exprimiert sein und regulieren alleine oder in Kombination mit anderen transkriptionsassoziierten Proteinen die Differenzierung vieler verschiedener Zelllinien, aber auch die ubiquitäre Expression von Haushaltsgenen [352]. Die Gene dieser Proteinfamilie enthalten keine Introne und sind evolutionär stark konserviert [353]. Die POU-Domäne, nach welcher die Familie benannt ist, ist eine hochkonservierte DNA-Bindedomäne, die sich aus einer N-terminalen POU-spezifischen Domäne von etwa 75 aa und einer C-terminalen POU-Homeodomäne von ca. 60 aa zusammensetzt, die über eine flexible Sequenz variabler Länge verknüpft sind und klassischerweise Bindesequenzen bestehend aus acht Nukleotiden erkennen (Abb. 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung des humanen Transkriptionsfaktors BRN2.** (A) Schematische Darstellung des 443 aa langen POU-Domäne-enhaltenden TF BRN2, der in seiner regulatorischen Domäne einen Polyglycin (PolyG)- und einen PolyQ-Abschnitt (PolyQ) enthält. Der C-Terminus setzt sich aus der spezifischen POU-Domäne (POU<sub>S</sub>) und der Homeobox-POU-Domäne (POU<sub>H</sub>) zusammen, die durch eine variable Region von einander getrennt sind und gemeinsam die DNA-bindende Domäne des Proteins bilden. (B) Primärsequenz von BRN2, in der die Q-Reste hervorgehoben sind. Die PolyG- und PolyQ-Abschnitte im N-terminalen Bereich lassen sich deutlich erkennen. Die POU<sub>S</sub>-Domäne erstreckt sich von aa 262 bis 336 und die POU<sub>H</sub>-Domäne von aa 355 bis 412. Auch die DNA-bindende Domäne enthält mehrere, vereinzelte Q-Reste. Quelle: NP\_005595.2 (Refseq Protein ID).

BRN2 (POU3F2) gehört zur Klasse III der POU-Domänen enthaltenden TF und wird hauptsächlich im ZNS exprimiert [353]. In der Zelle ist BRN2 je nach Zelltyp exklusiv im Nukleus oder auch im Cytoplasma zu finden, wobei es dann einem selektiven nukleocytoplasmatischen Transfer durch Importin-Alpha unterliegt, der die transaktivierende Aktivität des TF reguliert [353,354]. Im Menschen ist *BRN2* auf Chromosom 6q16 lokalisiert und Orthologe des Gens können bis zu *Caenorhabditis elegans* gefunden werden [353,355]. Während der Embryonalentwicklung der Säugetiere wird BRN2 im frühen Neuralrohr und später im Hypothalamus exprimiert. In der Entwicklung des Hypothalamus spielt BRN2 eine wichtige Rolle, indem es die terminale Differenzierung der hypothalaminergen, neurosekretorischen Zellen reguliert [356]. Weiterhin wird BRN2 in dieser Hirnregion zusammen mit SIM2 für die Expression der sekretierten neuroendokrinen Hormone Oxytocin, Arginin-Vasopressin, Somatostatin und dem Corticotropin-releasing-Hormon benötigt [356–358]. Durch die Aktivierung des *TPH2*-Promotor und damit der Kontrolle über die Expression des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der 5-HT-Synthese (Absch. I.2.1.1), ist BRN2 entscheidend an der Regulation des zentralen serotonergen Systems beteiligt [282]. Die Regulation des *TPH2*-Promotors scheint in synergistischer Wirkungsweise mit SIM1 zu erfolgen [359].

Außerdem reguliert BRN2 zusammen mit SOX2 und anderen POU-Domäne-enhaltenden TF die Entwicklung von embryonalen Stammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen, wobei Stammzell-spezifische Gene wie Nestin aktiviert werden [360,361]. Eine weitere Aufgabe im ZNS, die u.a.

durch BRN2 zusammen mit OCT6 über die Aktivierung des Zinkfingerproteins KROX20 realisiert wird, ist die Myelinisierung der Schwannschen Zellen [362]. Zusätzlich reguliert BRN2 verschiedene Aspekte der Neurogenese wie die Teilung von Vorläuferzellen, deren Differenzierung und die Migration von Neuronen [363]. In Kombination mit ASCL1 und MYT1 ist BRN2 in der Lage murine embryonale und postnatal gewonnene Fibroblasten effizient und direkt in funktionelle Neuronen umzuwandeln [364]. Diese direkte Reprogrammierung findet ebenfalls mit analog gewonnenen, humanen Fibroblasten statt, wobei neben den genannten TF noch NeuroD1 verwendet werden muss [365]. Unter Verwendung von BRN2, SOX2 and FOXG1 konnten aus murinen und humanen Fibroblasten tripotente neuronale Vorläufer generiert werden, die in der Lage sind zu Neuronen, Astrocyten und Oligodendrocyten zu differenzieren [366].

Auch außerhalb des ZNS übernimmt BRN2 einige Aufgaben. So ist der TF an der Regulierung der Differenzierung von Keratinocyten beteiligt [367]. Weiterhin ist BRN2 einer von mehreren TF, die in einem komplexen regulatorischen Netzwerk die Differenzierung und Proliferation von Melanocyten kontrollieren [367,368]. BRN2 inhibiert hierbei die Promotoraktivität der Tyrosinase und wirkt abhängig vom Kontext aktivierend oder inhibierend auf den *Microphthalmia-associated* TF (MITF). Allerdings wird BRN2 in Melanomen durch Beta-Catenin stark hochreguliert, reprimiert hierbei MITF und die cGMP-abhängige Phosphodiesterase 5A, aktiviert den Stammzellfaktor KITL und trägt damit entscheidend zur Proliferation, Morphologie, Invasivität und Tumorgenität der Zellen bei [369–373]. Weiterhin ist BRN2 notwendig für die letzten Schritte in der Entwicklung der Augenlinse und reguliert die Expression diverser Gene in den bipolaren Zellen der Retina [374,375].

Es wurde gezeigt, dass BRN2 und BRN4 an die selbe regulatorische DNA-Sequenz von *DAR1A* binden können, jedoch entgegengesetzte Effekte auf die transkriptionelle Aktivität des dazugehörigen Promotors haben [375]. BRN4 hat hierbei eine verstärkende aktivierende Wirkung, die BRN2 fehlt. Es wird vermutet, dass es einen inhibitorischen, transkriptionellen Kofaktor gibt, der den Polyglutaminabschnitt von BRN2 bindet, der in BRN4 fehlt. Im Kontext zweier, unterschiedlicher Promotoren wurde die reprimierende Wirkung von PQBP1 auf die Aktivität von BRN2 gezeigt (Absch. I.3.4.1).

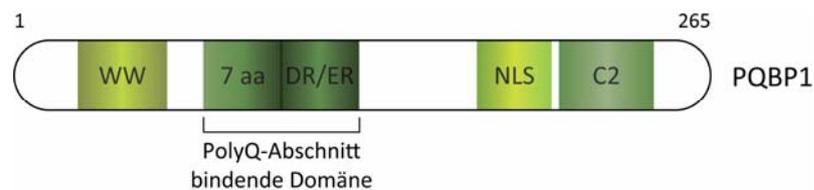
### **3.5 Die Familie der Polyglutamin-bindenden Proteine**

#### **3.5.1 Das Polyglutamin-bindende Protein 1**

PQBP1 wurde über die Bindung an einen 26 Glutamin-enthaltenden Abschnitt des Proteins BRN2 (Absch. I.3.3) isoliert und befindet sich innerhalb der Zelle vorwiegend im Nukleus [274,284,376]. PQBP1 wird ubiquitär exprimiert und zeigt im Gehirn hohe Expressionslevel im Hippocampus, im

cerebellaren Cortex und im *Bulbus olfactorius* [277]. PQBP1 ist evolutionär stark konserviert und findet sich sowohl im Nematoden *C. elegans* als auch in der Pflanze *Arabidopsis thaliana*.

Das humane PQBP1 hat eine Länge von 265 aa, ein Molekulargewicht von 30,4 kDa und ist auf dem Chromosom Xp lokalisiert. PQBP1 besitzt eine einzigartige Struktur, die zum einen aus einer N-terminalen WW-Domäne besteht, die exakt mit der Konsensussequenz der Domänenfamilie dieser Proteinmodule übereinstimmt (Abb. 13) [377,378]. WW-Domänen binden prolinreiche Liganden und kommen in mehreren verschiedenen TF vor [379]. Die WW-Domäne findet sich ebenfalls in dem PQBP1-Homologen von *M. musculus* und *C. elegans* [376]. Interessanterweise fungierte die WW-Domäne des PQBP1 allein als transkriptioneller Aktivator in einem GAL4 DNA-Bindungsfusionsexperiment [379]. Der mittlere Teil des PQBP1 besteht aus einer Domäne, die durch polare Aminosäuren gekennzeichnet ist [284]. Die polaren Aminosäuren bilden Wiederholungen einer Abfolge von zwei und sieben Aminosäuren. Meist kommen DR- oder ER-Wiederholungen in alternierender Folge vor.



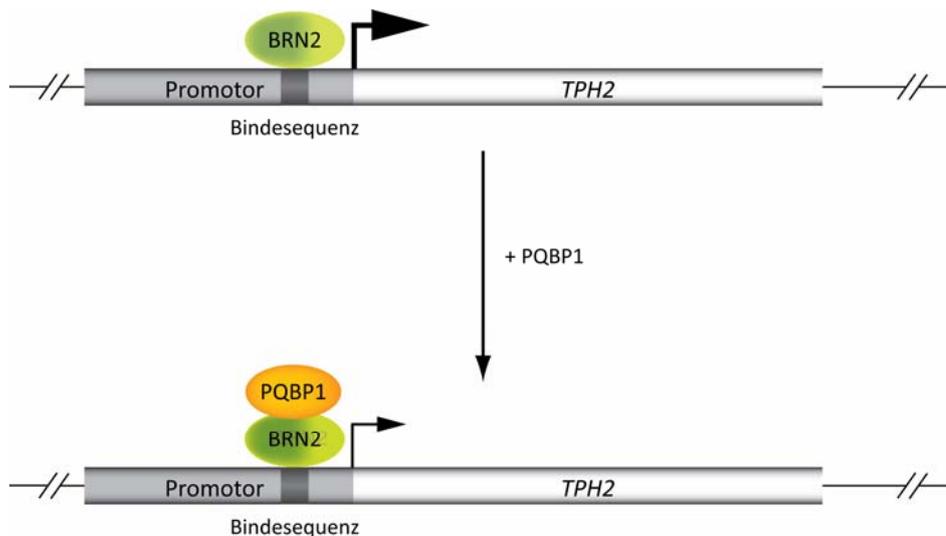
**Abbildung 13: Schematische Darstellung des 265 aa langen Polyglutamin-bindenden Proteins 1.** Das PolyQ-bindende Protein 1 (PQBP1) besitzt in seinem N-Terminus eine Domäne mit zwei konservierten Tryptophan (W)-Resten, welche die Bindung zu prolinreichen Sequenzen vermittelt. Im zentralen Teil des Proteins bildet der Abschnitt aus polaren aa, wie Aspartat (D), Glutamat (E) und R, die PolyQ-Abschnitt-bindende Domäne. Der C-Terminus setzt sich aus einem Kernlokalisierungssignal (NLS) und der  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden C2-Domäne zusammen. Quelle: NP\_001027556.1 (Refseq Protein ID), modifiziert nach [379].

Die Abfolge von zwei polaren Aminosäuren findet man auch in anderen Proteinen, u.a. in zwei Proteinen, die ebenfalls Proteine mit pathologisch verlängerten Polyglutaminabschnitten binden [380,381]. Jedoch ist die sich wiederholende Abfolge von sieben Aminosäuren bisher nur im humanen PQBP1 gefunden worden [284]. *Two-hybrid*-Deletionsanalysen zeigen, dass die mittlere polare Domäne von PQBP1 essentiell für die Bindung an Polyglutaminabschnitte ist [277]. Die C-terminale Domäne von PQBP1 ist wiederum spezifisch für das Protein, evolutionär stark konserviert und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen [284]. Sie enthält ein vermeintliches Kernlokalisierungssignal und eine C<sub>2</sub>-Domäne, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phospholipidsignalweiterleitungen vermitteln könnte [277].

*Yeast-two-hybrid*-Experimente zeigen eine Interaktion dieser C-terminalen Domäne sowie des kompletten Proteins mit U5-15kD (DIMP1) [277,382], dem Hefehomolog von U5-15kD [383]. U5-15kD ist als snRNP-Komponente ein Teil des Proteinkomplexes U5, der zusammen mit U4 und U6 das Spleißosom ausbildet. Außerdem bindet die WW-Domäne von PQBP1 an NpwBP, das

ebenfalls als Bindepartner von U5-15kD identifiziert wurde [382,384]. Befunde deuten darauf hin, dass PQBP1 das Bindeglied zwischen Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Proteinen und dem Spleißosom sein könnte. Dieses wird ferner dadurch unterstützt, dass die Koexpression von PQBP1 und U5-15kD die Verteilung des nicht-snRNP Spleißfaktors SC-35 und des Kofaktors SRm300 ändert [382]. Neben der Beteiligung an Spleißprozessen könnte PQBP1 an der direkten Regulation von transkriptionellen Vorgängen mitwirken. Es ist bekannt, dass einige WW-Domäne-enthaltende Proteine, u.a. CA150, PRP40, PIN1 und NEDD4 mit der Carboxyterminalen Domäne (CTD) der großen Untereinheit der DNA-abhängigen Pol II interagieren und so die Terminierung der RNA-Synthese, das Spleißen und die Degradierung der Pol II regulieren [377]. Auch PQBP1 kann die CTD von Pol II binden, wobei die Bindung abhängig vom Grad der Phosphorylierung des CTD ist [385].

Weiterhin wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität des neuronalen TF BRN2, welcher im Nukleus mit PQBP1 kolokalisiert, reprimiert wird (Abb. 14) [277]. Dieses konnte zum einen durch Chloramphenicol-Acetyltransferase-Experimente im Kontext von *DAR1A* in NS20Y-Zellen und zum anderen über Luciferaseexperimente am *TPH2*-Promotor in SHP-Zellen gezeigt werden [277,282].



**Abbildung 14: Die Regulatorische Funktion von PQBP1 im Kontext der transkriptionellen Aktivität des Transkriptionsfaktors BRN2.** BRN2 bindet an eine spezifische Bindesequenz im Promotor von *TPH2* und aktiviert dadurch die Expression des Gens. Die Anwesenheit von PQBP1 im Nukleus bewirkt eine Inhibition der transkriptionellen Aktivität des TF [277,282].

Da PQBP1 sowohl das Spleißosom, als auch TF direkt binden kann, könnte es die Transkription mit dem Spleißprozess verbinden. Es ist bekannt, dass die basale Transkription durch die Phosphorylierung der CTD von Pol II erhöht wird, was vorrangig auf eine verstärkte Interaktion mit Spleißfaktoren zurückzuführen ist und die transkriptionelle Regulation eng mit dem Spleißen verknüpft [386]. Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, ob PQBP1 hauptsächlich die basale Transkription kontrolliert oder eine spezifische Kontrolle ausübt und ob diese ausschließlich

reprimierend wirkt oder auch eine positive Regulation zur Folge haben kann. Pathophysiologisch ist bekannt, dass Mutationen im PQBP1 syndromische und nichtsyndromische mentale Retardierungen verursachen, die u.a. durch Mikrozephalie, eine Lippenkieferspalte, einem angeborenen Herzfehler und eine kleine Statur gekennzeichnet sein können [387,388]. Trunkierte Formen von PQBP1, die in mehreren Familien gefunden wurden und sich durch das Fehlen der C-terminalen Domäne auszeichnen, führen hierbei zu einer verminderten Lokalisation im Nukleus [389,390]. Des Weiteren wird vermutlich die Interaktion mit U5-15kD und damit dem Spleißosom gestört, was schlussendlich zu Schäden in der Gehirnentwicklung führt [389,391]. Außerdem wurden Mutationen identifiziert, welche die DR/ER-Wiederholungen der polaren Domäne betreffen, Bindungsstudien mit diesen mutierten Formen stehen noch aus [392]. Eine Punktmutation (Tyr > Cys) in der WW-Domäne, die einen konservierten Tyrosinrest betrifft, führen zu einer verminderten Bindung von prolinreichen Proteinliganden und dem Spleißfaktor WBP11 [393,394].

Weiterhin häuft sich Evidenz, dass PQBP1 mit dem Verlauf von neurodegenerativen Erkrankungen wie Spinozerebellärer Ataxie und HD in Verbindung steht [274]. Diese Erkrankungen kommen durch eine Verlängerung des Polyglutaminabschnitts verschiedener Proteine zustande (Absch. I.3.1), die abgesehen von diesem Merkmal nicht miteinander in Verbindung zu bringen sind. Interessanterweise zeichnen sich die neun bekannten Polyglutaminerkrankungen allesamt durch eine transkriptionelle Dysregulation aus, die neben der Bildung von Proteinaggregaten im Gehirn in Verdacht steht den Zelltod spezifischer Neuronen in verschiedenen Regionen des ZNS zu verursachen.

Die Verlängerung des Polyglutaminabschnitts des Ataxin-1 ist u.a. für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 1 verantwortlich [385]. Es konnte gezeigt werden, dass PQBP1 mit Ataxin-1 abhängig von der Länge des Polyglutaminabschnitts interagiert und damit den neuronalen Zelltod mittels eines apoptotischen Mechanismus fördert. PQBP1 bindet hierbei an die CTD der Pol II. Die Bindung ist vom Phosphorylierungsstatus der CTD abhängig und wird durch das mutierte Ataxin-1 verstärkt. Die Bildung des ternären Komplexes aus Pol II-CTD/PQBP1/PolyQ-Ataxin-1 führt weiterhin zu einer verminderten Phosphorylierung der CTD und damit zu einer abgeschwächten basalen Transkription. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch ein *in vivo*-Experiment bestätigt, in denen die Überexpression von PQBP1 in Mäusen einen SCA1-ähnlichen Phänotyp hervorruft [395]. Zusätzlich konnte durch *Two-hybrid*-Experimente eine Interaktion von PQBP1 mit Huntingtin und dem Androgenrezeptor gezeigt werden, dessen Mutation die spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy auslöst und eine generelle Beteiligung von PQBP1 in Trinukleotiderkrankungen durch transkriptionelle Veränderungen impliziert [277].

Abschließend sollte erwähnt werden, dass vom humanen PQBP1 mehrere alternative Transkripte bekannt sind, die als PQBP1a-d bezeichnet werden [396]. PQBP1a enthält nur die WW-Domäne, PQBP1b/c enthalten zusätzlich dazu die mittlere polare Domäne und PQBP1d besteht nur aus der WW- und der C-terminalen Domäne. Eine biologische Funktion dieser Transkripte ist bisher unbekannt.

### 3.5.2 Die weiteren Mitglieder der Familie der Polyglutaminabschnitt-bindenden Proteine

Neben PQBP1 wurden über die Bindung an einen 26 Glutamine enthaltenden Polyglutaminabschnitt des TF BRN2 fünf weitere Klone isoliert, die allesamt die polare Domäne mit PQBP1 gemeinsam haben, die beim PQBP1 essentiell für die Bindung an Polyglutaminabschnitte ist [274,277]. Einer der identifizierten Klone ist identisch mit der *transitional* ER ATPase (TERA), die am ATP-abhängigen vesikulären Transport vom ER in den Golgiapparat beteiligt ist [396,397]. Die restlichen vier Klone wurden als PQBP2-PQBP5 benannt. PQBP2 und PQBP5 bilden laut computer-gestützten Vorhersagen wie PQBP1 helikale Strukturen in ihrer polaren Domäne aus. *Northern Blotting*-Analysen zeigen, dass *PQBP3* und *TERA* im humanen Gehirn exprimiert sind.

PQBP2 findet sich in der Literatur auch als *Vacuolar Protein Sorting 37 Homolog A* (VPS37A) oder *Hepatocellular carcinoma-related Protein 1* (HCRP1). VPS37A wurde als Homolog eines der Proteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, das für die Abkapselung der Viruspartikel des Humanen Immundefizienz-Virus Typ 1 von der Wirtszelle notwendig sind und dabei direkt an TSG101 bindet [398]. VPS37A besitzt eine konservierte mod\_r-Domäne und eine mutmaßliche UEV-Domäne. UEV-Domänen sind für ihre Bindungskapazität von Ubiquitin bekannt und kommen häufig in Proteinen vor, die ubiquitinylierte Proteine der endosomalen Proteinsortierung und damit der Degradierung in Lysosomen, aber auch nicht degradierenden regulatorischen Prozessen zuführen [399–401]. Folgearbeiten bestätigen, dass VPS37A eine Untereinheit des ESCRT-I-Komplexes ist, die essentiell für den lysosomalen Abbau des EGF-Rezeptors und die erfolgreiche Infektion des *Non-enveloped picornavirus echovirus 1* ist [402,403]. HCRP1 wird während der Entstehung von hepatozellulären Karzinomen herunterreguliert [404]. HCRP1 befindet sich größtenteils im Nukleus, aber auch über das Cytoplasma verteilt. Eine direkte Wirkung als Tumorsuppressorgen konnte *in vivo* nicht gezeigt werden, jedoch stimuliert eine Reduktion der VPS37A/HCRP1-Level in BEL-7404-Zellen das Zellwachstum und verstärkt die Invasivität der Zellen [405]. Weiterhin ist die Expression von HCRP1 nach einer tumorbedingten Leberresektion in humanen Patienten mit einer erhöhten postoperativen Überlebensrate assoziiert [406]. Diese Befunde werden dadurch gestützt, dass HCRP1 auch in Ovarialkarzinomen herunterreguliert wird und hier mit einer erhöhten Invasivität und Therapieresistenz der Tumorzellen verknüpft ist [407].

PQBP3 wird auch als *Nucleolar protein 7* (NOL7) bezeichnet. Die subzelluläre Lokalisation von NOL7 ist neben dem Nukleolus auch der Nukleus [408,409]. Untersuchungen haben gezeigt, dass NOL7 drei Kernlokalisierungssignale besitzt, welche für den aktiven Transport in den Kern und weiter in den Nukleolus notwendig sind [410]. Die Deletion von *NOL7* auf Chromosom 6p23 führt zur Entwicklung von Gebärmutterhalskrebs nach Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus. Mehrere Tumorzelllinien und humane Tumorproben zeigen den allelischen Verlust oder somatische Mutationen von *NOL7* [408,411]. Die Funktion als Tumorsuppressorgen konnte auch *in vivo* bestätigt werden, wo NOL7 das Tumorwachstum von Xenotransplantaten durch verminderte Angiogenese inhibierte. Dies konnte durch eine verminderte Expression des *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und des Inhibitors der Angiogenese Thrombospondin-1 gezeigt werden. Eine Deletion des chromosomalen Abschnitts 6p23 kann ebenso in anderen Tumorarten wie Leukämien, Lymphadenomen, Osteosarcoma oder Retinoblastoma gefunden werden und diese Tumore sind daher ebenso auf den Verlust von NOL7 zurückzuführen [409]. Der Promotor von *NOL7* wird von den TF SP1, MYC und RXR $\alpha$  gebunden, wobei die beiden letzteren die Expression von *NOL7* positiv beeinflussen. Vom humanen NOL7 wurden drei alternative Spleißformen identifiziert, die in unterschiedlichen nukleären Kompartimenten zu finden sind [412]. Der *Knockdown* von *NOL7* führt zu einem Verlust der inneren nukleolären Architektur und vermindert die Proliferation der Zellen.

Die Gensequenz von PQBP4 ist bisher nicht annotiert und es sind keine weiteren Interaktionen oder physiologische Funktionen des Proteins bekannt. PQBP5 findet sich in der Literatur als NOL10. Es konnte gezeigt werden, dass NOL10 mit der DEAD-*box* RNA-Helikase DDX47 interagiert, die eine Rolle in der Prozessierung von prä-rRNA spielt und damit am RNA-Metabolismus und zusammen mit NOL10 an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist [413,414]. Beide Proteine finden sich im Nukleolus. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das *NOL10*-Homolog *CG7516* in *Drosophila melanogaster* an der Speicherung von Triglyceriden beteiligt ist und die erhöhte Menge von *NOL10* mit Adipositas in der Maus assoziiert werden kann [415,416].

TERA, auch *Valosin containing protein* oder p97, ist bis zum Krallenfrosch *Xenopus laevis* konserviert und stellt das notwendige ATP für den Transport von Vesikeln des ER zum Golgiapparat bereit [396,417]. In diesem Kontext nimmt TERA Funktionen in einer Vielzahl von zellulären Prozessen wahr. Die meisten dieser Funktionen werden direkt oder indirekt über das Ubiquitin-Proteasom reguliert und sind z.B. Ubiquitin-abhängige Proteindegradierung, Stressantworten, apoptotische Vorgänge oder die Assemblierung des ER und des Golgiapparates [418]. Die native Form von TERA besteht aus sechs Monomeren mit jeweils einem Molekulargewicht von 100 kDa, die sich zu einer ringförmigen Struktur zusammensetzen. Obwohl TERA hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert ist, führt die Stimulation mit EGF zur Translokation in den Nukleus [419]. Es

wurde gezeigt, dass TERA *in vitro* und *in vivo* mit dem *testis brain RNA*-bindenden Protein interagiert [420]. Beide Proteine sind vermutlich Komponenten eines Komplexes, der den intra- und auch interzellulären Transport und die Positionierung von mRNA organisiert. Des Weiteren ist TERA essentiell für die Fragmentierung des ER und Golgiapparates während der Mitose, der anschließenden Reassemblierung dieser Zellorganellen und der Bildung der Kernhülle und somit für die Regulation der Proliferation [421,422]. In humanen Zelllinien lässt sich zeigen, dass TERA an der Proteasom-vermittelten Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  beteiligt und assoziiert an das 19 S und 26 S Proteasom zu finden ist [423].

TERA ist weiterhin durch die Interaktion mit mehreren Ubiquitin-Ligasen am Abbau von fehlgefalteten Proteinen beteiligt [424]. Außerdem wird NF $\kappa$ B *in vitro* durch TERA aktiviert, wodurch die ATPase in Dunn-Zellen als antiapoptotischer Faktor wirkt und die Metastasenbildung dieser Tumorzellen fördert [425]. Übereinstimmend damit vermittelt TERA die Resistenz gegen den TNF $\alpha$ -abhängigen Zelltod in murinen Hepatomazellen und findet sich in erhöhten Mengen in Patienten mit kolorektalen oder Lungen- oder Schilddrüsenkarzinomen [426–429]. Außerdem wirkt sich das Fehlen von TERA in Hepatocyten negativ auf das Überleben der Zellen aus, wenn diese mit Chrom(VI)-Verbindungen behandelt werden [430]. In stimulierten neutrophilen Granulozyten, die im Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis vorherrschen, wird die Expression von 21 verschiedenen Proteinen hochreguliert, darunter TERA, Cathepsin D und TGM2, die damit an den entzündlichen Prozessen der Krankheit beteiligt sein könnten [222]. Nach der Induktion von *Diabetes mellitus* Typ I kommt es neben anderen Proteinen ebenfalls zu einer erhöhten Expression von TERA und der regulatorischen Untereinheit 7 des Proteasoms S26, die mit der IL 1 $\beta$ -induzierten Inhibition der  $\beta$ -Zellfunktion in Zusammenhang steht [431].

## 4 Zielsetzung

In Säugetieren gibt es durch die Blut-Hirn-Schranke und die Existenz zweier Isoformen der TPH, die das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der 5-HT-Synthese ist, eine strikte Trennung der zentralnervösen und peripheren 5-HT-Pools [95]. Humane und murine Genkopplungsstudien zeigen, dass die periphere Form des Enzyms TPH1 zu den genetischen Risikofaktoren gehören könnten, die die Entwicklung eines Alkoholismus begünstigen [432,433]. Weiterhin gibt es Studien an verschiedenen ethnischen Gruppen, die intronische Polymorphismen von *TPH1* direkt mit einem gesteigerten Risiko zur Entwicklung eines Alkoholismus und außerdem mit einem frühen Eintrittsalter in die Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang bringen [434–436]. Aufgrund der Tatsache, dass die zweite TPH-Isoform erst 2002 entdeckt wurden, ergibt sich weiterhin die Problematik, dass frühere Untersuchungen davon ausgingen, dass TPH1 die neuronale Form des Enzyms ist [83,95].

Im Rahmen dieser Promotion sollte daher überprüft werden, ob neben der veränderten serotonergen Neurotransmission auch die Aktivität der TPH1 und damit die peripheren 5-HT-Spiegel die freiwillige Alkoholaufnahme beeinflussen [437]. Dafür sollten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen angeboten und die Flüssigkeitsaufnahme mit der von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Mäusen verglichen werden. Weiterhin sollte der Vergleich von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tieren in der selben Untersuchungsanordnung Aufschluss darüber geben, ob ein möglicher Unterschied im Ethanolkonsum allein auf den eingeführten genetischen Defekt zurückgeführt werden kann oder der genetische Hintergrund den Phänotyp beeinflusst. Würde sich ein Unterschied im Ethanolkonsum zwischen den Genotypen ergeben, sollte kontrolliert werden, ob die Wiederherstellung des peripheren 5-HT-Pools mittels Supplementierung mit 5-HTP die gesteigerte Ethanolaufnahme senken kann. Des Weiteren sollte die Überprüfung genetischer Variationen mittels Analyse veränderter Restriktionsendonukleaseschnittstellen oder Sequenzierung zeigen, ob der gemischte genetische Hintergrund der Versuchstiere der Linie KI19 die Ethanolaufnahme beeinflussen könnte.

Da bekannt ist, dass *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine gestörte Leberregeneration haben [19], sollten die unterschiedlichen serologisch-klinischen, leberrelevanten Parameter beider Genotypen im Anschluss an den Ethanoltrinkversuch betrachtet werden. Weiterhin sollte mittels Proliferationsexperimenten, welche die Zellzahl über die mitochondriale Aktivität oder die DNA-Menge quantifizieren, der Einfluss von Ethanol, 5-HT und weiterer biogener Monoamine auf die Proliferation verschiedener hepatischer Zelllinien untersucht werden. Die molekulare Grundlage der verschlechterten Leberregeneration sollte über eine Hochdurchsatz-Sequenzierung des Lebertranskriptoms mit einem SOLiD4-System analysiert und die Fehlregulation einzelner Gene mittels qPCR verifiziert werden. Zum Abschluss sollte gezeigt werden, ob die differentielle Genexpression in der Leber der *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf eine Serotonylierung von TF zurückzuführen wäre, die analog zu der Modifikation von GTPasen eine physiologische Funktion ausüben könnte [86,87]. Dafür sollten verschiedene Polyglutaminabschnitt-enthaltende und ein glutaminreicher TF *in vitro* exemplarisch mit mehreren biogenen Monoaminen modifiziert und mittels EMSA- und Affinitätsexperimenten untersucht werden, ob die Modifikation einen funktionellen Einfluss auf die Bindung der TF an ihre Zielsequenz oder dem Interaktionspartner PQBP1 hat, der als Suppressor der Aktivität des TF BRN2 bekannt ist [277,282].



## II Materialien und Methoden

### 1 Materialien

#### 1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, von den Herstellern AppliChem, Fluka, Gibco, Merck, Roth und Sigma-Aldrich in p.a. Qualität bezogen und eingesetzt.

#### 1.2 Radiochemikalien

Die verwendeten Radiochemikalien wurden von den Firmen GE Healthcare und Perkin Elmer erworben.

Tabelle 1: Verwendete Radiochemikalien.

Radiochemikalie	Spezifische Aktivität
5-Hydroxy[ <sup>3</sup> H]-tryptamin-trifluoroacetat	80-130 Ci/mmol
[2,5- <sup>3</sup> H]-Histamin-dihydrochlorid	10-40 Ci/mmol
[7,8- <sup>3</sup> H]-Dopamin	20-40 Ci/mmol
L-[7,8- <sup>3</sup> H]-Noradrenalin	10-30 Ci/mmol
γ-[ <sup>32</sup> P]-ATP	3000 Ci/mmol
[α <sup>32</sup> P]-dCTP	800 Ci/mmol

#### 1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Die angegebenen Puffer, Lösungen und Medien wurden, falls nicht anders vermerkt, als wässrige Lösungen hergestellt und bei Raumtemperatur gelagert. Sofern angegeben, wurden sie bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Die Zusammensetzung wird im jeweiligen Abschnitt des Methodenteils angegeben.

## 1.4 Antikörper

Tabelle 2: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller
Esel-anti-Ziege-IgG; HRP-konjugiert	Santa Cruz
Kaninchen-anti-pCREB (S133)-IgG	Cell Signaling
Kaninchen-anti-PSF(H-80)-IgG	Santa Cruz
Maus-anti-cMyc-IgG1	Santa Cruz
Maus-anti-p54 <sup>nrb</sup> -IgG1	BD Biosciences
Maus-anti-Penta-His-IgG1	Qiagen
Ziege-anti-Aktin-IgG	Santa Cruz
Ziege-anti-ALDH2 (N-14)-IgG	Santa Cruz
Ziege-anti-BRN2 (C-20)-IgG	Santa Cruz
Ziege-anti-Kaninchen-IgG; HRP-konjugiert	Sigma
Ziege-anti-Maus-IgG; HRP-konjugiert	Sigma

## 1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen BioTeZ Berlin-Buch GmbH oder Eurofins MWG Operon mittels Festphasensynthese hergestellt. Die jeweilige Sequenz ist im Anhang A, Tabelle 10 angegeben.

Die für die quantitative PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen SABiosciences und Qiagen erworben. Hierbei kamen spezifische Oligonukleotide für die humanen Zielgene *CDKN1A*, *EGFR*, *MET* und *SP1* und das humane Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) und das murine Zielgen *Aldh2* zum Einsatz. Die Oligonukleotide für das murine Referenzgen *Gapdh* stammten aus der AG Mundlos, MPIMG.

## 1.6 Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Eigenschaft	Hersteller
pCMV-Tag3A-PQBP1	eukaryotischer Expressionsvektor	AG V. Kalscheuer, MPIMG
pDEST_6xH-Brn-2	prokaryotischer Expressionsvektor	imaGenes
pEGFP-C1	eukaryotischer Expressionsvektor	Clontech
pGEM-T Easy	Ligationsvektor	Promega
pGEX-4T-1	eukaryotischer Expressionsvektor	GE Healthcare
pHis5BA-hCREBwt	eukaryotischer Expressionsvektor	AG H. Seitz, MPIMG
pHis5BA-hCREBS142'	eukaryotischer Expressionsvektor	AG H. Seitz, MPIMG
pN3SP1-FL	eukaryotischer Expressionsvektor	addgene
pQE40	prokaryotischer Expressionsvektor	Qiagen
pQE40-NonO	prokaryotischer Expressionsvektor	Diplomarbeit, S. Stahlberg
pQE40(DHFR <sup>-</sup> )-SFPQ	prokaryotischer Expressionsvektor	Diplomarbeit, L. Theobald
pREP4-groESL	prokaryotischer Expressionsvektor	P. Caspers, Hoffmann-LaRoche, Basel (Schweiz)

## 2 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.1 Bakterienstämme

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 $\lambda$ -	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F- ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal $\lambda$ , dcm+	Stratagene
<i>E. coli</i> GM2163 (dam- dcm-)	F- dcm-6- dam-13::Tn9- araC14 leuB6 fhuA13 lacY1 tsx-78 glnV44(0c) galT22 LAM-mcrA0 hisG4(0c) rfbD1 rpsL136(strR) xylA5 mtl-12 thi-1 mcrB9999 hsdR2	New England Biolabs
<i>E. coli</i> JM109	endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) relA1 supE44 $\Delta$ (lac-proAB) [F' traD36 proAB laqI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]	Promega
<i>E. coli</i> XL1 blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacl <sup>q</sup> Z.M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	Stratagene

## **2.2 Zelllinien**

### **2.2.1 Cos7**

Cos7 ist eine adhärente Fibroblasten-ähnliche Zelllinie, die der Niere der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) entstammt. Sie wurde aus der CV-1 Zelllinie durch Transformation mit einer defekten Mutante von SV40, die das Wildtyp-T-Antigen kodiert, gewonnen.

### **2.2.2 HEK293**

Bei HEK293 (human embryonic kidney) handelt es sich um eine humane fötale Tumorzelllinie mit hypotriploiden Karyotyp. Die Zelllinie wurde mittels Transformation mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus 5 geschaffen. Die mittlere Anzahl der Chromosomen liegt bei 64 Stück. Die Zellen haben eine epitheliale Morphologie und wachsen adhärent.

### **2.2.3 HeLa**

Die humane Zelllinie HeLa hat eine epitheliale Morphologie und wächst adhärent. Sie entstammt einem Adenokarzinom des Gebärmutterhalses. Die Zellen sind zu 100 % aneuploid mit einer mittleren Anzahl von 82 Chromosomen, welche sich zwischen 70 und 164 Stück bewegt. 98 % der Zellen besitzen ein kleines, telozentrisches Chromosom.

### **2.2.4 HepG2**

HepG2 ist eine humane Zelllinie, die einem hepatozellulären Karzinom entstammt. Die Zellen haben eine epitheliale Morphologie und wachsen adhärent. HepG2 Zellen haben eine mittlere Anzahl von 55 Chromosomen, welche sich zwischen 50 und 60 Stück bewegt, und ein reorganisiertes Chromosom 1.

### **2.2.5 Huh7**

Bei Huh7 handelt es sich um eine ausdifferenzierte humane Zelllinie, welche 1985 aus einem hepatozellulären Karzinom gewonnen wurde. Es handelt sich um adhärent wachsende Zellen mit einer epithelialen Morphologie. Huh7 haben eine mittlere Anzahl an Chromosomen von 60 Stück.

### **2.2.6 LX2**

LX2 ist eine von zwei humanen hepatischen Sternzelllinien, welche 2005 etabliert wurden. Die Zellen haben eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie und wachsen adhärent. LX2 wurde in Medium mit geringer Serummengung spontan immortalisiert. Sie zeigen eine hohe Übereinstimmung (98,7 %) der Genexpression mit primären hepatischen Sternzellen.

### 2.2.7 P815

P815 wurde aus Mastzellen des Mausstammes (*M. musculus*) DBA/2 gewonnen. Diese murine Mastocytomazelllinie wächst in Suspension, kann aber adhären Zellen mit großen Granula ausbilden. Der Karyotyp von P815 ist bisher nicht spezifiziert worden.

### 2.2.8 SHP77

Bei SHP77 (Shadyside Hospital, Pittsburgh, PA) handelt es sich um eine humane Zelllinie, die eine ungewöhnliche, undifferenzierte große Variante des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC) darstellt. Sie hat eine abweichende epitheliale Morphologie, mit biochemischen Eigenschaften des klassischen SCLC. SHP77 ist eine Suspensionszelllinie mit leicht adhärenter Eigenschaft.

### 2.2.9 SK-Hep1

SK-Hep1 ist eine humane Zelllinie der Leber, die 1971 im Memorial Sloan-Kettering Cancer Center aus einem Adenokarzinom isoliert wurde. Die Zellen entstammen Endothelgewebe, haben eine epitheliale Morphologie und wachsen adhären. SK-Hep1 haben einen aneuploiden Chromosomensatz mit einigen hypotriploiden Chromosomen. Die normalen Chromosomen N1, N13, N14, N15 und N16 sind unterrepräsentiert, während N7, N12, and N17 in manchen Metaphasen überrepräsentiert sind.

### 2.2.10 $\beta$ TC3

Bei  $\beta$ TC3 handelt es sich um eine murine Zelllinie, die von einem Insulinom des Pankreas einer transgenen Maus stammt. Die Zelllinie trägt ein Hybridgen für Insulin und das *large-T*-Antigen des SV40-Virus und produziert sowie sekretiert Insulin.  $\beta$ TC3 ist eine adhären Zelle.

## 3 Molekularbiologische Methoden

### 3.1 Isolierung und Analyse von Nukleinsäuren

#### 3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung analytischer Mengen von Plasmid-DNA wurden 3 mL selektives LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator (250 rpm, 37 °C, Orbital Shaker, Thermo Forma) inkubiert. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken mittels alkalischer Lyse gewonnen [438] und zur präparativen Aufarbeitung nach Herstellerangaben (FastPlasmid Mini, Eppendorf) isoliert. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden

durch Animpfung von 200 mL selektivem LB-Medium gewonnen und wurde nach Angaben des Herstellers (Nucleobond Extra Midi, Macherey&Nagel) isoliert.

LB-Medium/Antibiotika	10 g/L Select Trypton 140; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 100 µg/mL Ampicillin; 100 µg/mL Chloramphenicol; 50 µg/mL Kanamycin; 25 µg/mL Zeocin; 4 °C
-----------------------	---

### 3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien wurde das Gewebe in 350 µL Schwanzlysepuffer aufgenommen und 2-4 h im Schüttler (55 °C, 800 rpm) inkubiert. Nach einer anschließenden Inkubation von 10 min auf Eis wurden 150 µL gesättigte NaCl-Lösung (~6 M) zugegeben und die Proteine durch Inkubation auf Eis für 10 min und Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit 10 µg RNase A für 15 min bei 37 °C versetzt und im Anschluss die DNA durch Zugabe von 1 mL eiskaltem 100 %igem Ethanol gefällt und abzentrifugiert (14000 rpm, 20 min, 4 °C). Das DNA-Sediment wurde mit 1 mL 70 %igem Ethanol gewaschen, 10 min luftgetrocknet, in 100 µL TE-Puffer bei 4 °C und 500 rpm über Nacht gelöst, die Konzentration nach photometrischer Bestimmung auf 100 ng/µL eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Schwanzlysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS; 100 mM NaCl; 0,5 g/L Proteinase K
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8

### 3.1.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurde pro konfluenter 100 mm-Kulturschale 3 mL TRIzol-Reagenz (Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden geerntet, einmal in PBS gewaschen und die Isolierung nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Die gewonnene RNA wurde direkt in die reverse Transkription eingesetzt oder bei -80 °C gelagert. Um den Abbau der RNA zu verhindern wurden alle Flächen und verwendeten Geräte mit einer kommerziellen Lösung abgewischt (RNaseZap, Ambion).

PBS	2,7 mM KCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 140 mM NaCl; 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; autoklaviert
-----	--

### 3.1.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Erforderliche Verdünnungen erfolgten mit 10 mM Tris/HCl, pH 7. Eine optische Dichte von OD<sub>260 nm</sub> = 1 entspricht dabei in einer Quartz-Küvette mit 1 cm Kantenlänge einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA, 37 µg/mL ssDNA oder 40 µg/mL ssRNA. Die Konzentration von geringen Mengen DNA wurde in einem

Agarosegel adäquater Konzentration mittels DNA-Konzentrationsstandards (MBI Fermentas) ermittelt. Die Konzentration von geringen Mengen an RNA wurde mittels der NanoDrop-Technologie (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) bestimmt.

### 3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Zu analysierende DNA-Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese in 1-3 % (w/v) Agarose (Invitrogen, Biozym) in 0,5 x TBE mit 0,1 % (w/v) Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Proben wurden mit DNA-Ladepuffer versetzt und zusätzlich ein adäquater DNA-Größenstandard (MBI Fermentas, Promega) aufgetragen. Der Gellauf fand bei 120 V für 15-30 min in 0,5 x TBE-Puffer statt. Auf einem UV-Iluminator (Gel Doc 2000, BioRad) erfolgte durch Anregung des Fluorophors Ethidiumbromid mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 302$  nm die Visualisierung der DNA, die mit einer Digitalkamera dokumentiert wurde

0,5 x TBE	44,5 mM Tris-Base; 44,5 mM Borsäure; 1 mM EDTA, pH 8
6 x DNA-Ladepuffer	0,15 % (w/v) Bromphenolblau; 42 % (w/v) Saccharose; in 1 x TBE; 4 °C

### 3.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde nach Angaben des Herstellers (QIAquick Gel Extraction, Qiagen; NucleoSpin Extract II, Macherey&Nagel) vorgenommen.

### 3.1.7 Sequenzierung von DNA

Zu sequenzierende DNA-Proben wurden von der Firma MWG Biotech nach der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert [439].

## 3.2 Enzymatische und thermische Manipulation von Nukleinsäuren

### 3.2.1 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs; MBI Fermentas) wurde nach Angaben des jeweiligen Herstellers für das entsprechende Enzym durchgeführt, wobei pro 1  $\mu$ g DNA eine Enzymeinheit der Restriktionsendonuklease eingesetzt wurde. Bei präparativen Spaltungen wurden die DNA-Fragmente für anschließende Schritte über ein Agarosegel aufgereinigt. Falls für eine DNA-Spaltung unterschiedliche Enzyme benötigt wurden, deren Reaktionsbedingungen nicht kombiniert werden konnten, wurde erst mit einem Enzym gespalten, das Enzym hitzeinaktiviert, der Reaktionsansatz 20 min über eine Dialysemembran (Typ VS; 0,025  $\mu$ m; Millipore) gegen ddH<sub>2</sub>O entsalzt und die DNA daraufhin unter den Bedingungen des zweiten Enzyms gespalten. Wenn die Erkennungssequenz einer Endonuklease aufgrund einer

vorhandenen Methylierung nicht gespalten werden konnte, wurde das Plasmid durch Transformation in einen methylasedefizienten Stamm demethyliert, das Plasmid präparativ isoliert und dann gespalten.

### 3.2.2 Reverse Transkription

Um eventuellen DNA-Verunreinigungen entgegenzuwirken wurde die isolierte Gesamt-RNA einer DNase-Behandlung (RQ1-RNase-freier RQ1-DNase, Promega) nach Angaben des Herstellers unterzogen. Für die reverse Transkription wurden Random Hexamer-Oligonukleotide (Promega) und Moloney-Murine Leukämie Virus-Reverse Transkriptase (M-MLV-RT, Promega) nach Herstellerangaben verwendet. Die synthetisierte cDNA wurde direkt in eine analytische PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle auf Kontaminationen wurde jeweils ein Ansatz ohne RNA und ohne M-MLV-RT mitgeführt. Die Qualität der synthetisierten cDNA wurde in der analytischen PCR mittels Nachweis des Haushaltsgens *GAPDH* überprüft.

DEPC-Wasser

0,1 % (v/v) DEPC; doppelt autoklaviert

### 3.2.3 Polymerasekettenreaktion

Zur Amplifikation und Analyse spezifischer DNA-Fragmente aus genomischer DNA, cDNA oder Plasmiden wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Für analytische PCR-Ansätze wurde die *Taq*-Polymerase, eine hitzestabile Polymerase aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus*, aus laboreigener Herstellung verwendet. Typischerweise wurden für einen Reaktionsansatz 100 ng genomische DNA oder cDNA oder 1 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Zur DNA-Matrize wurden 0,2-2 µM der jeweiligen Oligonukleotide, 5 U der Polymerase, PCR-Reaktionspuffer, 2-5 mM Magnesiumchlorid und 200-250 µM der vier benötigten dNTPs auf Eis zusammengegeben und in den vorgeheizten 95 °C heißen PCR-Inkubator (Eppendorf Master Cycler gradient, Eppendorf; Peltier Thermal Cycler PTC-200 Gradient, MJ Research) gestellt. Einzelne Parameter des Reaktionsansatzes bzw. Hybridisierungstemperatur und Elongationszeit wurden gegebenenfalls variiert, um die Synthese des PCR-Produktes zu optimieren. Weiterhin wurde nach Bedarf 4 % (v/v) DMSO zur besseren Denaturierung der DNA in den PCR-Ansatz gegeben. Ein repräsentatives PCR-Programm ist in Tabelle 5 dargestellt. Für präparative PCR-Ansätze wurde eine kommerziell erhältliche DNA-Polymerase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Diese Schimäre aus einer Pyrococcus-ähnlichen Polymerase und einer zusätzlich eingefügten dsDNA-bindenden Domäne zeichnet sich durch eine 3'→5'Exonukleasefunktion aus und verfügt über höhere Prozessivität und geringere Fehlerrate als die herkömmliche *Taq*-Polymerase.

10 x PCR-Reaktionspuffer

500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM Tris-Base; -20 °C

Tabelle 5: Repräsentatives Programm einer Polymerasekettenreaktion.

Temperatur	Schritt	Dauer	
95 °C	Initiale Denaturierung	5 min	
95 °C	Denaturierung	30 s	25-35 Zyklen
56-70 °C	Hybridisierung	30 s	
72 °C	Elongation	1 min/kb	
72 °C	finale Elongation	2 min	

### 3.2.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion mittels SYBR Green

Die relative Expression verschiedener Gene wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert. Dafür wurde die in cDNA umgeschriebene RNA aus Leber von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen oder unterschiedlich behandelte HepG2-Zellen verwendet. Zur Visualisierung der Zunahme der gebildeten doppelsträngigen DNA wurde der sequenzspezifische Fluoreszenz-Farbstoff SYBR Green verwendet. Da bei dieser Methode nicht zwischen der Fluoreszenz verschiedener PCR-Produkte unterschieden werden kann, wurde nach jeder qPCR eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlänge der gebildeten DNA-Produkte und die Spezifität der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt werden konnte.

Zur relativen Quantifizierung der DNA-Menge wurden der Ct-Wert und die Amplifikationseffizienz der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt und mit einem Referenzgen verglichen. Der Ct-Wert beschreibt den qPCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über den Wert der Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und wird in jedem Reaktionsansatz bestimmt. Der Ct-Wert ist umso kleiner, desto mehr Matrizen eines bestimmten DNA-Fragmentes im Ansatz vorhanden sind. Die Berechnung der Oligonukleotid-Effizienzen erfolgte mit Hilfe der Steigung einer erstellten Standardkurve, bei der die ermittelten Ct-Werte über die logarithmische Konzentration der cDNA aufgetragen wurden. Zur Effizienzbestimmung der eingesetzten Oligonukleotide wurde cDNA von unbehandelten HepG2-Zellen oder *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren in definierten Verdünnungen (1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024) eingesetzt und die ermittelten Ct-Werte jeder Verdünnung über den Logarithmus der eingesetzten Konzentration zu einer Geraden aufgetragen, dessen Anstieg (m) zur Berechnung der Effizienz benutzt wurde. Ein Wert von 2 bedeutet theoretisch eine Effizienz von 100 %, wobei die in jedem Zyklus vorliegende Menge an DNA-Matrizen verdoppelt wurde.

Die Effizienz ( $E$ ) berechnet sich wie folgt:

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Zur vereinfachten Normierung einer jeden qPCR-Reaktion ( $\Delta Ct$ ) wird das Verhältnis von Ziel- und Referenzgen basierend auf der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode wie folgt errechnet:

$$\frac{(E_{\text{Zielgen}})^{-Ct_{\text{Zielgen}}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{-Ct_{\text{Referenzgen}}}}$$

Zur Normierung wurden die Referenzgene *Gapdh*, *GAPDH*,  *$\beta$ -AKTIN* und das ribosomale Protein L13 (*RPL13*) verwendet. Ein 10  $\mu$ L-Reaktionsansatz enthielt 100-200 ng der jeweiligen cDNA, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,4  $\mu$ M eines kommerziellen Oligonukleotidgemisches (SABiosciences; Qiagen) oder synthetisierte Oligonukleotide (Anhang A, Tabelle 10). Der Reaktionsansatz wurde auf Eis in speziellen optischen 96-Kavitäten-Platten (Applied Biosystems) zusammengegeben, mit einer Folie (MicroAmp<sup>TM</sup> Optical Adhesive Film, Applied Biosystems) bedeckt, zentrifugiert (200 x g, 1 min, 4 °C) und in den PCR-Inkubator (ABI PrismR 7900HT Sequence Detection System, Applied Biosystems) eingelegt. Alle qPCR-Reaktionen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt und ggf. im Anschluss zur Überprüfung der Produktbildung auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Das Temperaturprogramm einer qPCR ist der Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Programm der quantitativen Polymerasekettenreaktion.

Temperatur	Schritt	Dauer	
95 °C	Initiale Denaturierung	10 min	
95 °C	Denaturierung	15 s	40 Zyklen
55 °C	Hybridisierung	30 s	
60 °C	Elongation	1 min	
95 °C	Schmelzpunktanalyse	15 s	
60 °C		15 s	
95 °C		15 s	

### 3.2.5 Bestimmung lokaler Expressionsunterschiede mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung mit der SOLiD-Technologie

Für die Sequenzierung des vollständigen Lebertranskriptom wurden jeweils neun Mäusen (*Tph1*<sup>+/+</sup> und *Tph1*<sup>-/-</sup>) der große Leberlappen entnommen und auf Trockeneis schockgefroren. Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurden 1 mL TRIzol (Invitrogen) auf 50-100 mg gefrorenes Lebergewebe gegeben, mit einem Homogenisator (PT 3100, Polytron) zerkleinert und nach Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Die isolierte RNA wurde über Nacht bei -20 °C gelöst, die Konzentration bestimmt und pro Genotyp drei Proben à 250 µg zu einer Probe von 750 µg RNA vereint. Die sich daraus ergebenden sechs Proben wurden mit Nuklease-freiem Wasser (Ambion) auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die mRNA durch zweifache Aufreinigung (PolyATtract mRNA Isolation System III, Promega; RiboMinus Concentration Module, Invitrogen) nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss wurde eine cDNA-Bank nach Herstellerangaben zur Präparation ganzer Transkriptom-Banken (SOLiD Total RNA-Seq Kit, Applied Biosystems) erstellt. Dafür wurde die mRNA fragmentiert und mit spezifischen Adaptoren hybridisiert und ligiert. Die mRNA wurde dann mit zu den Adaptoren komplementären Oligonukleotiden revers transkribiert und die synthetisierte cDNA im Größenbereich von 150 bis 250 Nukleotiden über ein Harnstoffgel (NovexR Pre-Cast TBE-Urea-Gelelektrophorese, Invitrogen) selektiert. Daraufhin wurde die cDNA mit zu den Adaptoren komplementären, mit einem spezifischen Barcode versehenen Oligonukleotiden (SOLiD RNA Barcoding Kit, Module 1-16, Applied Biosystems) amplifiziert und aufgereinigt. Somit konnten mehrere Proben in einem einzigen multiplexen Sequenzierlauf analysiert werden. Für den Lauf wurde eine Partikel-Präparation nach Angaben des Herstellers vorgenommen. Zur Herstellung der Partikel in einer speziellen Emulsion wurden verschiedene Reaktionssysteme (SOLiD EZ Bead Amplifier E80 Kit; SOLiD EZ Bead Emulsifier E80 Kit; SOLiD EZ Bead Enricher E80 Kit, alle Applied Biosystems) mit dazugehörigen Geräten (SOLiD EZ Bead Emulsifier; -Amplifier und -Enricher; sowie Covaris S2 System, alle Applied Biosystems) verwendet. Die markierten DNA-Matrizen der dsDNA-Bibliothek wurden hierbei mittels kleiner magnetischer Partikel mit Adaptoren, die partiell komplementär zu den markierten DNA-Fragmenten sind (SOLiD P1-DNA-Partikel, Applied Biosystems) in einer Emulsions-PCR klonal amplifiziert. Im Anschluss wurden die Partikel gewaschen, angereichert, mit Hilfe einer chemischen Modifikation auf einem Träger immobilisiert und die DNA-Fragmente daraufhin über das SOLiD 4-System nach der Ligationsmethode sequenziert. Konzentrationsmessungen der Nukleinsäuren wurden mittels spezieller Fluoreszenzfarbstoffe (Qubit dsDNA HS Assay Kit; Qubit RNA Assay Kit; Qubit Fluorometer, Invitrogen) vorgenommen. Erforderliche Aufreinigungen erfolgten über Anionenaustauschersäulen (MiniElute PCR Purification Kit, Qiagen; PureLink PCR Micro Kit, Invitrogen). Die Qualität der Nukleinsäuren wurde mit Hilfe einer auf der

Kapillarelektrophorese basierenden Methode (Agilent DNA 1000 Kit; Agilent RNA 6000 Nano Kit; Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) durchgeführt. Die SOLiD 4-Sequenzierung und die Sequenzdatenanalyse erfolgte in der Forschungsgruppe Diagnostische Bioinformatik von Prof. Dr. Peter Beyerlein an der Technischen Hochschule Wildau. Der angegebene *FoldChange* errechnete sich wie folgt:  $FoldChange = \log_2(\text{Expression Gen A (TPH1+)}) - \log_2(\text{Expression Gen A (TPH1-)})$ .

### 3.2.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Um zwei einzelsträngige, teilweise zueinander komplementäre DNA-Moleküle zu hybridisieren, wurden je 22,7  $\mu\text{M}$  beider Oligonukleotide mit 4,6 mM  $\text{MgCl}_2$  vermischt. Dieser Ansatz wurde 2 min auf 95 °C erhitzt und anschließend schrittweise für jeweils 30 min auf 70 °C, 65 °C, 60 °C, 55 °C und 22 °C abgekühlt.

### 3.2.7 Radioaktive Markierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden

Die zum Teil überlappenden doppelsträngigen Oligonukleotide wurden an den Enden mit fehlenden, komplementären Desoxyribonukleotiden aufgefüllt. Ein 50- $\mu\text{L}$ -Ansatz enthielt 300 ng DNA, 0,15 mM dNTPs ohne dCTP, 0,5  $\mu\text{L}$  [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ , Perkin Elmer), Reaktionspuffer für Klenow Fragment und 10 U Klenow Fragment  $\text{exo}^-$  (MBI Fermentas), welches die große Untereinheit der DNA-Polymerase I aus *E. coli* darstellt. Das Fragment hat alle Funktionen der Polymerase ohne 5'→3' Exonukleaseaktivität. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt und mit 20  $\mu\text{L}$  STE-Puffer abgestoppt.

STE-Puffer 100 mM NaCl; 10 mM Tris-Base pH 7,5; 1 mM EDTA; 4 °C

### 3.2.8 Sicherung von PCR-Produkten

Die *Taq*-Polymerase verlängert das fertige DNA-Amplifikat um ein dATP (A-Überhang), wodurch die amplifizierten PCR-Produkte direkt in Vektoren mit T-Überhängen ligiert werden können. PCR-Produkte der Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, die glatte DNA-Enden produziert, erhielten nachträglich A-Überhänge. Dafür wurde das PCR-Produkt über ein Agarosegel nach Angaben des Herstellers (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel) aufgereinigt, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM dATP, PCR-Puffer und 5 U *Taq*-DNA-Polymerase zugegeben und der Ansatz für 30 min bei 72 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Enzym dreimal in Trockeneis inaktiviert und das PCR-Produkt erneut aufgereinigt.

Zur Integration eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor wurden die beiden Komponenten in einem molaren Verhältnis von 3:1 (Fragment:Vektor) zusammengegeben. Zur Bildung der Phosphordiesterbindungen zwischen den DNA-Strängen wurden 400 U T4-DNA-Ligase, 1 x Ligasepuffer (New England Biolabs) pro 100 ng DNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte

über Nacht bei 16 °C. Um eine intramolekulare Ligation zu verhindern wurden die 5'-Phosphatreste der freien Enden des Vektors mit 5 U Phosphatase/1 µg DNA nach Herstellerangaben (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs) dephosphoryliert. Im Anschluss wurde das Enzym bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert und der Vektor mittels Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt. Ligationen mit dem kommerziellen Expressionsvektor pGEM-T Easy (Promega) erfolgten nach Angaben des Herstellers.

### 3.3 Bakterienkulturen

#### 3.3.1 Generierung und Lagerung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli* wurden 100 mL LB-Medium (Reagenzien Invitrogen) mit 1 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft und im Schüttler (225 rpm, 37 °C) inkubiert bis eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,45-0,55 erreicht war. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt, zentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4 °C), in 30 mL eiskaltem TFB I resuspendiert und für 30-90 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde erneut abzentrifugiert (4000 x g, 5 min, 4 °C), das Pellet in 4 mL eiskaltem TFB II resuspendiert, in 50 µL-Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots der Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	10 g/L Select Trypton 140; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C
TFB I	50 mM $MnCl_2$ ; 100 mM KCl; 10 mM $CaCl_2$ ; 30 mM KOAc; 15 % (v/v) Glycerol; ad pH 6,1 mit $CH_3COOH$ ; sterilfiltriert (0,45 µm); 4 °C
TFB II	75 mM $CaCl_2$ ; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerol; ad pH 7 mit KOH; sterilfiltriert (0,45 µm); 4 °C

#### 3.3.2 Transformation

Für eine Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden 50 µL des entsprechenden kompetenten Bakterienstamms auf Eis aufgetaut und mit 50-100 ng DNA vermischt. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert, für 1 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt, weitere 5 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 500 µL LB-Medium (Reagenzien Invitrogen) für 1 h (37 °C, 800 rpm) geschüttelt. 100 µL des Ansatzes wurden unter selektiven Bedingungen auf eine LB-Platte (Reagenzien Invitrogen) gestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um prokaryotische Zellen zu lysieren, wurde ein 50 µL-Zellsediment direkt mit 5 x Lämmli-Puffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

LB-Agar	20 g/L Select Agar in LB-Medium; autoklaviert; 4 °C
---------	---

LB-Agar/Antibiotika	20 g/L Select Agar in LB-Medium; autoklaviert nach Abkühlung auf 60 °C Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin; 50 µg/mL
LB-Agar/X-Gal/IPTG	20 g/L Select Agar in LB-Medium; autoklaviert LB-Agar mit 20 mM IPTG und 80 mg/l X-Gal frisch bestrichen
LB-Medium	10 g/L Select Trypton 140; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C

### 3.3.3 Lanzeitlagerung von Bakterien

Zur Langzeitlagerung von Bakterien in Glycerolkulturen wurden 4 mL einer frischen Übernachtskultur sedimentiert (15 min, 2000 x g, 4 °C), in 1 mL LB-Medium resuspendiert und 1 mL 87 %iges Glycerol zugegeben. Die Kultur wurde 24 h bei -20 °C und anschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	10 g/L Select Trypton 140; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C
-----------	---

## 4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.1 Isolierung und Analyse von Proteinen

#### 4.1.1 Überexpression eines Proteins im eukaryotischen System

Zur Überexpression eines Proteins wurde dessen cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, die entsprechende Zelllinie mit Dreamfect (OZ Biosciences) nach Angaben des Herstellers mit dem Vektor transfiziert, das Medium nach 24 h gewechselt, die Zellen nach 48 h geerntet und die Zellen nach Bedarf weiterverarbeitet.

#### 4.1.2 Überexpression eines 6xHis-Fusionsproteins im prokaryotischen System

Zur Überexpression eines 6xHis-Fusionsproteins und anschließender Aufreinigung wurde dessen cDNA in einen prokaryotischen Expressionsvektor kloniert, der eine Sequenz für sechs aufeinanderfolgende Histidinreste (His) kodiert. Der Bakterienstamm (*E. coli* BL21 (DE3)), der den Chaperonkomplex GroEL/GroES auf dem separaten Plasmid pREP4-groESL enthielt [440], wurde mit dem Expressionskonstrukt transformiert und die Bakterien selektiv auf einer LB-Platte (Reagenzien Invitrogen) über Nacht kultiviert. Für eine Expression mit Autoinduktion wurden am nächsten Tag 5 mL 2YT-Medium (Reagenzien Invitrogen) selektiv mit einer einzelnen Bakterienkolonie als Vorkultur angeimpft. Nach 3-4 h Wachstum (37 °C, 250 rpm) wurden 0,5 mL der Vorkultur in 200 mL selektives NZYM-Medium gegeben. Die Kultur wurde 2-3 Tage bei RT geschüttelt (250 rpm) bis eine OD<sub>600</sub> von 4-6 erreicht war, abzentrifugiert (2000 x g, 15 min, 4 °C), 200 µL Proteaseinhibitor (Complete, Roche) zugegeben und bis zur Aufreinigung der Proteine bei -20 °C gelagert.

Alternativ wurde die Expression des Proteins mit IPTG induziert. Dafür wurde eine 20 mL LB-Vorkultur (Reagenzien Invitrogen) selektiv angesetzt, über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt, im Anschluss 10 mL der Vorkultur in 200 mL selektives 2YT-Medium gegeben und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6-0,7 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 3-4 h Wachstum wurden die Bakterien analog zu der Autoinduktionsmethode geerntet.

LB-Agar	20 g/L Select Agar in LB-Medium; autoklaviert; 4 °C
LB-Agar/Antibiotika	20 g/L Select Agar in LB-Medium; autoklaviert nach Abkühlung auf 60 °C Zugabe von 100 µg/mL Ampicillin; 50 µg/mL Kanamycin; 4 °C
NZYM-Medium	10 g/L Proteinhydrolysat-N-Z-amin; 5 g/L NaCl; 5 g/L Hefeextrakt; 2 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O; pH 7; 1 x Lösung M; 1 x Lösung 5052; autoklaviert
50 x Lösung M	1,25 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,25 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 2,5 M NH <sub>4</sub> Cl; 0,25 M Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; autoklaviert
50 x Lösung 5052	25 % (v/v) Glycerol; 2,5 % (w/v) Glukose; 10 % (w/v) α-D-Laktose; autoklaviert
LB-Medium	10 g/L Select Trypton 140; 5 g/L Hefeextrakt; 10 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C
2YT-Medium	16 g/L Select Trypton 140; 10 g/L Hefeextrakt; 5 g/L NaCl; autoklaviert; 4 °C
X-Medium/Antibiotika	entsprechendes Medium, 100 µg/mL Ampicillin; 100 µg/mL Chloramphenicol; 50 µg/mL Kanamycin; 25 µg/mL Zeocin; 4 °C

#### 4.1.3 Aufreinigung von 6xHis-Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung eines 6xHis-Fusionsproteins wurde das Sediment einer 200 mL-Bakterienzellkultur in 10 mL eiskaltem Ni-NTA-Lysepuffer resuspendiert und für 15 min bei 4 °C invertiert. Anschließend wurden die Zellen durch 3 x 30 s Ultraschall (Sonifier B-12 Cell Disruptor 40, Branson Sonic Power Company) auf Eis aufgeschlossen, 500 µL 10 % Triton X-100 zugegeben, 30 min bei 4 °C invertiert und abzentrifugiert (12000 x g, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde auf 500 µL 50 % Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) gegeben, die zuvor zweimal mit 5 mL eiskaltem PBS (Absch. II.3.1.3) gewaschen wurde, und zur Bindung über Nacht bei 4 °C invertiert. Am nächsten Tag wurde der Bindungsansatz zweimal mit 10 mL Ni-NTA-Waschpuffer (2000 x g, 5 min, 4 °C) gewaschen und zur Entfernung des gebundenen Chaperonkomplexes 500 µL GroESL-Waschpuffer zugegeben, dann 10 min bei 4 °C invertiert und zentrifugiert (500 x g, 5 min, 4 °C). Die Elution der Proteine von der Matrix wurde durch dreimalige Zugabe von 400 µL Ni-NTA-Elutionspuffer, 15 min Invertierung bei 4 °C und anschließender Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4 °C) durchgeführt. Nach Zugabe von 10 % Glycerol wurden die Proteine bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford- oder BCA-Methode bestimmt.

Ni-NTA-Lysepuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 500 µg Lysozym; pH 8; 4 °C
Ni-NTA-Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8; 4 °C
GroESL-Waschpuffer	50 mM TEA; 50 mM KCl; 20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 5 mM ATP; pH 7,5; 4 °C
Ni-NTA-Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8

#### 4.1.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach der Bradford- oder BCA-Methode bestimmt. Für die Bradford-Methode [441] wurden 5-10 µL der Proteinlösung ggf. in Verdünnungen mit kommerziellem Bradford-Reagenz (Sigma) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die jeweilige Proteinkonzentration wurde durch die Anfertigung einer Eichgerade mit BSA-Lösung bestimmt. Die Bestimmung mit BCA (Bicinchoninsäure) [442] erfolgte nach Herstellerangaben (QuantiPro BCA, Sigma).

#### 4.1.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Detektion von Proteinen wurden diese mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE in Mini-Protean-II-Kammern (BioRad) aufgetrennt. Die Proteine wurden zur Denaturierung mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Zur Fokussierung der Proteinbanden wurde in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer für 20 min eine Spannung von 80 V angelegt und im Anschluss wurden die Proteine für 45-60 min bei 200 V aufgetrennt. Zum Vergleich wurde ein Größenstandard (PageRuler Protein Ladder, Fermentas) herangezogen. Die Detektion der Proteine fand mittels Coomassie-, Silberfärbung oder Immunoblotting statt. Quantitative Auswertungen der Signale erfolgten densitometrisch.

Sammelgel	125 mM Tris/PO <sub>4</sub> pH 6,8; 5 % (v/v) Acrylamid/BIS (29:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (v/v) TEMED und 0,1 % (v/v) APS
Trenngel	375 mM Tris/HCl pH 8,8; 10-16 % (v/v) Acrylamid/BIS (29:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 % (v/v) TEMED; 0,1 % (v/v) APS
5 x SDS-Ladepuffer	225 mM Tris/HCl pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 250 mM DTT; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; -20 °C
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris-Base; 1 % (w/v) SDS; 14,4 % (w/v) Glycin

#### 4.1.6 Coomassie- und Silberfärbung

Für die Coomassiefärbung wurde ein kommerzieller, kolloidaler Coomassie-Farbstoff (PageBlue Protein Staining Solution, Fermentas) nach Herstellerangaben verwendet. Silberfärbungen und das darauffolgende Entfärben erfolgten mit Pierce Silver Stain Kit for MS (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers.

### 4.1.7 Immunoblotting

Die über ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten wurden mittels *Semidry*-Blotmethode auf eine Nitrozellulosemembran (HybondECL, GE Healthcare) transferiert. Dafür wurden ein Whatman-Papier (Roth), die Membran, das Gel und ein weiteres Whatman-Papier mit Transfer-Puffer befeuchtet, auf der Anode der Blot-Apparatur (Trans-Blot SD cell, BioRad) luftblasenfrei übereinander gelegt und für 45-90 min eine konstante Spannung von 16 V angelegt (PowerPac Universal Netzgerät, BioRad). Im Anschluss wurden die freien Bindungsstellen der Membran für 1 h mit Blockierungspuffer abgesättigt, mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C in Antikörperpuffer (1:500 bis 1:5.000) inkubiert, dann dreimal für 15 min in PBST überschüssige Antikörper abgewaschen, mit dem Zweitantikörper in PBST für 1 h inkubiert und erneut dreimal für 10 min in PBST gewaschen. Die Zweitantikörper wurden im Verhältnis 1:60.000 bis 1:150.000 eingesetzt, waren gegen die Spezies des entsprechenden Erstantikörpers gerichtet und mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die Entwicklung wurde mit ECL-Lösung (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei spaltet HRP das im Reagenz befindliche Luminol oxidativ unter Aussendung von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 428$  nm, das mit einem Röntgenfilm (Super RX, FUJIFILM) und variierenden Belichtungszeiten detektiert (Curix 60, AGFA) werden kann. Der entwickelte Film wurde anschließend mit einem Durchlichtscanner (Duoscan f40, AGFA; HP ScanJet 5370C, Hewlett-Packard) dokumentiert.

PBST	2,7 mM KCl; 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 140 mM NaCl; 8,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 % (v/v) Tween <sup>®</sup> 20
Transferpuffer	39 mM Glycin; 48 mM Tris-Base; 0,0375 % (w/v) SDS; 0,01 % (w/v) $\text{NaN}_3$ ; 20 % (v/v) Methanol
Blockierungspuffer	3 % (w/v) BSA; 0,01 % (w/v) $\text{NaN}_3$ ; in PBST; 4 °C
Antikörperpuffer	1 % (w/v) BSA; 0,01 % (w/v) $\text{NaN}_3$ ; in PBST; 4 °C

## 4.2 TGM-vermittelte Transamidierung und Analyse von Proteinen

### 4.2.1 *In vitro*-Monoaminylierung

Für die Monoaminylierung von Proteinen wurden 5-20  $\mu\text{g}$  aufgereinigtes 6xHis-Fusionsprotein zu 0,2-0,3 mM MDC bzw. 0,3-2 mM HA oder 5-HT, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM DTT, 2,5-5 mU TGM 2 (Zedira), mit 50 mM Tris/HCl pH 8 in einem Gesamtvolumen von 50-100  $\mu\text{L}$  gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C und 400 rpm in einem Thermomixer inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5 x SDS-Ladepuffer abgestoppt. Nach Aufkochen der Probe für 5 min bei 95 °C wurden die Proteine entweder über ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das kovalent gebundene Fluorophor MDC auf einem UV-Illuminator (Model GelDoc 2000, BioRad) detektiert

und das Gel anschließend einer Coomassie-Färbung unterzogen. Alternativ wurden die monoaminylierten Proteine in Folgeexperimente (EMSA, *Pull-Down-Experiment*) eingesetzt. Die hier beschriebenen Monoaminylierungsexperimente basieren auf Erkenntnissen und Methoden der Arbeitsgruppe Neurochemie, MPIMG [86].

#### 4.2.2 *In vitro*-Monoaminylierung mit anschließender Quantifizierung

80 pmol des aufgereinigten 6xHis-Fusionsproteins wurden analog zu II.4.2.1 mit 5 mU TGM2, 1 x Proteaseinhibitor (Complete, EDTA-frei, Roche) und jeweils 8 pmol der [<sup>3</sup>H]-markierten Monoamine [<sup>3</sup>H]-5-HT-Trifluoracetat, [7,8-<sup>3</sup>H]-DA, [2,5-<sup>3</sup>H]-HA-Di-HCl und I-[7,8-<sup>3</sup>H]-NE (Perkin Elmer, GE Healthcare) in einem Gesamtvolumen von 25 µL versetzt. Die Monoaminylierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 mg/mL BSA und 25 % (w/v) Perchlorsäure (PCA) abgestoppt und zur Fällung des enthaltenen Proteins für 2 h auf Eis inkubiert. Zur Quantifizierung der proteingebundenen Radioaktivität wurde das gefällte Protein abfiltriert. Dafür wurde eine Filternutsche aus Edelstahl (Hoefer) mit einem Durchmesser von 25 mm verwendet, die einen hohen, abnehmbaren Rand besitzt. Auf die Nutsche wurde ein in PBS (Absch. II.3.1.3) vorgeweichter GF-C-Glasfaserfilter (Millipore) aufgelegt, Vakuum angelegt, in schneller Folge 1 mL Filter-Waschpuffer zu der Probe gegeben, diese resuspendiert und auf den Filter aufgebracht. Der Filter wurde zur Abtrennung der ungebundenen [<sup>3</sup>H]-markierten Monoamine dreimal mit 2 mL Filter-Waschpuffer gewaschen, in ein Szintillationsgefäß (PolyvialsV, Zinsser Analytic) mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit (Ready Protein +, Beckman Coulter) gegeben und das Filtrat für 1 min in einem Szintillationsmessgerät (Liquid Scintillation Counter 1409, Wallac) vermessen.

Zur Untersuchung des Einflusses der Monoaminylierung auf die Phosphorylierung (CREB) wurden 5 µg prokaryotisch exprimiertes 6xHis-CREB mit 5 µg GST, PKA-Puffer, 125 U PKA (beides New England Biolabs), 2 mM ATP oder 0,6 µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP, 300 µM 5-HT, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1,5 mU TGM2 (Zedira) ad 50 µL mit 50 mM Tris/HCl pH 8 für 10 min bei 30 °C und 400 rpm auf einem Thermomixer umgesetzt. Als Kontrollen wurden einzelne Bestandteile nicht mitgeführt. Wenn beide Enzyme eingesetzt werden sollten, so wurde zuerst das eine Enzym zugegeben und nach der Reaktionszeit das andere Enzym für weitere 10 min. Im Anschluss wurden die Proben wie oben beschrieben abfiltriert oder durch SDS-PAGE analysiert.

Filter-Waschpuffer

100 mM PCA; 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS; 4 °C

#### 4.2.3 *In vitro*-Interaktion von PQBP1 mit Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Proteinen (Pull-Down-Assay)

Zur Untersuchung des Einflusses der Monoaminylierung auf die Interaktion zwischen PQBP1 und verschiedener Polyglutaminabschnitt-enthaltender TF *in vitro* wurden cmypPQBP1-enthaltende Zelllysate mittels Transfektion von Cos7-Zellen mit dem Plasmid pCMV-Tag3A-PQBP1 hergestellt.

20 µg der zu untersuchenden prokaryotisch exprimierten TF wurden einer *in vitro*-Monoaminylierung mit anschließender Bindung der Proteine an magnetische Ni-NTA-Agarosepartikel (Qiagen) unterzogen. Nach der Monoaminylierung wurden die modifizierten Proteine zu 10 µL Agarosepartikel in einem Gesamtvolumen von 700 µL Lysepuffer gegeben und für 2 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Im Anschluss wurden 30 µg des parallel mit Agarosepartikeln vorgereinigtem cmypPQBP1-Lysats zu den an die Partikel gebundenen, modifizierten Proteinen gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Absch. II.3.1.3) inklusive eines Gefäßwechsels wurden die Partikel mit den gebundenen Proteinen in 30 µL SDS-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C aufgekocht und vollständig auf ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Immunoblottings, wobei PQBP1 mit anti-cmyc- und die TF mit anti-6xHis-Antikörpern detektiert wurden.

Lysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-Base; 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 x Protease-Inhibitor; pH 7,4; 4 °C
SDS-Ladepuffer	45 mM Tris/HCl, pH 6,8; 1 % (w/v) SDS; 50 mM DTT; 10 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 4 °C

#### 4.2.4 Untersuchung der Interaktion von DNA-Oligonukleotiden mit Proteinen mittels nativer Polyacrylamidgele (Electrophoretic Mobility Shift Assay; EMSA)

Für die Durchführung eines EMSAs wurden prokaryotisch exprimiertes, aufgereinigtes Protein und <sup>32</sup>P-markierte, doppelsträngige Oligonukleotide verwendet. Der 50 µL-Bindungsansatz enthielt 12,5 µL Bindungspuffer, 40 mM KCl, 8 ng der markierten Oligonukleotide, 5 µg des aufgereinigten Proteins in Form des Monoaminylierungsansatzes. Die Bindungsreaktion fand für 1 h bei 37 °C statt.

Zur spezifischen Kompetition des Signals wurde das selbe Oligonukleotid in nicht markierter Form als Kompetitor eingesetzt, das sich radioaktiv markiert in dem Bindungsansatz befand. Zur Kontrolle wurde ein nicht markiertes Oligonukleotid mit einem Abschnitt des Promoterbereichs von *RPL13A* verwendet, das nicht das für den TF spezifische Sequenzmotiv enthielt, jedoch von gleicher Länge war wie die zu untersuchenden bindenden Motiv-Oligonukleotide. Von den beschriebenen Kompetitoren wurden jeweils 500 ng in den oben beschriebenen 50 µL-Bindungsansatz eingesetzt.

Nach der Bindung wurden die Proben sofort mit 6 x DNA-Ladepuffer\_2F vermischt und auf ein 4 %iges natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Der einstündige Vorlauf sowie der Probenlauf fanden bei einer Spannung von 250 V mit 1 x TBE als Laufpuffer statt. Eine für kurzweilige Strahlung sensitive Platte (Molecular Dynamics) wurde auf das ungetrocknete Gel aufgelegt, die Platte über Nacht exponiert und die von der Platte abgegebene Phosphoreszenz anschließend mit einem Scanner (Storm800, Molecular Dynamics) dokumentiert.

4 x Bindungspuffer	80 mM HEPES pH 7,5; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 20 % (v/v) Glycerol; 0,04 % (v/v) NP40; 23 nM BSA; 2 mM PMSF; 16 mM DTT; 4 °C
6 x DNA-Ladepuffer_2F	0,15 % (w/v) Bromphenolblau; 0,15 % (w/v) Xylencyanol; 42 % (w/v) Saccharose; in 1 x TBE; 4 °C
Natives Polyacrylamidgel (4 %)	4 % (v/v) Acrylamid/BIS (37,5:1); 5 % (v/v) Glycerol; 1 x TBE; 0,3 % (v/v) TEMED; 0,03 % (v/v) APS; sterilfiltriert (0,45 µM)
1 x TBE	89 mM Tris-Base; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8

## 5 Zellkulturarbeiten

### 5.1 Allgemein

Generell wurden alle Arbeiten an einer Sterilbank (HERA safe, Heraeus) durchgeführt. Die Kulturmedien (Cambrex) und andere Reagenzien wurden steril eingesetzt, bei 4 °C gelagert und vor Verwendung in einem sterilen Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Fötales Rinderserum (FBS) wurde vor Gebrauch für 30 min auf 56 °C erhitzt, um vorhandene Komplementfaktoren zu inaktivieren. Um Kulturmedium ohne biogene Monoamine einsetzen zu können, wurde dialysiertes FBS (10.000 Dalton Ausschlussmembran, PAN Biotech) eingesetzt.

### 5.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden mittels steriler Zellkulturmaterialien (Falcon; Costar; Gibco; Greiner; TPP) in einem Inkubatorschrank (Heraeus) bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil kultiviert. Jedes Kulturmedium enthielt 10 % (v/v) FBS (Gibco) und 50 µg/mL Penicillin/Streptomycin (Cambrex). Eine Ausnahme machte das Medium der LX2-Zellen, das 2 % FBS enthielt. Zu jedem dritten angesetzten Medium wurde 1 mg/mL Geneticin gegeben, um einem Pilzbefall der Zellen entgegen zu wirken. Cos7-, HEK293-, HeLa-, HepG2-, Huh7-, LX2- und P815-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 4,5 g/L Glukose und L-Glutamin (LONZA) und SHP77- und SK-Hep1-Zellen in RPMI 1640-Medium mit L-Glutamin (LONZA) kultiviert. βTC3-Zellen wurden in spezifischem DMEM-Medium mit 2 mM L-Gln, ohne Glukose (LONZA) mit 15 % (v/v) DHS



nen Organ wurde die Leber mit 1 mL RIPA-Puffer versetzt und homogenisiert (PT 3100, Polytron). Im Anschluss wurden weitere 4 mL des Puffers zugefügt und das Homogenat mehrfach zentrifugiert (14000 rpm, 10 min, 4 °C), um das vorhandene Fett zu entfernen. Vor dem Einfrieren bei -80 °C wurde das Lysat mit 10 % (v/v) Glycerol versetzt.

Zur Isolierung von Mitochondrien aus Leberzellen wurde zuerst das gewonnene Lebergewebe mittels eines Glashomogenisators in 5 mL Leberlysepuffer homogenisiert und die Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation abgetrennt (700 x g, 5 min, RT). Der entstandene Überstand wurde erneut zentrifugiert (4500 x g, 10 min, RT), um die Mitochondrien zu gewinnen. Die mitochondriale Fraktion wurde mit 800 µL Lysepuffer pro 200 µL Sediment und 3 x 30 s Ultraschall (Sonifier B-12 Cell Disruptor 40, Branson Sonic Power Company) auf Eis aufgeschlossen. Die mitochondrialen Trümmer wurden mittels Zentrifugation (14000 x g, 20 min, RT) abgetrennt.

Lysepuffer	150 mM NaCl; 50 mM Tris-Base; 0,5 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 x Protease-Inhibitor; pH 7,4; 4 °C
RIPA-Puffer (Leber)	150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 % (v/v) Triton X-100; 1 % (v/v) DOC; 0,1 % (v/v) SDS; 5 µg/mL Aprototinin; 5 µg/mL Leupeptin; 50 mM Tris/HCl; pH 7,4; 4 °C
5 x SDS-Ladepuffer	225 mM Tris/HCl, pH 6,8; 5 % (w/v) SDS; 250 mM DTT; 50 % (v/v) Glycerol; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol; -20 °C
Leberlysepuffer	250 mM Saccharose; 10 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; 2 mM DTT; pH 7,4; 4 °C

## 5.5 Transfektion und Ernte eukaryotischer Zellen

Die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Absch. II.4.1.1). Vor der Ernte wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (Absch. II.3.1.3) gewaschen, mit einem Zell-Schaber vom Boden der Kulturschale entfernt und anschließend in 1 mL PBS mit Proteaseinhibitor (Complete, Roche) aufgenommen.

## 5.6 Detektion von Serotonin und Serotoninmetaboliten

Zur Detektion von 5-HT und dessen Metaboliten in βTC3-Zellen wurde die für Indole charakteristische Fluoreszenz genutzt. Dafür wurden die Zellen für 16 h mit 1 g/L Glukose, 0,5 mM 5-HT und Ethanollösungen verschiedener Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und dreimal mit kaltem PBS (Absch. II.3.1.3) gewaschen. Nach einmaligem Gefrieren auf Trockeneis wurden die Zellen mittels 100 µL Aufschlusspuffer und Inkubation (30 min; 4 °C) lysiert und die gefällten Proteine mittels dreimaliger Zentrifugation (14000 x g; 15 min; 4 °C) abgetrennt. 50 µL des Überstandes wurden in die HPLC-Anlage (Shimadzu) injiziert und mittels einer C18-

Reversed-Phase-Säule (Vydac, Typ 218TP104) aufgetrennt [443]. Die Fluoreszenz wurde bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm über einen spektrofluometrischen Detektor (RF-10AXL, Shimadzu) ausgelesen. Der Elutionspuffer, der als mobile Phase diente, wurde mit 0,5 mL/min durch die Säule gepumpt. Zur Auswertung wurden die Signalhöhen und -flächen bestimmt und mit Hilfe einer Standardkurve in ng umgerechnet.

Aufschlusspuffer	300 mM PCA; 4 mM SMBS; 4 °C
Elutionspuffer	30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 5 % Methanol; 0,165 mM EDTA

## 5.7 Analyse der eukaryotischen Zellproliferation

### 5.7.1 Quantifizierung der genomischen DNA

Die Bestimmung der relativen Zellzahl anhand des zellulären DNA-Gehalts wurde mittels Interkalation eines kommerziellen Fluoreszenzfarbstoffes (CyQUANT NF, Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 3000 Zellen der jeweiligen Zelllinie pro Kavität in Monoamin-freiem Medium in 96-Kavitäten Platten ausgesät. Die verschiedenen Bedingungen eines Experiments wurden jeweils als 4-fach-Bestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden mindestens eine Woche mit Medium, das dialysiertes FBS enthielt, vorkultiviert, um eine mögliche Speicherung der Monoamine zu verhindern. Die verschiedenen Hepatocytenzelllinien wurden zusätzlich in Kulturmedium mit einem geringeren Serum-Anteil (0,5 % (v/v)) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen mit 5-HT und/oder Ethanol verschiedener Konzentrationen oder PBS (Absch. II.3.1.3) als Kontrolle behandelt. Nach 48 h wurde das Medium entfernt und durch das Farbstoffreagenz ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffes fand mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm und Detektion bei 530 nm mittels eines Fluoreszenz-Mikroplattenlesers statt (POLARstar Omega, BMG Labtech).

### 5.7.2 Quantifizierung der mitochondrialen Aktivität

Die Bestimmung der relativen Zellzahl anhand der mitochondrialen Aktivität wurde mittels der Umsetzung des löslichen Farbstoffes XTT (AppliChem) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zuerst wurden 3000 Zellen der jeweiligen Zelllinie pro Kavität in Monoamin-freiem Medium in 96-Kavitäten Platten ausgesät. Die verschiedenen Bedingungen eines Experiments wurden jeweils als 6-fach-Bestimmung durchgeführt. Die Zellen wurden mindestens eine Woche mit Medium, das dialysiertes FBS enthielt, vorkultiviert, um eine mögliche Speicherung der Monoamine zu verhindern. Die verschiedenen Hepatocytenzelllinien wurden zusätzlich dazu in Kulturmedium mit einem geringeren Serum-Anteil (0,5 % (v/v)) ausgesät. Nach der Aussaat wurden die Zellen mit

dem jeweiligen Monoamin (5-HT, DA, NE) und/oder Ethanol verschiedener Konzentrationen oder PBS (Absch. II.3.1.3) als Kontrolle behandelt.

Nach 48 h wurde das XTT-Reagenz zu 100  $\mu\text{L}$  Medium gegeben und die Zellen für weitere 90 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Höhe der Absorption des Farbstoffes wurde mit Hilfe eines ELISA-Messgerätes (Spectra Max 250, Molecular Devices) bei 470 nm (Farbstoff) und bei 660 nm (Referenz) nach einer Inkubationszeit von 90 min detektiert. Als Nullwert diente hierbei zellfreies Medium mit dem jeweiligen Monoamin oder PBS. In Vorexperimenten wurde zum einen gezeigt, dass der pH-Indikator Phenolrot bei der Messung zu vernachlässigen ist und die Absorptionsmaxima des XTT-Farbstoffs ermittelt. Zum anderen wurde die optimale Zellzahl, sowie Kultivierungsdauer der Zellen nach der Behandlung bestimmt.

### 5.8 Monoaminylierung der Proteine eukaryotischer Zellen

Zum quantitativen Nachweis der Aufnahme von Monoaminen und der generellen Monoaminylierung der Proteine einer bestimmten Zelllinie wurden 500.000 Zellen/Kavität in einer 12-Kavitäten-Platte als 3-fach-Bestimmung mit [ $^3\text{H}$ ]-markiertem 5-HT, DA, HA und NE behandelt und anschließend mittels eines Szintillationszählers die ins Proteom inkorporierte Radioaktivität gemessen. Zur Kontrolle der spezifischen Monoaminylierung wurden die Zellen 3 h nach Aussaat mit 500  $\mu\text{M}$  Cysteamin (CTA), einem kompetitiven Inhibitor der TGM-Familie [444], behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 21 h wurden 100  $\mu\text{M}$  des jeweiligen biogenen Monoamins zugegeben, wobei 5  $\mu\text{Ci}$  des radioaktiven Monoamins mit nicht-radioaktiven Monoaminen gemischt wurden, so dass ein Zehntel der zugegebenen Stoffmenge [ $^3\text{H}$ ]-markiert war (Spezifische Aktivität, Radiochemikalien Tabelle 1). Die Zellen wurden weitere 3 h inkubiert, mittels Zellschaber von der Kunststoffoberfläche abgelöst, zweimal mittels Zentrifugation (5 min, 400 x g, RT) mit PBS (Absch. II.3.1.3) gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Die gefrorenen Zellsedimente wurden auf Eis in 100  $\mu\text{L}$  300 mM PCA mit Hilfe eines Akkuschaubers (BAS 18-2/1 HA, Einhell Bavaria) und einem Pistill (DSTROY-S, Biozym) für 2 x 20 s bei 400 rpm mechanisch aufgeschlossen. Die gesamte Probe wurde mit 400  $\mu\text{L}$  300 mM PCA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Pipettenspitze, das Pistill und das alte Reaktionsgefäß mit 1 mL 300 mM PCA abgespült und mit der Probe vereint. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (15 min, 20000 x g, 4 °C) vom Überstand, der das cytosolische Extrakt enthielt, abgetrennt. Das Sediment wurde zweimal mit 300 mM PCA gewaschen, in 10 % (w/v) SDS bei 95 °C unter Schütteln für 10 min gelöst und in 2 mL Szintillationsflüssigkeit (ReadyProtein+, Beckman Coulter) gegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit 1 mL Szintillationsflüssigkeit nachgespült und diese mit der das Sediment enthaltenen Szintillationsflüssigkeit vereint.

Zusätzlich wurden 1/10 der zytosolischen Fraktion in einem Szintillationsgefäß (PolyvialsV, Zinsser Analytic) in 3 mL Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler (Wallac 1409, PerminElmer) vermessen.

## 6 Tierphysiologische Studien

### 6.1 Mausstämme und Haltungsbedingungen

Die verwendeten TPH1-defizienten (*Tph1*<sup>-/-</sup>) Tiere und die wt-Kontrolltiere mit intaktem *Tph1*-Gen (*Tph1*<sup>+/+</sup>) der Linie Kl19 besaßen einen gemischten genetischen Hintergrund der Mausstämme (*Mus musculus*) 129/SvEvBrd und C57BL/6J und wurden am Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin (Berlin-Buch) generiert [94,95]. *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden in regelmäßigen Abständen miteinander verpaart und die daraus entstandenen *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zur erneuten Etablierung der *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Linien eingesetzt, um eine genetische Drift zwischen den einzelnen Linien auszuschließen [445].

Für die Entnahme der Lebern zur Analyse mit Hochdurchsatz-Sequenzierung, qPCR und Immunoblotting wurden insgesamt jeweils 18 Tiere der Linien Kl19 *Tph1*<sup>+/+</sup> und Kl19 *Tph1*<sup>-/-</sup> mit gemischtem genetischen Hintergrund verwendet. Die Tiere waren 16-24 Monate alt. Die Lebern zur Isolierung der Mitochondrien stammten aus zwei Monate alten Tieren.

Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen in einem klimatisierten Raum mit einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 h und freiem Zugang zu Futter in kleinen Gruppen von bis zu sechs Tieren in IVC-Käfigen (*Individually Ventilated Cages*) gehalten. Der freie Zugang zu Wasser wurde durchgängig gewährleistet.

### 6.2 Untersuchung der freiwilligen Selbstverabreichung von Ethanol

Für die Untersuchung der freiwilligen Ethanolaufnahme wurden 15 Tiere pro Genotyp eingesetzt, die einen homogenen gemischten genetischen Hintergrund aus elf Verpaarungen der oben genannten Stämme besaßen. Die freiwillige Ethanolaufnahme wurde auch mit heterozygoten Inzuchtmäusen (8. Generation auf C57BL/6J) und Tieren des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Hier kamen ebenfalls 15 Tiere pro Genotyp zum Einsatz. Für die Untersuchung des Einflusses von 5-HTP und die Bestimmung des genetischen Hintergrundes wurden 24 weibliche Tiere eingesetzt, die über elf Generationen mit dem Inzuchtstamm C57BL/6J zur Hybridlinie rückgekreuzt waren [446]. Alle Tiere waren zu Untersuchungsbeginn zwischen 8-11 Monate alt.

Um einen Flüssigkeitsverlust durch Tropfen zu minimieren, wurden spezielle 75 mL Trinkflaschen mit einem Doppelkugelsystem (Caldex Limited) verwendet. Die Tiere und der Inhalt der angebotenen Trinkflaschen wurden alle 24 h gewogen. Die Anordnung der Flaschen wurde jeden Tag gewechselt, um die jeweilige Rechts-Links-Präferenz der Tiere von der Flaschenwahl zu trennen [447].

Während einer Eingewöhnungsphase in die Laborräume wurde den Tieren für acht Tage Wasser in zwei Trinkflaschen angeboten. Daraufhin stand den Tieren Wasser und Ethanol in aufsteigender Konzentrationsfolge (3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 % und 25 %) zur Verfügung. Wenn nötig, wurde den Tieren nach der Eingewöhnungsphase zur Konditionierung für zehn Tage eine 10 %ige Ethanol-lösung in zwei Flaschen angeboten. Im Anschluss hatten sie wiederum die Wahl zwischen Ethanol in aufsteigender Konzentrationsfolge, wobei jede Konzentration für acht Tage angeboten wurde.

Zur Untersuchung des Einflusses von 5-HTP auf die freiwillige Selbstverabreichung von Ethanol wurde den Tieren nach der Eingewöhnungsphase für sechs Tage Wasser in zwei Flaschen angeboten. In den folgenden zwei Tagen wurde dem Wasser 250  $\mu$ M Ascorbinsäure (ASC, KuraVit) zugefügt. Darauf folgte eine 16-tägige Konditionierungsphase mit einer ASC-enthaltenden 10 %igen Ethanol-lösung in beiden Flaschen. Weitere zehn Tage wurde den Mäusen dann die Wahl zwischen 10 % Ethanol (250  $\mu$ M ASC) und Wasser (250  $\mu$ M ASC) gelassen. Im folgenden Untersuchungsabschnitt wurden die Tiere beider Genotypen jeweils in zwei Kollektive unterteilt (Tier 1-6 = Kollektiv 1; Tier 7-12 = Kollektiv 2). Ein Kollektiv jedes Genotyps erhielt für zehn Tage weiterhin eine 10 %ige Ethanol-lösung und Wasser, während das Kollektiv 2 sowohl Wasser als auch Ethanol-lösung mit 0,5 mg/mL 5-HTP bekam. Während der gesamten Testreihe befand sich in allen Lösungen 250  $\mu$ M ASC, um Oxidationsreaktionen des 5-HTP zu verhindern. Für die folgenden zehn Tage wurde die 10 %ige Ethanol-lösung und das Wasser mit 3 % (w/v) Saccharose (Invitrogen) versetzt, um den bitteren Geschmack des 5-HTPs zu neutralisieren. Da der Zusatz von Saccharose keinen Effekt zeigte, wurde die Untersuchung für weitere 25 Tage ohne Saccharose weitergeführt, wobei sich 5-HTP nur noch in der Ethanol-lösung befand.

### 6.3 Schwanzbiopsien

Zur Genotypisierung wurde den Tieren im Alter von 5-6 Wochen etwa 0,5 cm der Schwanzspitze abgetrennt und die Wunde im Anschluss thermisch verödet. Zur Untersuchung des genetischen Hintergrundes den Tieren zum Ende des Trinkuntersuchunges mit 5-HTP ein 1-2 cm langes Stück der Schwanzspitze mittels einer Schere entfernt und die enthaltene genomische DNA extrahiert (Absch. II.3.1.2).

## 6.4 Blutentnahme

0,9 mL Blut der geopferten Tiere wurden mit 30 U/mL Lithium-Heparin (USB Corporation) versetzt. Das Blutplasma wurde mittels Zentrifugation (10 min, 2000 x g, 24 °C) abgetrennt und das erhaltene Blutserum zur Untersuchung in das veterinärmedizinische Labor der Vet-MedLab GmbH gegeben

## 7 Statistische Analyse

Die erarbeiteten Daten wurden mittels Excel (Microsoft) ausgewertet. Bei den in den Diagrammen dargestellten Werten handelt es sich, falls nicht anders angegeben, um Mittelwerte der Datenreihen  $\pm$  Standardabweichung. Das Signifikanzniveau zwischen den Wertpopulationen wurde falls nicht anders angegeben mit Hilfe eines zweiseitigen t-Tests Typ 3 nach Student ermittelt und Irrtumswahrscheinlichkeiten mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant befunden. Weiterhin wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten mit  $0,09 > p \geq 0,05$  als statistischer Trend befunden und als Tendenzen angegeben.

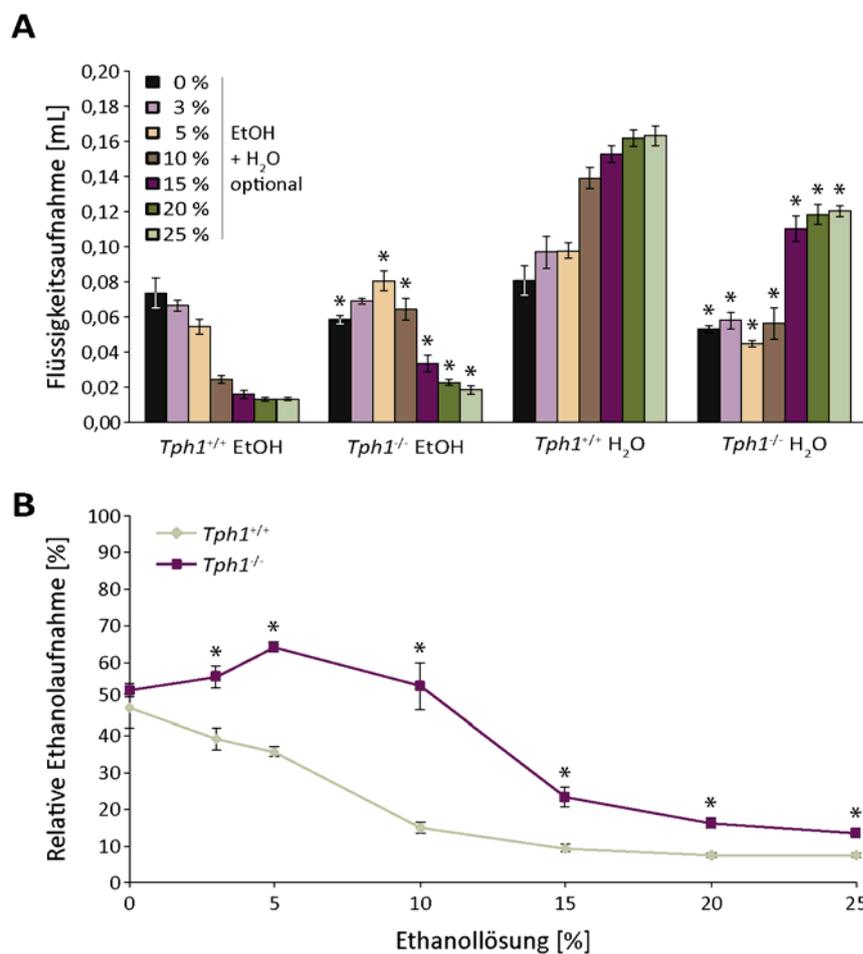


## III Ergebnisse

### 1 Der Einfluss des serotonergen Systems auf Alkoholkonsum und Leberregeneration

#### 1.1 *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere nehmen erhöhte Mengen an Ethanol zu sich

Genkopplungsstudien im Menschen und in der Maus haben gezeigt, dass *TPH1* und *Tph1* an der Entwicklung von Alkoholismus beteiligt sein könnten [432,433]. Daher wurden *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einem homogen gemischten genetischen Hintergrund Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen angeboten und die Flüssigkeitsaufnahme mit der von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Mäusen verglichen.



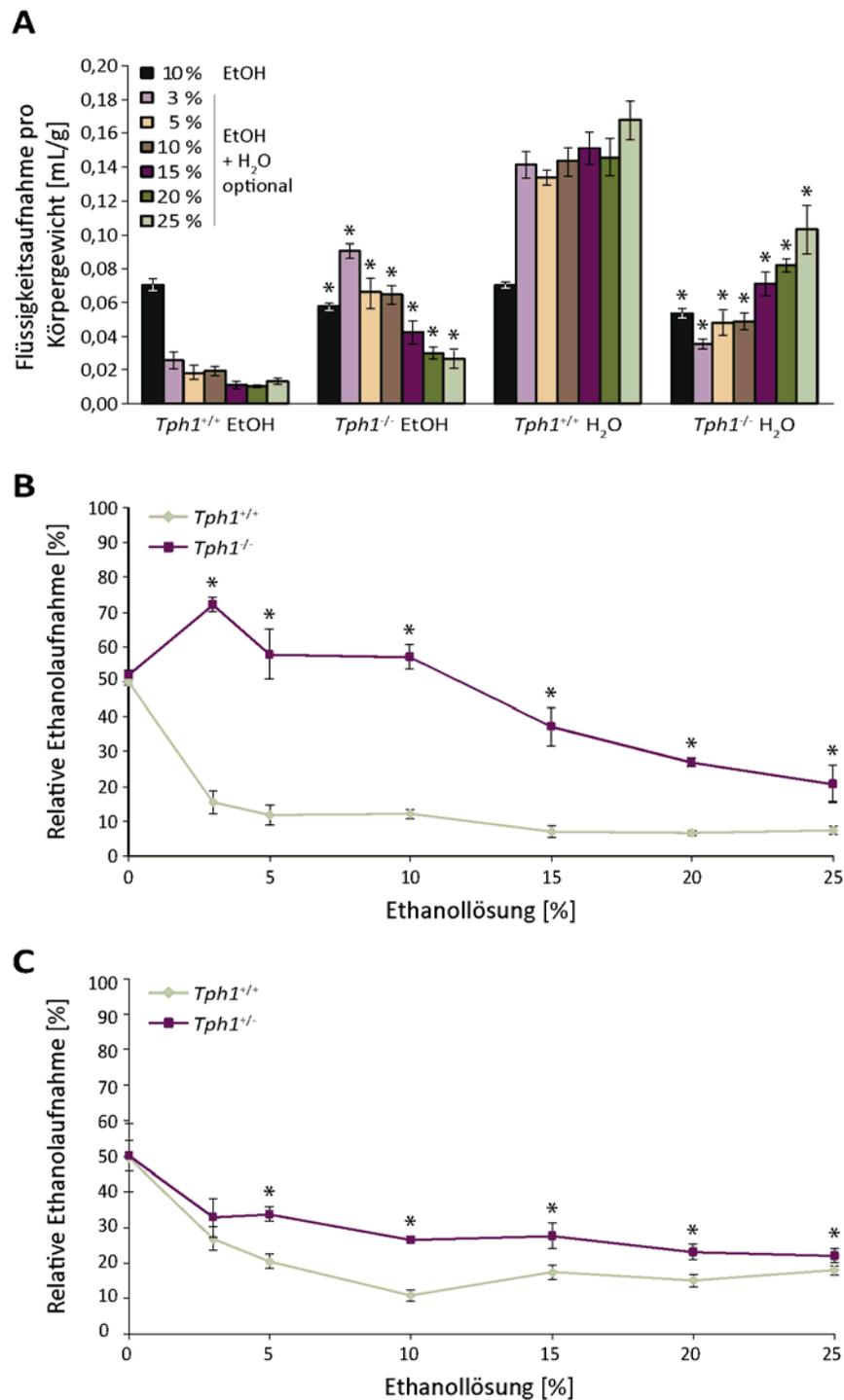
**Abbildung 15:** *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen eine erhöhte freiwillige Aufnahme von Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen. *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit einem homogen gemischten genetischen Hintergrund hatten die Wahl zwischen zwei Flaschen mit H<sub>2</sub>O und Ethanol(EtOH)-Lösungen verschiedener Konzentrationen, die in aufsteigender Reihenfolge für jeweils acht Tage angeboten wurden. Die Anordnung der Flaschen wurde jeden Tag gewechselt und jeweils der Mittelwert aus zwei Tagen berücksichtigt, um die Rechts-Links-Präferenz der Tiere von der Flaschenwahl zu trennen. **(A)** Gezeigt ist die absolute Aufnahme der jeweiligen Flüssigkeit. 15 biologische Replikate pro Genotyp; \*p < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>. **(B)** Dargestellt ist die relative Ethanolaufnahme in Bezug auf die Gesamtflüssigkeitsaufnahme der Tiere, 15 biologische Replikate pro Genotyp; \*p < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>.

Die Tiere hatten dabei die Wahl zwischen Wasser und der jeweiligen Ethanollösung. *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere zeigten für alle dargebotenen Konzentrationen eine signifikant erhöhte Aufnahme, wobei geringere Konzentrationen (3-5 % Ethanol) von beiden Genotypen verstärkt im Vergleich zu höheren Ethanolkonzentrationen konsumiert wurden (Abb. 15). *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere deckten 50-60 % ihres gesamten Flüssigkeitsbedarfs mit 3-5 %igen Ethanollösungen, während *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tiere nur 35-40 % in Form von 3-5 %igem Ethanol aufnahmen. Bei den 15-25 %igen Lösungen sind es bei den *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren 15-25 % des Gesamtbedarfs, während es bei den *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren unter 10 % sind.

## 1.2 Eine Präkonditionierung vermindert die erhöhte Präferenz der *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere zur Ethanolaufnahme nicht

Da die freiwillige Aufnahme von Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren erhöht war (Absch. III.1.1), sollte die aversive Reaktion nach einer zehntägigen Konditionierungsphase mit einer 10 %igen Ethanollösung ermittelt werden. Des Weiteren wurde hier das Gewicht der Tiere berücksichtigt, das bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren durch eine erhöhte Futtermittelaufnahme höher liegt als das Gewicht der *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tiere [448] und damit eine höhere absolute Flüssigkeitsaufnahme erwarten ließe. *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere zeigten nach der Konditionierung weiterhin eine signifikant erhöhte Aufnahme aller angebotenen Ethanollösungen, wobei die Ethanollösungen in sämtlichen Konzentrationen von den *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren zu einem höherem Maße konsumiert wurden als von den Kontrolltieren (Abb. 16A und B). *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere deckten 50-75 % ihres gesamten Flüssigkeitsbedarfs mit 3-10 %igen Ethanollösungen, während bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren nur etwa 15 % der Flüssigkeitsaufnahme aus diesen Ethanollösungen bestand. Bei den 15-25 %igen Lösungen waren es bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren 20-45 % des Gesamtbedarfs und bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren lediglich etwa 10 %.

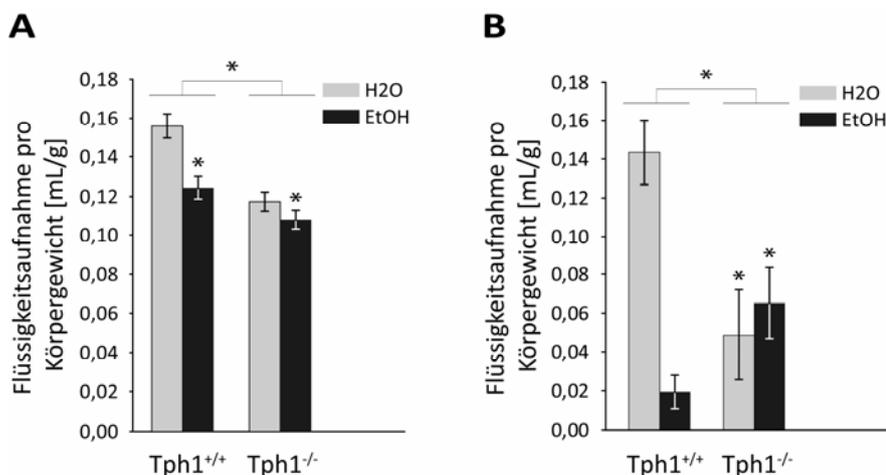
Auch heterozygote *Tph1<sup>+/-</sup>*-Tiere zeigten nach Konditionierung eine signifikant erhöhte Aufnahme der 5-25 %igen Ethanollösungen gegenüber *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren (Abb. 16C), was den Phänotyp auf den eingeführten Gendefekt und nicht auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückführen lässt. *Tph1<sup>+/-</sup>*-Tiere deckten ca. 35 % ihres gesamten Flüssigkeitsbedarfs mit der 3 %igen und 5 %igen Ethanollösung, während bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren etwa 25 % der Flüssigkeitsaufnahme aus diesen Ethanollösungen bestand. Bei den 10-25 %igen Lösungen waren es bei *Tph1<sup>+/-</sup>*-Tieren 22-28 % des Gesamtbedarfs und bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren 11-18 %.



**Abbildung 16: *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen keine verminderte Aufnahme von Ethanol nach Präkonditionierung.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere wurden für zehn Tage mit einer 10 %igen EtOH-Lösung konditioniert und hatten im Anschluss die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und EtOH-Lösungen verschiedener Konzentrationen, die in aufsteigender Reihenfolge für jeweils acht Tage angeboten wurden. **(A)** Gezeigt ist die absolute Aufnahme der jeweiligen Flüssigkeit bezogen auf das Körpergewicht der Tiere. Für die Konditionierungsphase mit EtOH (schwarze Säule) entspricht H<sub>2</sub>O der zweiten angebotenen Flasche mit EtOH. 15 biologische Replikate pro Genotyp mit homogen gemischtem genetischen Hintergrund; \**p* < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>. **(B)** Dargestellt ist die relative Ethanolaufnahme in Bezug auf die Gesamtflüssigkeitsaufnahme der Tiere, 15 biologische Replikate pro Genotyp mit homogenem gemischtem genetischen Hintergrund; \**p* < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>. **(C)** Dargestellt ist die relative Ethanolaufnahme in Bezug auf die Gesamtflüssigkeitsaufnahme der Tiere, 15 biologische Replikate pro Genotyp; Rückkreuzung der 8. Generation auf C57BL/6J; \**p* < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>.

### 1.3 *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere verringern die Gesamtflüssigkeitsaufnahme in der Konditionierungsphase unterschiedlich

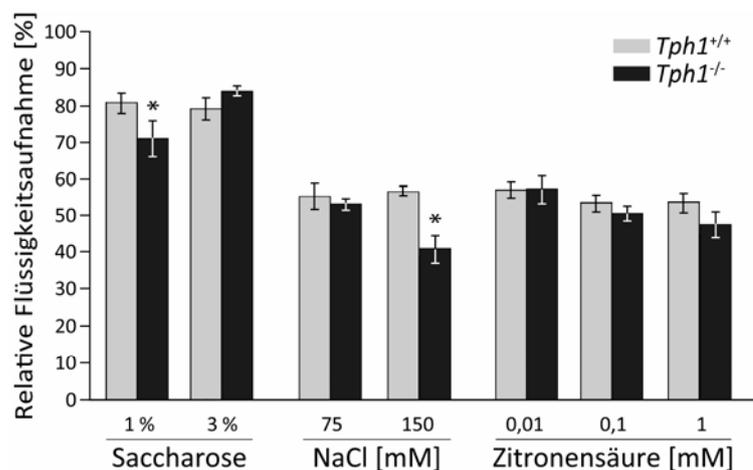
Bei der unter Absch. III.1.2 beschriebenen Konditionierung der Tiere mit Ethanol zeigte sich eine Abnahme der gesamten Flüssigkeitsaufnahme bei beiden Genotypen mit homogen gemischten genetischen Hintergründung (Abb. 17 A). *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere nahmen pro Gramm Körpergewicht pro Tag durchschnittlich 0,156 mL Wasser zu sich. Bei der Gabe einer 10 %igen Ethanollösung verringerte sich die Flüssigkeitsaufnahme signifikant auf 0,124 mL/g Körpergewicht. Bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren lag die Menge der getrunkenen Flüssigkeit für Wasser bei 0,117 mL/g Körpergewicht und für eine 10 %ige Ethanollösung bei 0,108 mL/g. Damit war die Flüssigkeitsaufnahme bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant um 8 % reduziert, wobei die der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere um 21 % abnahm. Des Weiteren ist festzuhalten, dass *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere unabhängig von der Art der Flüssigkeit signifikant mehr Volumen zu sich nahmen als *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere. Wenn die Tiere die Wahl zwischen Wasser und einer 10 %igen Ethanollösung hatten, kehren beide Genotypen zu der anfänglichen Aufnahmemenge an Gesamtflüssigkeit zurück (Abb. 17 B). Dabei deckten *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere 88 % des Gesamtbedarfs mit Wasser und 13 % mit der 10 %igen Ethanollösung, während es bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren 43 % Wasser und 57 % Ethanollösung waren (Absch. III.1.2).



**Abbildung 17: *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen eine verminderte Aufnahme von 10 %igem Ethanol gegenüber Wasser.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere bekamen acht Tage lang Wasser, wurden dann für zehn Tage mit einer 10 %igen EtOH-Lösung konditioniert und hatten im Anschluss die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung; 15 biologische Replikate pro Genotyp (A) Bei der anfänglichen Gabe von H<sub>2</sub>O nahmen die Tiere pro Tag und Gramm Körpergewicht 0,156 mL H<sub>2</sub>O zu sich; wenn sie zur Konditionierung ausschließlich 10 % EtOH bekamen sind es 0,124 mL/g. Sowohl bei H<sub>2</sub>O als auch bei EtOH lag die Gesamtflüssigkeitsaufnahme bei *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren höher. \*p < 0,05 H<sub>2</sub>O vs. EtOH bzw. *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>. (B) Nach der Konditionierung hatten die Tiere die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung. Dabei nahmen *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere bezogen auf die Gesamtflüssigkeitsaufnahme 88 % Wasser und 13 % EtOH-Lösung zu sich, während es bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren 43 % Wasser und 57 % EtOH-Lösung waren. *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere tranken wiederum insgesamt signifikant mehr als *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere; \*p < 0,05 H<sub>2</sub>O vs. EtOH bzw. *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>.

### 1.4 *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere weisen kaum veränderte Präferenzen für süßen, salzigen und sauren Geschmack auf

Um zu verifizieren, ob der gemischte genetische Hintergrund der Tiere keiner genetischen Drift unterlag, sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied der Geschmackspräferenz zwischen den verwendeten Genotypen für drei unterschiedliche Geschmacksrichtungen gibt. Eine Stamm-spezifische Präferenz wurde bereits für verschiedene Mauslinien beschrieben [449–451]. Die Gabe von Lösungen der Geschmacksrichtungen süß, salzig und sauer in unterschiedlichen Konzentrationen ergab, dass *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren eine signifikant geringere Aufnahme einer 1 %igen süßen Saccharoselösung, sowie einer 150 mM salzigen NaCl-Lösung zeigen (Abb. 18). Die höhere Saccharosekonzentration von 3 % führte zu keiner verringerten Aufnahme durch *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, genau wie die 75 mM NaCl-Lösung. Die Gabe einer sauren Zitronensäurelösung mit einer Konzentration von 0,01 mM, 0,1 mM oder 1 mM führte zu keinem signifikanten Unterschied bei der Flüssigkeitsaufnahme zwischen den Genotypen.

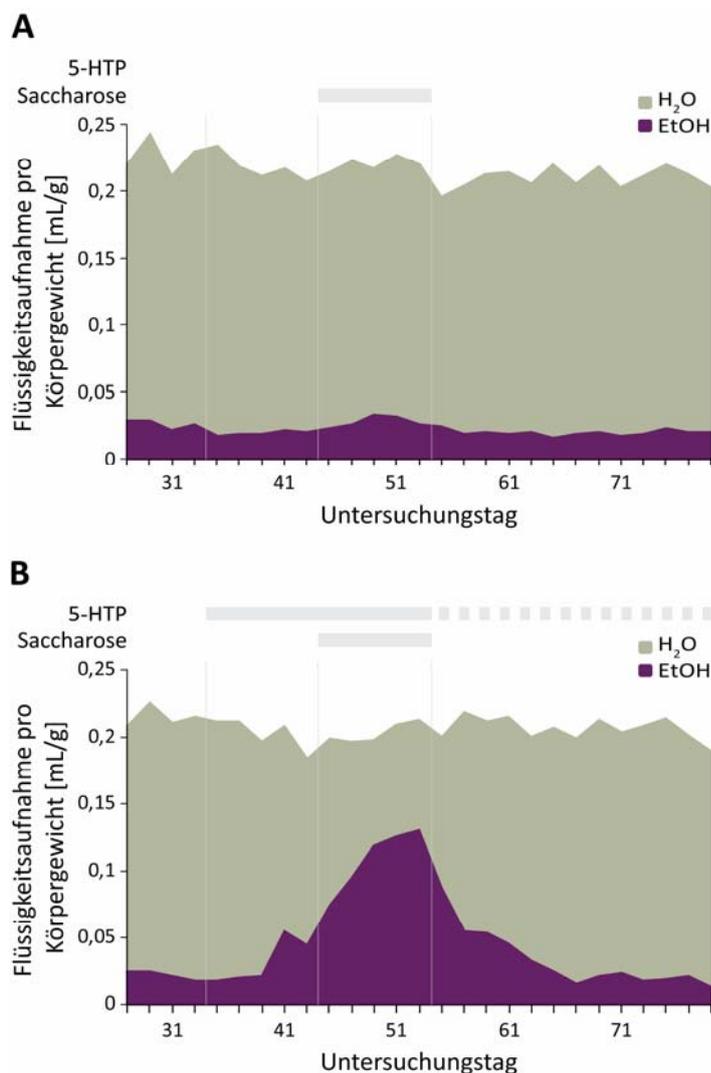


**Abbildung 18: *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere unterscheiden sich geringfügig in ihrer Präferenz für süßen und salzigen Geschmack.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere hatten für jeweils acht Tage die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und Lösungen mit Substanzen unterschiedlicher Geschmacksrichtungen in verschiedener Konzentrationen, die in aufsteigender Reihenfolge angeboten wurden. Dabei tranken *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren 10 % weniger Flüssigkeit von einer 1 %igen süßen Saccharoselösung und 16 % weniger Flüssigkeit, wenn ihnen eine salzige 150 mM NaCl-Lösung angeboten wurde. Die Höhe der Aufnahme einer sauren Zitronensäurelösung dreier verschiedener Konzentrationen war zwischen den Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Dargestellt ist die relative Flüssigkeitsaufnahme pro Gramm Körpergewicht der Tiere, 15 biologische Replikate pro Genotyp; \*p < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>.

### 1.5 Die Gabe von 5-Hydroxytryptophan verringert die erhöhte Ethanolaufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere

Die zuvor beobachtete erhöhte Aufnahme von Ethanolösungen unterschiedlicher Konzentrationen bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren mit gemischtem genetischen Hintergrund und heterozygoten Inzuchtmäusen (Absch. III.1.2) wurde mit Tieren, die über elf Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6J rückgekreuzt waren, reproduziert. Als Kontrolltiere (*Tph1*<sup>+/+</sup>) wurden hierbei Tiere des Stammes

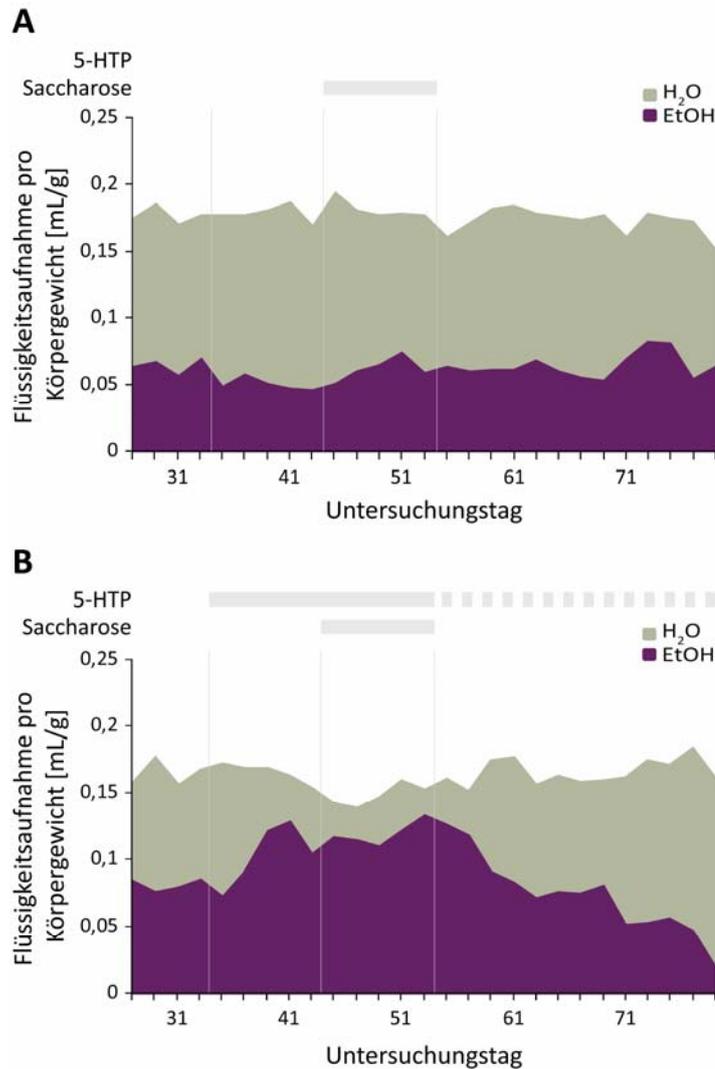
C57BL/6J verwendet. Anschließend wurde der Einfluss der 5-HT-Vorstufe 5-HTP auf das Trinkverhalten beider Genotypen untersucht. Während des gesamten Versuchs befand sich Ascorbinsäure (ASC) als Antioxidans in den Lösungen.



**Abbildung 19:** *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere zeigen eine konstante Aufnahme einer 10 %igen Ethanollösung, die jedoch bei gleichzeitiger Gabe von 5-HTP und Saccharose stark erhöht wird. *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere wurden für sechzehn Tage mit einer 10 %igen EtOH-Lösung konditioniert und hatten im Anschluss für 10 Tage die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung. Zwischen Tag 44 und 54 wurde 3 % Saccharose zu den Lösungen beider Flaschen gegeben. Während der gesamten Untersuchung befand sich in allen Lösungen 250 µM Ascorbinsäure (ASC), um eine Oxidation des 5-Hydroxytryptophans (5-HTP) zu verhindern. Auf die Darstellung der Fehlerbalken wurde der Übersichtigkeit halber verzichtet. Gezeigt ist die Ethanol- und Wasseraufnahme in Bezug auf das Körpergewicht der Tiere in einer additiven Darstellung, 12 biologische Replikate pro Genotyp **(A)** Ohne Zugang zu 5-HTP blieb während der gesamten Untersuchung die Aufnahme des Ethanols bei etwa 10 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme. **(B)** Zwischen Tag 34 und 54 wurde den Lösungen beider Flaschen 0,5 mg/mL 5-HTP beigemischt (geschlossener Balken), im Anschluss wurde das 5-HTP nur noch in die Flasche mit der Ethanollösung gegeben (durchbrochener Balken). Die Aufnahme des Ethanols lag hier zu Beginn und am Ende der Untersuchungszeit um die 10 %, während sie zwischenzeitlich auf über 60 % anstieg.

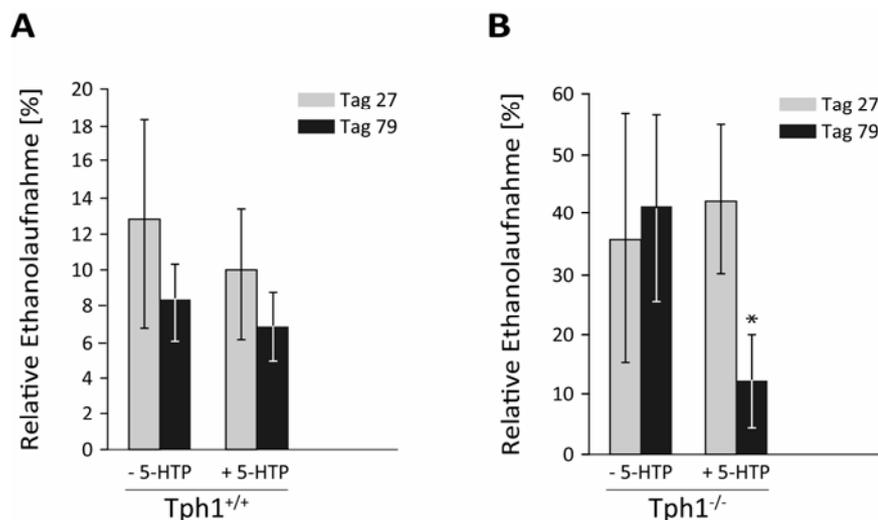
Die Tiere wurden über 16 Tage hinweg mit einer 10 %igen Ethanollösung präkonditioniert und hatten dann die Wahl zwischen Ethanol und Wasser. Die *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere, die keinen Zugang zu

5-HTP hatten, zeigten während der gesamten Zeit eine relativ konstante Aufnahme der 10 %igen Ethanollösung von etwa 10 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 19 A). Zugabe von 3 % Saccharose zu beiden Flaschen führte hier zu einem minimalen Anstieg der Ethanolaufnahme auf 15 % am 49. Tag.



**Abbildung 20:** *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen eine relativ konstante Aufnahme einer 10 %igen Ethanollösung, die durch Saccharosegabe vorübergehend erhöht, aber durch die Zugabe von 5-Hydroxytryptophan im Anschluss signifikant gesenkt wird. *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere wurden für sechzehn Tage mit einer 10 %igen EtOH-Lösung konditioniert und hatten im Anschluss für 10 Tage die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung. Zwischen Tag 44 und 54 wurde 3 % Saccharose zu den Lösungen beider Flaschen gegeben. Während der gesamten Untersuchung befand sich in allen Lösungen 250 µM ASC, um eine Oxidation des 5-HTP zu verhindern. Auf die Darstellung der Fehlerbalken wurde der Übersichtlichkeit halber verzichtet. Gezeigt ist die Ethanol- und Wasseraufnahme in Bezug auf das Körpergewicht der Tiere in einer additiven Darstellung, 12 biologische Replikate pro Genotyp. **(A)** In Abwesenheit von 5-HTP blieb die Aufnahme des Ethanols während der gesamten Untersuchung zwischen 30 % und 45 % der Gesamtflüssigkeitsaufnahme. **(B)** Zwischen Tag 34 und 54 wurde den Lösungen beider Flaschen 0,5 mg/mL 5-HTP beigemischt (geschlossener Balken), im Anschluss wurde das 5-HTP nur noch in die Flasche mit der Ethanollösung gegeben (durchbrochener Balken). Die Aufnahme des Ethanols lag hier zu Beginn der Versuchszeit bei 50 %, stieg zwischenzeitlich auf fast 90 % an und lag am Ende der Untersuchung bei 30 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme.

*Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere, die mit 5-HTP supplementiert wurden, zeigten zu Anfang der Untersuchung analog zu den Tieren ohne 5-HTP eine Ethanolaufnahme, die bei etwa 10 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme lag (Abb. 19 B). Ab dem 39. Tag stieg die Ethanolaufnahme an und erreicht mit der Zugabe von Saccharose am 53. Tag ein Maximum von 61 %. Nachdem die Saccharose aus den Lösungen entfernt wurde und das 5-HTP nur noch der Ethanollösung zugesetzt wurde, um den bitteren Geschmack im Wasser zu eliminieren, sank die Ethanolaufnahme der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere wieder auf das anfängliche Niveau von ca. 10 % ab (Abb. 19 B und Abb. 21 A).



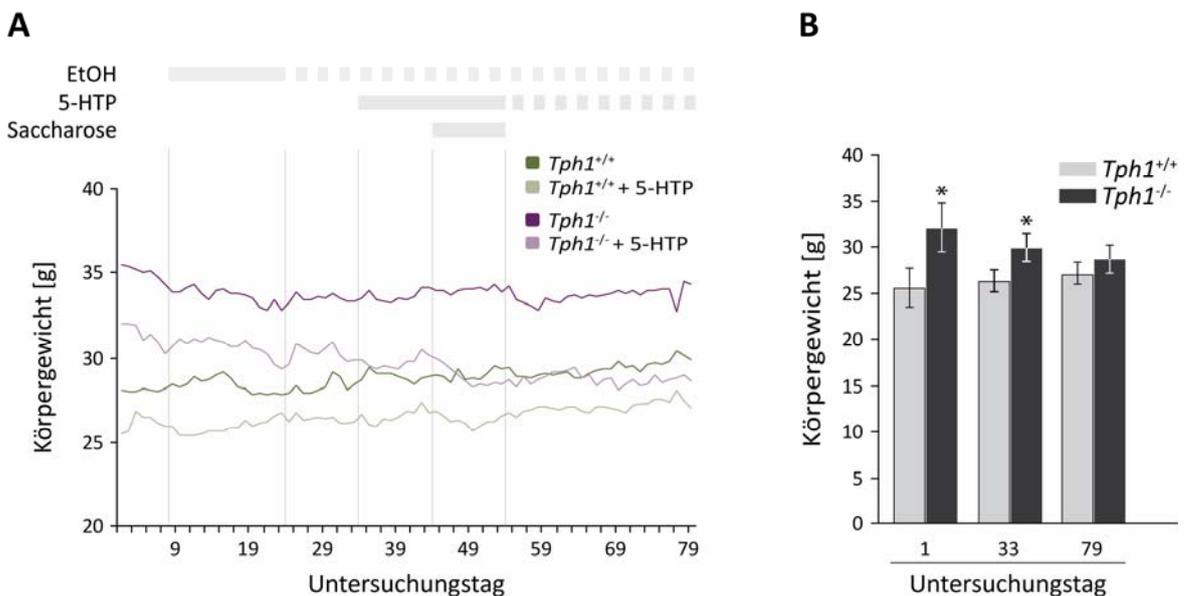
**Abbildung 21: Die Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan führt bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer verminderten Aufnahme von Ethanol.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden nach einer Eingewöhnungszeit sechzehn Tage lang mit einer 10 %igen EtOH-Lösung präkonditioniert und hatten im Anschluss ab dem 24. Tag für zehn Tage die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung. Ab dem 34. Tag befanden sich 0,5 mg/mL 5-HTP in beiden angebotenen Lösungen. Zwischen Untersuchungstag 44 und 54 wurde 3 % Saccharose zu den Lösungen beider Flaschen gegeben. Im Anschluss wurde das 5-HTP nur noch in die Flasche mit der EtOH-Lösung gegeben. Während der gesamten Untersuchung befand sich in allen Lösungen 250 µM ASC, um eine Oxidation des 5-HTP zu verhindern. Gezeigt ist die relative Ethanolaufnahme in Bezug auf die Gesamtflüssigkeitsaufnahme und das Körpergewicht der Tiere, 12 biologische Replikate pro Genotyp, \*p < 0,05. **(A)** Die Aufnahme der 10 %igen EtOH-Lösung durch *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere sank tendenziell zwischen dem 27. und 79. Tag, wobei die Abnahme nicht signifikant bleibt und unabhängig von der Gabe des 5-HTP ist. **(B)** Die Aufnahme von EtOH durch *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere blieb ohne 5-HTP unverändert, während die Gabe von 5-HTP zu einer signifikanten Abnahme des Ethanolkonsums von 40 % der Gesamtflüssigkeitsaufnahme auf etwa 12 % führte.

*Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die keinen Zugang zu 5-HTP hatten, zeigten während der gesamten Untersuchungszeit eine Aufnahme der 10 %igen Ethanollösung zwischen 30 % und 45 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 20 A und Abb. 21 B). Die Zugabe von 3 % Saccharose zu beiden Flaschen führte hier zu keiner signifikanten Veränderung der Ethanolaufnahme. Die *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die mit 5-HTP supplementiert wurden, zeigten zu Anfang der Untersuchung eine Ethanolaufnahme von etwa 50 % der gesamten Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 20 B). Ab dem 37. Tag stieg die Ethanolaufnahme mit der Gabe von 5-HTP an und erreichte nach der Zugabe von Saccharose am 53. Tag ein Maximum von 87 %. Nachdem die Saccharose aus den Lösungen entfernt und das 5-HTP nur

noch der Ethanollösung zugesetzt wurde, sank die Ethanolaufnahme der Tiere auf 30 % und am letzten Untersuchungstag auf 10 % der Gesamtflüssigkeitsaufnahme ab (Abb. 21 B).

### 1.6 Die Gabe von 5-Hydroxytryptophan reduziert das Körpergewicht von *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren

Während der Trinkuntersuchung wurde das Körpergewicht der Mäuse erfasst, um die Flüssigkeitsaufnahme darauf normieren zu können. Übereinstimmend mit bisherigen Beobachtungen lag das Körpergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere aufgrund einer gesteigerten Futteraufnahme im Durchschnitt höher als das der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere [87]. Das Gewicht der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere stieg unabhängig von der Gabe von 5-HTP während der Untersuchung tendenziell durchschnittlich um 1,5 g an (Abb. 22 A). Das Gewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die kein 5-HTP bekamen, lag anfänglich bei 35 g und blieb dann durchschnittlich konstant bei 34 g.



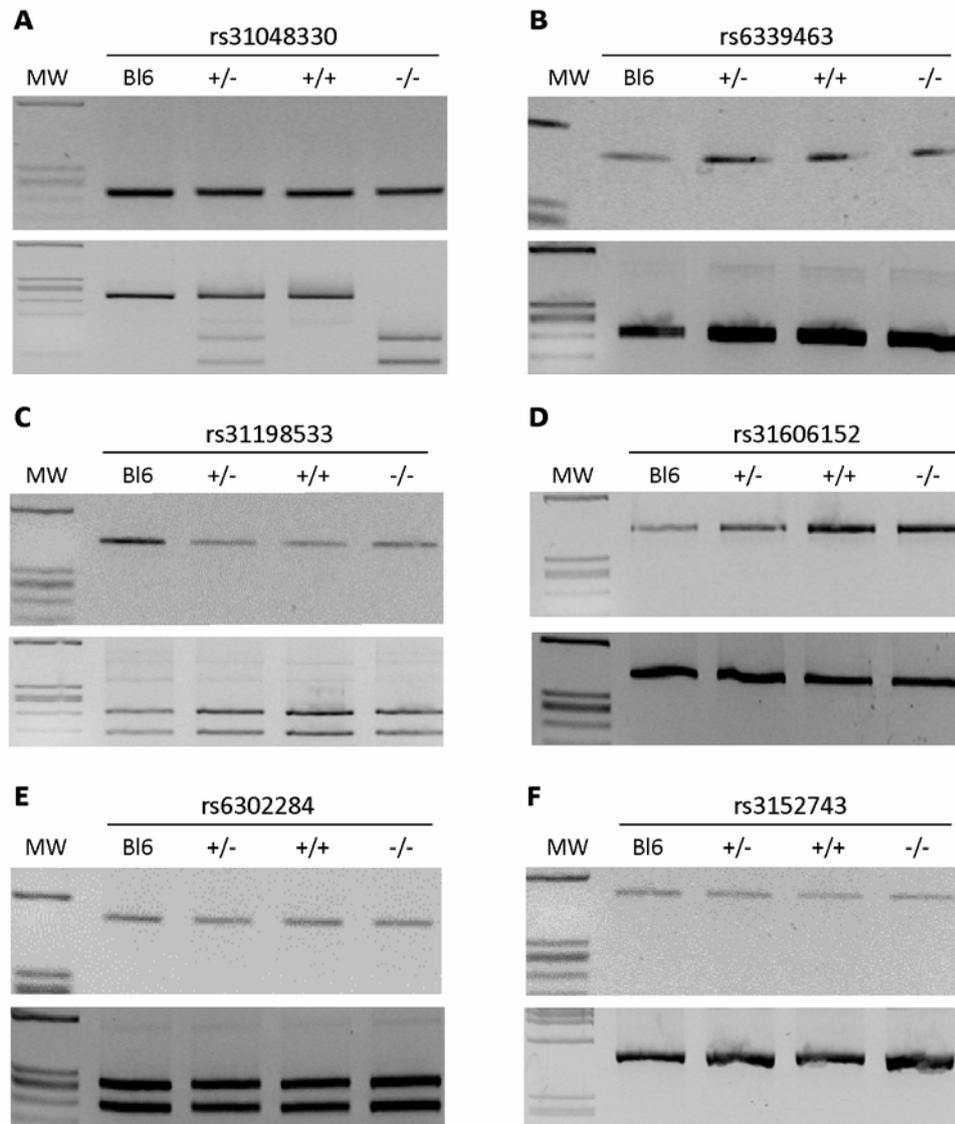
**Abbildung 22: Die Behandlung mit 5-Hydroxytryptophan führt bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer Normalisierung des Körpergewichts.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere wurden für sechzehn Tage mit einer 10 %igen EtOH-Lösung konditioniert (geschlossener Balken) und hatten im Anschluss für 10 Tage die Wahl zwischen H<sub>2</sub>O und einer 10 %igen EtOH-Lösung (durchbrochener Balken). Zwischen Tag 34 und 54 wurde den Lösungen beider Flaschen 0,5 mg/mL 5-Hydroxytryptophans (5-HTP) beigemischt (geschlossener Balken), im Anschluss wurde das 5-HTP nur noch in die Flasche mit der EtOH-Lösung gegeben (durchbrochener Balken). Zwischen Tag 44 und 54 wurde 3 % Saccharose zu den Lösungen beider Flaschen gegeben. Während der gesamten Untersuchung befand sich in allen Lösungen 250 µM ASC, um eine Oxidation des 5-HTP zu verhindern. **(A)** Das Gewicht der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere stieg tendenziell während der Untersuchung an. Das Gewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere ohne 5-HTP-Gabe blieb konstant und das Körpergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere sank während des Versuches auf das Niveau der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere. Auf die Darstellung der Fehlerbalken wurde der Übersichtigkeit halber verzichtet. Gezeigt ist das durchschnittliche Körpergewicht von jeweils 12 biologischen Replikaten pro Kollektiv. **(B)** Am ersten Tag der Untersuchung lag der Unterschied im Gewicht der Genotypen durchschnittlich bei 6,5 g, am 33. Tag, d.h. bevor die 5-HTP-Gabe durchgeführt wurde, gab es einen signifikanten Gewichtsunterschied von 3,7 g und am 79. Tag lag das das Gewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere 1,6 g über dem der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere, \*p < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>.

Das Körpergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die 5-HTP bekamen, verringerte sich während der Untersuchung kontinuierlich und näherte sich zum Ende der Untersuchungszeit an das Gewicht der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere an, die 5-HTP bekamen. Am ersten Untersuchungstag lag der Gewichtsunterschied zwischen den Genotypen durchschnittlich bei 6,5 g, am 33. Tag, bevor die 5-HTP-Supplementierung durchgeführt wurde, gab es einen signifikanten Gewichtsunterschied von 3,7 g (Abb. 22 B). Ab dem 45. Tag war kein signifikanter Gewichtsunterschied mehr zwischen den beiden Genotypen mit Gabe von 5-HTP festzustellen, wobei das Gewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere am 79. Tag nur noch 1,6 g über dem der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere lag.

### **1.7 Die erhöhte Ethanolaufnahme ist nicht auf den genetischen Hintergrund der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zurückzuführen**

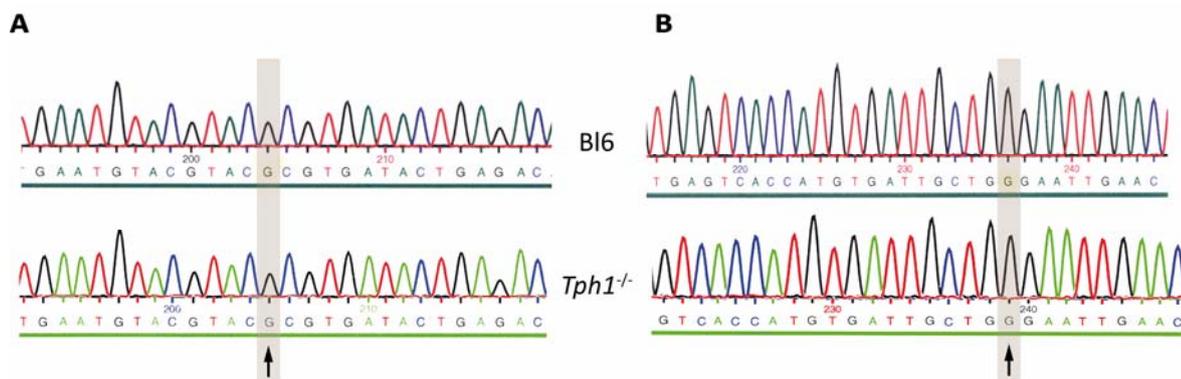
In mehreren Untersuchungen wurde über Unterschiede in der freiwilligen Ethanolaufnahme verschiedener Mauslinien berichtet [433,449]. Da es sich bei den verwendeten Tieren um Mäuse der Linie Kl19 handelt, die einen gemischten genetischen Hintergrund der Stämme 129/SvEvBrd und C57BL/6J besitzen, sollte überprüft werden, inwiefern der beobachtete Phänotyp auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen sein könnte. Zur Analyse des genetischen Hintergrundes wurden die Tiere untersucht, die in der Untersuchung mit 5-HTP-Supplementierung verwendet wurden (Absch. III.1.5). Diese Tiere waren über elf Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6J rückgekreuzt worden.

Zur Überprüfung des genetischen Hintergrundes in der Umgebung von *Tph1* auf Chromosom 7 wurden acht Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) ausgewählt (Tabelle 7). Bei sechs dieser SNP kam es durch den Basenaustausch zur Veränderung einer Restriktionsendonukleaseschnittstelle. Die Analyse dieser SNP erfolgte klassischerweise über Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP). Hierzu wurde das entsprechende DNA-Fragment mittels PCR aus der genomischen DNA der untersuchten Tiere generiert und dieses mit dem in Frage kommenden Restriktionsenzym inkubiert (Tabelle 7). Es stellte sich heraus, dass sowohl *Tph1*<sup>+/-</sup>, *Tph1*<sup>+/-</sup> als auch *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere für die SNP rs6339463, rs31198533, rs31606152, rs6302284 und rs3152743 den genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6J zeigen (Abb. 23 B-F). Während der SNP rs31048330, der bei den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren der Linie C57BL/6J entspricht, bei den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren auf die Linie 129/SvEvBrd zurückzuführen ist und entsprechend bei den heterozygoten *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tieren beide SNP zu erkennen sind (Abb. 23 A).



**Abbildung 23: Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)-Analyse der in Tabelle 7 dargestellten genetischen Variationen zwischen den Mausstämmen C57BL/6J und 129/SvEvBrd in der Umgebung von *Tph1*.** Von aus Schwanzbiopsien stammender genomischer DNA wurden mittels PCR spezifische DNA-Fragmente erzeugt und einer Spaltung mit Restriktionsendonukleasen unterzogen. Als Positivkontrolle diente DNA des Stammes C57BL/6J (Bl6). Die weiteren Genotypen waren Tiere der Genotypen *Tph1*<sup>+/-</sup> (+/-), *Tph1*<sup>+/+</sup> (+/+) und *Tph1*<sup>-/-</sup> (-/-), die über elf Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6J rückgekreuzt worden waren. Molekulargewichtsmarker (MW):  $\phi$ 174 *Hae* III DNA-Leiter. **(A)** Einzelnukleotid-Polymorphismus SNP rs31048330: PCR-Produkt 248 bp mit *Bcc* I inkubiert; (Bl6: 248 bp; 129/SvEvBrd (129Sv): 141 bp + 114 bp); **(B)** SNP rs6339463: PCR-Produkt 474 bp mit *Sac* I inkubiert; (Bl6: 241 bp + 232 bp; 129Sv: 474 bp); **(C)** SNP rs31198533: PCR-Produkt 424 bp mit *Sph* I inkubiert; (Bl6: 232 bp + 191 bp; 129Sv: 424 bp); **(D)** SNP rs31606152: PCR-Produkt 402 bp mit *Sna* BI inkubiert; (Bl6: 402 bp; 129Sv: 211 bp + 190 bp); **(E)** SNP rs6302284: PCR-Produkt 496 bp mit *Kpn* I inkubiert; (Bl6: 276 bp + 219 bp; 129Sv: 496 bp); **(F)** SNP rs3152743: PCR-Produkt 499 bp mit *Nhe* I inkubiert; (Bl6: 499 bp; 129Sv: 272 bp + 226 bp).

Fragmente, welche die beiden übrigen SNP enthielten, wurden analog zu den RFLP mittels PCR aus der genomischen DNA der Tiere amplifiziert und durch Sequenzierung verglichen. In beiden Fällen stimmten die SNP rs31200615 und rs31573973 der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit denen des Stammes C57BL/6J überein (Abb. 24).



**Abbildung 24:** Analyse der in Tabelle 7 dargestellten SNP zwischen den Mausstämmen C57BL/6J und 129/SvEvBrd in der Umgebung von *Tph1* mittels Sequenzierung. Ausschnitt der Sequenzen der PCR-Produkte. Die obere Sequenz stammt aus dem Vergleichsstamm C57BL/6J (Bl6) und die untere Sequenz von den verwendeten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren. Die Position der genetischen Variation, die zwischen den Stämmen C57BL/6J und 129/SvEvBrd auftritt, ist grau hinterlegt und mit einem Pfeil gekennzeichnet. **(A)** SNP rs31200615; **(B)** SNP rs31573973.

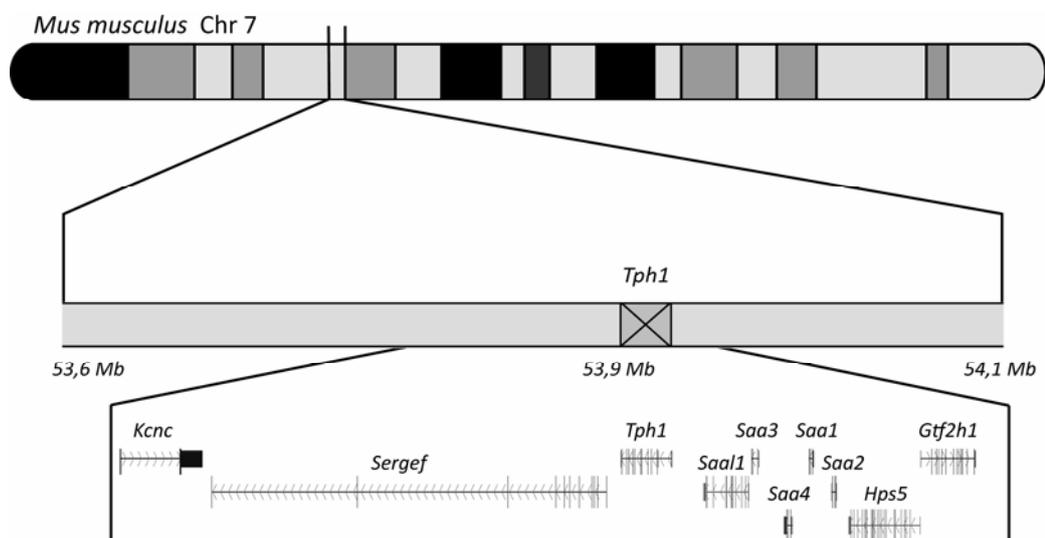
**Tabelle 7: Übersicht über die untersuchten genetischen Variationen der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den Mauslinien C57BL/6J und 129/SvEvBrd.** Untersucht wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP), die mit verschiedenen Restriktionsenzymen (Enzym) analysiert wurden. Als Quelle über den Variationstyp, die Position auf Chromosom 7 (Chr7) und den damit verbundenen Abstand zu *Tph1*, sowie die dazugehörige SNP ID dienen die Datenbanken MGI und NCBI.

SNP ID	Position	Abstand von <i>Tph1</i>	Variations-typ	Enzym	C57BL/6J	129X1/SvJ	<i>Tph1</i> <sup>-/-</sup>
rs6302284	Chr7: 5976518	538685 bp downstream	RFLP	<i>Kpn</i> I	A	G	A
rs31198533	Chr7: 46206901	308302 bp downstream	RFLP	<i>Sph</i> I	G	T	G
rs31048330	Chr7: 46264359	250844 bp downstream	RFLP	<i>Bcc</i> I	C	T	T
rs31200615	Chr7: 46546491	5912 bp upstream	SNP	-	G	C	G
rs31573973	Chr7: 46568078	27499 bp upstream	SNP	-	G	A	G
rs31606152	Chr7: 46652963	112384 bp upstream	RFLP	<i>Sna</i> BI	T	C	T
rs3152743	Chr7: 46842616	302037 bp upstream	RFLP	<i>Nhe</i> I	G	A	G
rs6339463	Chr7: 47038717	498138 bp upstream	RFLP	<i>Sac</i> I	G	A	G

Zusammenfassend hat die Analyse des genetischen Hintergrundes auf der Grundlage der verschiedenen Variationstypen gezeigt, dass *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere der elften Rückkreuzung bis 6 kb downstream und 308 kb upstream von *Tph1* auf Chromosom 7 den C57BL/6J-Haplotyp aufweisen.

Dazwischen befindet sich ein Bereich, der den Haplotyp von 129/SvEvBrd aufweist, wie die Analyse des RFLP rs31048330 zeigt (Tabelle 7).

Dieser Bereich auf Chromosom 7 beinhaltet *upstream* von *Tph1* die Gene *Kcnc1* und *Sergef*, die für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal bzw. einen GTP-Austauschfaktor kodieren, und *downstream* von *Tph1* das *Saa*-Gencluster und die Gene *Hps5* und *Gtf2h1* (Abb. 25) [452,453]. Die Serumamyloid A (*Saa*)-Gene kodieren allesamt für Apolipoproteine, wobei das Cluster mit *Saal1* ein Gen enthält, das lange als Pseudogen galt, jedoch an der Entwicklung einer Synovitis beteiligt zu sein scheint [454,455]. Bei den anderen beiden Genen handelt es sich um ein Integrin-bindendes Protein, das an der Bildung von Lysosomen beteiligt ist, und um eine Komponente des TFIID-Komplexes, der für die basale Transkription benötigt wird [456,457].



**Abbildung 25: Gene in der Umgebung von *Tph1*, die auf den genetischen Hintergrund des Mausstammes 129/SvEvBrd zurückzuführen sind, korrelieren nicht mit einer erhöhten Ethanolaufnahme.** K119 *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere besitzen einen gemischten genetischen Hintergrund aus den Stämmen C57BL/6J und 129/SvEvBrd. Chromosom 7 (Chr 7) der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die über elf Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6J rückgekreuzt worden waren, zeigt die genetischen Variationen des Stammes C57BL/6J, womit dieser genetische Hintergrund auf 0,3 Megabasenpaare (Mb) *downstream* und 6 kb *upstream* von *Tph1* einzugen ist. Der dazwischen liegende Teil geht zumindest zum Teil auf den genetischen Hintergrund des Stammes 129/SvEvBrd zurück.

### 1.8 Kurzzeitiger Konsum von Ethanol führt bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu keinem signifikant verstärkten Leberschaden

Im Anschluss an die präkonditionierten Untersuchungen mit Ethanol und 5-HTP (Absch. III.1.5) wurde einem Teil der Tiere Blut entnommen und das Blutplasma durch ein veterinärmedizinisches Labor auf unterschiedliche serologisch-klinische Parameter untersucht. Dabei zeigte sich, dass *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere, die 5-HTP bekamen, signifikant mehr Harnstoff und weniger Cholesterin gegenüber unbehandelten *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren im Blut hatten (Tabelle 8). Zusätzlich zeigte sich tendenziell eine Abnahme des Gesamtproteins. *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die 5-HTP bekamen, wiesen signifikant weniger

Gesamtprotein gegenüber unbehandelten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren auf. Tendenziell war hier der Glukosewert erhöht und tendenziell der Wert des Cholesterins und der Triglyceride erniedrigt.

**Tabelle 8: Blutserumparameter von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nach 10-wöchigem Ethanolkonsum.** ALT (GPT): Alanin-Aminotransferase (früher: Glutamat-Pyruvat-Transaminase), AST (GOT): Aspartat-Aminotransferase (früher: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), ALP: Alkalische Phosphatase, GLDH : Glutamatdehydrogenase. \*p < 0,05, jeweiliger Genotyp vs. Genotyp + 5-HTP, #p < 0,05, *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup> bzw. *Tph1*<sup>+/+</sup> + 5-HTP vs. *Tph1*<sup>-/-</sup> + 5-HTP ; fünf biologische Replikate pro Genotyp und Genotyp + 5-HTP.

Klinischer Parameter (Einheit)	<i>Tph1</i> <sup>+/+</sup>	<i>Tph1</i> <sup>+/+</sup> + 5-HTP	<i>Tph1</i> <sup>-/-</sup>	<i>Tph1</i> <sup>-/-</sup> + 5-HTP
Harnstoff-N (mg/dL)	19,9±1,94	24,4±2,46*	25,0±5,17	23,4±2,49
Kreatinin (mg/dL)	0,08±0,03	0,10±0,00	0,08±0,03	0,08±0,03
Gesamtprotein (g/dL)	3,60±0,10	3,42±0,10	4,08±0,14 <sup>#</sup>	3,72±0,10 <sup>*#</sup>
Serumalbumin (g/dL)	2,20±0,07	2,18±0,07	2,59±0,22 <sup>#</sup>	2,38±0,14
Bilirubin (mg/dL)	0,17±0,01	0,20±0,04	0,17±0,02	0,17±0,01
ALT (GPT) (U/L)	21,9±2,25	21,2±3,15	29,1±7,27	22,8±6,39
AST (GOT) (U/L)	46,7±3,53	53,0±8,77	69,8±12,6 <sup>#</sup>	57,8±9,10
ALP (U/L)	87,0±12,3	114±51,0	168±87,4	116±30,1
GLDH (U/L)	6,95±2,62	12,8±9,21	8,29±2,99	6,02±1,77
Gallensäuren (µmol/L)	2,75±0,67	3,00±0,84	3,55±1,32	3,02±1,46
α-Amylase (U/L)	2147±308	2094±165	2390±365	2045±414
Lipase (U/L)	13,8±0,83	14,4±1,28	15,2±1,44	14,4±1,28
Glukose (mg/dL)	156±20,0	147±25,8	171,7±31,2	244±48,6 <sup>#</sup>
Cholesterin (mg/dL)	64,7±2,56	56,2±4,64*	55,2±7,36	41,4±10,5
Triglyceride (mg/dL)	39,7±7,33	37,0±1,60	56,75±7,10 <sup>#</sup>	40,2±9,76

Ein Vergleich der beiden Genotypen miteinander ist nur bedingt gerechtfertigt, da *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere während der Versuchszeit signifikant mehr Ethanol zu sich nahmen. Jedoch zeigte sich ohne die Gabe von 5-HTP eine signifikante Zunahme der Werte für Gesamtprotein, Serumalbumin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Triglyceride, während tendenziell die Menge an Harnstoff, Alanin-Aminotransferase (ALT) und alkalischer Phosphatase (ALP) erhöht und die des Cholesterins erniedrigt war. Mit Zugabe von 5-HTP zeigte sich zwischen den Genotypen eine signifikante Erhöhung der Gesamtprotein- und der Glukosekonzentration. Tendenziell war hier das Serumalbumin bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren erhöht und die Glutamatdehydrogenase (GLDH) und das Cholesterin

erniedrigt. Die Blutwerte, die eine Aussage über den Zustand der Leber zulassen, sind zum einen Serumalbumin- und Bilirubin, welche die Funktionalität der Leber widerspiegeln und zum anderen die Werte für ALT, AST, GLDH und ALP, deren Erhöhung auf Leberschäden hinweisen [1,458,459].

Eine Erhöhung der Cholesterinblutwerte deutet auf eine Nieren- oder auch chronische Lebererkrankung hin, während eine Verringerung eine Leberinsuffizienz- oder -zirrhose bedeuten kann. Triglyceridwerte steigen bei Leberschäden, aber auch bei gesunden Individuen nach Alkoholkonsum deutlich an. Die Menge an Gamma-Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), deren Anstieg mit einem leichten Leberschäden verbunden ist, wurde bei allen untersuchten Kollektiven mit kleiner als 1 U/L angegeben und konnte daher nicht weiter ausgewertet werden. Die Arbeit von Paulmann *et al.* erlaubt einen Vergleich der leberrelevanten Werte beider Genotypen mit den Werten nach der hier durchgeführten Gabe von Ethanol. Ohne Zugang zu Ethanol zeigten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere bereits signifikant erhöhte Werte von Gesamtprotein, Serumalbumin, ALT, AST und GLDH gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren [448]. Es zeigte sich weiterhin, dass der Ethanolkonsum der Tiere keinen Einfluss auf die Gesamteiweiß-, Serumalbumin-, Billirubin-, ALT, GLDH- und Cholesterinwerte beider Genotypen hat. Die AST- und ALP-Werte der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere waren nach Ethanolaufnahme tendenziell erhöht, während die Konzentration an Triglyceriden in beiden Genotypen signifikant verringert wurde.

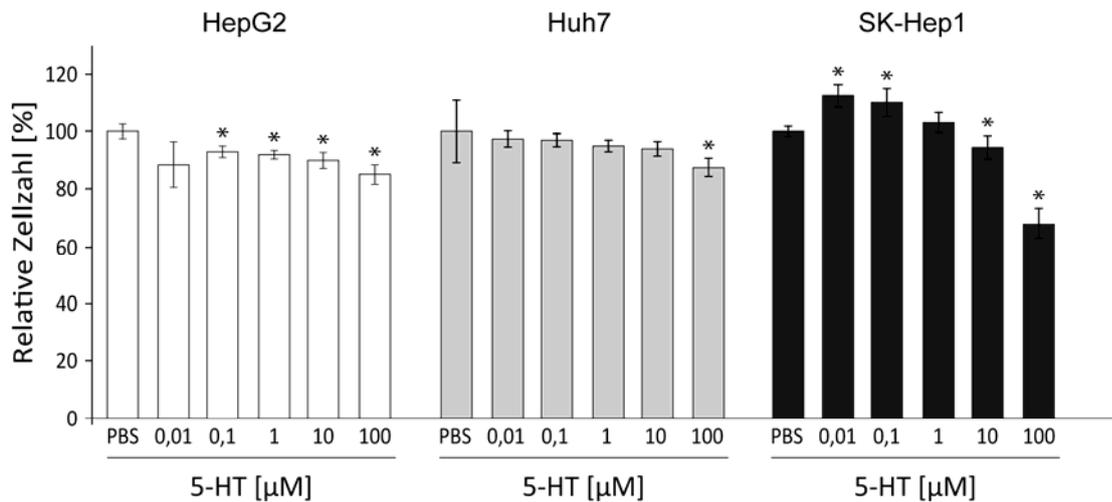
## 1.9 Der Einfluss von Monoaminen auf die Proliferation von Leberzelllinien

### 1.9.1 Serotonin hat eine widersprüchliche Wirkung auf die Proliferation verschiedener hepatischer Zelllinien

Da bekannt ist, dass peripheres Serotonin *in vivo* die Kapazität der Leber zur Regeneration fördert [19], sollte der Einfluss verschiedener biogener Monoamine auf die Proliferation unterschiedlicher sekundärer, hepatischer Zelllinien untersucht werden. Im Vorfeld wurde mittels der für Indole charakteristischen Fluoreszenz in HPLC-Messungen bestimmt, ob HepG2-Zellen, die exemplarisch für eine sekundäre Hepatocytzelllinie stehen, in der Lage sind 5-HT aufzunehmen. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme von 5-HT, die unabhängig vom SERT ist, da der spezifische SERT-Inhibitor Fluoxetin keine Wirkung auf die Aufnahme zeigte [460,461].

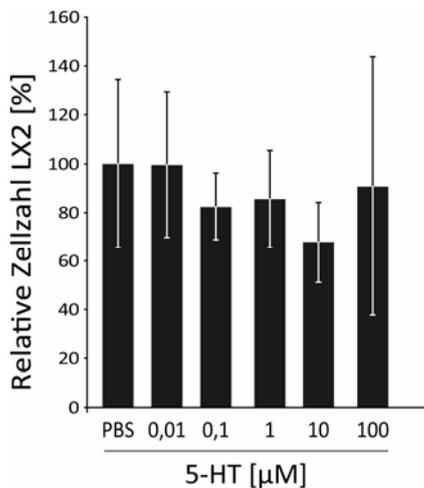
Zur Untersuchung der Proliferationsrate wurden die Zellen unterschiedlicher Hepatocytzelllinien in definierter Zahl auf 96-Kavitäten-Platten aufgebracht und in Mangelmedium mit dialysiertem FBS für 48 h mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen behandelt. Die relative Zellzahl wurde indirekt über die mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt, indem der membrangängige, lösliche Farbstoff XTT in das Medium gegeben wurde, der dann durch die Succinat-Dehydrogenase der mitochondrialen Atmungskette umgesetzt wird und photometrisch quanti-

fiziert werden kann. Die Inkubation der HepG2-Zellen führte hierbei zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation um 8-15 % mit allen zugesetzten 5-HT-Konzentrationen außer der Geringsten von 0,01  $\mu\text{M}$  (Abb. 26). Bei Huh7-Zellen hatte 5-HT keinen Einfluss auf die Proliferation, mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , die zu einer signifikanten Abnahme von 15 % führte. Die SK-Hep1-Zellen zeigten mit 0,01 und 0,1  $\mu\text{M}$  5-HT eine verstärkte Proliferation von bis zu 15 %, während 10 und 100  $\mu\text{M}$  zu einer Abnahme von 10 % und 35 % führten.



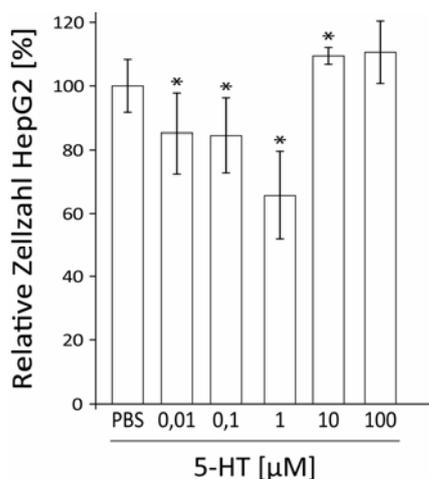
**Abbildung 26: Serotonin führt bei verschiedenen Hepatocytzelllinien zu einem widersprüchlichen Effekt auf die Proliferation.** Die Zellen wurden für eine Woche in 5-HT-defizienten Medium kultiviert. Im Anschluss wurden 3000 Zellen/Kavität in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS kultiviert und für 48 h mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen behandelt. Danach wurde das XTT-Farbreakanz zu dem Medium gegeben und die Höhe der Absorption des entstandenen Farbstoffes nach weiteren 90 min photometrisch bestimmt. HepG2-Zellen zeigten mit allen angewendeten 5-HT-Konzentrationen eine verminderte Proliferation. Huh7-Zellen zeigten bei 100  $\mu\text{M}$  5-HT eine verminderte Proliferation, die anderen Konzentrationen zeigten keinen Einfluss, SK-Hep1-Zellen proliferierten mit 0,01 und 0,1  $\mu\text{M}$  5-HT stärker und mit 10 und 100  $\mu\text{M}$  schwächer als der Kontrollansatz mit PBS. \* $p < 0,05$ , 5-HT vs. PBS, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Sechsfachbestimmung durchgeführt wurden.

Um zu vergleichen, ob es einen Unterschied in der Proliferation von Hepatocytten und einem anderen Zelltyp der Leber, den hepatischen Sternzellen, gibt, wurde die Zelllinie LX2 analog zu den Hepatocytzelllinien behandelt und vermessen. Da LX2-Zellen im Gegensatz zu LX1-Zellen über ein Kulturmedium mit 2 % (v/v) FBS definiert sind [462], wurde bei diesem Versuch diese Konzentration des dialysierten FBS beibehalten. Die Zugabe aller Konzentrationen an 5-HT zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen. 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  5-HT verringerten tendenziell die Proliferation der LX2-Zellen (Abb. 27).



**Abbildung 27: Serotonin hat auf die Proliferation der hepatischen Sternzelllinie LX2 keinen signifikanten Effekt.** Die Zellen wurden für eine Woche in 5-HT-defizientem Medium kultiviert. Im Anschluss wurden 3000 Zellen/Kavität in Kulturmedium mit 2 % (v/v) dialysiertem FBS kultiviert und für 48 h mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen behandelt. Danach wurde das XTT-Farbreagenz zu dem Medium gegeben und die Höhle der Absorption des entstandenen Farbstoffes nach weiteren 90 min photometrisch bestimmt. LX2-Zellen zeigten eine tendenzielle Verminderung der Proliferation bei einer 5-HT-Konzentration von 0,1-10 µM, jedoch keine signifikante Veränderung der Proliferationsrate. Die anderen beiden Konzentrationen zeigten keinen Einfluss. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Sechsfachbestimmung durchgeführt wurden.

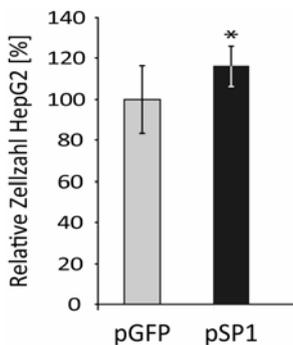
Um zu überprüfen, ob die ermittelten relativen Zellzahlen nicht auf metabolische Prozesse durch den Einfluss des 5-HT und damit einer Veränderung der mitochondrialen Aktivität zurückzuführen sind, wurde die Proliferationsrate zusätzlich mittels des DNA-Gehalts der Zellen bestimmt. Dafür wurde ein kommerzieller Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der konzentrationsabhängig in die DNA interkaliert, wodurch diese mittels eines Fluoreszenz-Mikroplattenlesers quantifiziert werden kann. Dafür wurden die Zellen in definierter Zahl auf 96-Kavitäten-Platten aufgebracht und in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS für 48 h mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen behandelt. Daraufhin wurde das Medium durch den Fluoreszenzfarbstoff ersetzt und nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C vermessen. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der Proliferation um 15 % nach Behandlung mit 0,01 und 0,1 µM 5-HT, eine Verminderung um 35 % mit 1 µM 5-HT und eine signifikante Proliferationssteigerung von 10 % mit 10 mM 5-HT (Abb. 28). 100 mM 5-HT bewirkte eine tendenzielle Steigerung der Proliferation um ebenfalls 10 %.



**Abbildung 28: Serotonin hat konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die Proliferation der Hepatocytenzelllinie HepG2, die anhand des DNA-Gehalts ermittelt wurde.** Die Zellen wurden für eine Woche in 5-HT-defizientem Medium kultiviert. Danach wurden 3000 Zellen/Kavität in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS kultiviert und für 48 h mit verschiedenen 5-HT-Konzentrationen behandelt. Das Medium wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff ersetzt und die Zellen nach einer Inkubationszeit von 45 min gewaschen und mittels eines Fluoreszenz-Mikroplattenlesers vermessen. HepG2-Zellen zeigten eine signifikante Verminderung der Proliferation bei einer 5-HT-Konzentration von 0,01-10 µM und eine signifikante Erhöhung mit 10 µM 5-HT. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden, \*p < 0,05, 5-HT vs. PBS.

### 1.9.2 SP1 hat eine proliferationssteigernde Wirkung auf die Hepatocytzelllinie HepG2

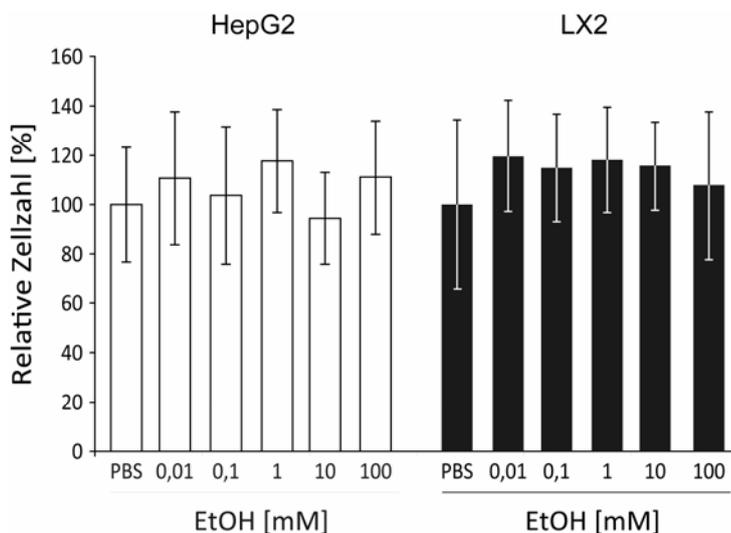
Um den Effekt des TF SP1 auf die Proliferation von Hepatocyt zu untersuchen, wurde die Zelllinie HepG2 transient mit einem *SP1*-enthaltenden Plasmid transfiziert und die Menge der Zellen analog zu Absch. III.1.9.1 mittels eines XTT-Experiments bestimmt. Die Überexpression von SP1 führte nach zwei Tagen in Kultur zu einer um 16 % erhöhten Proliferation der Zellen gegenüber des Kontrollansatzes mit einem *GFP*-enthaltenden Plasmid (Abb. 29). Die Zellen wurden in Medium mit einem Anteil von 10 % FBS kultiviert. Der gebildete XTT-Farbstoff wurde nach einer Umsetzungszeit von 90 min photometrisch quantifiziert.



**Abbildung 29: Die Überexpression von SP1 führt zu einer erhöhten Proliferation von HepG2-Zellen.** Die Hepatocytzelllinie HepG2 wurde im üblichen Kulturmedium transient mit eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert, die zum einen für das fluoreszierende Protein GFP (pGFP) und zum anderen für den TF SP1 (pSP1) kodierten. Dafür wurden 5000 Zellen pro Kavität eingesät, transfiziert und nach 48 h das XTT-Reagenz zugegeben. Nach weiteren 90 min wurde der durch die Zellen gebildete Farbstoff photometrisch quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Wiederholungen, welche jeweils als Achtfachbestimmung durchgeführt wurden, \*  $p < 0,05$ , GFP vs. SP1.

### 1.9.3 Ethanol zeigt kurzfristig keinen Einfluss auf die Proliferation von Leberzelllinien

Um den Einfluss von Ethanol auf die Proliferation von Leberzellen zu untersuchen, wurden wiederum die parenchymale Zelllinie HepG2 und die nicht-parenchymale Sternzelllinie LX2 verwendet, die unterschiedliche Leberzelltypen repräsentieren.

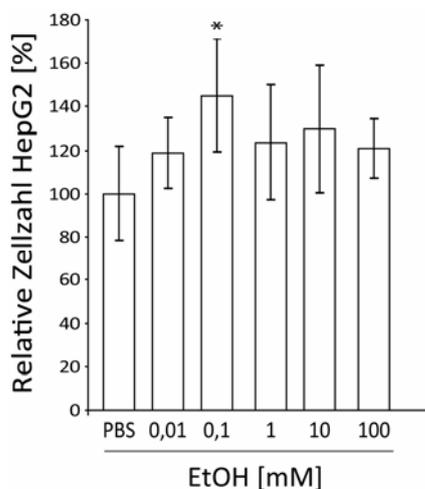


**Abbildung 30: Ethanol hat auf die Proliferation der Leberzelllinien HepG2 und LX2 keinen signifikanten Einfluss.** Die Zellen wurden für eine Woche in 5-HT-defizientem Medium kultiviert. Dann wurden 3000 Zellen/Kavität in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) (HepG2) oder in Kulturmedium mit 2 % (v/v) dialysiertem FBS (LX2) kultiviert und für 48 h mit verschiedenen EtOH-Konzentrationen behandelt. Danach wurde das XTT-Farbreakenz zu dem Medium gegeben und die relative Zellzahl über die Höhe der Absorption des entstandenen Farbstoffes nach weiteren 90 min photometrisch bestimmt. Weder

HepG2- noch LX2-Zellen zeigten eine signifikante Veränderung der Proliferation. In beiden Fällen gab es mit den meisten Konzentrationen eine tendenzielle Erhöhung der Proliferation. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Sechsfachbestimmung durchgeführt wurden.

Zuerst wurde die relative Zellzahl über die mitochondriale Aktivität mittels des XTT-Farbreagens bestimmt. Die Parameter entsprachen dabei den oben beschriebenen (Absch. III.1.9.1). Hierbei zeigte sich kein eindeutiger oder signifikanter Einfluss der verschiedenen Ethanolkonzentrationen auf die Proliferationsrate der Zellen (Abb. 30). Die HepG2-Zellen zeigten konzentrationsabhängig eine tendenzielle Steigerung von bis zu 15 % bei 0,01, 1 und 100  $\mu\text{M}$  Ethanol und keinen Einfluss bei 0,1 und 10  $\mu\text{M}$  Ethanol. Bei LX2-Zellen hatte Ethanol in allen angewendeten Konzentrationen eine tendenzielle Steigerung von maximal 20 % zur Folge.

Im Anschluss wurde der Einfluss des Ethanol auf die Proliferation von HepG2-Zellen mittels einer weiteren Methode verifiziert, die den DNA-Gehalt über die Interkalation eines Fluoreszenzfarbstoffes quantifiziert, wodurch eine relative Zellzahl ermittelt werden kann (Absch. III.1.8.1). Das Experiment wurde analog zu der Behandlung mit 5-HT durchgeführt. Im Gegensatz zur Bestimmung der Zellzahl über die mitochondriale Aktivität zeigte sich anhand des DNA-Gehalts eine signifikante Proliferationssteigerung von 45 % bei der Behandlung mit 0,1  $\mu\text{M}$  Ethanol und eine tendenzielle Erhöhung der Proliferation nach Inkubation mit den anderen Ethanolkonzentrationen (Abb. 31).

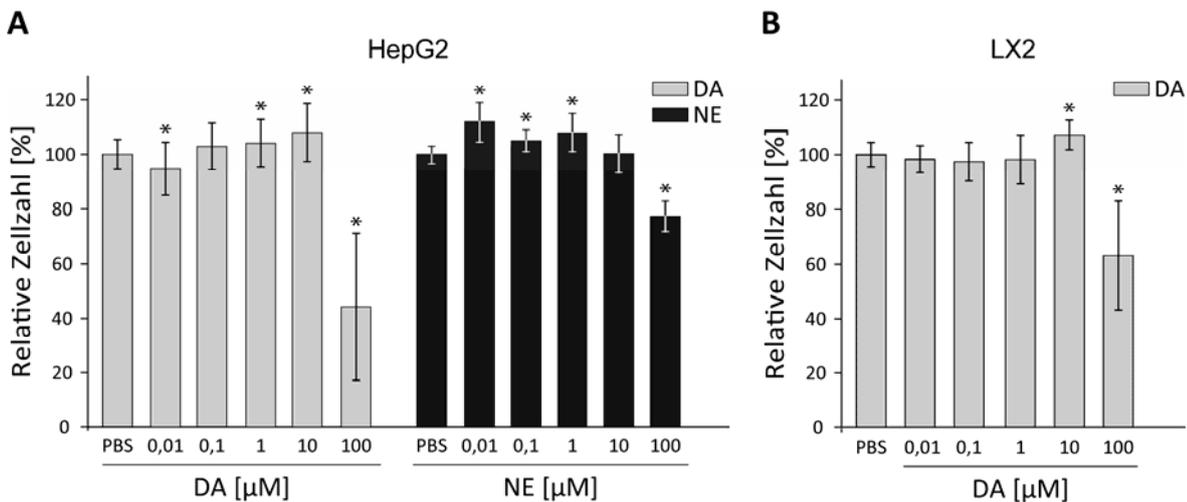


**Abbildung 31: Ethanol hat ermittelt über den DNA-Gehalt der Zellen eine proliferationssteigernde Wirkung auf die Hepatocytenzelllinie HepG2.** Die Zellen wurden für eine Woche in 5-HT-defizientem Medium kultiviert. Daraufhin wurden 3000 Zellen/Kavität in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS kultiviert und für 48 h mit verschiedenen EtOH-Konzentrationen behandelt. Im Anschluss wurde das Medium durch den Fluoreszenzfarbstoff ersetzt und die Zellen nach einer Inkubationszeit von 45 min gewaschen und mittels eines Fluoreszenz-Mikroplattenlesers vermessen. HepG2-Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Proliferation bei einer EtOH-Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  und eine tendenzielle Erhöhung bei 0,01 und 1-100  $\mu\text{M}$  EtOH. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden, \* $p < 0,05$ , 5-HT vs. PBS.

#### 1.9.4 Dopamin zeigt konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die Proliferation von Leberzelllinien

Da die Behandlung mit 5-HT keinen einheitlichen Einfluss auf das Wachstum verschiedener sekundärer Leberzelllinien erkennen ließ, wurden zwei der Zelllinien exemplarisch mit den biogenen Monoaminen DA und NE behandelt. Dazu wurden definierte Zellzahlen der Zelllinien HepG2 und LX2 auf 96-Kavitäten-Platten aufgebracht und in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS oder LX2-spezifischen Kulturmedium mit 2 % (v/v) dialysiertem FBS für 48 h mit verschiedenen DA- und NE-Konzentrationen behandelt. Die relative Zellzahl wurde indirekt über die mitochondriale Aktivität der Zellen bestimmt (Absch. III.1.9.1). Die Inkubation der HepG2-Zellen führte bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DA zu einer erhöhten Proliferation von 5-10 % gegenüber der

Kontrolle, 0,01  $\mu\text{M}$  senkte die Proliferationsrate um 5 %, während 100  $\mu\text{M}$  DA zu einer Verminderung von 55 % führte (Abb. 32). NE hatte bei einer Konzentration von 0,01 bis 1  $\mu\text{M}$  eine proliferationssteigernde Wirkung von 5-10 % auf die Hepatocyten, während 100  $\mu\text{M}$  NE die Proliferation um 25 % senkte und 10  $\mu\text{M}$  keinen Effekt zeigte. Bei LX2-Zellen zeigten nur 10  $\mu\text{M}$  DA einen proliferationssteigernden Effekt von 10 %, während 100  $\mu\text{M}$  DA die Proliferation der Zellen um 40 % senkte und 0,01 bis 1  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Proliferation hatten.



**Abbildung 32: Dopamin und Norepinephrin haben konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die Proliferation verschiedener Leberzelllinien.** Die Zellen wurden für eine Woche in Monoamindefizientem Medium kultiviert. Im Anschluss wurden 3000 Zellen/Kavität in Mangelmedium mit 0,5 % (v/v) dialysiertem FBS für 48 h mit verschiedenen DA- und NE-Konzentrationen behandelt. Danach wurde das XTT-Farbreakanz zu dem Medium gegeben und die Höhe der Absorption des entstandenen Farbstoffes nach weiteren 90 min photometrisch bestimmt. HepG2-Zellen zeigten bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  DA eine erhöhte Proliferation, 0,01  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  DA senkten die Proliferationsrate. NE hatte bei einer Konzentration von 0,01 bis 1  $\mu\text{M}$  eine proliferationssteigernde Wirkung, während 100  $\mu\text{M}$  NE die Proliferation senkte. Bei LX2-Zellen zeigte nur 10  $\mu\text{M}$  DA einen proliferationssteigernden Effekt, während 100  $\mu\text{M}$  DA die Proliferation der Zellen minderte. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen, die jeweils als Sechsfachbestimmung durchgeführt wurden, \* $p < 0,05$ , 5-HT vs. PBS.

## 2 Der molekulare Hintergrund der erhöhten Ethanolaufnahme und der gestörten Leberregeneration der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere

### 2.1 Die periphere Serotonindefizienz führt in der Leber zur Deregulation unterschiedlichster Gene

#### 2.1.1 Die Hochdurchsatz-Sequenzierung des Lebertranskriptom legt die differentielle Expression vielfältiger Gene zwischen *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren offen

Um die molekulare Ursache für die gestörte Leberregeneration und die erhöhte freiwillige Ethanolaufnahme durch *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere (Absch. III.1.2) aufklären zu können [19], sollte das vollständige Lebertranskriptom von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren mittels Hochdurchsatz-Sequenzierung bestimmt werden. Dafür wurden jeweils neun Mäusen pro Genotyp die Lebern

entnommen, die mRNA isoliert und von jedem Genotyp drei cDNA-Pools à drei Individuen mittels SOLiD 4-Sequenzierung analysiert. Von den Genen, die leberrelevante Blutwerte widerspiegeln, ist die Expression von *Glud1* signifikant und von *Alb* tendenziell erhöht (Tabelle 9 I). Es gibt eine Fehlregulation einiger Gene, die mit einem Leberschaden (*Ctgf*, *Epcam*) oder -karzinom assoziiert werden (Tabelle 9 II) und in diesem Zusammenhang z.B. auf apoptotische Vorgänge (*Casp3/8*) oder eine gesteigerte Angiogenese (*Pdgfc*, *Vegfb*) hinweisen (Absch. IV.2.1). Des Weiteren weist die Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere eine gestörte Expression zahlreiche Proliferations-assoziiierter Gene auf (Tabelle 9 III), die z.B. proliferationsfördernde Cycline und Cytokinrezeptoren, wie *Ccnh* und *Tgfbr2*, aber auch Zellzyklusinhibitoren wie *Cdkn1a* und *Bcl2l1* miteinschließen.

Von den Genen, die mit dem Katabolismus von Alkoholen assoziiert sind, sind *Aldh3a2*, *Aldh2* und *Adh6-ps1* signifikant erhöht (Tabelle 9 IV), wobei Aldh2 das Hauptenzym des zweiten Schritts im Abbau von Ethanol ist [15]. Die Enzyme Adh1 und Cyp2e1, die ebenfalls am Ethanolkatabolismus beteiligt sind, sind unverändert (Anhang B, Tabelle 11). Ebenfalls unverändert ist die Expression der Gene des 5-HT-Metabolismus *Maoa*, *Maob* und *Ddc* (Tabelle 9 V). Des Weiteren gibt es eine veränderte Expression verschiedener Fettsäuretransportergene und eine tendenzielle Erhöhung eines OCT (Tabelle 9 VII). Von den Genen, die im Zusammenhang mit einer Monoaminylierung und damit der transkriptionellen Fehlregulation stehen könnten (Absch. I.2.4, I.2.5 und I.3.3) sind *Tgm1* und *Tgm2* hochreguliert (Tabelle 9 VI) und *Pqbp1* ist unverändert (Tabelle 9 VIII). Außerdem zeigt sich bei den Genen, die niedrig exprimiert sind, eine Verringerung von *5Htr5b* und *2c*, eine tendenzielle Erhöhung von *Tgm7* und eine Verringerung von *Sert* (*Slc6a4*) (Tabelle 9 IX).

**Tabelle 9: Die Expression ausgewählter Gene in der Leber von *Tph1*<sup>+/-</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren.** Dargestellt sind die Identifikationsnummer (ID) der Ensemble-Datenbank, der Protein- und Genname des jeweils exprimierten Gens. Weiterhin ersichtlich ist der *FoldChange*, der im Falle eines negativen Wertes angibt, dass die Expression des jeweiligen Gens in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tieren erhöht ist. Umgekehrt ist im Falle eines positiven Wertes die Expression des jeweiligen Gens in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tieren erniedrigt. Ein Signifikanzwert (p-Wert) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant und von  $0,09 > p \geq 0,05$  als statistischer Trend befunden. Die relative Genexpression der einzelnen Proben kann Anhang B, Tabelle 11 entnommen werden. Die fett dargestellten Gene kodieren für TF. Die grau hinterlegten Zeilen weisen auf Gene, die unter der transkriptionellen Kontrolle von SP1 stehen. Die Gene wurden nach ihrer Funktion in Klassen eingeteilt und aufsteigend nach dem p-Wert sortiert.

Ensemble ID	Proteinname	Genname	FoldChange	p-Wert
<b>I Gene, die leberrelevante Blutwerte widerspiegeln</b>				
ENSMUSG0000021794	glutamate dehydrogenase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95753]	<i>Glud1</i>	-0,321	0,049
ENSMUSG0000029368	albumin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87991]	<i>Alb</i>	0,286	0,074

**II Gene, die mit einem Leberschaden bzw. -karzinom assoziiert sind**

ENSMUSG00 000029231	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97530]	<i>Pdgfra</i>	-0,598	< 0,001
ENSMUSG00 000028019	platelet-derived growth factor, C polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859631]	<i>Pdgfc</i>	-0,573	0,003
ENSMUSG00 000024962	vascular endothelial growth factor B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106199]	<i>Vegfb</i>	-0,431	0,011
ENSMUSG00 000019997	connective tissue growth factor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95537]	<i>Ctgf</i>	-0,874	0,024
ENSMUSG00 000045394	epithelial cell adhesion molecule [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106653]	<i>Epcam</i>	-0,780	0,027
ENSMUSG00 000026029	caspase 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1261423]	<i>Casp8</i>	-0,472	0,066
ENSMUSG00 000031628	caspase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107739]	<i>Casp3</i>	-0,354	0,067
ENSMUSG00 000031480	thrombospondin, type I, domain 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929096]	<i>Thsd1</i>	-0,525	0,071
ENSMUSG00 000000791	interleukin 12 receptor, beta 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104579]	<i>Il12rb1</i>	-0,459	0,083
<b>III Gene, die mit der Leberproliferation bzw. -regeneration assoziiert sind</b>				
ENSMUSG00 000021548	cyclin H [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913921]	<i>Ccnh</i>	-0,325	0,006
ENSMUSG00 000032440	transforming growth factor, beta receptor II [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98729]	<i>Tgfbr2</i>	-1,100	0,007
ENSMUSG00 000030796	TEA domain family member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104904]	<b><i>Tead2</i></b>	-0,529	0,007
ENSMUSG00 000030782	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102784]	<i>Tgfb1i1</i>	0,374	0,009
ENSMUSG00 000035493	transforming growth factor, beta induced [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99959]	<i>Tgfbi</i>	-0,753	0,009
ENSMUSG00 000020053	insulin-like growth factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96432]	<i>Igf1</i>	0,197	0,010
ENSMUSG00 000023067	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104556]	<i>Cdkn1a</i>	-1,693	0,038
ENSMUSG00 000007659	BCL2-like 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88139]	<i>Bcl2l1</i>	-0,431	0,043
ENSMUSG00 000002068	cyclin E1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88316]	<i>Ccne1</i>	-0,351	0,061
ENSMUSG00 000021936	mitogen-activated protein kinase 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346861]	<i>Mapk8</i>	-0,251	0,070
ENSMUSG00 000001034	mitogen-activated protein kinase 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346347]	<i>Mapk7</i>	-0,745	0,071
ENSMUSG00 000057329	B-cell leukemia/lymphoma 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88138]	<i>Bcl2</i>	-0,725	0,073
ENSMUSG00 000028864	hepatocyte growth factor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96079]	<i>Hgf</i>	-0,452	0,079

ENSMUSG00 000042688	mitogen-activated protein kinase 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1354946]	<i>Mapk6</i>	-0,431	0,081
ENSMUSG00 000063065	mitogen-activated protein kinase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346859]	<i>Mapk3</i>	-0,270	0,083
ENSMUSG00 000024558	mitogen-activated protein kinase 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444559]	<i>Mapk4</i>	-0,742	0,084
ENSMUSG00 000022610	mitogen-activated protein kinase 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353438]	<i>Mapk12</i>	-0,207	0,084
ENSMUSG00 000007613	transforming growth factor, beta receptor I [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98728]	<i>Tgfbr1</i>	-0,377	0,084
ENSMUSG00 000020326	cyclin G1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102890]	<i>Ccng1</i>	-0,512	0,086
ENSMUSG00 000035476	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913974]	<i>Tab3</i>	-0,379	0,086
ENSMUSG00 000024286	cyclin Y [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915224]	<i>Ccny</i>	-0,210	0,090
ENSMUSG00 000002603	transforming growth factor, beta 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98725]	<i>Tgfb1</i>	-0,630	0,098
ENSMUSG00 000001280	trans-acting transcription factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98372]	<i>Sp1</i>	-0,289	0,134
<b>IV Gene, die mit dem Alkoholmetabolismus assoziiert sind</b>				
ENSMUSG00 000020248	nuclear transcription factor-Y beta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97317]	<i>Nfyb</i>	-0,356	< 0,001
ENSMUSG00 000010025	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353452]	<i>Aldh3a2</i>	-0,720	0,011
ENSMUSG00 000029455	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99600]	<i>Aldh2</i>	-0,558	0,011
ENSMUSG00 000090306	alcohol dehydrogenase 6 (class V), pseudogene 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918999]	<i>Adh6-ps1</i>	-1,299	0,044
ENSMUSG00 000024885	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914939]	<i>Aldh3b1</i>	-1,243	0,061
ENSMUSG00 000021238	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915077]	<i>Aldh6a1</i>	-0,263	0,075
ENSMUSG00 000024431	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95824]	<i>Nr3c1</i>	-0,343	0,075
<b>V Gene, die mit dem 5-HT-Metabolismus assoziiert sind</b>				
ENSMUSG00 000025037	monoamine oxidase A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96915]	<i>Maoa</i>	-0,334	0,392
ENSMUSG00 000020182	dopa decarboxylase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:94876]	<i>Ddc</i>	0,031	0,897
ENSMUSG00 000040147	monoamine oxidase B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96916]	<i>Maob</i>	-0,012	0,954
<b>VI Transglutaminasen</b>				
ENSMUSG00 000022218	transglutaminase 1, K polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98730]	<i>Tgm1</i>	-0,465	0,011
ENSMUSG00 000037820	transglutaminase 2, C polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98731]	<i>Tgm2</i>	-0,411	0,057

**VII Fettsäure- und Monoamintransporter**

ENSMUSG00 000002944	CD36 antigen [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107899]	<i>Cd36</i>	-1,207	0,007
ENSMUSG00 000030382	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347100]	<i>Slc27a5</i>	0,385	0,031
ENSMUSG00 000023073	solute carrier family 10, member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1201406]	<i>Slc10a2</i>	1,250	0,032
ENSMUSG00 000027932	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347358]	<i>Slc27a3</i>	0,844	0,061
ENSMUSG00 000018900	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1329012]	<i>Slc22a5</i>	-0,537	0,078
ENSMUSG00 000025094	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106677]	<i>Slc18a2</i>	-0,208	0,111

**VIII Polyglutamin-bindende Proteine**

ENSMUSG00 000015846	retinoid X receptor alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98214]	<i>Rxra</i>	-0,271	0,026
ENSMUSG00 000031157	polyglutamine binding protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859638]	<i>Pqbp1</i>	-0,059	0,802

**IX Niedrig exprimierte Gene**

ENSMUSG00 000050534	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96284]	<i>Htr5b</i>	-0,567	0,020
ENSMUSG00 000041380	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96281]	<i>Htr2c</i>	-0,436	0,030
ENSMUSG00 000079103	transglutaminase 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 2151164]	<i>Tgm7</i>	0,679	0,059
ENSMUSG00 000020838	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96285]	<i>Slc6a4</i>	-0,556	0,061
ENSMUSG00 000070687	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96276]	<i>Htr1d</i>	-1,010	0,068

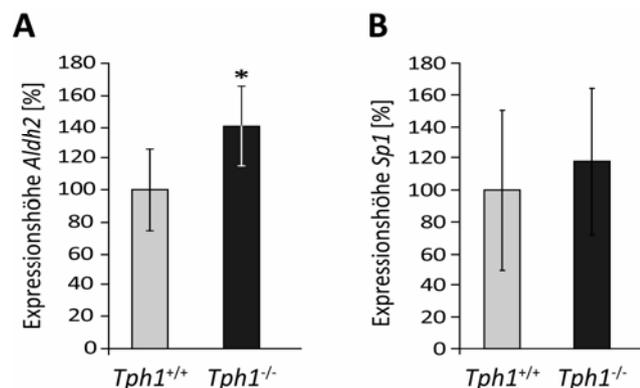
**2.1.2 Die Analyse mittels quantitativer PCR bestätigt die Expressionslevel von *Aldh2* und *Sp1* in der Leber von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Zur Bestätigung der in der Hochdurchsatz-Sequenzierung ermittelten Expressionshöhen der murinen *Aldh2* und *Sp1* wurde die aus den Lebern gewonnene cDNA beider Genotypen (Absch. III.2.1.1) mittels qPCR analysiert. Dafür wurden zuerst die Effizienzen der eingesetzten Oligonukleotide bestimmt.

Für das Referenzgen *Gapdh* lag die Effizienz bei einem Wert von 1,95 (Anhang C, Abb. 56 A). *Gapdh* wurde in diesem Kontext als Referenzgen gewählt, da sich in der Sequenzierung mit dem SOLiD 4-System kein signifikanter Unterschied in der Expression des Gens zwischen den

Genotypen ergab (Anhang B, Tabelle 11). Die Effizienzen der kommerziellen Oligonukleotidpaare für die betrachteten Zielgene *Aldh2* und *Sp1* weisen Werte von 1,92 bzw. 2,09 auf. Bei dem Oligonukleotidpaar für *Sp1* handelt es sich um Oligonukleotide für das humane Gen *SP1*, die ebenfalls ein Fragment des murinen Gens amplifizieren. Die Amplifikation des gesuchten, korrekten PCR-Fragmentes wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Streuung um die Regressionsgerade ist für die betrachteten Oligonukleotidpaare mit Werten des Determinationskoeffizienten  $R^2$  zwischen 0,991 und 0,999 sehr gering.

Der Vergleich der relativen Expression von *Aldh2* zeigte eine gesteigerte Expression in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren von 41 % gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren (Abb. 33 A). Die gesteigerte Expression von *Aldh2* in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren deckt sich mit dem Ergebnis der Hochdurchsatz-Sequenzierung, die eine um 47 % erhöhte Expression von *Aldh2* zeigte (Absch. III.2.1.1). Die relative Expression von *Sp1* war in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren tendenziell, jedoch nicht signifikant um 18 % erhöht, was sich ebenfalls mit dem Befund der tendenziellen Erhöhung um 22 % in der Sequenzierung mit dem SOLiD 4-System deckt (Abb. 33 B).

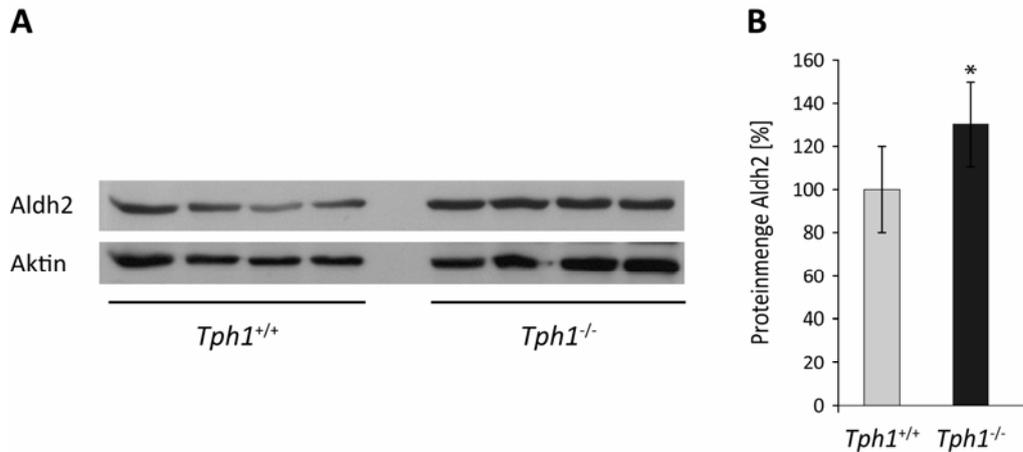


**Abbildung 33: Tryptophan-Hydroxylase 1-defiziente Tiere haben eine erhöhte Genexpression von Aldehyd-Dehydrogenase 2 in der Leber.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren wurden die Lebern entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Die RNA von neun Tieren pro Genotyp wurde zu drei Pools à jeweils drei Lebern vereint. Die daraus hergestellte cDNA wurde mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind die reziproken Werte der auf die Effizienz der Oligonukleotide bezogenen und auf die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) normierten Ct-Werte. \*p < 0,05 *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup>. Gezeigt ist der Mittelwert der relativen Expressionshöhen von drei biologischen und technischen Replikaten. (A) Die relative Expression von *Aldh2* war in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren signifikant um 41 % erhöht. (B) Die relative Expression von *Sp1* war zwischen *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nicht signifikant verändert.

### 2.1.3 Die Analyse mittels Immunoblotting bestätigt das erhöhte Level von ALDH2 in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere

Um die gesteigerte Expression von *Aldh2* in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden aus den Lebern von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren die Mitochondrien isoliert. Das Mitochondrienlysate diente zur Quantifizierung von ALDH2 mittels Immunoblotting, wobei das Strukturprotein  $\beta$ -AKTIN zur Normierung der Proteinmenge herangezogen wurde. Die Analyse zeigt eine

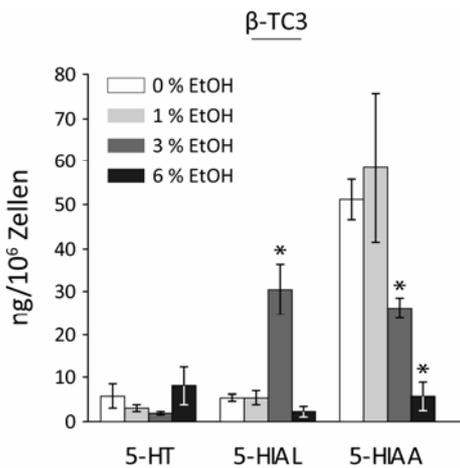
30 %ige Erhöhung von ALDH2 in den Mitochondrien der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere (Abb. 34). Diese Erhöhung auf Proteinebene bestätigt die erhöhte Expression der *Aldh2* um 47 % bzw. 41 % (Absch. III.2.1.2).



**Abbildung 34: Tryptophan-Hydroxylase 1-defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Menge an mitochondrialer Aldehyd-Dehydrogenase 2 in der Leber.** *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren wurden die Lebern entnommen und aus dem Zelllysat im Anschluss die Mitochondrien isoliert. Die lysierten Mitochondrien dienten zur Quantifizierung von ALDH2 mittels Immunoblotting. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit vier biologischen Replikaten, das als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die Menge an ALDH2 wurde auf die Menge des Strukturproteins  $\beta$ -AKTIN (Aktin) normiert. **(A)** Repräsentatives Immunoblotting-Experiment mit Signalen von ALDH2 und AKTIN. **(B)** Die relative Proteinmenge von ALDH2 war in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren um 30 % erhöht. \* $p < 0,05$  *Tph1*<sup>+/+</sup> vs. *Tph1*<sup>-/-</sup> (t-test 1;3).

## 2.2 Ethanol beeinflusst den Katabolismus von Serotonin in $\beta$ -TC3-Zellen

Der Abbau von 5-HT geschieht in einer zweistufigen Reaktion mittels der Enzyme MAO A und ALDH2 [92]. Ethanol wird hauptsächlich über die Enzyme ADH und ALDH2 abgebaut, wodurch eine metabolische Verbindung beider Katabolismen besteht (Absch. I.1.2 und I.2.1.1). Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den Ethanol- und 5-HT-Metabolismen wurden  $\beta$ -TC3-Zellen verwendet, die nicht eigenständig in der Lage sind 5-HT zu synthetisieren, jedoch 5-HT aus der extrazellulären Umgebung aufnehmen und metabolisieren können [463,464]. Eine kompetitive Hemmung der ALDH2 durch Ethanol sollte zu einem verminderten Abbau von 5-HIAL zu 5-HIAA führen, wodurch es zu einer Anreicherung von 5-HIAL in den Zellen kommen würde. Die Behandlung der  $\beta$ -TC3-Zellen mit Glukose, 5-HT und Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen führte im Fall der 3 %igen Ethanollösung zu einer Anreicherung des 5-HIAL (Abb. 35). Die 3 %ige und 6 %ige Ethanollösung führte in den Zellen jeweils zu einer verminderten Menge an 5-HIAA.



**Abbildung 35: Ethanol führt konzentrationsabhängig zu einem verminderten Abbau von 5-Hydroxyindolacetaldehyd zu 5-Hydroxyindolessigsäure.**  $10^6$   $\beta$ -TC3-Zellen wurden mit 1 g/L Glukose, 0,5 mM 5-HT und 1-6 %igen Ethanol (EtOH)-Lösungen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurde das Lysat der Zellen mittels HPLC auf die Menge an 5-HT und dessen Kataboliten 5-Hydroxyindolacetaldehyd (5-HIAL) und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) untersucht. Mit der 3 %igen EtOH-Lösung nahm das Produkt der MAO A 5-HIAL signifikant zu. Die Behandlung mit 3 %iger und 6 %iger EtOH-Lösungen führte zu einer signifikanten Abnahme von 5-HIAA, welches das Produkt der katalytischen Reaktion der ALDH2 ist. \* $p < 0,05$  jeweilige EtOH-Lösung vs. 0 % EtOH. Gezeigt ist der Mittelwert von drei biologischen und technischen Replikaten.

## 2.3 Die Behandlung mit Ethanol und Serotonin verändert die Expression SP1-abhängiger Gene in HepG2

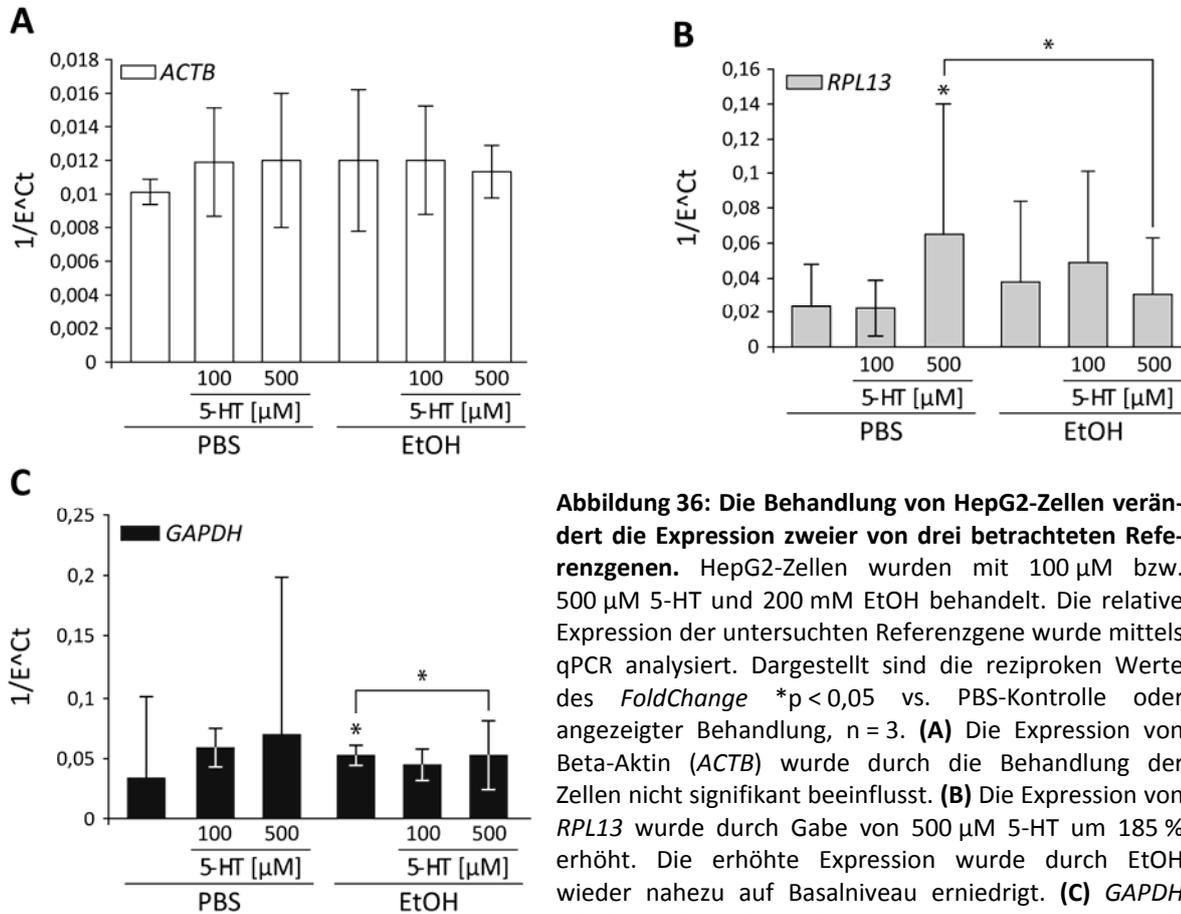
### 2.3.1 Effizienzbestimmung der genspezifischen Oligonukleotide

Zur Effizienzbestimmung der eingesetzten Oligonukleotide wurde cDNA von unbehandelten HepG2-Zellen eingesetzt. Trotz der Verwendung von kommerziellen Oligonukleotidpaaren schwankte die Effizienz der Referenzgene *ACTB*, *GAPDH* und *RPL13* zwischen Werten von 1,97 und 2,47 (Anhang C, Abb. 56 B). Die Streuung um die Regressionsgerade ist mit Werten des Determinationskoeffizienten  $R^2$  von beinahe 1 sehr gering. Die Effizienzen der kommerziellen Oligonukleotidpaaren für die betrachteten Zielgene *SP1*, *CDKN1A*, *EGFR* und *HGFR* lagen zwischen Werten von 1,99 und 2,59 (Anhang C, Abb. 57). Die Streuung um die Regressionsgerade ist mit Werten des Determinationskoeffizienten  $R^2$  zwischen 0,945 und 0,991 sehr gering.

### 2.3.2 Die Behandlung der HepG2-Zellen verändert die Expression von Referenzgenen

Zur Ermittlung eines geeigneten Referenzgenes, auf welches die Expressionsstärken der betrachteten Zielgene normiert werden konnten, wurden HepG2-Zellen über Nacht mit 100  $\mu$ M bzw. 500  $\mu$ M 5-HT und 200 mM (11,6 % (v/v)) Ethanol inkubiert. Im Anschluss wurde die GesamtrNA der unterschiedlichen Ansätze isoliert, die RNA zu cDNA transkribiert und in gleicher Konzentration in die qPCR eingesetzt. Für die Referenzgene fand ausschließlich eine Normierung mittels Effizienzen der Oligonukleotidpaare statt. Die Genexpression des Strukturproteins  $\beta$ -Aktin (*ACTB*) wurde durch die Behandlung der Zellen nicht signifikant beeinflusst (Abb. 36 A). *ACTB* eignet sich somit als Referenzgen in dieser Versuchsanordnung. Die Expression des Stoffwechsellzyms *GAPDH* erhöhte sich durch Zugabe von Ethanol in Abwesenheit von 5-HT um 35 %. Die Anwesenheit von 500  $\mu$ M 5-HT führte zu einer signifikanten Abnahme von 0,4 % (Abb. 36 B). Die Genexpression des ribosomalen Proteins L13 (*RPL13*) wurde durch Gabe von 500  $\mu$ M 5-HT um 185 % erhöht. Diese Erhöhung wurde durch Ethanol um 158 % erniedrigt und erreichte damit

wieder nahezu das Basalniveau (Abb. 36 C). Sowohl *GAPDH* als auch *RPL13* eignen sich in diesem Experiment nicht als Referenzgene, da ihre Expression durch Ethanol und 5-HT beeinflusst wird.

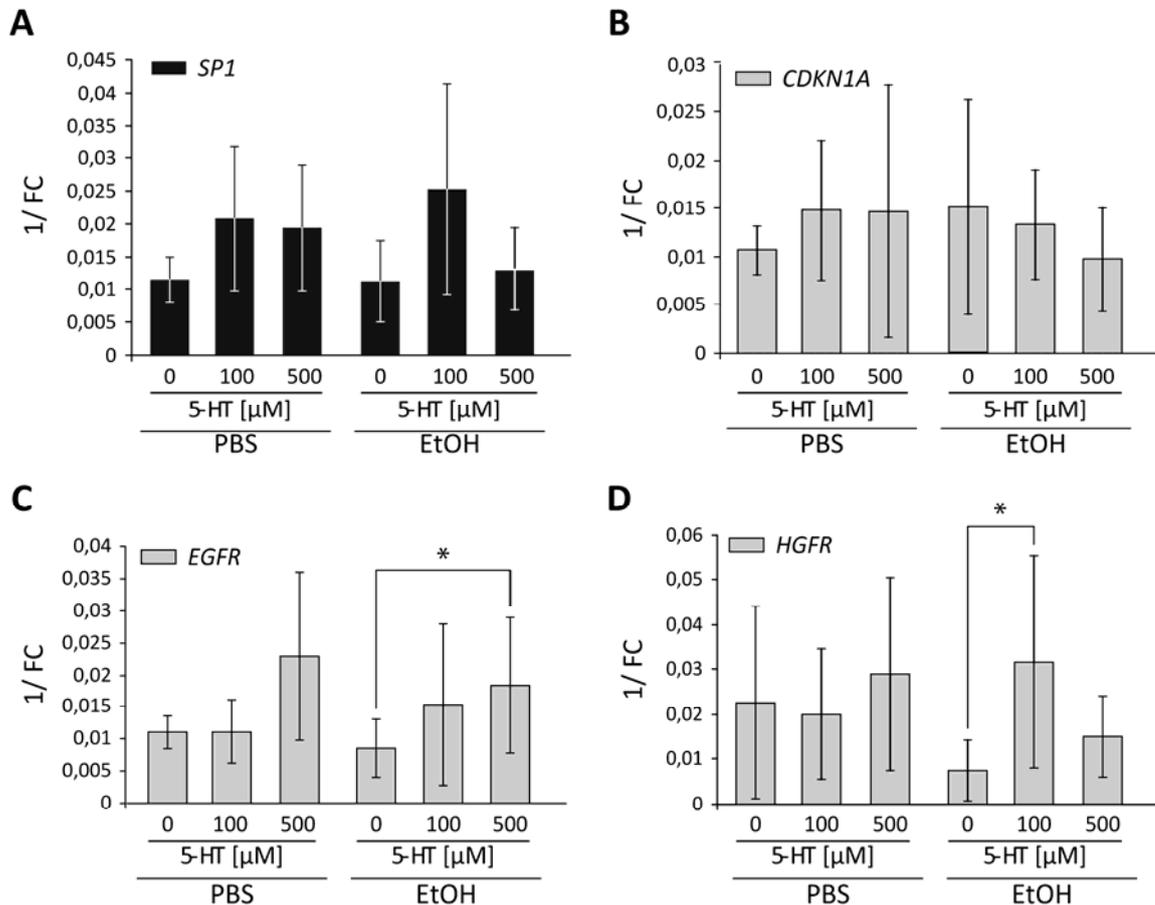


**Abbildung 36: Die Behandlung von HepG2-Zellen verändert die Expression zweier von drei betrachteten Referenzgenen.** HepG2-Zellen wurden mit 100  $\mu$ M bzw. 500  $\mu$ M 5-HT und 200 mM EtOH behandelt. Die relative Expression der untersuchten Referenzgene wurde mittels qPCR analysiert. Dargestellt sind die reziproken Werte des *FoldChange* \* $p < 0,05$  vs. PBS-Kontrolle oder angezeigter Behandlung,  $n = 3$ . **(A)** Die Expression von Beta-Aktin (*ACTB*) wurde durch die Behandlung der Zellen nicht signifikant beeinflusst. **(B)** Die Expression von *RPL13* wurde durch Gabe von 500  $\mu$ M 5-HT um 185 % erhöht. Die erhöhte Expression wurde durch EtOH wieder nahezu auf Basalniveau erniedrigt. **(C)** *GAPDH* erhöhte sich durch Zugabe von EtOH um 35 %. Die Anwesenheit von 500  $\mu$ M 5-HT führt demgegenüber zu einer Abnahme von 0,4 %.

### 2.2.3 Die Behandlung der HepG2-Zellen verändert die Expression von SP1-Zielgenen

Um den direkten Einfluss der 5-HT- bzw. Ethanolbehandlung auf die Genexpression in HepG2-Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen analog zur Expressionsanalyse der Referenzgene für 12 h mit 100  $\mu$ M oder 500  $\mu$ M 5-HT und 200 mM (11,6 % (v/v)) Ethanol inkubiert. Im Anschluss wurde die gewonnene cDNA mittels qPCR analysiert. Die untersuchten Zielgene wurden auf das Referenzgen *ACTB* normiert (Absch. III.2.2.2). Die Genexpression von *SP1* war durch die Behandlung der Zellen 5-HT (100 und 500  $\mu$ M) und 100  $\mu$ M 5-HT/Ethanol tendenziell erhöht, aber nicht signifikant verändert (Abb. 37 A). Weiterhin zeigte *CDKN1A* keine signifikante Veränderung der Genexpression (Abb. 37 B). Die Expression des Genes von *EGFR* wurde in Anwesenheit von Ethanol und der Gabe von 500  $\mu$ M 5-HT signifikant um 114 % erhöht (Abb. 37 C). Außerdem zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung bei der Behandlung mit 500  $\mu$ M 5-HT. Die Genexpression von *HGFR* erhöhte sich in Anwesenheit von Ethanol und mit der Gabe von 100  $\mu$ M 5-HT um 320 % (Abb. 37 D). Im Vorfeld wurde mittels der für Indole charakteristischen Fluoreszenz in HPLC-

Messungen bestimmt, ob HepG2-Zellen generell in der Lage sind 5-HT aufzunehmen. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Aufnahme von 5-HT [460,461], die unabhängig vom SERT ist, da der spezifische SERT-Inhibitor Fluoxetin sich nicht auf die Aufnahme auswirkte (Absch. III.1.8.1) [461].



**Abbildung 37: Die Behandlung von HepG2-Zellen führt zu Veränderungen in der Expression der SP1-Zielgene *EGFR* und *HGFR*.** HepG2-Zellen wurden mit 100 µM bzw. 500 µM 5-HT und 200 mM EtOH behandelt. Als Kontrolle diente jeweils die Zugabe von PBS. Die relative Expression von SP1 und drei von dessen Zielgenen wurde mittels qPCR analysiert und auf das Referenzgen *ACTB* bezogen. Dargestellt sind die reziproken Werte des *FoldChange*. \* $p < 0,05$ , die einzelnen Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt;  $n = 4$ . **(A)** Die Genexpression von *SP1* war durch Behandlung der Zellen mit 5-HT generell und mit 100 µM 5-HT/EtOH tendenziell erhöht, aber nicht signifikant verändert. **(B)** *CDKN1A* zeigt keine signifikante Veränderung der Genexpression. **(C)** Die Expression von *EGFR* war mit 500 µM 5-HT und in Anwesenheit von EtOH um 114 % erhöht. **(D)** Die Expression von *HGFR* war mit 100 µM 5-HT und in Anwesenheit von EtOH um 320 % erhöht.

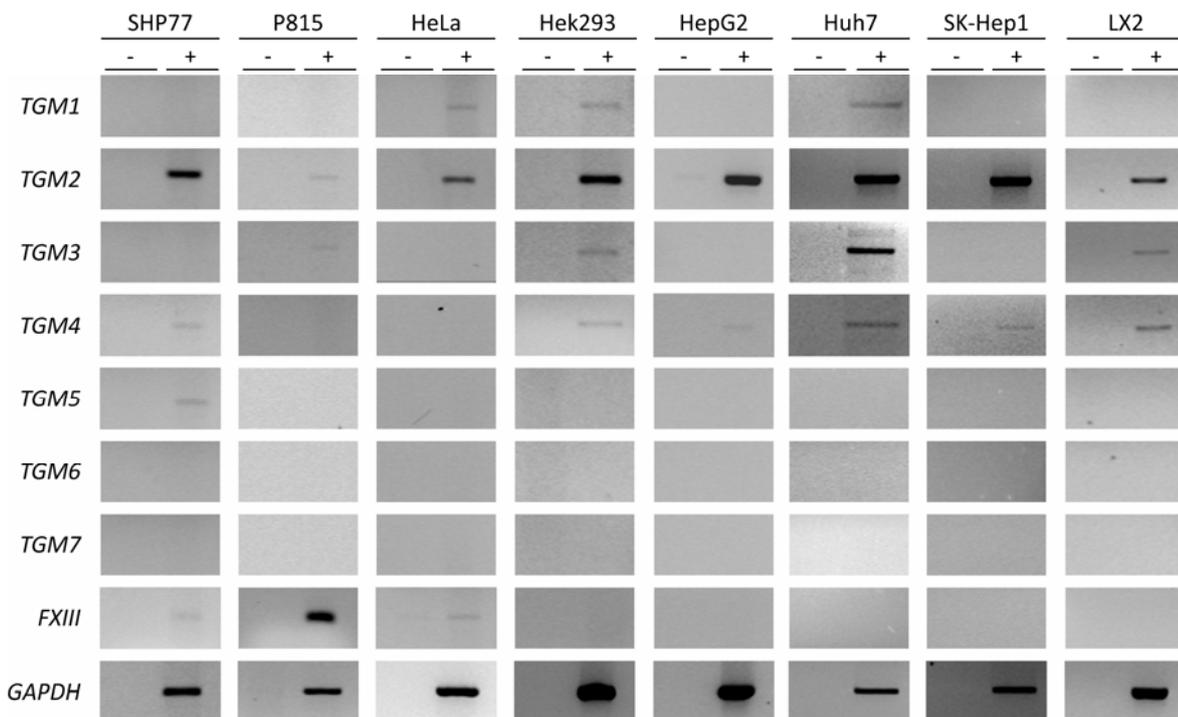
## 2.3 Die Monoaminylierung in verschiedenen Leberzelllinien

### 2.3.1 Zelllinien unterschiedlicher Herkunft exprimieren Transglutaminasen

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Zelllinien und Gewebe generell in der Lage sind, verschiedene biogene Monoamine mittels membranständigen Transportmolekülen aufzunehmen und diese dann TGM-vermittelt in Proteine zu inkorporieren, wurde die Expression von

Monoamintransportern und TGM mittels PCR überprüft. Des Weiteren wurde exemplarisch gezeigt, dass eine Monoaminylierung der Proteine in Leberzellen stattfindet.

Um zu untersuchen, ob verschiedene Mitglieder der TGM-Familie in sekundären Zelllinien unterschiedlicher Gewebe exprimiert sind, wurde eine Charakterisierung mittels PCR mit für die Gene spezifischen Oligonukleotiden vorgenommen. Dafür wurde zuerst die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese einer PCR unterzogen. Alle untersuchten Zelllinien der Gewebe Lunge (SHP77), Mastzellen (P815), Gebärmutterhals (HeLa), Niere (HEK293) und Leber (HepG2, Huh7, SK-Hep1 und LX2) exprimierten *TGM2* (Abb. 38). HeLa-, Hek293- und Huh7-Zellen exprimierten *TGM1*, P815-, Hek293-, Huh7- und LX2-Zellen *TGM3*, SHP77-, Hek293-, HepG2-, Huh7-, SK-Hep1- und LX2-Zellen exprimierten *TGM4*. *TGM5* wurde ausschließlich von SHP77-Zellen exprimiert. *TGM6* und *TGM7* wurden von keiner der untersuchten Zelllinien exprimiert, während SHP77-, P815- und HeLa-Zellen *FXIII* exprimierten.



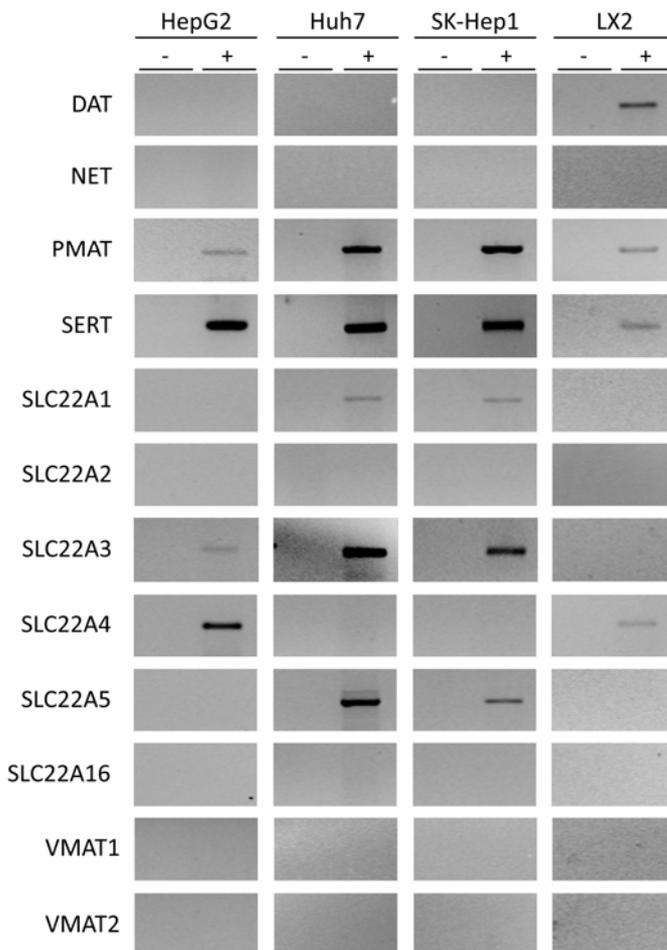
**Abbildung 38: Verschiedene Transglutaminasen werden in Zelllinien von Geweben unterschiedlicher Herkunft exprimiert.** Durch Isolierung der RNA verschiedener Zelllinien mit anschließender cDNA-Synthese und Charakterisierung mittels PCR konnte die Expression verschiedener TGM in unterschiedlichen Zelllinien humaner und muriner Herkunft nachgewiesen werden. Die entstandenen PCR-Fragmente konnten mittels Sequenzierung eindeutig identifiziert werden. Alle untersuchten Zelllinien aus den Geweben Lunge (SHP77), Mastzellen (P815), Gebärmutterhals (HeLa), Niere (HEK293) und Leber (HepG2, Huh7, SK-Hep1 und LX2) exprimierten *TGM2*. Transkripte der anderen TGM wurden nur in einem Teil der untersuchten Zelllinien gefunden. *GAPDH* diente als Kontrolle der cDNA-Qualität. Neben der spezifischen Amplifikation in der PCR (+) wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA (-) mitgeführt.

Zur Kontrolle der Ansätze auf Verunreinigungen wurden Negativkontrollen ohne cDNA durchgeführt. Außerdem wurde als Kontrolle der cDNA-Qualität das Haushaltsgen *GAPDH*

amplifiziert. Die Identität der entstandenen PCR-Fragmente wurde anschließend stichprobenartig per Sequenzierung überprüft und durchweg bestätigt.

### 2.3.2 Verschiedene Leberzelllinien exprimieren Monoamin- und Kationentransporter

Die Expression verschiedener spezifischer Monoamintransporter und unspezifischer Kationentransporter wurde in unterschiedlichen sekundären Zelllinien hepatischer Herkunft mittels PCR untersucht. Alle untersuchten Hepatocyten (HepG2, Huh7 und SK-Hep1) und hepatischen stellare Zellen (LX2), exprimierten den peripheren Monoamintransporter *PMAT* und den Serotonintransporter *SERT* (Abb. 39). Der Dopamintransporter *DAT* wurde ausschließlich von LX2-Zellen, *SLC22A3* von allen Hepatocytenzelllinien, sowie *SLC22A1* von Huh7- und SK-Hep1-Zellen exprimiert. *SLC22A4* konnte in HepG2 und LX2-Zellen und *SLC22A5* in Huh7- und SK-Hep1-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von *NET*, *SLC22A2*, *SLC22A16*, *VMAT1* und *VMAT2* konnte in keiner der untersuchten Leberzelllinien detektiert werden. Zur Kontrolle der Ansätze auf Verunreinigungen wurden Negativkontrollen ohne cDNA durchgeführt. Außerdem wurde als Positivkontrolle das Haushaltsgen *GAPDH* amplifiziert. Die Identität der entstandenen PCR-Fragmente wurde anschließend stichprobenartig per Sequenzierung überprüft und durchweg bestätigt.

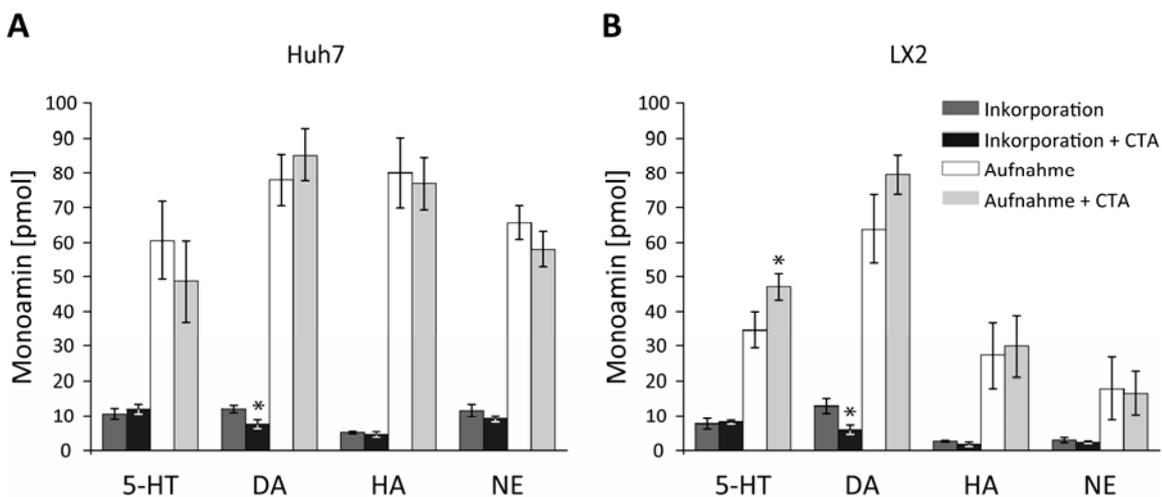


**Abbildung 39: Verschiedene spezifische und unspezifische Monoamintransporter werden in Zelllinien der Leber exprimiert.**

Durch Isolierung der RNA verschiedener Zelllinien mit anschließender cDNA-Synthese und Charakterisierung mittels PCR konnte die Expression verschiedener Monoamintransporter in unterschiedlichen Zelllinien humaner Herkunft nachgewiesen werden. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden hierbei so ausgewählt, dass Fragmente einer Größe von 300-500 bp entstanden und die Amplifikation unspezifischer Fragmente vermieden wurde. Die entstandenen PCR-Fragmente konnten stichprobenartig mittels Sequenzierung eindeutig identifiziert werden. Alle untersuchten Zelllinien der Leber exprimieren *PMAT* und *SERT*. Transkripte der anderen Transporter konnten nur in einem Teil der hepatischen Zelllinien gefunden werden. Die Expression von *NET*, *SLC22A2*, *SLC22A16*, *VMAT1* und *VMAT2* konnte nicht gezeigt werden. *GAPDH* diente als Kontrolle der RNA-Qualität (nicht dargestellt, Abb. 38). Neben der spezifischen Amplifikation in der PCR (+) wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA (-) mitgeführt.

### 2.3.3 In Leberzellen werden Proteine dopaminyliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass verschiedene Leberzelllinien TGM und Monoamintransporter exprimieren und damit generell in der Lage sind Monoamine aufzunehmen und diese mittels TGM-vermittelter Transamidierung in Proteine zu inkorporieren, sollte untersucht werden, ob diese Zelllinien in Kultur eine Monoaminaufnahme bzw. -inkorporation zeigen. Dafür wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -markierten biogenen Monoaminen und dem TGM-Inhibitor CTA behandelt. Die nach der Behandlung säuregefällten Proteine wurden durch Filtration von freiem Monoamin getrennt und extensiv gewaschen. Die schwache  $\beta$ -Strahlung des  $^3\text{H}$  wurde anschliessend mittels einer Szintillationsflüssigkeit quantifiziert. Im Fall der Hepatocytzelllinie Huh7 und der hepatischen stellaren Zelllinie LX2 zeigte sich eine Inkorporation von Dopamin (Abb. 40 A und B). Im Fall von LX2 wurde die Aufnahme von 5-HT durch CTA signifikant gesteigert (Abb. 40 B). Eine Hemmung der Serotoninylierung, Histaminylierung und Norepinephrinylierung durch CTA konnten bei diesem *in vitro*-Ansatz nicht detektiert werden.



**Abbildung 40: Die Leberzelllinien Huh7 und LX2 zeigen eine Transglutaminase-abhängige Dopaminylierung.** In Filterexperimenten konnte mittels  $^3\text{H}$ -markierten Monoaminen eine kovalente Bindung von Dopamin an die Proteine der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Die Inhibition der Dopaminylierung durch den TGM-spezifischen Inhibitor Cysteamin (CTA) zeigt die TGM-spezifische Inkorporation gegenüber der unspezifischen Hintergrundbindung von  $^3\text{H}$ -DA. Die Aufnahme von 5-HT in die Zellen der Linie LX2 wurde durch CTA signifikant verstärkt. \* $p < 0,05$   $^3\text{H}$ -Monoamin vs. Kontrolle (+ CTA); gezeigt ist ein repräsentatives, in Triplikaten durchgeführtes Experiment aus drei Wiederholungen.

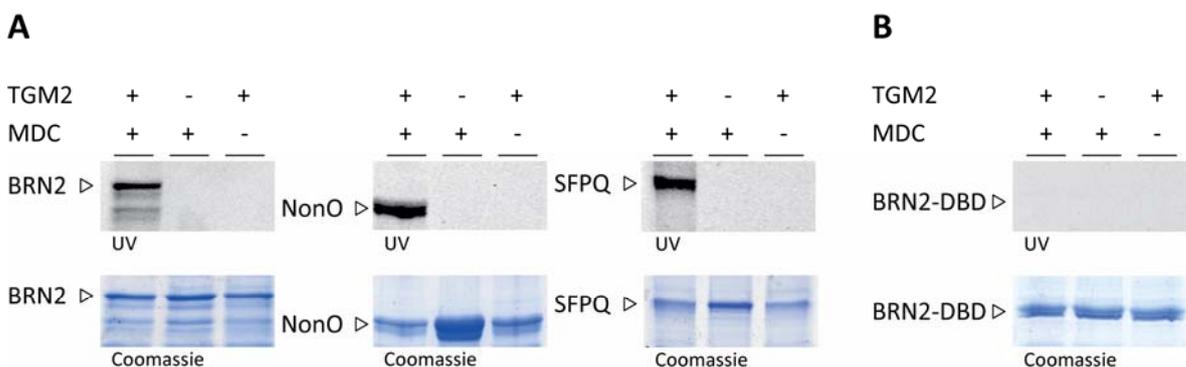
## 3 Transkriptionsfaktoren als Substrate für die Monoaminylierung

### 3.1 BRN2, NonO und SFPQ sind Substrate von TGM2 *in vitro*

Um zu überprüfen, ob Polyglutaminabschnitt-enthaltende TF generell von TGM2 kovalent mit Monoaminen modifiziert werden können, wurden drei verschiedene prokaryotisch exprimierte und über die 6xHis-Markierung aufgereinigte, humane TF *in vitro* mit TGM2 und dem

fluoreszierenden Monoamin-Analogen MDC umgesetzt. Nach der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE überprüft, ob das Signal des entsprechenden Molekulargewichts durch Anregung mit UV-Strahlung fluoreszierte. Bei BRN2, NonO und SFPQ zeigte sich eine kovalente Modifikation (Abb. 41 A), die nur in Anwesenheit des Enzyms TGM2 und des Monoamin-Substrats auftritt. In der Coomassiefärbung des selben Gels zeigt sich das Proteinsignal ebenfalls in den Kontrollen ohne Enzym oder Monoaminsubstrat. Hierbei fällt v.a. bei NonO und SFPQ auf, dass sich in den Proben mit TGM2 weniger Protein befindet, da das Enzym die TF in einer Nebenreaktion zu hochmolekularen Komplexen polymerisiert.

Zur Überprüfung der Spezifität der beobachteten Monoaminylierung wurde die DNA-bindende Domäne von BRN2, welche zwar glutaminreich ist, aber keinen Polyglutaminabschnitt enthält, ebenfalls *in vitro* mit TGM2 und MDC umgesetzt (Abb. 41 B). Dabei kam es trotz vorhandener Glutamine zu keiner kovalenten Modifikation mit MDC und analog dazu zu keiner sichtbaren Polymerisierung des Proteins.

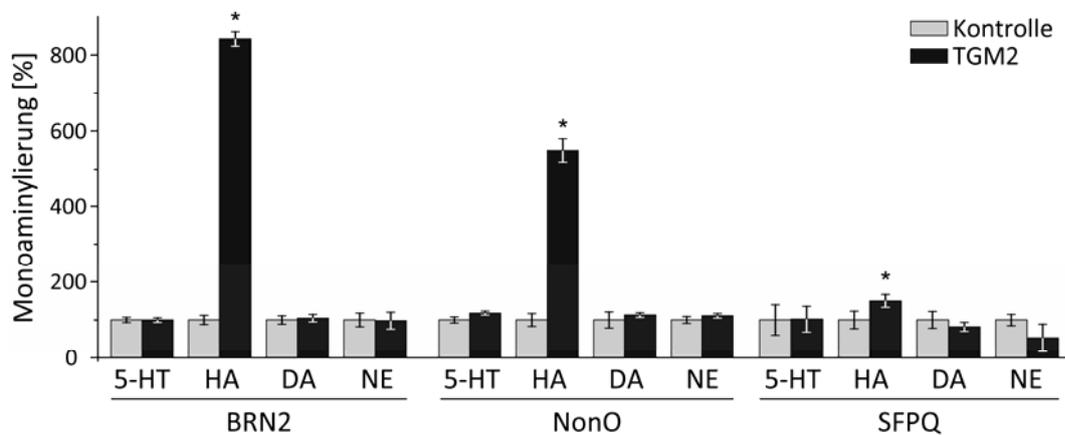


**Abbildung 41: Die Polyglutaminabschnitt-enhaltenden humanen Transkriptionsfaktoren BRN2, NonO und SFPQ werden *in vitro* Transglutaminase 2-abhängig monoaminyliert. (A)** Durch Inkubation mit TGM2 und dem Fluorophor MDC konnten die prokaryotisch exprimierte, 6xHis-markierte TF BRN2, NonO und SFPQ monoaminyliert und die kovalente Bindung von MDC mittels fluoreszierenden Proteinsignale nach einer SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der Proteine wurde anschliessend anhand einer Coomassiefärbung überprüft. In Abwesenheit von TGM2 oder MDC kam es zu keiner Monoaminylierung. **(B)** Bei der DNA-bindenden Domäne (DBD) des BRN2, die keinen Polyglutaminabschnitt enthält, jedoch glutaminreich ist, kam es zu keiner Monoaminylierung. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

### 3.2 BRN2, NonO und SFPQ inkorporieren Histamin mittels TGM2 *in vitro*

Nachdem eine generelle Monoaminylierung der Polyglutaminabschnitt-enhaltenden, humanen TF BRN2, NonO und SFPQ gezeigt werden konnte (Absch. III.3.1), wurden die drei Proteine *in vitro* mit TGM2 und den biogenen Monoaminen 5-HT, HA, DA und NE umgesetzt. Dafür wurden die TF prokaryotisch exprimiert, über eine 6xHis-Markierung aufgereinigt und mit [<sup>3</sup>H]-markierten biogenen Monoaminen behandelt. Die nach der Behandlung säuregefällten Proteine wurden durch Filtration von freiem Monoamin getrennt, extensiv gewaschen und die Höhe der

schwachen  $\beta$ -Strahlung des  $[^3\text{H}]$  mittels einer Szintillationsflüssigkeit quantifiziert. In allen drei Fällen zeigte sich eine signifikante Modifikation mit HA (Abb. 42), die bei BRN2 um etwa 800 %, bei NonO um 500 % und bei SFPQ um 150 % über der unspezifischen Bindung des jeweiligen Kontrollansatzes ohne TGM2 liegt. Das Ausmaß dieser Histaminierung spiegelt dabei teilweise die Länge des Polyglutaminabschnitts wieder (Abb. 53), der bei BRN2 mit 21 aufeinanderfolgenden Glutaminresten am längsten ist. Jedoch sind die Polyglutaminabschnitte von NonO und SFPQ mit sechs und fünf Glutaminresten in der Länge vergleichbar und die Höhe der Histaminierung unterscheidet sich zwischen diesen beiden TF um 350 %. Serotonylierung, Dopaminylierung und Norepinephrinylierung konnte bei diesem *in vitro*-Ansatz nicht beobachtet werden.

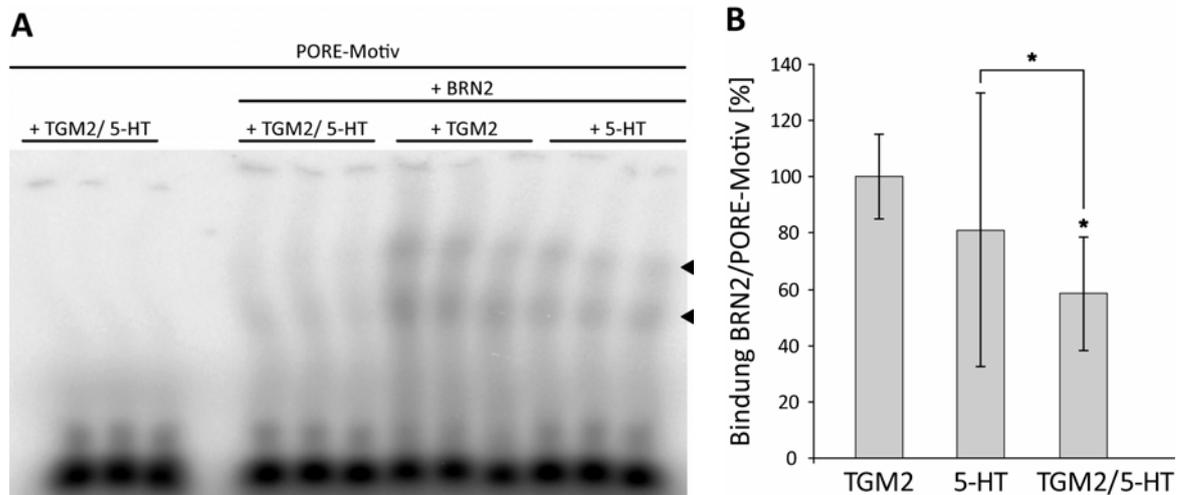


**Abbildung 42: Die Polyglutaminabschnitt-enthaltenden TF BRN2, NonO und SFPQ werden *in vitro* TGM2-abhängig histaminylt.** In Filterexperimenten konnte mittels  $[^3\text{H}]$ -markierten Monoaminen eine kovalente Bindung von Histamin (HA) an prokaryotisch exprimierte, humane TF nachgewiesen werden. Die TF wurden über eine 6xHis-Markierung aufgereinigt und zeigten eine um etwa 800 % (BRN2), 500 % (NonO) und 150 % (SFPQ) über der unspezifischen Bindung liegende Histaminierung mit  $[^3\text{H}]$ -HA (HA). Für  $[^3\text{H}]$ -5-HT (5-HT),  $[^3\text{H}]$ -Dopamin (DA) und  $[^3\text{H}]$ -Noradrenalin (NE) konnte keine kovalente Bindung *in vitro* gezeigt werden. \* $p < 0,05$  TGM2 vs. Kontrolle (ohne TGM); gezeigt ist ein repräsentatives, in Triplikaten durchgeführtes Experiment aus drei Wiederholungen.

### 3.3 Die Monoaminylierung von BRN2 vermindert die Bindung zum PORE-Motiv

Zur Überprüfung des Einflusses der Monoaminylierung des TF BRN2 auf dessen Fähigkeit das BRN2-spezifische DNA-Motiv PORE zu binden, wurden Affinitätsexperimente mittel EMSA durchgeführt. BRN2 wurde dafür *in vitro* serotonyliert und mit einem radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid inkubiert. Um zu kontrollieren, ob es eine Bindung von TGM2 an das PORE-Motiv gibt, wurde der Ansatz parallel zu den anderen, aber ohne BRN2 durchgeführt. Dieser zeigt keine Signale hochmolekularer Komplexe. Die Ansätze mit BRN2 zeigen alle eine spezifische Bindung des TF (Abb. 43 und Abb. 45). Im Gegensatz zu den Kontrollen mit BRN2 und TGM2 oder 5-HT, zeigte der mit beiden Komponenten inkubierte TF eine signifikant verminderte Bindung an das PORE-Motiv (Abb. 43). Die Inkubation mit 5-HT alleine führte gegenüber der Inkubation mit TGM2

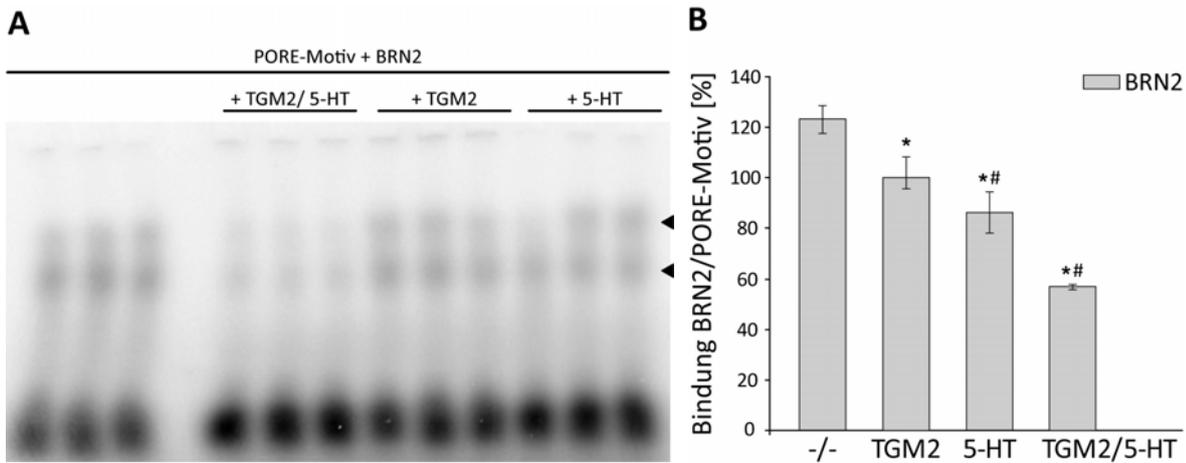
ebenfalls zu einer Abnahme der DNA-Bindung durch BRN2, welche jedoch nicht signifikant unterschiedlich war.



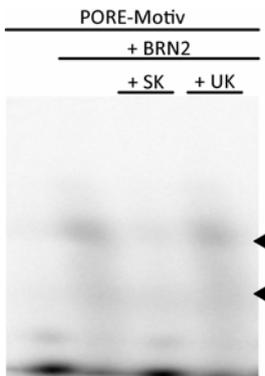
**Abbildung 43: Die Serotoninylierung von BRN2 führt zu einer verminderten Bindung des TF an das DNA-Motiv PORE.** (A) EMSA-Experimente zeigen eine spezifische Bindung von prokaryotisch exprimiertem humanen BRN2 (Pfeile) an  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA-Oligonukleotide, die das PORE-Motiv enthalten. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines nativen SDS-Geles. (A) und (B) Die Bindung des TF an die DNA nimmt nach Serotoninylierung signifikant ab, hierbei verringert sich die Bindung gegenüber der Behandlung mit TGM2 um etwa 40 % und gegenüber der Kontrolle mit 5-HT um etwa 20 %. Die Behandlung mit 5-HT beeinträchtigt die Bindung der DNA ebenfalls, jedoch führt diese Störung zu keinem signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle mit TGM2. (B) Dargestellt ist die densitometrische Quantifizierung der spezifischen Signale aus (A), welche auf die Intensität des ungebundenen Oligonukleotids normiert wurden. \* $p < 0,05$  TGM2/5-HT vs. Kontrolle (TGM2); gezeigt sind in Triplikaten durchgeführte Experimente aus sechs Wiederholungen.

Die Serotoninylierung sowie die Behandlung mit den Komponenten TGM2 oder 5-HT alleine führte in allen Kombinationen gegenüber dem unbehandelten BRN2, das nur den Puffer- und Temperaturbedingungen ausgesetzt war, zu einer verminderten spezifischen Bindung des Oligonukleotids (Abb. 44). TGM2-Behandlung führte dabei zu einer 23 %igen, 5-HT-Behandlung zu einer 37 %igen Abnahme und die Serotoninylierung zu einer um 66 % verminderten Bindung. Gegenüber der Inkubation mit TGM2 hat das mit 5-HT behandelte BRN2 eine um 14 % verminderte Bindungskapazität an das PORE-Motiv, während die Behandlung mit beiden Komponenten eine um 43 % verringerte Bindung zeigte.

Die Kompetition des auftretenden Signals durch Zugabe eines nicht-radioaktiv markierten, das PORE-Motivs enthaltenden Oligonukleotids, demonstriert die spezifische Bindung des betrachteten BRN2-Proteins an das genannte Motiv (Abb. 45). Hierbei kann das Signal nur mit dem selben nicht-radioaktiv markierten DNA-Oligonukleotid spezifisch kompetitiert werden, jedoch nicht mit einem anderen unspezifischen DNA-Oligonukleotid, das ein Sequenzmotiv aus dem Promotor von *RPL13A* enthält.



**Abbildung 44: Die Inkubation von BRN2 mit Transglutaminase 2 bzw. Serotonin führt gegenüber dem unbehandelten BRN2 zur verminderten Bindung des Transkriptionsfaktors an das DNA-Motiv PORE. (A)** EMSA-Experimente zeigten eine Abnahme der spezifischen Bindung (Pfeil) von prokaryotisch exprimiertem humanen BRN2 an [<sup>32</sup>P]-markierte, PORE-Motiv enthaltende DNA-Oligonukleotide nach Behandlung mit TGM2 oder 5-HT. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines nativen SDS-Geles. **(A)** und **(B)** Die Bindung des TF an die DNA nahm gegenüber dem nicht behandelten BRN2 nach TGM2-Behandlung um 23 % ab, nach 5-HT-Behandlung um 37 % und nach Behandlung mit Enzym und Aminosubstrat um 66 % ab. Weiterhin war eine verringerte Bindung nach 5-HT- und TGM2/5-HT- gegenüber der TGM2-Behandlung zu sehen. **(B)** Dargestellt ist die densitometrische Quantifizierung der spezifischen Signale aus (A), welche auf die Intensität des ungebundenen Oligonukleotids normiert wurden. \*p < 0,05 vs. -/-; # p < 0,05 vs. TGM2; gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

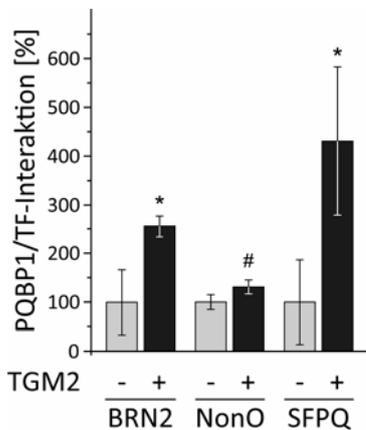


**Abbildung 45: BRN2 zeigt eine spezifische Bindung an das PORE-Motiv.** Die Inkubation von BRN2 mit einem das PORE-Motiv enthaltenden DNA-Oligonukleotid führte zu einem Signal (Pfeilspitze), das in Abwesenheit von BRN2 nicht zu beobachten war. Die Zugabe des nicht radioaktiv markierten PORE-Motivs (SK) führte zu einer spezifischen Konkurrenz des Signals. Demgegenüber führte die Inkubation mit einem nicht spezifischen DNA-Oligonukleotid (UK), welches ein Sequenzmotiv aus dem Promotor des ribosomalen Proteins RPL13A enthält, zu keiner Konkurrenz. Der spezifische und unspezifische Konkurrent wurde jeweils in einem 1000fachen molekularen Überschuss zugegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Autoradiogramm eines nativen SDS-Geles.

### 3.4 Die Monoaminylierung von Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Transkriptionsfaktoren verstärkt die Bindung zum Polyglutamin-bindenden Protein 1

Da bereits bekannt war, dass PQBP1 die Aktivität von BRN2 im Kontext zweier verschiedener Promotoren reprimiert [277,282], sollte untersucht werden, ob die Monoaminylierung verschiedener Polyglutaminabschnitt-enthaltender TF einen Einfluss auf die Interaktion von PQBP1 mit diesen Proteinen nimmt. Dazu wurden die 6xHis-markierten prokaryotisch exprimierten humanen TF BRN2, NonO und SFPQ an eine Ni-NTA-Matrix gebunden und anschließend mit Zelllysaten inkubiert, die das Fusionsproteins cmypPQBP1 enthielten. Durch Immunoblotting mit markierungsspezifischen Antikörpern konnte so die Bindung von PQBP1 an

die drei untersuchten TF demonstriert werden (Abb. 46 A) [277,284]. Weiterhin zeigte sich eine verstärkte TF/PQBP1-Interaktion nach MDC-Monoaminylierung der TF. Es kam zu einer Verstärkung der Bindung von etwa 150 % bei BRN2, 30 % bei NonO und 320 % bei SFPQ (Abb. 46 B). Die Erhöhung der Bindungsstärke zeigte sich dabei unabhängig von der Länge des Polyglutaminabschnitts, der bei BRN2 am längsten und bei SFPQ am kürzesten ist (Abb. 45).

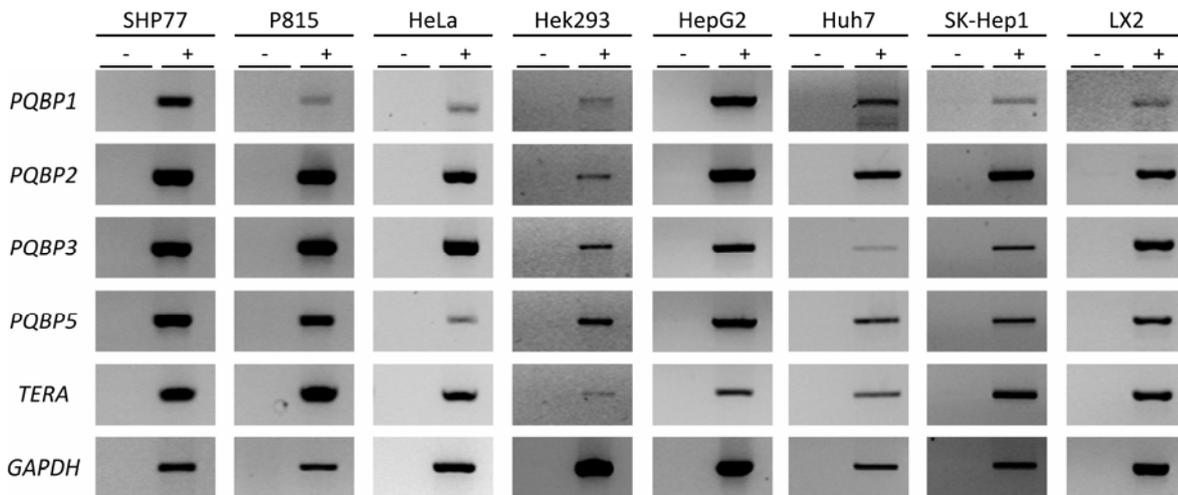


**Abbildung 46: Die Polyglutaminabschnitt-enthaltenden Transkriptionsfaktoren BRN2, NonO und SFPQ zeigen nach Monoaminylierung eine verstärkte Bindung an das Polyglutamin-bindende Protein 1.** Mittels Affinitätsbindung der 6xHis-markierten TF an eine Ni-NTA-Matrix und anschließendem Immunoblotting konnte eine Bindung von PQBP1 an die drei untersuchten, prokaryotisch exprimierten Polyglutaminabschnitt-enthaltenden TF nachgewiesen werden. Die humanen TF BRN2, NonO und SFPQ zeigten nach Monoaminylierung eine um etwa 150 % (BRN2), 30 % (NonO) und 320 % (SFPQ) verstärkte Bindung gegenüber dem jeweiligen nicht monoaminylierten TF. \* $p < 0.05$ ; # $p = 0.06$  TGM2/MDC vs. Kontrolle (ohne TGM);  $n = 3$ .

### 3.5 Zelllinien unterschiedlicher Gewebe exprimieren Mitglieder der Familie der Polyglutamin-bindenden Proteine

Mittels PCR wurde die Expression verschiedener Mitglieder der PQBP-Familie in sekundären Zelllinien unterschiedlicher Gewebe überprüft [274]. Hierfür wurde zuerst die RNA der Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese in eine PCR eingesetzt.

Alle untersuchten Zelllinien der Gewebe Lunge (SHP77), Mastzellen (P815), Gebärmutterhals (HeLa), Niere (HEK293) und Leber (HepG2, Huh7, SK-Hep1 und LX2) exprimierten sämtliche untersuchten PQBPs (Abb. 47). Zur Kontrolle der Ansätze auf Verunreinigungen wurden Negativkontrollen ohne cDNA durchgeführt. Außerdem wurde als Positivkontrolle der cDNA-Qualität das Haushaltsgen *GAPDH* amplifiziert. Die Identität der entstandenen PCR-Fragmente wurde anschließend stichprobenartig per Sequenzierung überprüft und durchweg bestätigt. *PQBP1-3*, *PQBP5* und *TERA* werden demnach in allen untersuchten humanen und murinen Zelllinien exprimiert. *PQBP4* ist bisher nicht annotiert und wurde daher in der Charakterisierung nicht berücksichtigt.

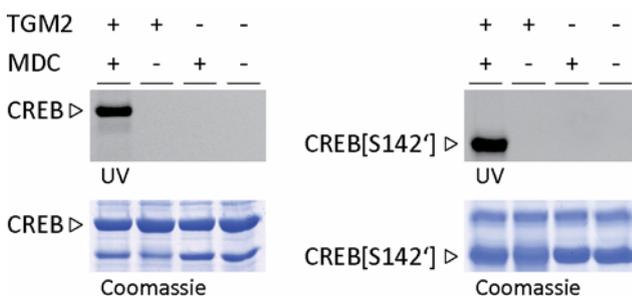


**Abbildung 47: Polyglutaminbindende Proteine werden in Zelllinien von Geweben unterschiedlicher Herkunft exprimiert.** Durch Isolierung der RNA verschiedener Zelllinien mit anschließender cDNA-Synthese und Charakterisierung mittels PCR konnte die Expression verschiedener PQBPs in unterschiedlichen Zelllinien humaner und muriner Herkunft nachgewiesen werden. Die Gen-spezifischen Oligonukleotide wurden hierbei so ausgewählt, dass Fragmente einer Größe von 300-500 bp entstanden und die Amplifikation unspezifischer Fragmente vermieden wurde. Die entstandenen PCR-Fragmente konnten mittels Sequenzierung eindeutig identifiziert werden. Alle untersuchten Zelllinien aus den Geweben Lunge (SHP77), Mastzellen (P815), Gebärmutterhals (HeLa), Niere (HEK293) und Leber (HepG2, Huh7, SK-Hep1 und LX2) exprimierten die Transkripte aller betrachteten Mitglieder der PQBP-Familie. *GAPDH* diente als Kontrolle der RNA-Qualität. Neben der spezifischen Amplifikation in der PCR (+) wurde eine Negativkontrolle ohne cDNA (-) mitgeführt.

## 4 Glutaminreiche Transkriptionsfaktoren als Substrate für die Monoaminierung

### 4.1 Der Glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB ist ein Substrat von TGM2 *in vitro*

Um eine generelle kovalente Modifizierung des glutaminreichen TF CREB durch TGM2 *in vitro* zu untersuchen, wurde humanes CREB prokaryotisch exprimiert, über die 6xHis-Markierung aufgereinigt und im Anschluss mit dem fluoreszenten Monoamin-Analogon MDC umgesetzt.



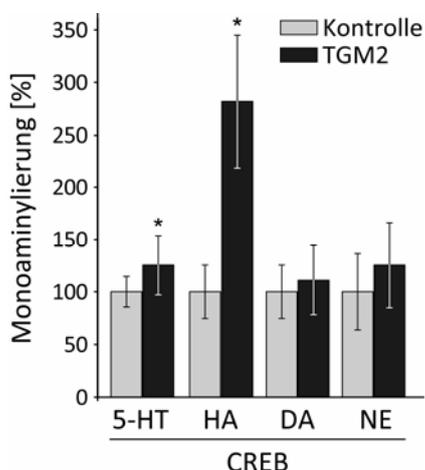
**Abbildung 48: Der glutaminreiche, humane Transkriptionsfaktor CREB und die verkürzte Form CREB[S142'] werden *in vitro* Transglutaminase 2-abhängig monoaminiert.** Durch Inkubation mit TGM2 und dem Monoamin-substrat MDC konnte das prokaryotisch exprimierte, 6xHis-markierte CREB (Isoform B) monoaminiert und die kovalente Bindung des Monoamins mittels der fluoreszierenden

Proteinsignale nach einer SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die verkürzte Form CREB[S142'], das die Q-reiche Domäne Q1 enthält wird ebenfalls mit MDC modifiziert. Die Anwesenheit der Proteine in den nicht fluoreszierenden Proben wurde anhand einer Coomassiefärbung überprüft. In Abwesenheit von TGM2 oder MDC kam es zu keiner Monoaminierung. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

Anschließend wurde das in einer SDS-PAGE auftretende Proteinsignal auf eine Fluoreszenz überprüft. Sowohl das vollständige CREB, als auch die verkürzte Form CREB[S142'], die nur die Q-reiche Domäne Q1 aber nicht die Q2-Domäne enthält (Abb. 48), zeigte eine kovalente Modifikation mit MDC (Abb. 48), die nur in Anwesenheit des Enzyms TGM2 und des Substrats auftritt. Das Fehlen einer dieser Komponenten führt zu keiner Modifikation. In der Coomassiefärbung des selben Gels zeigt sich das Proteinsignal ebenfalls in den Kontrollen ohne Enzym bzw. Monoaminsubstrat. Hierbei fällt auf, dass andere im Ansatz befindliche Proteine nicht von TGM2 mit MDC modifiziert werden. Weiterhin zeigt sich in den Ansätzen mit TGM2, aber ohne Monoaminsubstrat ein schwächeres Proteinsignal, das auf Polymerisierung der Proteine zu hochmolekularen Komplexen zurückzuführen ist.

#### 4.2 CREB wird *in vitro* TGM2-abhängig mit Serotonin und Histamin modifiziert

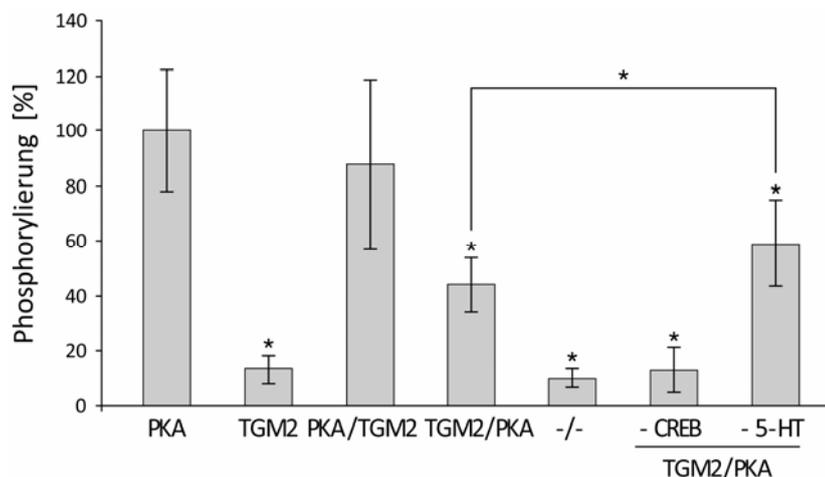
Nach der Demonstration einer generellen Monoaminylierung des glutaminreichen humanen TF CREB (Absch. III.4.1), wurde der TF *in vitro* mit TGM2 und den biogenen Monoaminen 5-HT, HA, DA und NE umgesetzt. Dafür wurde CREB wiederum prokaryotisch exprimiert, über eine 6xHis-Markierung aufgereinigt und mit den genannten [<sup>3</sup>H]-markierten biogenen Monoaminen behandelt. Das nach der Behandlung säuregefällte Protein wurde durch Filtration von freiem Monoamin getrennt, extensiv gewaschen und die schwache  $\beta$ -Strahlung des [<sup>3</sup>H] mittels einer Szintillationsflüssigkeit quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Modifikation mit 5-HT und HA (Abb. 49), die im Fall der Serotonylierung um etwa 20 % und bei der Histaminylierung um 180 % gegenüber dem jeweiligen Kontrollansatz ohne TGM2 erhöht war. Das Ausmaß der Histaminylierung war damit wesentlich höher als das der Serotonylierung. Dopaminylierung und Norepinephrinylierung konnten bei diesem *in vitro*-Ansatz nicht beobachtet werden.



**Abbildung 49: Der glutaminreiche humane Transkriptionsfaktor CREB wird *in vitro* Transglutaminase 2-abhängig serotonyliert und histaminyliert.** In Filterexperimenten konnte mittels [<sup>3</sup>H]-markierten Monoaminen eine kovalente Bindung von Serotonin (5-HT) und Histamin (HA) an den prokaryotisch exprimierten, humanen TF CREB nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein 6xHis-CREB wurde über die Markierung aufgereinigt und zeigte eine um etwa 20 % erhöhte Serotonylierung und eine um 180 % erhöhte Histaminylierung gegenüber der unspezifischen Bindung von [<sup>3</sup>H]-5-HT und [<sup>3</sup>H]-HA. Für [<sup>3</sup>H]-Dopamin (DA) und [<sup>3</sup>H]-Noradrenalin (NE) konnte *in vitro* keine kovalente Bindung gezeigt werden. \* $p < 0,05$  TGM2 vs. Kontrolle (ohne TGM); die einzelnen Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt;  $n = 3$ .

### 4.3 Die Monoaminylierung von CREB vermindert die Phosphorylierung durch PKA

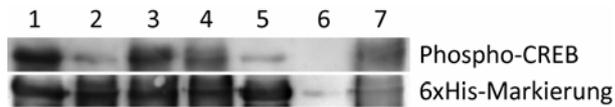
Um den Einfluss einer Serotoninylierung des humanen TF CREB auf die Phosphorylierung durch PKA zu untersuchen, wurde CREB prokaryotisch exprimiert, über eine 6xHis-Markierung aufgereinigt und mit  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP, 5-HT und den Enzymen PKA und TGM2 inkubiert. Das nach der Umsetzung säuregefällte Protein wurde über einen Filter aufgefangen, dieser im Anschluss gewaschen und die  $\beta$ -Strahlung des [ $^{32}$ P] mittels einer Szintillationsflüssigkeit quantifiziert. Die Phosphorylierung durch alleinige PKA-Behandlung wurde als 100 %-Wert gesetzt (Abb. 50). Die Inkubation mit TGM2, d.h. in Abwesenheit von PKA, ohne beide Enzyme oder ohne CREB, zeigte eine geringe Phosphorylierung von etwa 10-15 % im Vergleich zu der Behandlung mit PKA. Wurde nach Serotoninylierung mit TGM2 PKA zugesetzt, konnte lediglich eine Phosphorylierung von 50 % festgestellt werden. Eine Kontrollinkubation in der selben Reihenfolge, aber ohne das Monoaminsubstrat 5-HT, führte ebenfalls zu einer geringeren Phosphorylierung von etwa 65 %, welche jedoch signifikant höher war als die Phosphorylierung des vergleichbaren Ansatzes mit 5-HT.



**Abbildung 50: Die Serotoninylierung des glutaminreichen Transkriptionsfaktors CREB vermindert dessen Phosphorylierung durch Proteinkinase A.** In Filterexperimenten konnte mittels  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-markiertem ATP der Phosphorylierungsgrad des TF CREB quantifiziert werden. Dafür wurde CREB prokaryotisch exprimiert, über die 6xHis-Markierung aufgereinigt und ausschließlich mit PKA oder TGM2 oder zuerst mit PKA (PKA/TGM2) oder mit TGM2 (TGM2/PKA) in Kombination behandelt. Alle Ansätze erfolgten in Anwesenheit von 0,6  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATP und 300  $\mu$ M 5-HT. Die Serotoninylierung von CREB führte zu einer um ca. 50 % verminderten Phosphorylierung. Die Kontrollansätze mit TGM2, ohne Enzyme (-/-) und ohne CREB (-CREB) zeigten einen unspezifischen Hintergrund von etwa 10 %. Bei der Kontrolle ohne 5-HT (-5-HT) ist die Phosphorylierung um ca. 35 % gegenüber PKA-Behandlung erniedrigt, jedoch ist sie um 15 % signifikant höher als die des serotonylierten CREB (TGM2/PKA). Bei den Kontrollen ohne CREB und 5-HT wurde zuerst TGM2 und dann PKA zugegeben. \*p < 0,05 Ansätze vs. PKA; die einzelnen Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt; n = 3.

Der Einfluss der Serotoninylierung des humanen TF CREB auf die Phosphorylierung durch PKA wurde zusätzlich mittels der unabhängigen Methode des Immunoblottings und einem Phospho-CREB-spezifischen Antikörper exemplarisch verifiziert. Die Modifikation von CREB erfolgte dabei

analog zu der radioaktiven Umsetzung des Proteins. Die Phosphorylierung durch alleinige PKA-Behandlung (1) ergab dabei das stärkste Signal einer Phosphorylierung von Ser133. (Abb. 51).

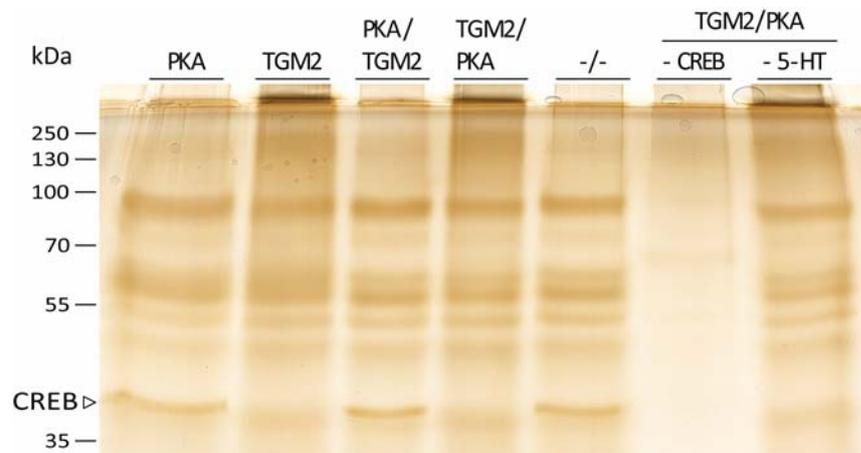


**Abbildung 51: Die Serotonylierung des Transkriptionsfaktors CREB vermindert dessen Phosphorylierung durch Proteinkinase A.** Die exemplarische Wiederholung des Versuchsansatzes

mittels Immunoblottings und Phospho-CREB-spezifischen bestätigt die in den Filterexperimenten gezeigte Abnahme der Phosphorylierung von CREB nach vorheriger Serotonylierung. CREB wurde analog zu Abb. 50 in Anwesenheit von ATP und 5-HT umgesetzt. PKA (1), TGM2 (2), PKA/TGM2 (3), TGM2/PKA (4), -/- (5), -CREB (6) und -5-HT (7).

Die Inkubation mit TGM2 in Abwesenheit von PKA (2) ergab ein vergleichbares geringes Signal wie der Ansatz ohne beide Enzyme (5) und stellt die unspezifische Bindung des Antikörpers an CREB dar. Diese unspezifische Bindung zeigte sich nicht in dem Ansatz ohne CREB (6). Nach Serotonylierung mit TGM2 kam es zu einer stark verminderten Phosphorylierung durch PKA (4). Während die Phosphorylierung durch PKA nur geringfügig abnahm, wenn TGM2 nach der PKA zu dem Ansatz gegeben wurde (3). Eine Kontrollinkubation in der selben Reihenfolge, aber ohne das Monoaminsubstrat 5-HT (7), führte ebenfalls zu einer geringeren Phosphorylierung.

#### 4.3 Die Phosphorylierung von CREB durch PKA vermindert dessen Polymerisierung durch TGM2.



**Abbildung 52: Die Phosphorylierung des glutaminreichen Transkriptionsfaktors CREB vermindert dessen Polymerisierung durch Transglutaminase 2.** Analog zu III.4.3 wurde der prokaryotisch exprimierte humane TF CREB mit PKA und TGM2 in Anwesenheit von 2 mM ATP und 300  $\mu$ M 5-HT umgesetzt. Dafür wurde CREB, über die 6xHis-Markierung aufgereinigt und ausschließlich mit PKA oder TGM2 oder zuerst mit PKA (PKA/TGM2) oder zuerst mit TGM2 (TGM2/PKA) in Kombination behandelt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert. Die Behandlung mit PKA bzw. ohne Enzyme (-/-) führte zu keiner Polymerisierung von CREB. Wurde zuerst TGM2 oder ausschließlich TGM2 zugegeben kam es zur Bildung hochmolekularer Proteinkomplexe, wobei das Proteinsignal auf der Höhe des Molekulargewichts von CREB schwächer wurde. Jedoch führte eine vorangegangene Phosphorylierung durch PKA zu keiner sichtbaren Polymerisierung (PKA/TGM2). Die Probe ohne CREB (-CREB) zeigte keine definierten Proteinsignale.

Aufgrund des Einflusses der Serotonylierung auf die Phosphorylierung von CREB durch PKA wurden Ansätze analog zu Abschn III.4.3 mit ATP und 5-HT durchgeführt. Nach der Umsetzung wurden die Proben über eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Die ausschließlich mit PKA und ohne Enzyme behandelten Proben zeigten keine Abschwächung des Proteinsignals auf Höhe des Molekulargewichts von CREB, im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit TGM2, die zur Polymerisierung von CREB führte (Abb. 52).

Ebenso kam es zur Bildung hochmolekularer Proteinkomplexe, wenn bei Inkubation mit PKA und TGM2 zuerst TGM2 zu CREB gegeben wurde (TGM2/PKA) unabhängig von der Anwesenheit des Monoaminsubstrats 5-HT. Jedoch zeigte sich bei vorangegangener Inkubation und Phosphorylierung durch PKA (PKA/TGM2) keine sichtbare Polymerisierung von CREB. Die Probe ohne CREB (-CREB) zeigte keine erkennbaren Proteinsignale.

## IV Diskussion

### 1 Das Fehlen von peripherem Serotonin aufgrund einer TPH1-Defizienz führt zu einem erhöhten Alkoholkonsum

#### 1.1 *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere nehmen verstärkt Ethanol zu sich

Um zu überprüfen, ob *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu ihren Wildtypartgenossen vermehrt zu der Aufnahme von Ethanol tendieren, wurden *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren mit einem homogenen gemischten genetischen Hintergrund Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen angeboten. Während der ersten Durchführung hatten die Tiere sofort die Wahl zwischen Wasser und der jeweiligen Ethanollösung, während die Tiere beider Genotypen in einem zweiten Ansatz zuvor mit einer 10 %igen Ethanollösung präkonditioniert wurden. *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere tranken ohne Präkonditionierung von den Ethanollösungen aller Konzentrationen höhere Mengen von bis zu 35 % als *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere (Abb. 15), wobei die aufgenommene Menge der Ethanollösung jeweils auf die gesamte aufgenommene Flüssigkeitsmenge normiert wurde. Allgemein nahmen beide Genotypen höhere Volumina der geringer konzentrierten Ethanollösungen zu sich. Die Wiederholung der Anordnung mit einer Präkonditionierung der Tiere für Ethanol und einer Berücksichtigung des Körpergewichts der Tiere bestätigte dieses Ergebnis und verstärkte die Präferenz der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere für die Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen, was sich vor allem bei den höherprozentigen Lösungen zeigte (Abb. 16A und B). *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere nahmen nach Präkonditionierung unverändert geringe Mengen der höherprozentigen Ethanollösungen zu sich, während die Aufnahme der geringer konzentrierten Ethanollösungen im Vergleich zu nicht konditionierten *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren nur noch ein Drittel betrug.

Zusätzlich wurde die Anordnung mit der Präkonditionierung mit *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren wiederholt (Abb. 16C). Hierbei fällt auf, dass die relative Ethanolaufnahme der heterozygoten Tiere, die über acht Generationen auf den Inzuchtstamm C57BL/6J zur Hybridlinie rüchgekreuzt waren, für einzelne Ethanollösungen um bis zu 25 % unter der Aufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere liegt (Abb. 16B), jedoch für die 5-25 %igen Ethanollösungen gegenüber den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren signifikant erhöht ist. Bei der 3 %igen Ethanollösung besteht kein signifikanter Unterschied zwischen *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren. Generell nehmen die *Tph1*<sup>+/+</sup>-Mäuse, welche Tiere des Mausstammes C57BL/6J sind, in dieser Anordnung von allen Ethanollösungen etwa 10 % mehr zu sich, als die *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere mit gemischtem genetischen Hintergrund in der Anordnung mit den *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren. Diese Beobachtung kann mit dem genetischen Hintergrund der jeweiligen Wildtyp-tiere erklärt werden. In der ersten Anordnung mit Präkonditionierung kamen bei beiden Geno-

typen Tiere mit homogenen gemischten genetischen Hintergrund zum Einsatz. Bei der zweiten Anordnung wurden den heterozygoten Tieren, die über acht Generationen mit dem Inzuchtstamm C57BL/6J rüchgekreuzt waren, als Vergleich Tiere des Stammes C57BL/6J gegenübergestellt. Tiere dieses Mausstammes weisen in verschiedenen Ansätzen eine erhöhte Ethanolpräferenz und -konsum auf als Tiere anderer Linien [449,465]. Interessanterweise nehmen *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tiere im Vergleich zu *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren anteilig zwar weniger der Ethanollösungen zu sich, was sich v.a. bei den 3-15 %igen Lösungen zeigt (Abb. 16B und C). Jedoch liegt der Konsum der heterozygoten Tiere signifikant über dem der *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tiere. Das Fehlen eines Allels von *Tph1* führt also bereits zu einer erhöhten freiwilligen Ethanolaufnahme. Diese Beobachtung spricht dafür, dass sich die Präferenz für Ethanollösungen auf den Gendefekt zurückführen lässt und nicht auf genetischen Hintergrund der *Tph1*<sup>+/-</sup>- oder *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere. *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tiere weisen dabei im Blut 50 % der 5-HT-Spiegel der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Kontrolltiere des Stammes C57BL/6J auf (unveröffentlichte Daten, Diego J. Walther).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Verringerung von peripherem 5-HT in diesem Tiermodell zu einem signifikant erhöhten Ethanolkonsum führt. Diese Erhöhung zeigt sich sowohl bei den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren mit einem homogen gemischten genetischen Hintergrund, und das sowohl nach Konditionierung als auch im naiven Zustand, als auch bei heterozygoten Tieren nach der Präkonditionierung. Dieses Ergebnis deckt sich mit Studien an verschiedenen humanen ethnischen Gruppen, die Polymorphismen der peripheren Form des Enzyms TPH, TPH1 direkt mit einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung eines Alkoholismus und außerdem mit einem frühen Eintrittsalter in die Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang bringen [434–436]. Zusätzlich gibt es humane und murine Genkopplungsstudien, die eine erhöhte Ethanolpräferenz mit den Chromosomenabschnitten in Verbindung bringen, auf denen jeweils *TPH1* (11p15) bzw. *Tph1* (7qB4) liegen [432,433,466]. Interessanterweise finden sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen Alkoholikern nahezu halbierte 5-HT-Spiegel in den Thrombocyten, die den Hauptspeicherort für peripheres 5-HT darstellen [19,467,468]. Somit scheint neben einem verringerten 5-HT- und 5-HIAA-Spiegel im ZNS und der veränderten serotonergen Neurotransmission [437], gekennzeichnet durch verringerte Affinitäten zu SERT und 5HTR [469,470], auch die Aktivität von TPH1 und damit die 5-HT-Konzentration in der Peripherie eine Rolle bei der Entwicklung eines Alkoholismus spielen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass aufgrund der geringeren TPH1-Aktivität auch die Spiegel des aus 5-HT entstehenden Melatonins in der Epiphyse verringert sind [435]. Es wurde gezeigt, dass gewisse Phasen des zirkadianen Rhythmus die Tendenz Ethanol zu konsumieren verstärken und Alkoholiker verringerte Spiegel an sekretiertem Melatonin im Blut aufweisen [471,472].

Jedoch zeigten sich in einer anderen Studie auch erhöhte Melatoninspiegel im Urin von Patienten mit Alkoholismus [473]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt in ALDH2, dem gemeinsamen Enzym im Katabolismus von 5-HT und Ethanol (Absch. I.1.2 bzw. I.2.1.1). ALDH2 entgiftet zum einen den Körper nach Ethanolkonsum, indem es Acetaldehyd in Essigsäure umsetzt [13]. Zum anderen ist ALDH2 am Abbau von 5-HT beteiligt [92], wo es 5-HIAL in 5-HIAA umsetzt. Da *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere nur sehr geringe Mengen an 5-HT in der Peripherie aufweisen [72], könnte das fehlende Substrat 5-HT für einen schnelleren Abbau des Ethanols durch ALDH2 und damit einer geringeren Toxizität des Alkohols sorgen. Des Weiteren würde die kompetitive Hemmung der ALDH2 durch Ethanol zu einem verzögerten Katabolismus des 5-HT und hierbei insbesondere zu einer Anreicherung von 5-HIAL führen [92,474], welches teilweise das Fehlen des Monoamins kompensieren könnte. Es hat sich außerdem gezeigt, dass auch die ADH im Metabolismus von 5-HT und Ethanol eine Rolle spielt [475]. Die kompetitive Inhibition der ALDH2 durch Acetaldehyd und einem erhöhten NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis führt zu einer Verschiebung des 5-HT-Abbaus: An Stelle der Oxidation von 5-HIAL zu 5-HIAA dominiert ein reduktiver Katabolismus, der zur Umformung des 5-HIAL in 5-Hydroxytryptophol (5-HTOL) führt. Die Reoxidierung von 5-HTOL durch ADH wird ebenfalls durch Ethanol gehemmt. Dieser reduktive Abbau findet neben der Leber auch in Niere, Lunge, Magen und Dickdarm statt.

Bei der Konditionierung beider Genotypen mit 10 %iger Ethanollösung fiel auf, dass *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tiere mit 0,156 mL/g Körpergewicht signifikant mehr Flüssigkeit zu sich nahmen, als *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere mit 0,117 mL/g Körpergewicht (Abb. 17). Nicht überraschend war die Tatsache, dass beide Genotypen das Gesamtvolumen an Flüssigkeit reduzierten, wenn ihnen nur 10 %ige Ethanollösung zur Verfügung stand. Jedoch ging die Aufnahme von Flüssigkeit bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren um 21 % und bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren nur um 8 % zurück. Die insgesamt verringerte Flüssigkeitszufuhr der *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere lässt sich nicht über die teilweise Regulation der Urinausscheidung und Wasseraufnahme durch den 5HTR1A erklären [476]. Agonisten dieses Rezeptortyps blockieren die Wasseraufnahme, wodurch das fehlende 5-HT in *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren den gegenteiligen Effekt haben würde. Die geringere Flüssigkeitsreduktion der *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere bei Konsum der 10 %igen Ethanollösung könnte daran liegen, dass die Tiere ohnehin weniger Flüssigkeit zu sich nehmen und es sich daher um die minimale Menge Flüssigkeit handelt, die die Tiere benötigen. Weiterhin könnten die oben genannten Gründe, die dazu beitragen würden, dass *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere den Ethanolkonsum besser vertragen bzw. zur teilweisen Kompensation des fehlenden 5-HT führen [92,474], die Tiere dazu veranlassen, die Aufnahme des Ethanols zu einem geringeren Teil zu reduzieren.

Zur Überprüfung, dass der gemischte genetische Hintergrund der *Tph1<sup>+/+</sup>*- und *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere keiner genetischen Drift unterliegt, sollte untersucht werden, ob es einen Unterschied in der Geschmackspräferenz der verwendeten Genotypen für die Geschmacksrichtungen süß, sauer und

bitter gibt. Eine solche Genotyp-spezifische Präferenz wurde bereits für verschiedene Mauslinien beschrieben [449–451]. Weiterhin ist bekannt, dass im Menschen und in der Ratte eine geringe Sensitivität gegenüber bitterem Geschmack mit einer vermehrten Aufnahme von Ethanol assoziiert ist [449]. Bei Verwendung einer süßen 1 %igen Saccharoselösung zeigte sich eine um 8 % verstärkte Präferenz der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere, die für die 3 %ige Lösung nicht bestätigt werden konnte (Abb. 18). Die salzige NaCl-Lösung wurde bei einer Konzentration von 75 mM durch beide Genotypen gleichermaßen aufgenommen, während die 150 mM Lösung wiederum um 15 % vermehrt von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren getrunken wurde. Bei den sauren Zitronensäurelösungen zeigte sich kein Unterschied in der Präferenz durch die beiden verwendeten Genotypen.

Die Abklärung einer potenziell bestehenden unterschiedlichen Geschmackspräferenz lässt direkte Schlüsse auf die Homogenität des gemischten genetischen Hintergrundes der verwendeten Tiere zu. Diverse Studien zeigen, dass für verschiedene Mauslinien unterschiedliche Geschmackspräferenzen in den Richtungen süß, salzig, sauer, bitter, aber auch für Capsaicin oder Ethanol bestehen [449,465]. Hierbei decken Tiere des Stammes C57BL/6J 80 % ihres Gesamtflüssigkeitsbedarfs mit einer 1 %igen Saccharoselösung und 97 % mit einer 3 %igen Lösung [449]. Bei Tieren des Stammes 129/SvEvBrd liegt der Anteil dieser Lösungen am Gesamtbedarf mit 62 % und 70 % signifikant darunter. *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere liegen somit bei der 1 %igen Saccharoselösung mit einer Aufnahme von 80 % auf dem Niveau des Stammes C57BL/6J, während *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zwischen der prozentualen Flüssigkeitsaufnahme beider Mausstämme liegen. Bei der 3 %igen Lösung liegen beide Genotypen mit 80-85 % zwischen den beobachteten Flüssigkeitsaufnahmen der Stämme C57BL/6J und 129/SvEvBrd. Bei den 75 mM und 150 mM NaCl-Lösungen decken Tiere des Stammes C57BL/6J 38 % ihres Gesamtflüssigkeitsbedarfs mit der geringer konzentrierten Salzlösung und 22 % mit der höher konzentrierten Lösung [449]. Bei den Tieren des Stammes 129/SvEvBrd liegt der Anteil dieser Lösungen am Gesamtbedarf mit 60 % und 56 % signifikant darüber. Beide untersuchte Genotypen liegen somit bei der 75 mM NaCl-Lösung mit einer Aufnahme von 52-55 % ihres Gesamtflüssigkeitsbedarfs zwischen den genannten Mausstämmen, aber näher an 129/SvEvBrd. Bei der 150 mM Lösung liegen *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere mit einer Aufnahme von 57 % auf dem Niveau des Stammes 129/SvEvBrd, während *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zwischen der prozentualen Flüssigkeitsaufnahme beider Mausstämme liegen.

Bei der Untersuchung einer möglichen Geschmackspräferenz gegenüber saurem Geschmack zeigte sich kein Unterschied zwischen *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren. Beide Genotypen deckten mit der 0,01; 0,1 und 1 mM Zitronensäurelösung 48-58 % ihres Gesamtflüssigkeitsbedarfs. Bei Tieren des Stammes 129/SvEvBrd sind es entsprechend ca. 75 %, 70 % und 62 %, während Tiere des Stammes C57BL/6J mit ca. 90 %, 88 % und 81 % signifikant darüber liegen. Damit nehmen die *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit gemischtem genetischen Hintergrund prozentual weniger von allen

verwendeten Zitronensäurelösungen zu sich, wie die zur Zucht verwendeten Ursprungsstämme. *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere unterscheiden sich somit nur leicht in der Präferenz einzelner Konzentrationen der Geschmacksrichtung süß und salzig, jedoch zeigt sich keine eindeutige Zuordnung eines Genotypen zu einem der zur Zucht verwendeten Stämme C57BL/6J und 129/SvEvBrd. Dadurch kann bei den verwendeten *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren von einem homogen gemischten genetischen Hintergrund ausgegangen werden.

## 1.2 Die Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan verringert die erhöhte Ethanolaufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere

*Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere des Stammes C57BL/6J ohne Zugang zu 5-HTP zeigten nach der Konditionierung einen gleichmäßigen Konsum der 10 %igen Ethanollösung von etwa 10 % der Gesamtflüssigkeitsaufnahme (Abb. 19 A). Diese Beobachtung deckt sich mit der Flüssigkeitsaufnahme der Wildtyp-tiere, die einen homogenen gemischten genetischen Hintergrund aufwiesen (Abb. 16B), obwohl Tiere des Mausstammes C57BL/6J einen erhöhten Ethanolkonsum gegenüber anderen Linien wie 129/SvEvBrd aufweisen [449,465]. Während der Supplementierung mit 3 % Saccharose stieg die Menge der aufgenommenen Ethanollösung um 5 %. Demgegenüber stieg der Anteil der Ethanollösung an der Gesamtflüssigkeitsmenge mit Gabe von 5-HTP um 50 % (Abb. 19 B). Obwohl bekannt ist, dass manche Mauslinien Ethanol nur aufnehmen, wenn der Geruch von dem des Zuckers überlagert wird und dass die Zugabe von Saccharose zu einem Anstieg des Ethanolkonsums um das Zwei- bis Dreifache führt [465], scheint es eine nicht zu erklärende Diskrepanz zwischen den Tieren ohne und mit 5-HTP-Supplementierung zu geben. Die Zugabe des 5-HTP alleine führt hier bereits zu einem Anstieg der Ethanolaufnahme, der sich damit erklären ließe, dass die Tiere den bitteren Geschmack des 5-HTP meiden, welcher teilweise durch den für Mäuse süßen Geschmack des Ethanols überdeckt wird [449,465]. Eventuell können die Tiere aufgrund des bitteren und süßen Geschmacks bzw. Geruchs nicht mehr zwischen Wasser und Ethanollösung unterscheiden und konsumieren daher beides zu gleichen Teilen, sobald Saccharose zugesetzt wird. Nach Entfernung beider Additiva aus dem Wasser kehrten die *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere zu dem vorigen Verhältnis von Wasser- und Ethanolzufuhr zurück.

*Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die keinen Zugang zu 5-HTP hatten, nahmen während der Versuchszeit eine relativ konstante Menge der 10 %igen Ethanollösung zwischen 30 % und 45 % der Gesamtflüssigkeitsmenge auf (Abb. 20 A). Damit liegt der Konsum der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere, die über elf Generationen mit dem Inzuchtstamm C57BL/6J zur Hybridlinie rückgekreuzt waren, unter dem der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit homogen gemischten genetischen Hintergrund, obwohl der Stamm C57BL/6J in verschiedenen Versuchsdurchführungen eine höhere Präferenz für Alkohol gezeigt hat als andere Mausstämme [449,465]. Analog zu den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren veränderte sich die aufgenommene Ethanolmenge nach

Zugabe der Saccharose nur geringfügig. Mit Gabe von 5-HTP kam es hier wiederum zu einem Anstieg des Ethanolkonsums auf bis zu 87 %, der nach Wegfall der Saccharose und 5-HTP aus der Wasserflasche auf einen Wert von 10 % absank (Abb. 20 B). Der Anstieg des Ethanolkonsums nach Supplementierung ließe sich erneut mit einer Aversion gegen bitteren Geschmack erklären. Nach Entfernen dieses Geschmacks aus der Flasche mit Wasser sank die Ethanolaufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere in einem Zeitraum von ca. 30 Tagen fast auf das Niveau der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere ab (Abb. 21). Dieser Abfall könnte mit steigenden peripheren Spiegeln an 5-HT zu tun haben, die mittels AADC aus 5-HTP unabhängig von TPH1 gebildet werden [71], da die orale Verabreichung die peripheren 5-HT-Spiegel signifikant erhöht [477]. Ein in Folge dessen gesteigerter Abbau des biogenen Monoamins resultiert in einer kompetitiven Hemmung der ALDH2, was wiederum zu einem verringerten Abbau des Ethanols und damit zu einer verstärkten Intoxikation führt [13,92]. Die langsame Abnahme des Ethanolkonsums spricht für einen pharmakologischen Effekt, bei dem der Wirkstoff zuerst akkumulieren muss, bevor er seine Wirkung entfalten kann. Auch in genetisch unveränderten Ratten führt die Gabe von 5-HTP zu einem Rückgang des Ethanolkonsums, der auf erhöhte 5-HT-Spiegel im Striatum und frontalen Kortex zurückgeführt wurde und durch die simultane Verabreichung des Neurostimulans Phentermin noch verstärkt werden konnte [478].

### **1.3 Die Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan reduziert das Körpergewicht der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere**

Während der Behandlung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere fiel auf, dass sich das um durchschnittlich 6,5 g erhöhte Körpergewicht des *Tph1*<sup>-/-</sup>-Kollektivs, das mit 5-HTP supplementiert wurde, an das Gewicht der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere annäherte und sich am Ende der Versuchszeit nicht mehr signifikant von diesem unterschied (Abb. 22). *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere haben aufgrund einer gesteigerten Futteraufnahme im Durchschnitt ein höheres Körpergewicht als *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere [87]. Außerdem zeigen erstere eine gestörte Insulinsekretion und dadurch eine Hyperglykämie, die beide durch die Verabreichung von 5-HTP normalisiert werden. Die anorektische Wirkung von 5-HTP ist seit Jahrzehnten bekannt und teilweise auf einen zentralnervösen Effekt des pharmakologisch erhöhten 5-HT zurückzuführen [477,479].

Zusätzlich zu dem 5-HT-Vorläufermolekül werden auch unterschiedliche selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer und 5HT<sub>1A</sub>-Agonisten auf ihre appetitzügelnde Wirkung hin untersucht und verwendet [480]. Da die intraperitoneale Gabe von 5-HT, das die Blut-Hirn-Schranke im Gegensatz zu 5-HTP nicht überwinden kann, ebenfalls anorektisch wirkt, muss auch das serotonerge System der Peripherie an diesem Effekt beteiligt sein [448]. So ist z.B. bekannt, dass eine Dehnung des Magens, die mit einem Sättigungsgefühl einhergeht, zu einer Ausschüttung von 5-HT durch die enterochromaffinen Zellen der Magenwand führt [481]. Das so in den Blutkreislauf gelangte 5-HT

bewirkt über den *Nervus vagus* eine Stimulation von Gehirnarealen, die an der Appetitregulation beteiligt sind [482]. Des Weiteren könnte die verminderte Insulinsekretion der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere eine vermehrte Nahrungsaufnahme bedingen. Insulin wirkt zum einen indirekt anorektisch über seine hypoglykämische Funktion und außerdem direkt über die Bindung von Insulinrezeptoren [483]. Die 5-HTP-induzierte Anreicherung von 5-HT in der Peripherie der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere würde die beschriebenen Effekte und damit die Nahrungsaufnahme normalisieren und somit zu den beobachteten Gewichtsverlusten führen.

Der Gewichtsverlust lässt sich nicht auf eine direkte Wirkung von Ethanol zurückführen, da es bei *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren ohne Zugang zu 5-HTP zu keiner Abnahme des Körpergewichts kam (Abb. 22). Interessanterweise hat sich gezeigt, dass obwohl Alkoholiker eine im Durchschnitt um 16 % erhöhte Kalorienzufuhr aufweisen, sie im Vergleich zu Nichttrinkern keinen veränderten Body-Mass-Index aufweisen [3]. Daher wird gestützt durch mehrere Studien davon ausgegangen, dass es bei einer Aufnahme von hohen Alkoholmengen von 40-60 % der Gesamtkalorienzufuhr zu einer verminderten Verwendung der vom Ethanol stammenden Kalorien kommt. Des Weiteren verursachen Ethanol und Acetaldehyd einen zellulären Verlust von Proteinen, der dann einen weiteren Verlust von cytoplasmatischem Wasser, Mineralien und Elektrolyten mit sich bringt und bei langem, chronischen Alkoholmissbrauch sogar zu einem Verlust von Körpergewicht führt. Die tendenzielle Gewichtszunahme des *Tph1*<sup>+/+</sup>-Kollektivs (Abb. 22 B), die nur etwa 10 % der Gesamtflüssigkeitsaufnahme mit einer 10 %igen Ethanollösung deckten (Abb. 19 A), könnte jedoch auf die erhöhte Kalorienzufuhr durch den täglichen Ethanolkonsum zurückzuführen sein.

#### **1.4 Die erhöhte Ethanolaufnahme der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere ist nicht auf den genetischen Hintergrund zurückzuführen**

Um zu überprüfen, ob der gemischte genetische Hintergrund der verwendeten *M. musculus*-Linie Kl19, welche aus einer Kreuzung der Linien 129/SvEvBrd und C57BL/6J besteht, einen Einfluss auf die erhöhte Ethanolaufnahme nimmt, wurde dieser mittels unterschiedlicher genetischer Variationstypen in der Umgebung von *Tph1* untersucht. Der genetische Hintergrund ist v.a. im Hinblick darauf wichtig, dass Tiere der Linie C57BL/6J gegenüber denen der Linie 129/SvEvBrd eine erhöhte Ethanolpräferenz und -konsum aufweisen [449,465]. Außerdem bevorzugen Tiere der Linie C57BL/6J süßen und sauren Geschmack und lehnen die salzige Geschmacksrichtung ab (Absch. IV.1.1).

Die Untersuchung der RFLP und SNP in der Umgebung der *Tph1* auf Chromosom 7 zeigte nach der Rückkreuzung auf den Inzuchtstamm C57BL/6J über elf Generationen für *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere vollständig den genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6J (Abb. 23), während *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere nur zwischen

308 kb *upstream* und 6 kb *downstream* den Genotyp der Linie 129/SvEvBrd aufwiesen (Abb. 23-25/Tabelle 7). Diese starke Eingrenzung auf den genetischen Hintergrund der Linie C57BL/6J verdeutlicht, dass die erhöhte freiwillige Selbstverabreichung von Ethanol auf den eingeführten Gendefekt der Tiere zurückzuführen ist. Des Weiteren gibt es in der Literatur keine Korrelation mit den auf diesem Chromosomenabschnitt befindlichen Genen *Kcnc1*, *Sergef*, *Hps5*, *Gtf2h1* und dem Gencluster *Saa* und einem erhöhten Ethanolkonsum (Abb. 24). *Kcnc1* und *Sergef* kodieren einen spannungsabhängigen Kaliumkanal und einen GTP-Austauschfaktor [452,453]. Die Serumamyloid A (*Saa*)-Gene kodieren allesamt für Apolipoproteine. Der Cluster enthält mit *Saal1* ein vermeintliches Pseudogen, das jedoch an der Entwicklung einer Synovitis, einer Entzündung der inneren Schicht der Gelenkkapsel, beteiligt zu sein scheint [454,455]. Bei *Hps5* und *Gtf2h1* handelt es sich zum einen um ein Integrin-bindendes Protein, das an der Bildung von Lysosomen beteiligt ist und zum anderen um eine Komponente des TFIID-Komplexes, der für die basale Transkription benötigt wird [456,457]. Damit lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, dass die phänotypischen Beobachtungen auf Unterschiede in den genannten Genen zurückzuführen sind, wodurch die Rolle der Polymorphismen von *Tph1* bzw. *TPH1* in der Ätiologie des Alkoholismus unterstrichen wird [434–436]. Weitere Rückkreuzungen werden in Zukunft zu einer Eingrenzung des Hintergrundes der Linie 129/SvEvBrd auf einen kleineren Bereich um *Tph1* und damit zu einer noch besseren Vergleichbarkeit beider Genotypen führen [445].

### **1.5 *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere weisen Leberschäden auf, welche durch den kurzzeitigen Ethanolkonsum nicht verstärkt werden**

Die Untersuchung verschiedener serologisch-klinischer Parameter des Blutes lässt Rückschlüsse auf die Konstitution des Gesamtorganismus aber auch einzelner Organe zu. Der Vergleich der Blutwerte der *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigte bereits in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren erhöhte Werte der Serumproteine inklusive Serumalbumin und der Enzyme ALT, AST und GLDH [448], die allesamt auf eine Schädigung der Leber hinweisen [1,458]. Der erhöhte Wert des Serumalbumins spricht allerdings gegen einen starken Leberschaden, da dieser meist mit einem Abfall des Plasmaalbuminspiegels assoziiert ist, welcher auf eine beeinträchtigte Synthese und Sekretion des Proteins durch die geschädigte Leber zurückzuführen ist [3]. Die Blutkonzentrationen des Cholesterins und der Triglyceride, die ebenfalls für einen Leberschaden sprechen, sind jedoch gegenüber denen der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere unverändert. Diese Befunde decken sich mit anderen Untersuchungen, die zeigen, dass *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere eine gestörte Fähigkeit zur Leberregeneration aufweisen, die durch Supplementierung mit 5-HTP wiederhergestellt werden kann und durch 5HTR2A und 5HTR2B vermittelt wird [19]. Die mitogene Wirkung von 5-HT und dessen Einfluss auf die Proliferation von Hepatocyten ist bereits seit längerer Zeit bekannt [63,484]. Auch in einem Rattenmodell, in welchem eine

Leberzirrhose induziert wurde, zeigten sich während der Regeneration erhöhte 5-HT-Spiegel in der Leber, die mit einer Aktivierung von 5HTR2A und 5HTR2B einhergingen [485]. Weiterhin weisen Patienten mit einer Leberzirrhose einen gestörten 5-HT-Metabolismus auf, der sich über einen erhöhten Plasmaspiegel an 5-HT und einen verminderten 5-HIAA-Spiegel zeigt [486].

Die 11-wöchige Selbstverabreichung einer 10 %igen Ethanollösung führte bei den *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren zu keiner Erhöhung der leberrelevanten Werte [448]. Jedoch war der Triglyceridspiegel gegenüber den Tieren ohne Zugang zu Ethanol fast halbiert. Dieser Unterschied könnte auf den genetischen Hintergrund der Tiere zurückzuführen sein. Die in der Literatur verwendeten Tiere wiesen einen homogen gemischten genetischen Hintergrund der Mausstämme 129/SvEvBrd und C57BL/6J auf, während die in dieser Arbeit für die Blutparameteranalyse verwendeten Tiere über elf Generationen mit dem Inzuchtstamm C57BL/6J zur Hybridlinie rückgekreuzt waren (Absch. II.6.2). Jedoch kann diese Annahme nicht durch eine Literaturangabe gestützt werden, da keine vergleichende Untersuchung der Bluttriglyceridspiegel unterschiedlicher Mausstämme zu finden war. Auch *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere wiesen nach Ethanolkonsum keine Verstärkung der Werte auf, die auf einen Leberschaden hindeuten, jedoch zeigten sich hier weiterhin erhöhte Werte der Serumproteine, AST und Triglyceride gegenüber *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren (Tabelle 8).

*Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere zeigten nach Gabe von 5-HTP übereinstimmend mit der mitogenen Wirkung des 5-HT auf die Leber [19] eine Normalisierung der Spiegel an Gesamtprotein, Serumalbumin, der leberrelevanten Enzyme und des Cholesterins und der Triglyceride. Jedoch war der Blutglukosespiegel bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren generell höher als bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren und es kam durch die Behandlung mit 5-HTP zu einem signifikanten Anstieg der Glukosemenge im Blut, der bei *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren nicht zu beobachten war. Dieser Befund widerspricht der Annahme, dass 5-HT die Insulinsekretion fördert und eine Behandlung mit 5-HTP die Hyperglykämie der *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tiere aufhebt [87]. Er steht jedoch im Einklang mit der widersprüchlichen Beobachtung, dass peripheres 5-HT über den 5HTR1 im Menschen und in der Maus eine kurzfristige Hyperglykämie verursacht [87,487]. Neben der Abnahme der Cholesterin- und Triglyceridwerte in *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren, zeigten auch *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tieren einen signifikanten Rückgang des Cholesterinspiegels. Peripheres 5-HT spielt bekanntermaßen neben dem Einfluss auf die Glukosehomöostase auch eine Rolle im Lipidmetabolismus und senkt sowohl die Spiegel von Triglyceriden, wie FFA und Cholesterin in verschiedenen Studien [88]. Diese Wirkung scheint über unterschiedliche 5HTR realisiert zu werden, wodurch 5-HT den Transport, die Anreicherung und die Aufnahme der Lipide in verschiedene Gewebe reguliert.

Die erhöhten Harnstoffwerte der *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tiere nach 5-HTP-Gabe könnten mit einem vermehrten Abbau des stickstoffhaltigen Tryptophanmetaboliten 5-HTP im Zusammenhang stehen. Dieser könnte bei den *Tph1<sup>+/+</sup>*-Tiere sofort katabolisiert werden, während 5-HTP bei *Tph1<sup>-/-</sup>*-Tieren zuerst

zu 5-HT verstoffwechselt und dann nach dem physiologischen Einsatz sukzessive abgebaut wird [488]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Dauer des Alkoholkonsums zu kurz war, um in beiden Genotypen Leberschäden zu induzieren. Die erhöhten leberrelevanten Blutwerte ließen sich jedoch durch 5-HTP abschwächen, was die Substanz zu einem potenziellen Therapeutikum für ernährungs- oder alkoholbedingte Leberschäden macht [7].

### **1.6 Der Einfluss verschiedener biogener Monoamine auf die Proliferation unterschiedlicher Hepatocytzelllinien**

Um der molekularen Ursache der mitogenen Wirkung von 5-HT auf Hepatocyten *in vivo* auf den Grund zu gehen [19,485], wurden unterschiedliche Hepatocytzelllinien *in vitro* mit 5-HT behandelt und die Proliferation der Zellen über die mitochondriale Aktivität quantifiziert. Bei der Betrachtung der drei Zelllinien HepG2, Huh7 und SK-Hep1 zeigt sich ein proliferationshemmender Effekt von 5-HT für HepG2 und kein Effekt oder nur eine die höchste Konzentration von 100 mM betreffende Proliferationshemmung für Huh7 (Abb. 26). Für SK-Hep1 hatten 10 und 100 nM einen proliferationssteigernden und 10 und 100 mM einen -inhibierenden Effekt. Dieser gegenteilige Effekt macht deutlich, dass sich selbst Tumorzelllinien eines gemeinsamen Ursprungszelltypen wie z.B. Hepatocyten, durch unterschiedliche Mutationen ihres Genoms stark in der Reaktion auf einen bestimmten Stimulus unterscheiden können [489]. Die Wirkung des 5-HT übersteigt jedoch in keinem der Fälle 10 % Unterschied gegenüber der Proliferation des Kontrollansatzes, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass die verwendeten Tumorzelllinien zum einen maximal proliferieren oder einer gestörten Zellzyklusregulation unterliegen [490,491]. Zum anderen befinden sich die vereinzelt Zellen unter Kulturbedingungen nicht im physiologischen Gewebeverbund, wodurch komplementierende Stimuli zur Proliferation fehlen könnten. Aus diesem Grund wurde die Wirkung von 5-HT auf HSC in einem analogen Versuchsansatz betrachtet. HSC produzieren u.a. den Wachstumsfaktor HGF, welcher proliferationssteigernd auf Hepatocyten wirkt [41]. 5-HT hatte jedoch die Proliferation betreffend auf die HSC-Zelllinie LX2 keine signifikante Wirkung (Abb. 27), was gleichfalls mit den oben genannten Eigenschaften einer Tumorzelllinie erklärbar wäre. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass im diesem *in vitro*-Modell Komponenten fehlen, die mit 5-HT synergistisch das Wachstumssignal für Hepatocyten geben. So sind im Mausmodell neben dem aus Thrombocyten stammenden 5-HT, auch eingewanderte Leukocyten und Kuppferzellen und deren Ausschüttung von TNF $\alpha$  und IL 6 für die initiale und maximale Hepatocytenproliferation notwendig [19].

Um auszuschließen, dass die mitochondriale Aktivität, die hier als Messgröße herangezogen wurde, die gemessenen Proliferationsraten der Zellen verfälscht, wurden HepG2-Kulturen exemplarisch mit 5-HT behandelt und die Proliferation im Anschluss über die DNA-Menge quantifiziert.

Für die niedrigen Konzentrationen bestätigte sich die Hemmung der Proliferation, die beiden höchsten 5-HT-Konzentrationen hatten jedoch im Gegensatz zur oben diskutierten Messung eine proliferationssteigernde Wirkung (Abb. 28).

Da bekannt ist, dass sich der TF SP1 durch die transkriptionelle Kontrolle verschiedener Cytokine und MET positiv auf die Proliferation von Hepatocyten auswirkt, wurden HepG2-Zellen transient mit einem Expressionsvektor für diesen TF transfiziert [40,187]. Die Proliferationssteigerung lag wiederum nur bei 16 % (Abb. 29), bestätigte jedoch, dass die angewendete Methode dazu geeignet ist mitogene Effekte auf Hepatocyten zu analysieren. Daher wurde im Anschluss überprüft, ob sich Ethanol direkt auf die Proliferation von Hepatocyten und HSC auswirkt. Sowohl die Quantifizierung über die mitochondriale Aktivität, wie über den DNA-Gehalt der Zellen ergab keine signifikante Auswirkung oder zeigte tendenziell und für eine Konzentration signifikant eine proliferationssteigernde Wirkung von Ethanol (Abb. 30/31). Dieses Modell könnte für die Untersuchung langfristiger Folgen des Alkoholkonsums nicht geeignet sein, da die Zellen dem Ethanol hierbei nur 48 h ausgesetzt sind. Obwohl die angewendeten Konzentrationen mit bis zu 58 ‰ (100 mM) größtenteils auch pathologische Blutalkoholkonzentrationen stark übersteigen, zeigten diese keinen Effekt. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass Tumorzellen gegenüber apoptotischen Signalen relativ inert sind und selbst hohe Konzentrationen eines Zellgiftes die Zellen nicht in den Zelltod treiben können [492]. Dem gegenüber steht eine Studie, die zeigt, dass es in HepG2 nach Behandlung mit 100 mM Ethanol zu einer Aktivierung von TGM2, Polymerisierung von SP1 und erhöhten Apoptose kommt [209]. Dieser Effekt zeigte sich auch in murinen Hepatocyten, die aus Ratten mit chronischem Alkoholkonsum isoliert wurden [12]. Durch die erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies und NADH, welche auf die Aktivität von ALDH2 zurückzuführen ist, sind die Zellen mitochondrialen Stress ausgesetzt, der die Apoptose einleitet. Außerdem kommt es durch Ethanol zu einer erhöhten Expression des FAS-Liganden CD95, was ebenfalls zur Apoptose führt. CYP2E1 spielte in diesem Zusammenhang keine Rolle.

Neben 5-HT wurden auch die biogenen Monoamine DA und NE auf einen mitogenen Einfluss gegenüber Hepatocyten überprüft. Von peripherem DA ist bisher keine direkte physiologische Wirkung auf die Leber bekannt. Jedoch wird DA direkt im Verdauungstrakt und der Niere synthetisiert und wirkt dort auf die Natriumausscheidung durch die Niere, beeinflusst die Beweglichkeit des Darms und reguliert die Säuresekretion des Magens [110,111]. NE erhöht in einem Konzentrationsbereich von 10 nM bis 100 µM als Komitogen von EGF direkt die Proliferation primärer Hepatocyten [493]. Dieser Effekt wird teilweise über die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivierung von ERK1/2 realisiert, die durch NE und Prostaglandin F<sub>2</sub>α initiiert werden kann [494]. Die proliferationssteigernde Wirkung von 10 nM bis 1 µM NE konnte im Rahmen dieser Arbeit für HepG2 bestätigt werden (Abb. 32), jedoch hatten 100 µM NE einen inhibierenden Effekt.

Interessanterweise scheint Ethanol Vorläufermolekül in einem neuartigen NE-Syntheseweg zu sein [494]. Daher erhöht der Konsum von Ethanol den endogenen NE-Spiegel und dieses könnte durch seinen Effekt auf die Leberproliferation und einer anhaltenden Zellteilung zu den alkohol-induzierten Leberschäden beitragen. Auch DA erhöhte bei HepG2 die Proliferation, während die höchste Konzentration wiederum zu einem starken Rückgang der Zellzahl führte. Bei der HSC-Linie LX2 führte DA mit Ausnahme von 10  $\mu\text{M}$  zu keiner eindeutigen Proliferationssteigerung, jedoch war erneut ein wachstumsinhibierender Effekt durch die höchste Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zu beobachten. Diese konstant zu beobachtende Zytotoxizität durch hohe Konzentrationen an Katecholaminen könnte sich auf oxidativen Stress zurückführen lassen, der bereits für Melanocyten und DA beschrieben wurde [495]. Hier löste eine Behandlung mit DA eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und über Aktivierung von Caspase 3 und Poly(ADP-ribose)-Polymerase die Apoptose der Zellen aus. Weiterhin bildet DA in Neuronen und anderen Zellen Chinon-Oxidationsprodukte, die zu einer mitochondrialen Dysfunktion und über Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 ebenfalls zur Apoptose führen können [496].

Allgemein stellt sich die Frage, ob Tumorzelllinien grundsätzlich für die Verwendung in Proliferationsstudien oder die Betrachtung komplexerer Vorgänge eines Organs geeignet sind. Zum einen besteht ein Organ wie die Leber aus unterschiedlichen Zelltypen, die über Cytokine und die extrazelluläre Matrix kommunizieren [496]. Die dreidimensionale Anordnung der Zellen ist in Kultur nicht gegeben und die Position der Zellen innerhalb der Leber hat sich für die Funktionalität des Organs als entscheidend herausgestellt. Zum anderen weisen die hepatischen Tumorzelllinien aufgrund der genomischen Mutationen gegenüber primären Hepatocyten eine stark veränderte Genexpression auf, die zusätzlich zu Unterschieden in den Reaktionen dieser Zellen führt [497]. Da in Zellkulturen systematisch bedingt meist hochproliferative Zellen selektiert werden, repräsentieren heute verwendete Zelllinien nicht notwendigerweise die physiologischen Eigenschaften der ursprünglichen Zelltypen.

## **2 Der molekulare Hintergrund der erhöhten Ethanolaufnahme und der gestörten Leberregeneration der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere**

### **2.1 Die periphere Serotonindefizienz führt in der Leber zur Deregulation verschiedener Gene des Ethanolmetabolismus und der Leberregeneration**

Zur Darlegung differentiell exprimierter Gene in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere im Vergleich zu den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren wurde die mRNA aus dem Organ mehrerer Individuen isoliert und mittels des SOLiD4-Systems quantitativ sequenziert (Absch. III.2.1.1). Die verwendeten Tiere hatten vor der durchgeführten Sequenzierung keinen Zugang zu Ethanol. Trotzdem bestätigt die Sequenzierung

eine Leberentzündung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere (Tabelle 9 I), die sich bereits in den Blutwerten dieses Genotyps offenbart hatte (Absch. IV.1.5). Das GLDH-Gen (*Glud1*) ist übereinstimmend mit den Blutwerten signifikant höher in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren exprimiert, während die Expression des Gens der ALT (*Gpt*) tendenziell erhöht ist. Die Expression der Gene von AST (*Got*), ALP (*Alp*) und Albumin (*Alb*) ist zwischen den Genotypen unverändert [459,498]. Damit gibt es jedoch keinen Widerspruch zu den ermittelten Blutwerten, da die entsprechenden Enzyme und Proteine durch Gewebe- und Zellschäden in das Blut gelangen und keine erhöhte Expression der entsprechenden Gene vorliegen muss [499].

Eine Erhöhung der Sekretion oder Expression von *Tgfb* und *Tgfb2* zeigt sich auch in Acetaldehyd-induzierten fibrotischen Lebern [500]. Die damit verbundene Aktivierung des *Col1a1*-Promotors, die zu der erhöhten Kollagensynthese in der Pathogenese einer Fibrose beiträgt, ist in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nicht ermittelt worden (Anhang B, Tabelle 11). Eine entzündete Leber zeichnet sich u.a. durch eine Aktivierung von Kupfferzellen aus, die dadurch vermehrt die Cytokine IL 8, IL 12 und IFN produzieren [34]. Die Entzündungsprozesse werden in Hepatocyten über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und spezifische IL-Rezeptoren vermittelt, jedoch findet sich in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere keine Veränderung der *Tlr4*-Expression und der IL 12-Rezeptor ist nur tendenziell hochreguliert (Tabelle 9 II/Anhang B, Tabelle 11 II). Eine Erhöhung des Strukturproteins EpCAM findet sich auch bei einer alkoholischen Hepatitis und weist auf eine Aktivierung der HPC hin [31]. Jedoch fehlt in diesem Kontext die erhöhte Expression der Gene von Prominin 1 und Keratin 7 und weiterer Stammzellmarker wie CD133 oder CD90, die allesamt in beiden Genotypen nicht exprimiert sind. Die vermehrte Synthese von EpCAM könnte hier demnach auch auf hepatozelluläre Karzinome hindeuten [501]. In der Tat wurden in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren während der Organentnahme vermehrt Tumore der Leber beobachtet, die jedoch großflächig abgetrennt wurden. Für das Vorhandensein von Karzinomen spricht außerdem die erhöhte Expression der Angiogenesemarker *Pdgf* und *Vegf* und des Proliferationsmarkers *Hgf* [408,502]. Widersprüchlich ist die tendenzielle Erhöhung der Expression von *Thsd1*, das antiangiogenetische Eigenschaften aufweist [503]. Auf Zellschäden und apoptotische Vorgänge weist auch die tendenzielle Erhöhung der Caspasen 3 und 8 hin, die ebenso durch chronischen Ethanolkonsum entstehen kann [12]. Die Expression von *Fabp1* ist jedoch unverändert, was im Gegensatz zur literaturbekannten Erhöhung bei Leberschäden durch chronischen Ethanolkonsum steht [6]. Es wäre daher interessant in einer Nachfolgestudie den Einfluss eines mehrwöchigen Alkoholkonsums auf die Genexpressionsmuster von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu betrachten.

Es gibt mehrere Wachstumsfaktoren und -rezeptoren, welche die Hepatocytenproliferation und damit die Leberregeneration fördern. Von diesen sind *Hgf*, *Tgfb* und TGF $\beta$ -assoziierte Transkripte, *Tgfb1*, *Tgfb2* und *Egfr* in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren erhöht oder tendenziell erhöht (Tabelle 9 III), während

die Anzahl der Transkripte von *Met* und *Tgfa* unverändert und *Igf* gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren vermindert ist [31]. Die Expression von *Tnfa*, *Nfkb* und *Il6*, die für Entzündungsvorgänge spricht [1], konnte mittels der verwendeten Methode nicht detektiert werden. Von den während der Proliferation hochregulierten Genen sind *Myc* und *Jun* zwischen den Genotypen unverändert [44,45] und auch der Proliferationsmarker *Pcna* liegt unverändert vor [19]. Außerdem gibt es eine tendenzielle Erhöhung einer Reihe von *Mapk*, deren Genprodukte in der Leber über TNF und NFκB aktiviert werden und den Wiedereintritt in den Zellzyklus koordinieren.

Neben diesen Wachstumsfaktoren sind ebenso Regulatoren des Zellzyklus maßgeblich an der Hepatocytenproliferation beteiligt (51). Die Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigt eine Erhöhung der Transkripte des proliferationssteigernden Cyclins H und eine tendenzielle Erhöhung der Cycline E1, G1 und Y. Dem entgegengesetzt gibt es ebenfalls eine gesteigerte Expression der Zellzyklusinhibitoren *Cdkn1a* (*p21*) und *Bcl2l1* und eine tendenzielle Erhöhung von *Bcl2*, während *Cdkn1b* (*p27*) und *Skp2* unverändert vorliegen [50–52]. Generell induziert TGFβ cytotostatische Prozesse, die u.a. die transkriptionelle Repression des Onkogens *Myc* und die Aktivierung von *Cdkn1a* (*p21*) einschließt [504]. Die gesteigerte Expression von *Cdkn1a* (*p21*) passt zu den vermehrt in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren beobachteten Tumoren der Leber, jedoch ist keine Repression von *Myc* zu beobachten. Weiterhin ist bekannt, dass Tumorzellen im Verlauf der Kanzerogenese die Fähigkeit verlieren, auf die Aktivierung von TGFβ mit einer Wachstumsinhibition zu reagieren und stattdessen invasivitäts- und proliferationsfördernde Gene hochregulieren.

Zusammengenommen weist die Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere vielfältige Fehlregulationen auf. Einerseits liegt übereinstimmend mit anderen Studien eine entzündete und geschädigte Leber vor [19,62,63], die teilweise Tumore ausgebildet hat. Der Leberschaden zeigt sich durch die Blutwerte und die vorliegenden Apoptose-fördernden Enzyme und wird durch die stark erhöhte Expression des *Ctgf* und *Tgfb* und die tendenzielle Erhöhung von *Smad2* bestätigt, die allesamt bei einer Leberfibrose zu beobachten sind. *AdipoR2* und *PPARα*, welche die negative Regulation von *Ctgf* über Adiponektin vermitteln, sind in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nicht signifikant verändert [54]. Andererseits gibt es trotz der Schädigung des Organs keine eindeutige Aktivierung von HPC und es laufen proliferationsfördernde Prozesse ab, die zum einen der Regeneration dienen oder im Zusammenhang mit den beobachteten Tumoren stehen könnten. Jedoch kommt es bei den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren auch zu einer gesteigerten Expression von Inhibitoren des Zellzyklus', die zwar die Ursache für einen Schaden des Lebergewebes sein könnten, dafür aber einer Tumorbildung entgegenwirken würden [505]. Möglicherweise könnte die transkriptionelle Fehlregulation auf eine gestörte Funktion der TF SP1, ETF und E2F2 zurückzuführen sein, die einzeln oder in Kombination in einem Modell der Leberregeneration an der transkriptionellen Kontrolle einer Vielzahl von geänderten Transkripten beteiligt waren [40].

Speziell von SP1 ist die Beteiligung an der transkriptionellen Kontrolle einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der Zellzykluskontrolle, Differenzierungs- und Apoptosevorgänge bekannt [505]. Der TF kann je nach spezifischem Kontext proliferationsfördernd oder auch -inhibierend wirken [40]. Betrachtet man die im Kontext der Proliferation fehlregulierten Gene im Einzelnen, fällt auf, dass etliche unter der transkriptionellen Kontrolle von SP1 alleine oder in Kombination mit ETF und E2F2 stehen. So werden *Pdgfra*, *Vegfb*, *Ctgf* und *Epcam* nachweislich von SP1 kontrolliert und besitzen eine entsprechende Bindestelle in ihrem Promotoren (Anhang B, Tabelle 11). Genauso verhält es sich mit *Tgfbr2*, *Tead2*, *Tgfbi*, *Igf1* und *Cdkn1a*. In allen Fällen mit Ausnahme von *Igf1* erhöht sich die aktivierende Wirkung von SP1 durch das fehlende 5-HT in der Peripherie der Tiere. Da SP1 in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nicht signifikant erhöht ist, scheint ein reprimierender Faktor zu fehlen, bei dem es sich jedoch nicht um SP3 handelt, da dessen Expression in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere unverändert ist [338].

Im Zusammenhang mit einem alkoholbedingten Leberschaden, der sich ebenfalls durch eine gestörte Expression von entzündungsfördernden und -hemmenden Cytokinen auszeichnet, zeigt sich u.a. eine Aktivierung von SP1 und AP1, die mit einer verstärkten Bindung an den Zielpromotor assoziiert ist [506]. Diese beobachtete verstärkte transkriptionelle Aktivierung durch SP1 nach chronischem Alkoholkonsum stimmt mit der hier beobachteten zusätzlichen Aktivierung verschiedener Gene in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren ohne Zugang zu Ethanol überein. Zusätzlich zeigen auch Alkoholiker unabhängig von Geschlecht und Rauchstatus einen stark verminderten, peripheren 5-HT-Spiegel [467,468], der analog zu den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren den alkoholbedingten Leberschaden verstärken könnte. Es gibt allerdings auch eine Reihe von Genen in diesem Zusammenhang (z.B. *Myc*, *Hsp90aa1*, *Adipor2*, *Ccnd1*, *Fos*, *Pcna*), die unter der Kontrolle von SP1 stehen und deren Expression durch die *Tph1*-Defizienz nicht signifikant verändert werden. Den Unterschied in der Regulation genauer zu untersuchen bleibt Gegenstand weiterer Studien. Jedoch unterliegen TF generell einer differentiellen Regulation, welche die Zellen in die Lage versetzt auf verschiedene Stimuli mit einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster zu reagieren, und SP1 ist aufgrund seiner vier Aktivierungsdomänen und der Kooperation mit anderen TF in dieser Hinsicht besonders flexibel [343].

Der Abbau von Ethanol in der Säugetierleber erfolgt über eine zweistufige Reaktion, die durch ADH und ALDH katalysiert wird [13]. Dabei sind ADH1 und ALDH2 die hauptsächlich an dem Katabolismus von Ethanol beteiligten Enzyme [15]. Die in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zu beobachtete Erhöhung der *Aldh2*-Expression könnte die verstärkte Ethanolaufnahme dieses Genotyps erklären (Tabelle 9 IV, Absch. III.1.1/1.2). Polymorphismen in *ALDH2*, welche die Aktivität des Enzyms herabsetzen, führen bei den humanen Betroffenen aufgrund der dysphorischen Effekte zu einer Aversion gegen den Konsum von Alkohol [20,21]. Des Weiteren

senkt die Gabe von siRNA gegen die mRNA von *Aldh2* die Ethanolaufnahme in Versuchstieren um bis zu 60 % [22,23]. Dieser Effekt lässt sich mit einem verminderten Abbau und damit einer verstärkten toxischen Wirkung des Acetaldehyds erklären, das die typischen „Katersymptome“, wie Übelkeit, Kopfschmerz und Schwindel verursacht [20,21]. Die erhöhte *Aldh2*-Expression von 47 % wurde mittels qPCR überprüft und konnte mit einer Erhöhung von 41 % bestätigt werden (Abb. 33 A). Auch die Quantifizierung auf der Proteinebene zeigt eine um 30 % erhöhte ALDH2-Menge in der Mitochondrienfraktion der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere (Abb. 34). Neben *Aldh2* ist noch die Expression von *Aldh3a2* und die von fünf weiteren *Aldh* tendenziell erhöht, was in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu einem gesteigerten Ethanolabbau beitragen könnte.

Interessanterweise ist ALDH2 selbst auf epigenetischer Ebene an transkriptionellen Vorgängen beteiligt [507]. ALDH2 wird nach Phosphorylierung in den Nukleus transloziert, wo das Enzym mit verschiedenen Histondeacytelasen assoziiert und damit zur generellen transkriptionellen Repression beiträgt. Die beobachtete Deregulation unterschiedlicher Gene könnte somit teilweise mit der Überexpression von *Aldh2* im Zusammenhang stehen. Die Expression von *Aldh2* wird zum einen von SP1 und dem Glucocorticoidrezeptor (NR3C1) aktiviert [508], dessen Transkripte in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren tendenziell erhöht sind. Zum anderen steht *Aldh2* unter der basalen transkriptionellen Kontrolle des Nuclear Transcription Factor-Y (NFY), der sich aus drei Untereinheiten zusammensetzt [509], von denen jedoch nur *Nfyb* in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren stark erhöht ist. Außerdem wird die Expression von *Aldh2* über Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF4A) aktiviert und über Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta (PPARD), Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-TF (NR2F2) und Apolipoprotein Regulatory Protein-1 (NR2F1) reprimiert und dadurch im Gleichgewicht gehalten [510]. Die Expression von *Hnf4a*, *Ppard* und *Nr2f2* ist allerdings unverändert, während *Nr2f1* nicht exprimiert wird. Die Expression von *Adh1* und *Cyp2e1*, deren Polymorphismen neben *Aldh2* als Marker für eine genetische Prädisposition zum Alkoholismus betrachtet werden [19,25,26], ist zwar SP1-abhängig aber zwischen den Genotypen unverändert [511,512]. Die Expression von *Aldh1b1*, dessen Genprodukt ebenfalls in den Mitochondrien vorliegt und dort teilweise für den Abbau von Acetaldehyd verantwortlich ist [15], ist zwischen den Genotypen unverändert. Die Expression weiterer *Adh* ist ebenfalls unverändert (Anhang B, Tabelle 11 IV).

Interessanterweise ist in beiden Genotypen die SP1-abhängige Expression von *Sert* zwar sehr gering [70], jedoch in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren tendenziell verringert (Anhang B, Tabelle 11). Humane Individuen, die die kurze Variante des *SERT*-Allels und damit eine Verminderung von SERT auf Proteinebene aufweisen [164], haben lebenslang ein höheres Risiko alkoholabhängig zu werden [165,166]. Die Expression von *5Htr1b*, von welchem ebenfalls eine positive Korrelation zu einer Alkoholabhängigkeit gefunden wurde [2], ist in der Leber der Tiere nicht detektierbar.

Trotz des sehr geringen 5-HT-Gehalts in der Leber weisen die *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere keine veränderten Genexpression der Enzyme des 5-HT-Katabolismus AADC (DDC), MAO A und MAO B auf [71,83,92] (Tabelle 9 V). Da diese Enzyme an dem Metabolismus von Katecholaminen, 5-HT und anderer Indolamine und weiterer biogener Monoamine beteiligt sind, überrascht diese Beobachtung nicht [513]. Weiterhin werden zahlreiche 5HTR in der Leber beider Genotypen sehr gering exprimiert. Die Expression von *5Htr1a*, *1b*, *1d*, *2a*, *2b*, *3a* und *3b* deckt sich mit *in vivo*-Daten [19], wobei *5Htr1a* unter der Kontrolle von SP1 steht [514]. mRNA von *5Htr1f* und *5Htr2c* konnte *in vivo* nicht gefunden werden. *5Htr2a* und *5Htr2b* sind dabei nachweislich an der Leberregeneration beteiligt, jedoch zwischen den Genotypen nicht unterschiedlich exprimiert. *5Htr2a* wird negativ von SP1 reguliert [515]. *5Htr2c* wird in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren niedriger exprimiert, nimmt jedoch laut Literatur keinen Einfluss auf die Leberregeneration [19]. Ebenso weisen die *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere eine verminderte Expression von *5Htr5b* und eine tendenzielle Abnahme der *5Htr1d*-Expression auf (Anhang B, Tabelle 11 IX).

Generell könnte an der beobachteten veränderten Expression zwischen *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren die Serotonylierung als posttranslationelle Modifikation von SP1 und anderen TF beteiligt sein, da in der Leber der Mäuse sowohl zwei TGM, verschiedene unspezifische Kationentransporter, als auch PQBP exprimiert werden. Interessanterweise zeigen die *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere eine erhöhte Expression von *Tgm1* und *Tgm2*, die jedoch für *Tgm2* knapp nicht signifikant ist (Tabelle 9 VI). Diese erhöhte Expression könnte auf eine Beteiligung der TGM und somit der Serotonylierung an der Regulation der Aktivität von TF hinweisen. Die 5-HT-Defizienz und die somit fehlende Modifikation könnte die transkriptionelle Deregulierung bewirken. So scheint TGM2 aktiv an der Hepatocytenproliferation beteiligt zu sein, da es in einem Modell der Leberregeneration zu einer verstärkten Expression von *Tgm2* kommt [40]. Auch während der Proliferationsphase nach einer partiellen Hepatektomie findet sich TGM2 verstärkt im Nukleus und zeigt dort eine Inkorporation von Polyaminen [226]. Weiterhin konnte bereits eine Rolle von TGM2 in der Genexpression gezeigt werden. Das Enzym verursacht Stimulus-abhängig eine Phosphorylierung oder Polymerisierung verschiedener TF, was sich stimulierend oder reprimierend auf deren Aktivität auswirkt [176,195]. Auch eine direkte inhibierende TF-TGM-Interaktion wurde *in vivo* beobachtet [196,204]. Auf SP1 kann TGM2 sowohl aktivierend als auch reprimierend wirken. Eine mutmaßliche Dimer- oder Trimerbildung von SP1 wirkt aktivierend auf die Expression verschiedener Zielgene [200], könnte jedoch auch auf eine Monoaminylierung zurückzuführen sein (Absch. I.2.5), die in bisherigen Studien nicht untersucht wurde und im Kontext anderer Signalmoleküle bereits als funktionelle Modifikation bekannt ist [86,87].

Die Behandlung von Hepatocyten mit Ethanol oder FFA führt hingegen zu einer Polymerisierung und Inaktivierung von SP1 [187,201]. Diese pathophysiologische Aktivität konnte auch in

Patienten mit nicht-alkoholinduzierter Steatohepatitis beobachtet werden und deutet auf apoptotische Vorgänge hin [203], an denen TGM2 bekanntermaßen beteiligt ist [191,192]. Die erhöhte Expression von *Tgm2* findet sich auch in sekundären, metastasierenden Karzinomen und könnte mit den beobachteten Tumoren und Angiogenesemarkern im Zusammenhang stehen [177,216]. TGM1 wird ausschließlich SP1-vermittelt exprimiert [516], während die Expression von TGM2 teilweise SP1-abhängig ist, aber zusätzlich über Retinoide, somit RA-Rezeptoren und die TF AP1 und NFκB aktiviert wird [194,202]. *Sp1* ist in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nur tendenziell erhöht. Die Expressionshöhe von *Jun* und *Fos*, deren Genprodukte zusammen AP1 bilden [517], und von *NFκB* ist zwischen den Genotypen unverändert, während die des Retinoidrezeptorgens *Rxra* signifikant erhöht und *Rara*, *Rarb* und *Rarg* unverändert ist [518]. Es hat sich gezeigt, dass SP1 mit RAR und RXR interagieren und dadurch die Bindung von SP1 an verschiedene Zielpromotoren verstärkt wird [202]. RA aktiviert somit nicht nur die Expression von *Tgm2*, sondern auch von *Tgfb* und *Tgfbr1* und *Tgfbr2*. Zusätzlich wird TGFB durch TGM2 aktiviert und ist dann an der transkriptionellen Regulation von *Tgm2* beteiligt, was zur tendenziellen Erhöhung von *Tgm2* beitragen und eine positive Rückkopplungsschleife von TGFB -Signalwegen darstellen könnte [217–219].

Weiterhin wird die Expression von *Sp1* direkt dosis-abhängig von TGFB inhibiert [519], trotzdem zeigten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit einer erhöhten *Tgfb*-Expression keine Abnahme der *Sp1*-Expression, was zusätzlich für einen transkriptionellen Einfluss des fehlenden 5-HT spricht. Die tendenzielle Erhöhung der *Sp1*-Expression um 22 % konnte mittels qPCR mit einem Anstieg von 18 % bestätigt werden (Abb. 33 B). Zusammengenommen mit der Übereinstimmung in der Erhöhung von *Aldh2* scheint die Sequenzierung mit dem SOLiD 4-System zuverlässige Aussagen über die Expressionshöhen spezifischer Gene zu liefern. Außer den genannten TGM, sind auch *Tgm3-7* in beiden Genotypen niedrig exprimiert, wobei *Tgm7* tendenziell in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren hochreguliert ist. TGM7 wird ubiquitär exprimiert und die genaue physiologische Funktion des Enzyms ist unbekannt [173]. Damit könnte TGM7 neben TGM1 und TGM2 ebenfalls an der Regulation der Aktivität von TF beteiligt sein und damit eine Rolle in den beobachteten transkriptionellen Fehlregulationen der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere spielen.

Neben den TGM als die Enzyme, welche die Transamidierung mit biogenen Monoaminen realisieren, ist der intrazelluläre 5-HT-Spiegel entscheidend für den Ablauf der Reaktion [258,259,273]. Zellen besitzen zur Aufnahme verschiedener Monoamine spezifische Monoamin- und unspezifische Kationentransporter [141,142]. Die Tiere beider Genotypen zeigen in ihrer Leber keine Expression des spezifischen Transporters der SLC6-Familie (Tabelle 9 VII) oder eine sehr geringe Expression von *Sert* (*Slc6a4*), die in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren tendenziell erniedrigt ist (Anhang B, Tabelle 11 IX). Im Gegensatz dazu werden mehrere Vertreter der SLC22-Familie der unspezifischen Kationentransporter exprimiert, von denen jedoch nur *Octn2* (*Slc22a5*) tendenziell

erhöht ist. Die Expression von *Oct1* und *Oct3* in der Leber ist bereits publiziert [142]. Die Expressionslevel von *Octn1* (*Slc22a4*) und *Slc22a18* sind zwar SP1-abhängig [520,521], liegen jedoch in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren unverändert vor. Die Expression von *Vmat2* (*Slc18a2*) ist SP1-abhängig, jedoch knapp tendenziell nicht erhöht, was für eine gesteigerte Speicherung bestimmter Monoamine in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere sprechen könnte [140,522]. Die Expression von *Pmat* (*Slc29a4*) ist zwischen den Genotypen unverändert (Anhang B, Tabelle 11). Weiterhin fällt auf, dass es eine Fehlregulation in der Expression einiger Mitglieder der SLC27-Familie in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere gibt, die allesamt Transportmoleküle für die Aufnahme von FFA darstellen [523]. Dabei sind *Slc27a5* und *Slc27a3* signifikant bzw. knapp nicht signifikant herunterreguliert. Die verminderte Expression dieser FFA-Transporter könnte zu der beeinträchtigten Leberregeneration der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere beitragen [19], da die gestörte Funktion von FFA-Transportern bereits mit akutem Leberversagen in Zusammenhang gebracht wurde [524]. Erhöhte Konzentrationen an FFA können zu Schäden der Zellmembran führen [6]. Auch die Ausbildung einer Fettleber durch Ethanolkonsum, was die erste Phase eines Leberschadens darstellt, ist auf einen gestörten Lipidmetabolismus und einer Akkumulation von Triglyceriden in der Leber zurückzuführen [29]. Neben der SLC27-Familie sind auch Fettsäuretranslokase (CD36) und *Long-Chain Fatty Acyl-Coenzym A-Synthetasen* (ACSL) an dem Transport von FFA über die Plasmamembran beteiligt [524]. Die Expression von *Cd36* ist in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren stark erhöht, die der *Acs1* unverändert. Bei der Untersuchung des Einflusses von 5-HT auf die Sekretion der Gallenflüssigkeit hat sich gezeigt, dass die Injektion von Mäusen mit 5-HT zur einer erhöhten Expression des Fibroblastenwachstumsfaktors 15 (*Fgf15*), *Cyp7a1* und des apikalen Natrium-abhängigen Gallensäuretransporters (*Asbt*, *Slc10a2*) führt [88]. FGF15 ist dabei ein Signalstoff, der daran beteiligt ist, dass sich die Gallenblase füllt. Das Cytochrom CYP7A1 ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Synthese der Gallensäuren aus Cholesterol und ASBT sorgt für die Reabsorption der Gallensäuren aus dem Darm, von denen 80 % von der Leber aus dem Blutkreislauf aufgenommen und wiederverwertet werden. Die Expression von *Fgf15* und des SP1-abhängigen Gens *Cyp7a1* ist zwischen den Genotypen unverändert, während *Asbt* in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren signifikant vermindert ist. Da sämtliche Gallensäuren in Hepatocyten synthetisiert werden, könnte die verminderte Wiederaufnahme aus der Leber zu einer erhöhten Beanspruchung der Hepatocyten durch die verstärkte Gallensäuresynthese führen, was ebenfalls zu den beobachteten Schäden der Leber von *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren beitragen könnte. Weiterhin sorgt 5-HT für die Aufnahme von Cholesterol in die Leber [88], die Störung dieses Mechanismus dürfte weiterhin die Synthese der Gallensäuren stören.

Es ist bekannt, dass die WW-Domäne von PQBP1 allein als transkriptioneller Aktivator fungieren kann [379] und die transkriptionelle Aktivität des neuronalen TF BRN2, der im Nukleus mit PQBP1

kolokalisiert, durch die Anwesenheit von PQBP1 reprimiert wird [277,282]. Die Lebern beider Genotypen exprimieren PQBP1 und die weiteren bisher annotierten PQBP (Tabelle 9 VIII) [274,277]. Die Expression von *Pqbp3* (*Nol7*) ist MYC, RXRA und SP1-abhängig [524]. Außerdem fungieren *Pqbp2* und *Pqbp3* als Tumorsuppressorgene [406–408,411]. Jedoch gibt es keine Veränderung der Expressionslevel aller *Pqbp* zwischen den betrachteten Genotypen. Die Proteinfamilie der *Pqbp* trägt damit nicht zu den Fehlregulationen in der Leber und der beobachteten Tumorbildung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere bei.

## **2.2 Die Behandlung mit Ethanol führt zu einer kompetitiven Hemmung von ALDH2 und damit zu einem verringerten Abbau von 5-Hydroxyindolacetaldehyd**

Um eine Wechselwirkung des Ethanol- mit dem 5-HT-Metabolismus aufzeigen zu können, wurden  $\beta$ -TC3-Insulinomazellen mit Ethanol behandelt und die Metaboliten des 5-HT in den Zellen quantifiziert. Dieser Zelltyp eignet sich für diese Untersuchung, da die Zellen nicht selbstständig in der Lage sind 5-HT zu synthetisieren, jedoch 5-HT aus der Umgebung aufnehmen und metabolisieren können [463,464]. Während eine 1 %ige Ethanollösung keinen Einfluss auf den Abbau von 5-HT hatte, führte eine 3 %ige Lösung zu einer kompetitiven Hemmung der ALDH2. Diese Hemmung zeigte sich deutlich an der sechsfachen Anreicherung von 5-HIAL (Abb. 35), das durch die Gabe von Ethanol von ALDH2 zu einem geringeren Teil abgebaut wurde. Übereinstimmend damit kam es zu einer 50 %igen Abnahme des zweiten Abbauproduktes 5-HIAA im Bezug zum Kontrollansatz. In der Tat ist in der Literatur bekannt, dass ALDH2 im oxidativen Abbau von Aldehyden, die von biogenen Monoaminen stammen, involviert ist und die Inhibition des Enzyms die 5-HT-Spiegel im Blut hebt und die freiwillige Ethanolaufnahme bei Goldhamstern absenkt [92]. Die Behandlung mit einer 6 %igen Ethanollösung führt zwar zu einer weiteren Abnahme des Produktes 5-HIAA um weitere 80 %, jedoch kam es zu keiner weiteren Anreicherung des Zwischenproduktes 5-HIAL, sondern zu einem starkem Abfall dieses Moleküls in den Zellen. Dieser Abfall lässt darauf schließen, dass die Zellen durch die 6 %ige Ethanollösung geschädigt wurden und deshalb schon vor oder während der Ernte lysiert wurden.

## **2.3 Die Behandlung mit Ethanol und Serotonin erhöht die Expression SP1-abhängiger Gene**

Der Einfluss von Ethanol auf die SP1-abhängige Expression ausgewählter Zielgene wurde mittels der Behandlung der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2 und anschließender Analyse der Genexpressionshöhe mit qPCR betrachtet. Als erstes fiel auf, dass die Behandlung mit Ethanol Einfluss auf die Expressionshöhe von *GAPDH* und *RPL13* nimmt, weshalb diese nicht als Referenz-

gene herangezogen werden konnten und stattdessen  $\beta$ -Aktin zur Normalisierung der Zellzahl verwendet wurde (Abb. 36). Die Wahl des Referenzgenes, dessen Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant bleibt, ist unabdingbar für die exakte Quantifizierung der Expression der Zielgene [525]. Die Wechselwirkung von Ethanol mit dem Fettmetabolismus der Zellen [1,28,29] scheint auch auf den Zuckerabbau und damit auf das an der Glykolyse beteiligte Enzym GAPDH Einfluss zu nehmen [526]. RPL13 eignet sich als Bestandteil des Ribosoms, dessen Anzahl die Wachstums- und Proliferationsrate von Zellen widerspiegelt [527], ebenso wenig, da das durch den Abbau von Ethanol entstehende Acetaldehyd u.a. mitochondriale Schäden verursacht und sich damit potentiell auf die Proliferation der Hepatocyten auswirkt [16]. Außerdem wird *RPL13* nach DNA-Schäden hochreguliert [528], die ebenfalls durch oxidativen Stress aufgrund der Anreicherung des Acetaldehyds auftreten könnten [4,8,9].

Die Behandlung mit 5-HT führte zu einer tendenziellen Erhöhung der Expression von *SP1* und *EGFR*. Ein Einfluss von 5-HT auf die Expression einer Vielzahl von Genen konnte bereits in SERT-defizienten Mäusen beobachtet werden, wo die Verminderung der intrazellulären 5-HT-Spiegel zu einer Deregulation von 124 Genen führte, die u.a. an Entzündungsprozessen und dem Energiemetabolismus beteiligt sind [529]. Die parallele Behandlung von HepG2-Zellen mit 5-HT und Ethanol führte zu einer gesteigerten Expression der SP1-abhängigen Gene *EGFR* und *HGFR* (Abb. 37) [40,530]. Somit scheint Ethanol zumindest kurzfristig die Proliferation der Hepatocytzelllinie über eine Aktivierung von SP1 und die damit gesteigerte Expression der beiden Wachstumsfaktorrezeptoren anzuregen [33]. Diese vermehrte Proliferation könnte die relativ langlebigen Hepatocyten an die Grenze ihrer Teilungsfähigkeit bringen [37–39] und somit die mit übermäßigem Alkoholkonsum einhergehenden Leberschäden mit verursachen [5,6]. Eine Erschöpfung der Replikationsfähigkeit der Hepatocyten führt im Organismus zur Aktivierung der Leberstammzellen HPC [32,39]. Diese Aktivierung findet sich auch in späten Stadien der Leberzirrhose und die Anzahl der HPC im Lebergewebe korreliert mit der Schwere der Erkrankung [54–57]. Interessanterweise ist die Proliferation der HPC eng mit der von HSC assoziiert [61], dessen Aktivierung mit einer verstärkten Ausschüttung von CTGF und TGF $\beta$  einhergeht, welche die Ausbildung einer Fibrose unterstützen [66]. Zusätzlich resultiert die Aktivierung von HSC nach einer Schädigung der Leber in einer Differenzierung dieser Vorläuferzellen zu Myofibroblasten, die kein Retinol mehr und dafür verstärkt Kollagene exprimieren [34]. Durch diesen fördernden Einfluss auf die Bildung der extrazellulären Matrix und die Sekretion von TGF $\beta$  fördern die HSC die Ausbildung einer Fibrose. Die Expression des SP1-abhängigen Zellzyklusinhibitors *CDKN1A* (*p21*) wird weder durch 5-HT noch durch Ethanol beeinflusst [531].

## 2.4 In Leberzellen werden Proteine dopaminyliert

Die generelle Fähigkeit zur Monoaminylierung in verschiedenen Leberzelllinien wurde überprüft, indem die Expression verschiedener erforderlicher Gene mittels PCR untersucht wurde. Zu diesen Genen gehört zum einen die Familie der TGM [77]. *TGM2* fand sich übereinstimmend mit der in der Literatur beschriebenen ubiquitären Expression in den Zelllinien aller untersuchten Gewebe (Abb. 38) [173]. Eine Expression von *TGM6* und *TGM7* war in den betrachteten Zelllinien nicht zu messen, wurde jedoch in anderen Arbeiten unter Verwendung der selben Oligonukleotide bereits nachgewiesen [178,463]. Die anderen *TGM* werden nur in einzelnen Zelllinien exprimiert. Es fällt auf, dass z.B. *TGM4*, die strikt als Enzym der Prostata gilt, hier in den der Leber und Niere entstammenden Zelllinien zu finden ist [177,180]. Weiterhin ist eine Expression von *TGM1* bisher nur für Keratinocyten, Epithel- und Endothelzellen und für das Gehirn sowie von *TGM3* für Plattenepithel und Gehirn beschrieben. Außerdem unterscheidet sich die Expression einzelner *TGM* zwischen den Hepatocytenzelllinien, was auf die starken chromosomalen Veränderungen dieser Tumorzelllinien zurückzuführen sein könnte [489]. Diese differentielle Expression verdeutlicht, dass nicht alle mit Zelllinien generierten Ergebnisse uneingeschränkt auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, da sich die Tumorzelllinien nicht nur untereinander, sondern außerdem in ihrem Expressionsmuster von primären Zelllinien und den Zellen *in vivo* unterscheiden [497].

Weiterhin wurden die hepatischen Zelllinien auf die Expression verschiedener spezifischer Monoamintransporter und unspezifischer Kationentransporter untersucht (Abb. 39), die den Transport der biogenen Monoamine über die Plasmamembran bewerkstelligen und somit die intrazellulären Monoaminlevel beeinflussen [139]. Alle betrachteten Zelllinien exprimierten den spezifischen *SERT*, dessen Expression in HSC und Hepatocyten ebenfalls *in vivo* zu finden ist [532,533]. Obwohl nur die HSC-Zelllinie LX2 den spezifischen *DAT* exprimiert [148], sind alle Hepatocytenzelllinien über die Expression der unspezifischen Kationentransporter in der Lage neben 5-HT auch DA, HA und NE aufzunehmen [141]. So übernehmen z.B. in *Sert*-defizienten Mäusen *DAT*, *OCT1* und *OCT3* den 5-HT-Transport [534]. Die Expression von *SLC22A1* und *SLC22A3* in der Leber ist bekannt [142], jedoch nicht in allen Hepatocytenzelllinien zu detektieren. Die nicht vorhandene Expression von *SLC22A2* deckt sich mit Angaben in der Literatur [153]. Auch hier zeigt sich analog zu den *TGM* eine differentielle Expression einiger Mitglieder der *SLC22*-Familie, die auf die genetischen Veränderungen der Tumorzelllinien zurückzuführen sein dürfte. Auch der polyspezifische Nucleosidtransporter *PMAT* ist in der Lage Monoamine und bevorzugt 5-HT zu befördern und findet sich in allen untersuchten Zelllinien [158]. Die Expression der *VMAT1* und *VMAT2* ist in keiner der Zelllinien zu finden, obwohl *VMAT2* in zahlreichen peripheren Geweben nachgewiesen werden konnte [162]. *VMAT1* hingegen wird ausschließlich in Neuronen

exprimiert [143]. Damit scheint es in Hepatocyten keine Speicherung von biogenen Monoaminen in spezifischen Vesikeln zu geben [140].

Nachdem gezeigt wurde, dass die Grundvoraussetzung für eine Monoaminylierung in den hepatischen Zelllinien vorhanden ist, wurden die Proteine der Hepatocytelinie Huh7 und die HSC-Linie LX2 auf eine generelle Modifikation mit den biogenen Monoaminen 5-HT, DA, HA und NE untersucht (Abb. 40). In beiden Zelllinien zeigte sich eine Inkorporation von DA, die durch den TGM-Inhibitor CTA signifikant vermindert wurde [177] und auf eine TGM-abhängige Modifikation der Leberzellproteine hinweist. Außerdem kam es durch 5-HT- und CTA-Behandlung zu einem signifikanten Anstieg der 5-HT-Aufnahme durch die LX2-Zellen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass eine Serotonylierung von RAB4 in Thrombocyten zu einer begünstigten Bindung der GTPase an SERT führt, was eine Abnahme der Transporterdichte in der Plasmamembran zur Folge hat [250]. Eine durch CTA-Behandlung verminderte Serotonylierung würde folglich in einer erhöhten SERT-Dichte und 5-HT-Aufnahme resultieren. Die beobachtete Dopaminylierung deckt sich nur zum Teil mit der TGM-abhängigen Proteininkorporation von HA, DA und NE in HepG2-Zellen [178] und verdeutlicht erneut den Unterschied in der Reaktion verschiedener Zelllinien. Weiterhin zeigen HepG2-Zellen nach CTA-Behandlung eine verminderte Aufnahme von NE, jedoch nicht von 5-HT. Diese *in vitro* nachgewiesene Modifikation von Leberzellproteinen mit verschiedenen biogenen Monoaminen deutet darauf hin, dass eine Serotonylierung in der Leber auch *in vivo* eine physiologische Rolle spielen könnte. Damit würde die Serotonylierung von TF neben der Modifikation anderer Signal- und Strukturproteine eine wichtige modulierende Funktion zukommen (Absch. I.2.8), die an den beobachteten Veränderungen der Genexpression in *Tph<sup>-/-</sup>*-Tieren beteiligt sein könnte (Absch. IV.2.1).

### **3 Polyglutaminabschnitt-enthaltende Transkriptionsfaktoren sind Substrate für die TGM-vermittelte Monoaminylierung**

#### **3.1 Polyglutaminabschnitte werden spezifisch und längenunabhängig transamidiert**

Um nachzuweisen, ob Polyglutaminabschnitt-enthaltende TF Substrate für die TGM-abhängige Monoaminylierung sind, wurden die TF BRN2, NonO und SFPQ *in vitro* mit dem künstlichen, fluoreszierenden Substrat MDC und den vier biogenen Monoaminen 5-HT, HA, DA und NE modifiziert. NonO und SFPQ sind Nukleinsäure-bindende Proteine, die als Heterodimer oder zusammen mit anderen Bindungspartnern an zahlreichen nukleären Prozessen wie dem Spleißen, nukleärer Retention von mRNA, DNA-Relaxation und transkriptioneller Regulation mitwirken [535–540]. Die Inkorporation von MDC in alle drei untersuchten TF zeigt (Abb. 41A), dass Poly-

glutaminabschnitte und TF neben den bisher identifizierten, physiologisch relevanten Substraten wie kleinen GTPasen und Oberflächen- und Strukturproteinen (Absch. I.2.5), potenzielle Ziele für die direkte TGM-vermittelte Monoaminylierung sind [85–87,250,254,260,262]. Weiterhin zeigt sich eine Spezifität der Modifizierung, da die Glutamin-enhaltende DNA-bindende Domäne von BRN2 unter den verwendeten *in vitro*-Bedingungen nicht monoaminyliert wird (Abb. 41B). Bei kleinen und heterotrimeren GTPasen kommt es im Gegensatz dazu zur Modifizierung einzelner Glutamin-Reste [178]. Eine Spezifität zeigt sich auch für das inkorporierte Monoaminsubstrat. TGM2-vermittelt wird von den vier angebotenen biogenen Monoaminen in dieser Versuchsanordnung *in vitro* nur HA signifikant in alle drei TF inkorporiert (Abb. 42). Das Ausmaß dieser Histaminylierung ist dabei unabhängig von der Länge des jeweiligen Polyglutaminabschnittes (Abb. 53). Obwohl bei es bei BRN2 mit einer Länge des Abschnitts von 21 Glutaminen zu der stärksten Histaminylierung von 800 % gegenüber der Kontrolle kommt, unterscheidet sich das Signal der Modifikation zwischen NonO und SFPQ mit 500 % und 150 % fast um den Faktor drei, wobei der Polyglutaminabschnitt beider TF mit sechs bzw. fünf Glutaminen eine vergleichbare Länge hat. Dieser Unterschied könnte sich über die Sequenzumgebung beider Abschnitte erklären lassen, die eine Konsensussequenz für TGM darstellen könnten und ein TF unabhängig von der Länge seines Polyglutaminabschnittes gegenüber dem anderen TF zu einem bevorzugten Substrat machen würde [541]. Außerdem spielt für die Spezifität der TGM auch die Sekundärstruktur der Domäne eine Rolle, in der sich der Glutaminrest befindet [541]. So scheint der Zielglutaminrest hauptsächlich in  $\beta$ -Schleifen, am Ende von  $\beta$ -Faltblättern oder auch in ungeordneten Bereichen zu liegen. Die Anwesenheit zahlreicher positiv-geladener Reste um den Glutaminrest scheinen die TGM-vermittelte Reaktion zu inhibieren.

Dass neben der Serotonylierung auch die posttranslationale Modifikation mit weiteren biogenen Monoaminen, wie HA, DA und NE, im Kontext verschiedener Proteinsubstrate möglich ist, haben wir kürzlich anhand von *in vitro*-Daten zeigen können [77,542]. Weiterhin offenbarten Affinitäts-experimente mit synthetisierten Biotin-DA und Biotin-NE unter Verwendung verschiedener Zelllinien und anschließender Identifikation der aufgereinigten Proteine mittels Massenspektrometrie, dass eine Vielzahl von Proteinen unterschiedlichster Zellvorgänge dopaminyliert und norepinephrinyliert werden können. Es konnte darüber hinaus anhand von vaskulären SMC gezeigt werden, dass neben der Serotonylierung auch die Inkorporation von NE in Proteine eine physiologische Rolle spielen kann [264]. Dabei nehmen die Zellen NE auf und inkorporieren das Monoamin

**A**

MATAASNHYS LLTSSASIVH AEPPGGM<sup>QQQ</sup> AGGYREA<sup>QSL</sup> VQGDY<sup>GALQS</sup>  
 NGHPLSHAH<sup>Q</sup> WITALSHGGG GGGGGGGGGG GGGGGGGGDG SPWSTSP<sup>LGQ</sup>  
 PDIKPSVVV<sup>Q</sup> QGGRGDELHG PGAL<sup>QQQHQQ</sup> <sup>QQQQQQQQQQ</sup> <sup>QQQQQQQQQR</sup>  
 PPHLVHHAAN HHPGPGAWRS AAAAAHLPPS MGASNGGLLY S<sup>QPSFTVNGM</sup>  
 LGAGG<sup>Q</sup>PAGL HHHGLRDAHD EPHHADHHPH PHSHPH<sup>QQFP</sup> P<sup>PPPPQ</sup>GPPG  
 HPGAHDPHS DEDTPTSDDL EQ<sup>FAKQ</sup>FK<sup>QR</sup> RIKLGF<sup>TQAD</sup> VGLALGTLYG  
 NVFS<sup>Q</sup>TICR FEAL<sup>Q</sup>LSFKN MCKLKPLLNK WLEEADSSSG SPTSIDKIAA  
 QGRKRKR<sup>TS</sup> IEVSVKGALE SHFLKCPKPS AQEITSLADS L<sup>QLEKEVVRV</sup>  
 WFCNRR<sup>Q</sup>KEK RMTPPGGTLP GAEDVYGGSR DTPPHHG<sup>VQT</sup> PV<sup>Q</sup>

**B**

M<sup>Q</sup>SNKTFNLE K<sup>Q</sup>NHTPRKHH <sup>Q</sup>HHH<sup>QQQH</sup>HO <sup>Q</sup>QQQQ<sup>PPPPP</sup> IPANG<sup>QQ</sup>ASS  
 QNEGLTIDLK NFRKPGKETF T<sup>Q</sup>RSRLFVGN LPPDITEEEM RKLFEKYGA  
 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAEIAKVELD NMPLRGK<sup>QLR</sup> VRFACHSASL  
 TVRNLP<sup>Q</sup>YVS NELLEEA<sup>FSV</sup> FG<sup>Q</sup>VERAVVI VDDRGRPSGK GIVEFSGKPA  
 ARKALDRCE GSFL<sup>LLTTFPR</sup> PVTVEPMD<sup>QL</sup> DDEEGLPEKL VIKN<sup>QQ</sup>FHKE  
 RE<sup>Q</sup>PPRFA<sup>Q</sup>P GSFEY<sup>EYAMR</sup> WKALIE<sup>MEKQ</sup> <sup>Q</sup>QD<sup>Q</sup>VDRNIK EAREKLEMEM  
 EAARHEH<sup>Q</sup>VM LMR<sup>Q</sup>DL<sup>MRRQ</sup> EELRRMEELH N<sup>Q</sup>EV<sup>Q</sup>KR<sup>KQL</sup> ELR<sup>Q</sup>E<sup>ERRR</sup>  
 REEEMR<sup>Q</sup>Q<sup>Q</sup>E EMMRR<sup>Q</sup>Q<sup>Q</sup>EGF KGTFPDARE<sup>Q</sup> EIRMG<sup>Q</sup>MAMG GAMGINNRGA  
 MPPAPVPAGT PAPPGPATMM PDGTLGLTTP TTERFG<sup>Q</sup>AAT MEGIGAIGGT  
 PPAFNRAAPG AEFAPNKRRR Y

**C**

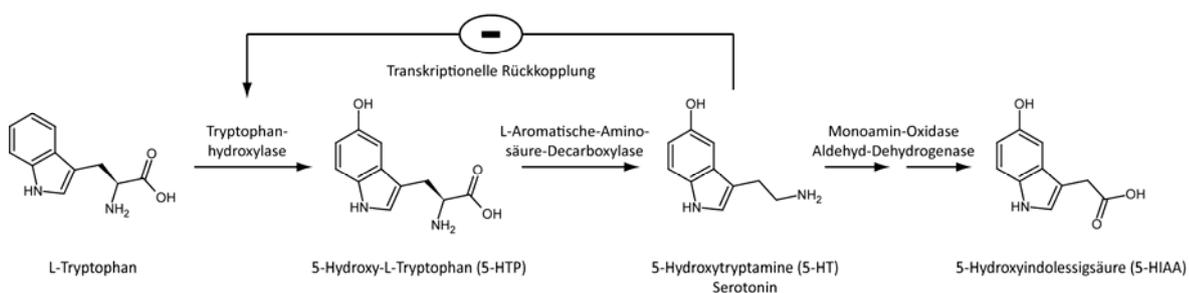
MSRDRFRSRG GGGGGFHRRG GGGGRGGLHD FRSPPPGMGL N<sup>Q</sup>NRGPMGPG  
 PG<sup>Q</sup>SGPKPPI P<sup>Q</sup>PPPH<sup>QQQQ</sup> <sup>Q</sup>PPP<sup>QQPPP</sup> <sup>Q</sup>PPPH<sup>QPPPH</sup> P<sup>Q</sup>PH<sup>QQQQ</sup>PP  
 PPP<sup>Q</sup>DSSKPV VA<sup>Q</sup>GPGPAPG VGSAPPASS APPATPPTSG APPGSGPGPT  
 PTPPPAVTSA PPGAPPPTPP SSGVPTTP<sup>Q</sup> AGGPPPPAA VPGPGPK<sup>Q</sup>  
 GPGGGPKGG KMPGGPKPGG GPGLSTPGGH PKPPHRGGGE PRGGR<sup>QHHP</sup>  
 YH<sup>Q</sup>QH<sup>Q</sup>GPP PGGPGRSEE KISDSEGFKA NLSLLRRPGE KTYT<sup>Q</sup>RCRLF  
 VGNLPADITE DEFKRLFAKY GEPGEVFINK GKGFGFIKLE SRALAEIACA  
 ELDDTPMRGR <sup>Q</sup>LRVRFATHA AALSVRNLS YVSNELLEEA FS<sup>Q</sup>FGPIERA  
 VVIVDDRGRS TGKGIVEFAS KPAARKAFER CSEGVLLTT TPRPVIVEPL  
 EQLDDEGLP EKLA<sup>Q</sup>KNPMY <sup>Q</sup>KERETPPRF AQHGTFEY<sup>EY</sup> S<sup>Q</sup>RWKSLEDEM  
 EK<sup>Q</sup>QRE<sup>Q</sup>VEK NMKDAKDKLE SEMEDAYHEH QANLLR<sup>Q</sup>QLM RR<sup>Q</sup>EELRRME  
 ELHN<sup>Q</sup>EM<sup>Q</sup>KR KEM<sup>Q</sup>LR<sup>Q</sup>EEE RRRREEEMMI R<sup>Q</sup>REMEE<sup>Q</sup>MR R<sup>Q</sup>REESYSRM  
 GYMDPRERDM RMGGGGAMNM GDPYSGG<sup>Q</sup>K FPPLGGGGGI GYEANPVVPP  
 ATMSGSMMS DMRTERF<sup>Q</sup>G GAGPVGG<sup>Q</sup>GP RGMGPGTPAG YGRGREEYEG  
 PNKKPRF

**Abbildung 53: Primärsequenzen der Transkriptionsfaktoren BRN2, NonO und SFPQ.** Zum Vergleich der Länge der PolyQ-Abschnittes der drei verwendeten TF sind die Sequenzen der Proteine gezeigt und die Q-Reste fett hervorgehoben. Es fällt auf, dass die Q-Abschnitte häufig von Prolin- (P) und H-Resten eingerahmt werden. Gezeigt sind jeweils die Sequenzen aus *Homo sapiens*. **(A)** Primärsequenz des TF BRN2 mit einer Länge von 443 aa und einem maximalen Q-Abschnitt von 21 Q. Quelle: NP\_005595.2 (Refseq Protein ID) **(B)** Die Primärsequenz von NonO weist eine Gesamtlänge von 471 aa und einen Q-Abschnitt mit sechs Q auf. Quelle: NP\_001138881.1 (Refseq Protein ID) **(C)** SFPQ hat eine Gesamtlänge von 707 aa und einen nicht durchbrochenen Q-Abschnitt von fünf Q. Quelle: NP\_005057.1 (Refseq Protein ID).

TGM2-abhängig, was zu einer Modulation der vaskulären Kontraktion der Zellen *in vitro* in einem Gewebepad führt. Die TGM2-vermittelte Inkorporation von HA, NE und 5-HT *in vitro* wurde neben der von Polyaminen bereits vor Jahrzehnten im Zuge der Charakterisierung von TGM2 entdeckt [240], jedoch wurde ihr bis vor einigen Jahren nie eine physiologische Funktion zugeordnet [86,260,448].

### 3.2 Die Monoaminylierung von BRN2 reguliert dessen Bindungskapazität an DNA

Eine mögliche physiologische Relevanz der Monoaminylierung von TF wurde am Beispiel von BRN2 mittels eines EMSA untersucht. Dafür wurde BRN2 *in vitro* serotonyliert und mit einem das PORE-Motiv-enthaltenden Oligonukleotid in das Affinitätsexperiment eingesetzt. Das serotonylierte BRN2 zeigte gegenüber der Behandlung mit TGM2 alleine eine um 40 % und gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine um 60 % verminderte Bindung an das OCT-spezifische Bindemotiv PORE (Abb. 43/44) [543]. Diese verminderte Bindungskapazität nach Modifizierung könnte *in vivo* zu der transkriptionellen Regulation beitragen. So könnte es im Kontext der 5-HT-Biosynthese im ZNS zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus kommen, der bei einer Akkumulation des Produkts 5-HT zu einer vermehrten Serotonylierung von BRN2 und damit zu einer verminderten Bindung des TF an den Promotor von *TPH2* und einer Abnahme der 5-HT-Synthese führen könnte (Abb. 54) [282]. Die gestörte Bindung an die Zielsequenz könnte auf einer direkten Störung der Protein-DNA-Interaktion beruhen oder auf einer verringerten Bildung von Homodimeren, die an Promotoren verschiedener Gene, wie *AADC*, dem Gen des Corticotropin-*releasing* Hormons (*CRH*) oder der Aldose C beobachtet wurde [544,545]. Zweiteres ist jedoch wahrscheinlicher, da die DBD von BRN2 *in vitro* nicht direkt modifiziert wurde (Absch. VI.3.1) und die Homodimerisierung von POU-TF Einfluss auf die DNA-Bindung nimmt [546]. Eine gestörte Interaktion mit Kofaktoren, wie TBP, TFIIB bzw. p300 oder eine Heterodimerisierung mit anderen POU-TF ist auszuschließen [547,548], da rekombinant aufgereinigtes BRN2 für den EMSA verwendet wurde. Einer Oxidation von Cysteinresten, die ebenfalls zu einer Abnahme der DNA-Bindung von BRN2 führen kann [549], wurde durch die Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol entgegengewirkt.



**Abbildung 54: Möglicher negativer transkriptioneller Rückkopplungsmechanismus in der Serotoninbiosynthese.** Nach der Akkumulation von 5-HT durch die zweistufige Synthese mittels TPH und AADC könnte die Serotonylierung des TF BRN2 und die damit verbundene verminderte Bindung an den TPH-Promotor zu einer Abnahme der Transkription von TPH führen (Absch. I.2.1.1). Diese Inhibition der Genexpression würde die weitere Synthese von 5-HT über einen negativen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus (-) herunterregulieren. Der Abbau von 5-HT über MAO und ALDH würde weiterhin parallel erfolgen und zusammen mit der Inhibition der Synthese in der Beseitigung des Signalmoleküls resultieren.

Die Abnahme der Protein-DNA-Interaktion durch Zugabe von 5-HT um bis zu 37 % könnte auf eine Interkalation des 5-HT zwischen DNA-Basen und v.a. auf eine bereits beschriebene unspezifische

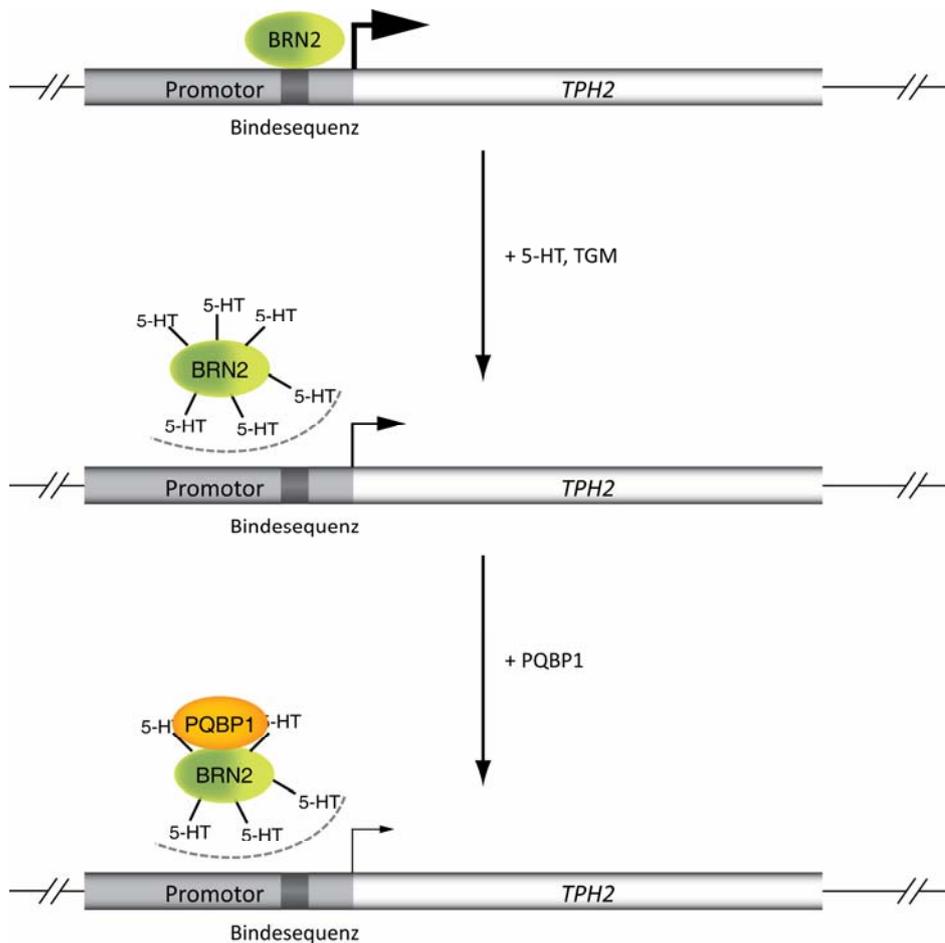
Bindung des Indolderivats an das DNA-Rückgrat zurückführen sein, die über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Kräfte vermittelt wird [550].

Einen Hinweis auf die mögliche physiologische Bedeutung der Transamidierung durch TGM2 in der transkriptionellen Regulation gibt die Erkenntnis, dass BRN1 und BRN2 aus RA-behandelten Zellkernextrakten an spezifische Promotorelemente von *PAX3* binden und RA die Expression der TGM2 in bestimmten Zelltypen hochreguliert [194,551]. Weiterhin zeigt sich bei Überexpression von BRN2 *in vitro* und *in vivo* kein aktivierender Einfluss auf die Expression von *CRH* oder des Vasopressingens, obwohl *Knockout*-Studien eine deutliche Beteiligung des TF zeigen, was sich mit einem fehlenden Stimulus oder Modifikation erklären ließe [552]. Tatsächlich sind zahlreiche posttranslationelle Modifikationen für BRN2 bekannt, die Oxidationen, Phosphorylierungen, Ubiquitylierungen, Sumoylierungen und Glykosylierungen einschließen [352]. Die Phosphorylierung eines Serinrestes in der POU<sub>H</sub>-Domäne führt zur Inhibition der Bindung der PORE- und NORE-Motive, jedoch nicht des MORE-Motivs, was auf eine regulatorische Funktion im zellulären Kontext schließen lässt [553]. Ebenso reduziert die Zellzyklus-abhängige Phosphorylierung von BRN2 die Bindekapazität an ein *Enhancer*-Element im Nestin-Promotor und verringert dadurch dessen Transkription [554].

### 3.3 Polyglutamin-bindende Proteine als Regulatoren der Genexpression

Um die physiologische Funktion der Monoaminylierung von TF weiter zu charakterisieren, wurden die Polyglutaminabschnitt-enthaltenden TF BRN2, NonO, SFPQ in Bezug auf ihre Affinität zu PQBP1 untersucht. Eine Monoaminylierung der TF *in vitro* führte zu einer verstärkten Bindung des PQBP1 gegenüber der Kontrolle ohne Monoamin (Abb. 46). Die Menge des gebundenen PQBP1 nahm dabei in unterschiedlichem Maße zu und war unabhängig von der Länge des modifizierten Polyglutaminabschnittes (Abb. 53). BRN2 mit einem Polyglutaminabschnitt von 21 Glutaminen zeigt eine Zunahme der PQBP1-Interaktion um 150 % nach Monoaminylierung, während NonO und SFPQ, die jeweils mit sechs und fünf aufeinanderfolgenden Glutaminresten einen vergleichbaren Polyglutaminabschnitt aufweisen, eine Bindungszunahme um 30 % und 320 % zeigten. Aufgrund der transkriptionellen Repression, die von PQBP1 auf BRN2 im Kontext der *TPH2*- und *DAR1A*-Promotoren ausgeübt wird [282,379], lässt sich schlussfolgern, dass die Monoaminylierung hier zu einer weiteren Inhibition der Genexpression führen würde (Abb. 55). Im Falle des *TPH2*-Promotors spricht das wiederum für einen negativen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus, der bei einer Akkumulation von 5-HT und einer verstärkten Serotonylierung von BRN2 zu einer Abnahme der *TPH2*-Expression führen würde (Absch. IV.3.2) [282]. Auch die Erkenntnis, dass die Polyglutaminabschnitt-bindende Domäne des PQBP1 autonom als transkriptioneller Aktivator fungieren kann und PQBP1 direkt die CTD der Pol II bindet [379,385],

deutet auf eine modulierende Funktion der Monoaminylierung auf die transkriptionelle Regulation durch PQBP1.



**Abb. 55: Potentielle regulatorische Funktion der Serotoninylierung im Kontext der Serotoninbiosynthese.** Bei Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo* könnte eine TGM-vermittelte Serotoninylierung des TF BRN2 zu einer verminderten Bindung des TF an den Promotor der *TPH2* führen. Zusammen mit der verstärkten Bindung von PQBP1 an BRN2 würde die Modifikation in einer Inhibition der Transkription des entsprechenden Gens und damit einem negativem transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus in der Synthese von 5-HT resultieren (Abb. 54). Diese Hypothese ließe sich auch auf die Regulation der Transkription weiterer Gene anwenden.

Interessant ist, dass auch von dem Koaktivator der basalen Transkription TAF<sub>II</sub>130 bekannt ist, dass dessen Aktivität unterdrückt wird, wenn das Protein an Polyglutaminabschnitte bindet [284]. Des Weiteren könnte es durch die Modifikation einen Einfluss auf Spleißprozesse geben, da PQBP1 mit dem spleißosomalen Proteinkomplex U5 interagiert und außerdem die Verteilung von weiteren Spleiß- und Kofaktoren beeinflusst [379,382]. Außerdem zeigt PQBP1 eine RNA-abhängige Interaktion mit RNA-bindenden Proteinen zu denen u.a. auch SFPQ gehört [555]. Die Kollokalisierung von PQBP1 mit diesen Proteinen und RNA in cytoplasmatischen Granula deutet auf eine Beteiligung von PQBP1 am cytoplasmatischen mRNA-Metabolismus und am Transport neuronaler RNA-Granula hin, der wichtig für die Entwicklung und Erhaltung neuronaler Netzwerke ist. Die Modifikation mit verschiedenen Neurotransmittern wie 5-HT oder DA könnte auch hierbei

eine Rolle spielen. Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, wie die Monoaminylierung *in vivo* eine regulatorische Funktion auf die transkriptionelle oder spleißosomale Aktivität von PQBP1 ausübt.

Da PQBP1 evolutionär stark konserviert ist und auch in niederen Organismen wie *C. elegans* und *A. thaliana* zu finden ist [284], überrascht es nicht, dass die Expression des Proteins in allen untersuchten humanen Geweben von Lunge, über Niere, Leber, Gebärmutterhals bis zu Mastzellen detektiert werden konnte (Abb. 47). Analog dazu wurden auch die Transkripte sämtlicher anderer Mitglieder der PQBP-Familie, die allesamt über die Bindung zu dem Polyglutaminabschnitt des TF BRN2 identifiziert wurden [274], in den verwendeten humanen Zelllinien gefunden. Eine Ausnahme bildet das Transkript von PQBP4, das aufgrund der fehlenden Annotation nicht untersucht wurde.

Auf die Expressionshöhe aufgrund der Signalstärke kann in diesem Versuchsansatz nicht geschlossen werden, da die Qualität der hergestellten cDNA variiert und die spezifischen Oligonukleotide unterschiedliche Effizienzen aufweisen. Die Expression aller untersuchten PQBPs in sämtlichen verwendeten humanen Zelllinien gibt Aufschluss über die Bedeutung dieser Proteine in vielfältigen basalen Funktionen. PQBP2 ist an lysosomalen Prozessen beteiligt und v.a. der Degradierung von Proteinen beteiligt und könnte daher regulatorisch auf die Genexpression wirken, indem es TF und transkriptionsassoziierte Faktoren der endosomalen Proteinsortierung zuführt [399–401]. Die verringerte Expression von PQBP2 in hepatozellulären Karzinomen unterstreicht die Wichtigkeit des Proteins in der Regulation der Hepatocytenproliferation [404]. Auch PQBP3 wirkt inhibierend auf das Zellwachstum und allelische Deletionen oder somatische Mutationen führen zu Tumoren unterschiedlicher Gewebe [408,411,524]. Weiterhin vermindert PQBP3 die Angiogenese von Xenotransplantaten, was auf eine verminderte Expression des VEGF und Thrombospondin-1 zurückzuführen ist und ebenfalls einen Einfluss auf transkriptionelle Prozesse erkennen lässt. PQBP5 ist in der Prozessierung von prä-mRNA und an der Ribosomenbiogenese beteiligt [413,414]. TERA nimmt durch die Bereitstellung von ATP an zahlreichen Prozessen teil, zu denen u.a. die Ubiquitin-abhängige Proteindegradierung, mRNA-Transport und die translationale Regulation gehört [418,420]. Außerdem schwächt TERA die hepatotoxische Wirkung von Chrom(VI)-Verbindungen ab [430]. Die Untersuchung des Einflusses der Monoaminylierung auf die Bindung der weiteren PQBP an ihre Zielproteine, assoziierter transkriptioneller und translationeller Vorgänge und damit auch auf die Hepatocytenproliferation ist daher vielversprechend. Die Befunde hinsichtlich der veränderten Interaktion des PQBP1 mit drei verschiedenen TF deuten alle auf die potenzielle Regulierung dieser Prozesse durch die neuartige postranslationelle Modifikation mit Monoaminen.

## 4 Der glutaminreiche Transkriptionsfaktor CREB ist ein Substrat für die TGM-vermittelte Monoaminylierung

### 4.1 Glutaminreiche Abschnitte werden TGM-abhängig transamidiert

Um zu überprüfen, ob auch glutaminreiche TF Substrate der TGM-vermittelten Monoaminylierung sind, wurde der TF CREB analog zu den Polyglutaminabschnitt-enthaltenden TF *in vitro* sowohl mit dem fluoreszierenden Monoamin MDC, als auch mit den radioaktiv markierten biogenen Monoaminen 5-HT, HA, DA und NE umgesetzt. Für die Inkorporation von MDC wurde sowohl das vollständige CREB-Protein, wie auch eine verkürzte Variante (S142') verwendet, welche die Q1-, aber nicht die Q2-Domäne enthielt (Abb. 8). Beide Varianten zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abb. 48), womit nachgewiesen ist, dass die Q1-Domäne des CREB monoaminyliert wird. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch die Q2-Domäne ein Proteinsubstrat der TGM darstellt. Von den vier angebotenen biogenen Monoaminen wurden 5-HT und HA signifikant TGM2-vermittelt in CREB inkorporiert (Abb. 49). HA zeigt dabei mit 180 % eine um fast das zehnfach gesteigerte Inkorporation gegenüber der Modifikation mit 5-HT, die gegenüber der unspezifischen Kontrolle bei 20 % liegt. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren *in vitro*-Untersuchungen überein, die zeigen, dass HA *in vitro* das bevorzugte Substrat der TGM2 ist [178,556].

Es ist bekannt, dass die Aktivität von CREB nicht nur über Phosphorylierungen gesteuert wird, sondern auch Modifikationen wie Ubiquitylierung, Sumoylierung, Acetylierung und Glykosylierung modulierend wirken [309–311], und dass nur 2 % der CREB-abhängigen Gene über die Erhöhung des cAMP-Spiegels gesteuert werden [296]. So könnte man sich vorstellen, dass die Monoaminylierung von CREB *in vivo* regulativ wirksam wird, wenn  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen wie CaMKI, II und IV oder  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Formen der Adenylat-Cyclase und parallel die Transamidaseaktivität der TGM aktiviert werden [299–301,308]. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Transamidierung benötigt je nach verwendeten Gewebeextrakt und Proteinglutamindonor intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 3-90  $\mu\text{M}$  [189]. Obwohl cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Bereich von 100 nM liegen, werden über verschiedene Signalwege kurzzeitig intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im mikromolaren Bereich erreicht, wodurch sich die Ergebnisse durchaus auf die *in vivo*-Situation übertragen lassen [556]. Außerdem gibt es eine Untersuchung, die zeigt, dass bereits intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 70-700 nM oder ein Rückgang der GTP-Konzentration um 20 % ausreichen um die Transamidaseaktivität der TGM2 zu aktivieren [557].

Des Weiteren sind einige Monoaminrezeptoren an Signalkaskaden gekoppelt, die intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  mobilisieren. So konnte gezeigt werden, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung durch 5HTR2A ausreicht um TGM in Neuronen und Thrombocyten zu aktivieren [86,270,558]. Weiterhin ist bekannt, dass die Q2-Domäne von CREB essentiell für die basale Aktivität des TF ist [313]. Die Interaktionen

dieser Domäne mit Komponenten der Pol II-Maschinerie, wie TFIIB oder TAF<sub>II</sub>130/135, könnten über Monoaminylierungen gesteuert werden [314,315]. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass pathologisch verlängerte Polyglutaminabschnitte bevorzugt TAF<sub>II</sub>130 binden und damit die CREB-abhängige Transkription inhibieren, was vermutlich zum beobachteten neuronalen Zelltod der entsprechenden degenerativen Erkrankungen beiträgt [333]. Daneben könnte auch eine Modifikation der Domänen Q1-Q4 von TAF<sub>II</sub>130/135 selbst eine Rolle spielen [321]. Außerdem vermittelt die Q2-Domäne von CREB zusätzlich zur bZIP-Domäne die Verweildauer der TF an der jeweiligen Zielsequenz eines Promotors [318], wodurch auch die DNA-Bindung von CREB analog zu den *in vitro*-Ergebnissen mit BRN2 durch die Modifikation mit Monoaminen beeinflusst werden könnte (Absch. IV.3.2).

Einen weiteren Hinweis auf eine funktionelle *in vivo*-Aktivität der Monoaminylierung gibt der Befund, dass die Aktivierung des *CRH*-Promotors durch CREB nicht alleine von der Phosphorylierung des TF abhängt, sondern zusätzlich ein Ca<sup>2+</sup>/Phospholipid-abhängiger Signalweg zu der Aktivierung von CREB in diesem Zusammenhang beiträgt [559]. Die Phosphorylierung ist hierbei notwendig, aber nicht ausreichend und weitere unbekannte Modifikationen oder Interaktionen mit Koaktivatoren scheinen stattzufinden. Weiterhin inhibiert Insulin die basale und PKA-induzierte transkriptionelle Aktivität von CREB ohne dass es zu einer Reduzierung der Ser133-Phosphorylierung kommt [290]. Ebenso reguliert im Nukleus befindliches Ca<sup>2+</sup> die CREB-abhängige Transkription und damit die Bindung des TF an das Ca<sup>2+</sup>-Response-Element, unabhängig von der genannten Phosphorylierung oder einer CaMKII-Aktivität.

#### **4.2 Die Monoaminylierung und Phosphorylierung von CREB beeinflussen das Ausmaß der jeweils anderen Modifikation**

Zur Überprüfung einer möglichen physiologischen Relevanz der Monoaminylierung auf die Funktion des TF CREB wurde dieser *in vitro* mit einem radioaktiv markierten Phosphatrest versehen. Vor dieser Phosphorylierung wurde der TF entweder nicht behandelt oder mittels TGM2 serotonyliert. Gegenüber der Phosphorylierung in Anwesenheit der PKA alleine gibt es nach der zuvorigen Behandlung mit TGM2 eine deutliche Abnahme um 50 % (Abb. 50). Diese Abnahme ist zum Teil auf eine Polymerisierung zurückzuführen, wie die Kontrolle ohne 5-HT zeigt, die ebenfalls eine Abnahme der Phosphorylierung um 35 % bedingt. Jedoch führt das Fehlen eines Monoaminsubstrates zum einen zu einer vermehrten Polymerisierung [560] (Absch. III.3.1 und III.4.1) und zwischen der Kontrolle und der monoaminylierten Probe besteht trotzdem ein signifikanter Unterschied von 15 %, was eindeutig auf einen direkten Einfluss der Serotonylierung auf das Ausmaß der Phosphorylierung hinweist. Eine Abnahme der Phosphorylierung um 15 % durch eine Polymerisierung von CREB und damit einer sterischen Hinderung der PKA, lässt sich ebenfalls in

dem Kontrollansatz sehen, der erst nach Beginn der Phosphorylierung mit TGM2 behandelt wurde.

Analog zu dem radioaktiven Filterexperiment wurden die Proben nach der Behandlung mittels eines Silber-gefärbten denaturierenden Polyacrylamidgels und zusätzlich über Immunoblotting analysiert. Die Silberfärbung zeigt ein deutliches Signal auf der Höhe des Molekulargewichtes von CREB, wenn TGM2 nicht alleine oder zuerst zu dem TF gegeben wird (Abb. 52). Das verringerte Signal von CREB bei Behandlung mit TGM2 zeigt eine teilweise Polymerisierung des TF durch die Transamidierungsfunktion des Enzyms. Interessanterweise kann TGM2 diese Polymerisierung nicht vornehmen, wenn CREB zuvor durch PKA phosphoryliert wurde. Dies könnte einerseits auf eine Überdeckung der TGM2-Bindungssequenzen durch die sterisch voluminösen, negativ geladenen Phosphatgruppen zurückzuführen sein [290,541]. So zeigt sich für TGM2 eine veränderte Affinität zum Proteinsubstrat RB, wenn dieses phosphoryliert vorliegt, was auf eine veränderte Faltung und exponierte Lysin- und Glutaminreste von RB schließen lässt [195]. Andererseits könnte die verringerte Polymerisierung auch einer direkten Modifikation von TGM2 durch die PKA geschuldet sein, die nachweislich die Transamidasefunktion des multifunktionellen Enzyms abschwächt und dessen intrinsische Kinasefunktion verstärkt [561]. Die exemplarische Wiederholung mit der unabhängigen Methode des Immunoblottings unter Verwendung eines Phospho-CREB-spezifischen Antikörpers bestätigte die ermittelte Abnahme der PKA-abhängigen Phosphorylierung von CREB nach Serotonylierung (Abb. 51). Jedoch zeigt sich, dass das Immunoblotting nur bedingt für Quantifizierungen geeignet ist, da man hier von der Spezifität des verwendeten Antikörpers abhängig ist. In diesem Beispiel sieht man, dass der Phospho-CREB-spezifische Antikörper teilweise das unphosphorylierte Protein erkennt, da auch in den Ansätzen ohne PKA ein geringes Signal auftritt.

Ein Einfluss des serotonergen Systems auf die Phosphorylierung von CREB wurde bereits im präfrontalen Cortex gezeigt, wo die chronische Gabe des SERT-Inhibitors Fluoxetin die Menge an phosphoryliertem CREB im Nukleus erhöhte. Die gesteigerte Phosphorylierung ist vermutlich auf eine Aktivierung der CaMKIV und der MAPK ERK1/2 zurückzuführen [562]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verminderte TGM2-Level oder -Aktivität die Phosphorylierung und die Bindung von CREB an den Promotor von *MMP2* verhindert, was mit einer TGM2-induzierten Degradierung der Proteinphosphatase 2 einhergeht [563]. Auch während der Differenzierung von Erythrocyten kommt es zu einer TGM2-vermittelten Aktivierung von AKT und einer Inaktivierung von ERK1/2 und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung von CREB [564]. Daneben ist TGM2 in der Lage die Aktivität der Adenylat-Cyclase zu verstärken, indem die Konformation des Enzyms verändert und damit in differenzierenden, neuronalen Zellen der Phosphorylierungsstatus von CREB erhöht wird [205].

Zusätzlich bestehen weitere Verknüpfungen von CREB mit dem serotonergen System. In Osteoblasten führt die Aktivierung von 5HTR1B über das G-Protein  $G_{\alpha i}$  und resultierender Abnahme der cAMP-Produktion zur Inhibierung von CREB. Durch die verminderte Bindung des TF an den Promotor des Gens von Cyclin D1 kommt es zur Proliferationsinhibition der Zellen, was eine Abnahme der Knochenmasse bewirkt [78]. In *C. elegans* reguliert das CREB-Homolog CRH1 die Expression von *Tph1* und damit das serotonerge System des Fadenwurms [565]. Weiterhin hat sich gezeigt, dass auch das dopaminerge System über DAR1 und DAR5 zusammen mit einer  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung Einfluss auf die Dauer der Phosphorylierung von CREB und damit die Expression des CRE-enthaltenden Gens von FOS nimmt [566]. Ebenso führt die Aktivierung des DAR1 im Striatum zusammen mit einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB [567]. Während der Differenzierung von Oligodendrocyten führt die Behandlung mit HA über eine  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung zu der Aktivierung von PKC und MAPK und damit zu einer Phosphorylierung des TF [568]. Zusammengenommen deutet die in dieser Arbeit gezeigte in vitro-Monoaminylierung von CREB und deren Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad des TF auf eine regulatorische Funktion dieser Modifikation innerhalb der Genexpression. Die Untersuchung einer physiologischen Funktion scheint v.a. im Kontext der Osteoblastenproliferation lohnenswert.

## 5 Schlussfolgerung und therapeutischer Ausblick

Im Rahmen dieser Promotion sollte der Einfluss des peripheren 5-HT-Spiegels auf die freiwillige Selbstverabreichung von Ethanol und ein damit verbundenes erhöhtes Risiko zur Ausbildung eines Alkoholismus untersucht werden. Grundlage für diese Annahme war zum einen die Tatsache, dass die zweite eigentlich neuronale TPH-Isoform, TPH2 erst 2002 entdeckt wurde. Daraus ergibt sich die Problematik, dass frühere Untersuchungen fälschlicherweise davon ausgingen, dass die periphere Isoform TPH1 die neuronale und auch einzige Isoform des Enzyms ist [83,95]. Außerdem liegen Studien an verschiedenen humanen ethnischen Gruppen, die intronische Polymorphismen der peripheren Isoform TPH1 direkt mit einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung eines Alkoholismus und außerdem mit einem frühen Eintrittsalter in die Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang bringen [434–436]. Zusätzlich gibt es humane und murine Genkopplungsstudien, die eine erhöhte Ethanolpräferenz mit den chromosomalen Abschnitten in Verbindung bringen, auf denen jeweils *TPH1* (11p15) und *Tph1* (7qB4) liegen [432,433,466]. Interessanterweise finden sich sowohl in männlichen als auch in weiblichen Alkoholikern nahezu halbierte 5-HT-Spiegel in Thrombocyten, die der Hauptspeicherort für peripheres 5-HT sind [19,467,468]. Damit stellte sich die Frage, ob verminderte periphere 5-HT-Spiegel die Ursache

eines chronischen Alkoholkonsums sein können, oder ob ein chronischer Alkoholkonsum die Ursache der beobachteten verminderten peripheren 5-HT-Spiegel ist.

Der signifikant höhere Ethanolkonsum von *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren, der mit 5-HTP-Gabe normalisiert werden kann (Absch. IV.1.1 und IV.1.2), spricht dafür, dass die Verminderung an peripherem 5-HT die Ursache für eine vermehrte freiwillige Ethanolaufnahme bildet. Dieses lässt sich über eine erhöhte Expression von *Aldh2* erklären, die in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere vorliegt (Absch. IV.2.1) und damit auch in humanen Individuen mit verminderten 5-HT-Spiegel zu finden sein sollte. Eine erhöhte Menge ALDH2 führt zu einem gesteigerten Abbau des Ethanolproduktes Acetaldehyd und damit zu einer Abnahme der typischen „Katersymptome“, wie Übelkeit, Kopfschmerz und Schwindel [20,21]. Polymorphismen in *ALDH2*, welche die Aktivität des Enzyms herabsetzen, führen bei den humanen Betroffenen aufgrund der dysphorischen Effekte zu einer Aversion gegen den Konsum von Alkohol. Des Weiteren senkt die siRNA-vermittelte Reduktion der mRNA von *Aldh2* die Ethanolaufnahme von Tieren um bis zu 60 % [22,23].

Bemerkenswerterweise kann damit einer Verringerung von peripheren 5-HT-Spiegeln die Entstehung eines Alkoholismus zugeschrieben werden, also einer psychiatrischen Erkrankung. Gemeinhin würde man erwarten, dass ausschließlich zentralnervös vorliegendes 5-HT an der Entstehung eines Alkoholismus beteiligt sein müsste, nicht jedoch peripher vorhandenes 5-HT. Der Einfluss eines gestörten Stoffwechselforganges auf neurobiologische Vorgänge ist jedoch auch bei der Stoffwechselstörung Phenylketonurie bekannt [569,570]. Bei dieser Erkrankung kann aufgrund des Fehlens oder der fehlenden Aktivität der Phenylalanin-Hydroxylase Phenylalanin nicht zu Tyrosin hydroxyliert werden. Es kommt zu einer Anreicherung von Tyrosin und dessen Metaboliten Phenylpyruvat, Phenylacetat und Phenyllactat, was ohne rechtzeitige und andauernde Behandlung zu einer schweren geistigen Entwicklungsstörung mit einer Epilepsie führt.

Die Expression von *Aldh2* wird u.a. von SP1 aktiviert [508], dessen Transkript in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren nur tendenziell erhöht ist (Absch. IV.2.1). Des Weiteren zeigt sich in der Leber der Tiere eine Fehlregulation zahlreicher Gene, von denen ein Teil unter der transkriptionellen Kontrolle von SP1 steht und die auf die starke Verminderung von 5-HT in der Peripherie der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere zurückzuführen sein muss (Absch. I.2.1.1). Daher wurde überprüft, ob analog zu der mit zahlreichen physiologischen Funktionen verbundenen Serotoninylierung von kleinen und heterotrimeren GTPasen (Absch. I.2.5) eine Monoaminylierung von TF *in vitro* nachgewiesen werden kann. Hierbei ergab sich eine Histaminylierung der Polyglutaminabschnitt enthaltenden TF BRN2, NonO und SFPQ und des glutaminreichen TF CREB (Absch. IV.3.1 und IV.4.1.). Obwohl die

Monoaminylierung von SP1 im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, müsste sich die bei CREB gezeigte Modifikation auch auf SP1 übertragen lassen, da die glutaminreichen Domänen beider TF homologe Funktionen aufweisen. Zum einen lässt sich die mutierte Q2-Domäne von CREB in einem Fusionsexperiment gegen die glutaminreiche B-Domäne von SP1 austauschen, wodurch die inhibierte Genexpression wieder aktiviert wird [318]. Zum anderen interagiert SP1 mit dem TAF<sub>II</sub>130/135-Homolog aus *D. melanogaster* (dTAFII110) über einen hydrophoben Abschnitt, der dem in der Q2-Domäne von CREB sehr ähnlich ist [290]. Die Q2-Domäne von CREB ist essentiell für die basale Aktivität des TF [313], da sie die Interaktion mit Komponenten der Pol II-Maschinerie, wie TFIIB und TAF<sub>II</sub>130/135 vermittelt [316,317].

Dass es einen Einfluss von TGM2 auf die SP1-abhängige transkriptionelle Regulation gibt, konnte bereits im Kontext des p21-Promotors gezeigt werden, bei welchem die Bindung des TF an die Zielsequenz und die Aktivierung der SP1-vermittelten Expression über eine Kotransfektion von TGM2 verstärkt wird [200]. Die Transfektion mit TGM2 erhöhte weiterhin die Menge an SP1 in den Zellen. Die verstärkte Aktivität wurde auf eine Dimerisierung von SP1 zurückgeführt, könnte jedoch auch mit einer Monoaminylierung des TF verbunden sein. Der transkriptionelle Einfluss von TGM2 konnte auch im Zusammenhang mit anderen Genen beobachtet werden. So zeigte sich in differenzierenden neutrophilen Granulozyten, dass ein RA-Stimulus zur Translokation von TGM2 in den Nukleus, einer Assoziation des Enzyms mit Chromatin und einer veränderten Expression verschiedener Gene der Chemotaxis, Phagozytosefähigkeit und Superoxidproduktion führt [187]. In einem neuronalen HD-Zellmodell reprimierte TGM2 die Aktivität von mitochondrialen Genen und scheint an der Expression von 40 % aller fehlregulierten Gene beteiligt zu sein, welche Histone und Chaperone einschließen [232].

Außerdem interagierte TGM im Nukleus direkt mit Histon H3. Tatsächlich sind 14 % der TGM2-Substrate oder -Interaktionspartner nukleäre Proteine, zu denen z.B. der Androgenrezeptor, Ataxin 1 und Lamin A und C gehören [187]. Auch im Kontext des MMP9-Promotors scheint TGM2 eine transkriptionelle Funktion einzunehmen, indem es JUN bindet und damit die Bindung des AP1-Komplexes an den Promotor blockiert [204]. Verschiedene Anhaltspunkte weisen zusätzlich auf eine TGM2-vermittelte Aktivierung von NFκB, die durch eine Bindung des NFκB-Inhibitors IκBα realisiert werden könnte [211].

Einen weiteren Hinweis auf einen physiologischen Einfluss von intrazellulärem 5-HT auf die Genexpression gibt eine Studie an *Sert*-defizienten Mäusen, die in der Lunge der Tiere eine Veränderung in der Expression von 124 Genen aufzeigt [529]. Obwohl die Beteiligung von TGM2 an vielfältigen transkriptionellen Prozessen nachgewiesen ist und das Enzym zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose zu steuern scheint, ist der genaue Mechanismus

bisher ungeklärt [187] und ließe sich über eine funktionelle Rolle der Monoaminylierung erklären. Diese Funktionalität deutet sich in den *in vitro*-Experimenten an, die zum einen eine verminderte Bindung von BRN2 an eine Zielsequenz nach Serotonylierung ergeben (Absch. IV.3.2) und zum anderen eine verminderte Phosphorylierung von CREB durch PKA nach Serotonylierung zeigen (Absch. IV.4.2). Des Weiteren verstärkt die Monoaminylierung von drei Polyglutaminabschnitt-enthaltenden TF die Bindung zu PQBP1 (Absch. IV.3.3), dessen reprimierender Einfluss auf die BRN2-vermittelte Genexpression bereits im Kontext von zwei verschiedenen Genen gezeigt werden konnte [282,379].

Dass es trotz niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ - und hoher GTP-Spiegel in der nicht-apoptotischen Zelle zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivierung der Transamidierungsfunktion von TGM2 kommen kann, ließe sich über temporäre signalbedingte Erhöhungen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels erklären. Die cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration liegt im Durchschnitt bei 100 nM, kann aber durch Stimuli bis zum mikromolaren Bereich ansteigen [189]. Dieses oder ein Abfall des GTP-Spiegels um 20 % reichen aus, um die Transamidierungsfunktion von TGM2 zu aktivieren. In manchen Zelltypen kommt es außerdem selbst unter physiologischen Bedingungen in einzelnen Kompartimenten oder Mikrodomänen zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen die einige hundert Mikromol erreichen können. Des Weiteren scheint es Speißvarianten von TGM2 zu geben, deren Transamidierungsfunktion unter einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 3–4  $\mu\text{M}$  aktiviert wird bzw. weniger sensitiv gegenüber der Inhibition durch GTP sind. Interessanterweise sensibilisiert das Membranlipid Lysophosphatidylcholin TGM2 für  $\text{Ca}^{2+}$ , sodass die Transamidierungsfunktion des Enzyms schon nah am physiologischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel aktiviert werden kann [541]. Die Signalgebung zur Monoaminylierung von TF muss nicht Rezeptor-unabhängig verlaufen, sondern wird vermutlich in einer synergistischen Wirkung mit den jeweiligen Monoaminrezeptoren realisiert werden. Diese Synergie zeigte sich bereits bei einer Studie bezüglich der Thrombocytenaggregation, bei der die Stimulierung von 5HTR2A und der damit verbundene  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Einstrom mit einer Aktivierung von TGM2 und Serotonylierung der kleinen GTPasen RHOA und RAB4 einherging [86]. Parallel dazu kommt es in der kortikalen Zelllinie A1A1v nach Stimulation von 5HTR2A zur Serotonylierung von RAC1 [270]. Ebenso könnte DA über DAR2 Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel nehmen, da eine Aktivierung des Rezeptors über einen ungeklärten Mechanismus die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung inhibiert [571]. Zusätzlich gibt es durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von PKC eine Internalisierung der an der Plasmamembran befindlichen DAT [149]. Die Anwesenheit von SERT und NET an der Plasmamembran wird ebenfalls über die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige CaMKII gesteuert.

Die beobachtete Fehlregulation der Genexpression in der Leber der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere könnte ebenfalls die Ursache für die gestörte Leberregeneration [19] und die anhand der leberrelevanten Blutparameter ermittelten Leberschäden der Tiere sein (Absch. IV.1.5). Anhand hepatischer Zelllinien

konnte gezeigt werden, dass Leberzellen generell in der Lage sind Proteine zu dopaminylieren (Absch. IV.2.4). Dass in den verwendeten Zelllinien keine Serotonylierung detektiert werden konnte, müsste auf die Detektionsgrenze der Methode oder chromosomale Veränderungen der Tumorzelllinien zurückzuführen sein [497], die sich auch in der differentiellen Expression mehrerer betrachteter Gene zwischen einzelnen Zelllinien zeigt (Absch. IV.2.4). Ebenso scheinen die Tumorzelllinien ungeeignet für Proliferationsstudien zu sein, da hier im Gegensatz zu den *in vivo*-Befunden kein proliferationssteigernder Einfluss von 5-HT auf hepatische Zellen gezeigt werden konnte (Absch. IV.1.6). Für eine physiologische Rolle von TGM und im speziellen der Serotonylierung von TF im Kontext der Hepatocytenproliferation spricht neben den Beobachtungen in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren, dass es nach einer partiellen Hepatektomie einen verstärkten Einbau der Polyamine Spermin, Spermidin und Putrescin in Leberproteine gibt [226].

Außerdem führt das Cytokin EGF, das auf Hepatocyten proliferationsfördernd wirkt, zu einer Desensibilisierung von TGM2 gegenüber der Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup> [572]. Bei humanen Individuen mit chronischem Ethanolkonsum könnte der verminderte 5-HT-Spiegel [19,467,468] durch eine Fehlregulation von Zellwachstum-assoziierten Genen (Absch. IV.2.1) die direkt durch Ethanol verursachten Leberschäden verstärken [4,9]. Außerdem könnte eine durch Ethanol verursachte gestörte Aktivierung von TGM zu diesem Effekt beitragen. So führte die Fütterung von Ratten mit Ethanol zu einer Verminderung des Retinolsäurespiegels in Leber und Plasma der Tiere, während die Expression von RARalpha, -beta, and -gamma in Bezug auf die Kontrollgruppe unverändert blieb [573]. Außerdem beeinflussen Störungen des zellulären Energiemetabolismus, die durch chronischen Alkoholkonsum verursacht werden, die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel und damit auch die Aktivierung von TGM [189]. Eine dauerhafte Aktivierung von TGM2 könnte so auch zur Apoptose von Leberzellen führen oder eine verstärkte Polymerisierung bestimmter Proteine wie Keratine verursachen, die zusammen mit der Bildung von Mallory-Körperchen in diversen Lebererkrankungen gefunden werden kann [177]. 5-HT spielt eine entscheidende Rolle bei der Abwendung von apoptotischen Vorgängen [574], weshalb es als Substrat der TGM2 die mit der Apoptose verbundene Polymerisierung durch das Enzym verhindern könnte.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ergeben sich neuartige Ansätze in der Therapie von Patienten mit Alkoholismus. Die Patienten könnten begleitend zur Suchttherapie mit dem 5-HT-Vorläufer 5-HTP behandelt werden, der zu einer Erhöhung des peripheren aber auch des zentralnervösen 5-HT-Spiegels führen würde [87]. Die damit verbundene Normalisierung der Genexpression in der Leber würde u.a. zu einer Abnahme der Expression von *ALDH2* und dadurch zu einem verringerten Abbau von Acetaldehyd führen [13]. Durch die negativen dysphorischen Auswirkungen des erhöhten Acetaldehydspiegels würde es vielleicht zu einer freiwilligen Reduktion des Ethanolkonsums kommen [20,21]. Außerdem könnte 5-HT aufgrund der mitogenen Eigenschaften und

des Einflusses auf die Normalisierung der Expression von proliferations-assoziierten Genen (Absch. IV.2.1) die häufig in Alkoholikern auftretenden Leberschäden abmildern [5,6]. Bisher werden Patienten mit einer alkoholbedingten Lebererkrankung hauptsächlich über eine die Abstinenz unterstützende psychologische Therapie und eine Verbesserung des Nährstoffstatus behandelt [16]. Einige Patienten bekommen zusätzlich einen irreversiblen ADH-Inhibitor, der jedoch hepatotoxisch wirkt und daher nur in frühen Stadien des Alkoholismus eingesetzt wird. Die letzte Stufe in der Behandlung einer alkoholbedingten Lebererkrankungen ist die Lebertransplantation. Die Erhöhung des zentralnervösen 5-HT-Spiegels könnte hier ebenfalls zu einem Therapieerfolg beitragen, da verringerte 5-HT- und 5-HIAA-Spiegel im ZNS und eine veränderte serotonerge Neurotransmission [437], gekennzeichnet durch verringerte Affinitäten zu SERT und 5HTR [469,470], auch eine Rolle bei der Entwicklung eines Alkoholismus spielen. Daneben könnte natürlich auch TGM als Zielobjekt zur Normalisierung der Fehlregulation in der Genexpression der Leber eingesetzt werden. Dafür sind jedoch weitere Studien notwendig. Je nachdem ob es im Kontext der Leberschäden eine Überaktivierung von TGM oder eine Inhibition gibt, könnte man dann mit TGM-Inhibitoren gegensteuern oder über spezifische Signalwege versuchen die Transamidaseaktivität der TGM zu erhöhen [575].

5-HTP selbst ist als Nahrungsergänzungsmittel auf dem amerikanischen Markt und wird seit einigen Jahrzehnten v.a. im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen therapeutisch angewendet [576]. Gewonnen wird 5-HTP aus der afrikanischen Schwarzbohne *Griffonia simplicifolia*, in der es in hohen Konzentrationen zu finden ist. Bei oraler Gabe wird ein Großteil bereits in der Peripherie zu 5-HT metabolisiert und nur ein kleiner Teil gelangt in das ZNS [577]. Jedoch kann 5-HTP im Gegensatz zu 5-HT die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Um die Menge an 5-HTP im ZNS zu erhöhen, wird es häufig in Kombination mit ausschließlich peripher wirkenden Inhibitoren von AADC verabreicht, welche die Umwandlung von 5-HTP zu 5-HT verhindern [578]. Bei der Erzielung von zentralnervösen Therapieansätzen kann durch diese kombinierte Gabe die Dosis von 5-HTP soweit verringert werden, dass periphere Nebenwirkungen wie Durchfall, Übelkeit und Erbrechen nicht auftreten [576]. Weiterhin können stark erhöhte 5-HT-Spiegel auch das „Serotoninsyndrom“ auslösen, das sich durch Schwindel, Desorientierung, Kopfschmerzen, Bluthochdruck, Schweißausbrüche und Schüttelkrämpfe auszeichnet [579]. Dieses tritt jedoch meist in Kombination mit der Einnahme von 5-HT-Wiederaufnahme- oder MAO-Hemmern auf und wurde bisher nicht für die alleinige Einnahme von 5-HTP beschrieben.

Betrachtet man die in dieser Arbeit beschriebene signifikant erhöhte Aufnahme von Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen durch *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse und die signifikante Senkung des freiwilligen Ethanolkonsums der Tiere durch die Gabe von 5-HTP, kommt man zu der Schlussfolgerung, dass verminderte periphere 5-HT-Spiegel auch eines der Risiken für die

Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit beim Menschen darstellt. Die genetische Ursache für diese Verminderung ist in Polymorphismen von *TPH1* zu suchen. Die Verabreichung von 5-HTP scheint somit ein lohnenswerter neuer Therapieansatz bei der Suchttherapie von Alkoholikern zu sein.



## V Literatur

1. DARWISH, ABD RABOH, & MAHDY (2012). Camel's milk alleviates alcohol-induced liver injury in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 1377–1383.
2. CAO, HU, YE, ET AL. (2011). Association between the 5-HTR1B gene polymorphisms and alcohol dependence in a Han Chinese population. *Brain Res.*, 1376: 1–9.
3. PREEDY, REILLY, PATEL, ET AL. (1999). Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole body. *Nutrition*, 15: 604–608.
4. NIEMELÄ (2001). Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 1533–1538.
5. LIU, HOU, YAO, ET AL. (2010). Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. *Toxicol. In Vitro*, 24: 516–522.
6. SMATHERS, GALLIGAN, STEWART, & PETERSEN (2011). Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem. Biol. Interact.*, 192: 107–112.
7. CHEDID, MENDENHALL, GARTSIDE, ET AL. (1991). Prognostic factors in alcoholic liver disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 86: 210–216.
8. LITOV, GEE, DOWNEY, & TAPPEL (1981). The role of lipid peroxidation during chronic and acute exposure to ethanol as determined by pentane expiration in the rat. *Lipids*, 16: 52–57.
9. O'SHEA, DASARATHY, & MCCULLOUGH (2010). Alcoholic liver disease. *Hepatology*, 51: 307–328.
10. ZHAO, CHEN, FU, & ZHANG (2008). ChemInform Abstract: Synthesis of Novel Pyrrolo[1',5'-a]-1,8-naphthyridine Derivatives Through a Facile One - Pot Process. *ChemInform*, 39: 2145–2152.
11. BREITKOPF, NAGY, BEIER, ET AL. (2009). Current Experimental Perspectives on the Clinical Progression of Alcoholic Liver Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 33: 1647–1655.
12. MIÑANA, GÓMEZ - CAMBRONERO, LLORET, ET AL. (2002). Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*, 35: 1205–1214.
13. RIVERA-MEZA, QUINTANILLA, & TAMPIER (2012). Reduction of Ethanol Consumption in Alcohol-Preferring Rats by Dual Expression Gene Transfer. *Alcohol and Alcoholism*, 47: 102–108.
14. SZALAI, DUESTER, FRIEDMAN, ET AL. (2002). Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *European Journal of Biochemistry*, 269: 224–232.
15. MUZIO, MAGGIORA, PAIUZZI, ET AL. (2012). Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.*, 52: 735–746.
16. GAO & BATALLER (2011). Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology*, 141: 1572–1585.
17. SHEN, AJMO, ROGERS, ET AL. (2009). Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 296: G1047–1053.
18. PRESCOTT & KENDLER (1999). Genetic and Environmental Contributions to Alcohol Abuse and Dependence in a Population-Based Sample of Male Twins. *Am. J. Psychiatry*, 156: 34–40.
19. LESURTEL, GRAF, ALEIL, ET AL. (2006). Platelet-Derived Serotonin Mediates Liver Regeneration. *Science*, 312: 104–107.
20. CHEN, LU, CHEN, ET AL. (1999). Interaction between the Functional Polymorphisms of the Alcohol-Metabolism Genes in Protection against Alcoholism. *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 795–807.
21. PENG, CHEN, TSAO, ET AL. (2007). Pharmacokinetic and pharmacodynamic basis for partial protection against alcoholism in Asians, heterozygous for the variant ALDH2\*2 gene allele. *Pharmacogenet. Genomics*, 17: 845–855.
22. OCARANZA, QUINTANILLA, TAMPIER, ET AL. (2008). Gene Therapy Reduces Ethanol Intake in an Animal Model of Alcohol Dependence. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 32: 52–57.

23. GARVER, TU, CAO, ET AL. (2001). Eliciting the Low-Activity Aldehyde Dehydrogenase Asian Phenotype by an Antisense Mechanism Results in an Aversion to Ethanol. *J. Exp. Med.*, 194: 571–580.
24. TANAKA, SHIRATORI, YOKOSUKA, ET AL. (1996). High incidence of ADH2\*1/ALDH2\*1 genes among Japanese alcohol dependents and patients with alcoholic liver disease. *Hepatology*, 23: 234–239.
25. HURLEY, BOSRON, HAMILTON, & AMZEL (1991). Structure of Human Beta 1 Beta 1 Alcohol Dehydrogenase: Catalytic Effects of Non-Active-Site Substitutions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 8149–8153.
26. CHEN, PENG, WANG, ET AL. (2009). Polymorphism of ethanol-metabolism genes and alcoholism: Correlation of allelic variations with the pharmacokinetic and pharmacodynamic consequences. *Chem. Biol. Interact.*, 178: 2–7.
27. RIVERA-MEZA, QUINTANILLA, TAMPIER, ET AL. (2010). Mechanism of Protection Against Alcoholism by an Alcohol Dehydrogenase Polymorphism: Development of an Animal Model. *FASEB J.*, 24: 266–274.
28. LIEBER (2004). Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol*, 34: 9–19.
29. EATON, RECORD, & BARTLETT (1997). Multiple biochemical effects in the pathogenesis of alcoholic fatty liver. *Eur. J. Clin. Invest.*, 27: 719–722.
30. SAXEMA (2003). *Hepatology: A Textbook of Liver disease. Hepatology*,
31. OLIVA, FRENCH, QING, & FRENCH (2010). The identification of stem cells in human liver diseases and hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.*, 88: 331–340.
32. CANTZ, MANNS, & OTT (2008). Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.*, 331: 271–282.
33. REINEHR & HÄUSSINGER (2012). CD95 death receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) in liver cell apoptosis and regeneration. *Arch. Biochem. Biophys.*, 518: 2–7.
34. SUH & JEONG (2011). Hepatic stellate cells and innate immunity in alcoholic liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 17: 2543–2551.
35. WAKE (1980). Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int. Rev. Cytol.*, 66: 303–353.
36. MICHALOPOULOS & DEFRANCES (1997). Liver regeneration. *Science*, 276: 60–66.
37. MINUK (2003). Hepatic regeneration: If it ain't broke, don't fix it. *Can. J. Gastroenterol.*, 17: 418–424.
38. GRISHAM (1962). A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res.*, 22: 842–849.
39. FAUSTO & CAMPBELL (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.*, 120: 117–130.
40. ZELLMER, SCHMIDT-HECK, GODOY, ET AL. (2010). Transcription factors ETF, E2F, and SP-1 are involved in cytokine-independent proliferation of murine hepatocytes. *Hepatology*, 52: 2127–2136.
41. MAHER (1993). Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J. Clin. Invest.*, 91: 2244–2252.
42. WEBBER, GODOWSKI, & FAUSTO (1994). In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology*, 19: 489–497.
43. WEBBER, BRUIX, PIERCE, & FAUSTO (1998). Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology*, 28: 1226–1234.
44. LIU, MARS, ZARNEGAR, & MICHALOPOULOS (1994). Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology*, 19: 1521–1527.
45. MEAD, BRAUN, MARTIN, & FAUSTO (1990). Induction of Replicative Competence (“Priming”) in Normal Liver. *Cancer Res.*, 50: 7023–7030.

46. FAUSTO & MEAD (1989). Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. *Lab. Invest.*, 60: 4–13.
47. APTE, GKRETSI, BOWEN, ET AL. (2009). Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology*, 50: 844–851.
48. FAUSTO, LAIRD, & WEBBER (1995). Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *FASEB Journal*, 9: 1527–1536.
49. RUSSELL, KAUFMANN, SITARIC, ET AL. (1996). Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog.*, 15: 183–189.
50. VAIL, CHAISSON, THOMPSON, & FAUSTO (2002). Bcl-2 expression delays hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. *Oncogene*, 21: 1548–1555.
51. NAKAYAMA, NAGAHAMA, MINAMISHIMA, ET AL. (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.*, 19: 2069–2081.
52. MINAMISHIMA, NAKAYAMA, & NAKAYAMA (2002). Recovery of liver mass without proliferation of hepatocytes after partial hepatectomy in Skp2-deficient mice. *Cancer Res.*, 62: 995–999.
53. SUZUKI, ZHENG, KANEKO, ET AL. (2002). Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J. Cell Biol.*, 156: 173–184.
54. RIDLEY, PATERSON, NOBLE, & LAND (1988). Ras-mediated cell cycle arrest is altered by nuclear oncogenes to induce Schwann cell transformation. *EMBO J.*, 7: 1635–1645.
55. KATO, BAMBA, SHINOHARA, ET AL. (2005). Relationship between expression of cyclin D1 and impaired liver regeneration observed in fibrotic or cirrhotic rats. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 20: 1198–1205.
56. LOWES, BRENNAN, YEOH, & OLYNYK (1999). Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.*, 154: 537–541.
57. ROSKAMS, YANG, KOTEISH, ET AL. (2003). Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Pathol.*, 163: 1301–1311.
58. WIEMANN, SATYANARAYANA, TSAHURIDU, ET AL. (2002). Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J.*, 16: 935–942.
59. SANCHO-BRU, ALTAMIRANO, RODRIGO-TORRES, ET AL. (2012). Liver progenitor cell markers correlate with liver damage and predict short-term mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology*, 55: 1931–1941.
60. ALISON & LOVELL (2005). Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif.*, 38: 407–421.
61. PAKU, SCHNUR, NAGY, & THORGEIRSSON (2001). Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.*, 158: 1313–1323.
62. SEUWEN & POUYSSÉGUR (1990). Serotonin as a growth factor. *Biochem. Pharmacol.*, 39: 985–990.
63. BALASUBRAMANIAN & PAULOSE (1998). Induction of DNA synthesis in primary cultures of rat hepatocytes by serotonin: Possible involvement of serotonin S2 receptor. *Hepatology*, 27: 62–66.
64. WALTER, WANNINGER, BAUER, ET AL. (2011). Adiponectin reduces connective tissue growth factor in human hepatocytes which is already induced in non-fibrotic non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Mol. Pathol.*, 91: 740–744.
65. WANNINGER, WALTER, BAUER, ET AL. (2011). MMP-9 activity is increased by adiponectin in primary human hepatocytes but even negatively correlates with serum adiponectin in a rodent model of non-alcoholic steatohepatitis. *Exp. Mol. Pathol.*, 91: 603–607.
66. SCHÄFFLER, SCHÖMERICH, & BÜCHLER (2005). Mechanisms of Disease: adipocytokines and visceral adipose tissue-emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2: 273–280.
67. WANG, USINGER, NICHOLS, ET AL. (2011). Cooperative interaction of CTGF and TGF- $\beta$  in animal models of fibrotic disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 4: 4.
68. GEORGE & TSUTSUMI (2007). siRNA-mediated knockdown of connective tissue growth factor prevents N-nitrosodimethylamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Gene Therapy*, 14: 790–803.

69. ANANIA, POTTER, RENNIE-TANKERSLEY, & MEZEY (1996). Activation by acetaldehyde of the promoter of the mouse  $\alpha 2(I)$  collagen gene when transfected into rat activated stellate cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 331: 187–193.
70. HEILS, TEUFEL, PETRI, ET AL. (1996). Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *J. Neurochem.*, 66: 2621–2624.
71. HYLAND (1999). Presentation, diagnosis, and treatment of the disorders of monoamine neurotransmitter metabolism. *Semin. Perinatol.*, 23: 194–203.
72. CÔTÉ, THÉVENOT, FLIGNY, ET AL. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 13525–13530.
73. MATSUDA, IMAOKA, VOMACHKA, ET AL. (2004). Serotonin Regulates Mammary Gland Development via an Autocrine-Paracrine Loop. *Devel. Cell*, 6: 193–203.
74. SPRY, KIRK, & SALIBA (2008). Coenzyme A biosynthesis: an antimicrobial drug target. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32: 56–106.
75. GLUNDE, BHUJWALLA, & RONEN (2011). Choline metabolism in malignant transformation. *Nature Rev. Cancer*, 11: 835–848.
76. AMIREAULT, HATIA, BAYARD, ET AL. (2011). Ineffective erythropoiesis with reduced red blood cell survival in serotonin-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108: 13141–13146.
77. WALTHER, STAHLBERG, & VOWINCKEL (2011). Novel roles for biogenic monoamines: from monoamines in transglutaminase-mediated post-translational protein modification to monoaminylation deregulation diseases. *FEBS J.*, 278: 4740–4755.
78. YADAV, RYU, SUDA, ET AL. (2008). Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell*, 135: 825–837.
79. ZHANG, ZHANG, XU, & SU (2005). Luminescent Properties of Eu<sup>2+</sup>-Activated SrLaGa<sub>3</sub>S<sub>6</sub>O Phosphor. *ChemInform*, 36: no–no.
80. GUTKNECHT, WAIDER, KRAFT, ET AL. (2008). Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J. Neural. Transm.*, 115: 1127–1132.
81. RUSSO, KEMA, BOSKER, ET AL. (2009). Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications. *World J. Biol. Psychiatry*, 10: 258–268.
82. PHILIBERT, SANDHU, HOLLENBECK, ET AL. (2008). The relationship of 5HTT (SLC6A4) methylation and genotype on mRNA expression and liability to major depression and alcohol dependence in subjects from the Iowa Adoption Studies. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 147B: 543–549.
83. WALTHER & BADER (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1673–1680.
84. IZIKKI, HANOUN, MARCOS, ET AL. (2007). Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 293: L1045–L1052.
85. WATTS, PRIESTLEY, & THOMPSON (2009). Serotonylation of Vascular Proteins Important to Contraction. *PLoS ONE*, 4:
86. WALTHER, PETER, WINTER, ET AL. (2003). Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet  $\alpha$ -Granule Release. *Cell*, 115: 851–862.
87. PAULMANN, GROHMANN, VOIGT, ET AL. (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol*, 7: e1000229.
88. WATANABE, ROSE, & ASO (2011). Role of peripheral serotonin in glucose and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.*, 22: 186–191.
89. ABDULLAH, HIRATA, MATSUMOTO, ET AL. (1994). Contraction and Depolarization Induced by Fetal Bovine Serum in Airway Smooth Muscle. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 266: L528–L535.
90. COON, MAZURUK, BERNARD, ET AL. (1996). The Human Serotonin N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.87) Gene (AANAT): Structure, Chromosomal Localization, and Tissue Expression. *Genomics*, 34: 76–84.

91. BROADLEY (2010). The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacol. Ther.*, 125: 363–375.
92. KEUNG & VALLEE (1998). Daidzin and Its Antidipsotropic Analogs Inhibit Serotonin and Dopamine Metabolism in Isolated Mitochondria. *PNAS*, 95: 2198–2203.
93. POPOVA (2006). From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. *BioEssays*, 28: 495–503.
94. WALTHER (2000). Die Dualität des serotonergen Systems: Erstellung und Charakterisierung von Tiermodellen mit gezielten Manipulationen der Tryptophan-Hydroxylase. *Dissertation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Chemie*, 1–198.
95. WALTHER (2003). Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*, 299: 76–76.
96. LIU, YANG, SUN, ET AL. (2008). Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325: 47–55.
97. CHABBI-ACHENGLI, COUDERT, CALLEBERT, ET AL. (2012). Decreased Osteoclastogenesis in Serotonin-Deficient Mice. *PNAS*, 109: 2567–2572.
98. LIU, JIANG, SI, ET AL. (2011). Molecular regulation of sexual preference revealed by genetic studies of 5-HT in the brains of male mice. *Nature*, 472: 95–99.
99. SAVELIEVA, ZHAO, POGORELOV, ET AL. (2008). Genetic Disruption of Both Tryptophan Hydroxylase Genes Dramatically Reduces Serotonin and Affects Behavior in Models Sensitive to Antidepressants. *PLoS ONE*, 3:
100. ALENINA, KIKIC, TODIRAS, ET AL. (2009). Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106: 10332–10337.
101. TILIGADA, KYRIAKIDIS, CHAZOT, & PASSANI (2011). Histamine Pharmacology and New CNS Drug Targets. *CNS Neurosci. Ther.*, 17: 620–628.
102. PARSONS & GANELLIN (2006). Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 147: S127–S135.
103. HAAS, SERGEEVA, & SELBACH (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol. Rev.*, 88: 1183–1241.
104. MUSIO, GALLO, SCABENI, ET AL. (2006). A key regulatory role for histamine in experimental autoimmune encephalomyelitis: disease exacerbation in histidine decarboxylase-deficient mice. *J. Immunol.*, 176: 17–26.
105. EISENHOFER, HUYNH, HIROI, & PACAK (2001). Understanding catecholamine metabolism as a guide to the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, 2: 297–311.
106. BEAULIEU & GAINETDINOV (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol. Rev.*, 63: 182–217.
107. TAYEBATI, LOKHANDWALA, & AMENTA (2011). Dopamine and vascular dynamics control: present status and future perspectives. *Curr. Neurovasc. Res.*, 8: 246–257.
108. SIBLEY (1999). New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 313–341.
109. ZENG, SANADA, WATANABE, ET AL. (2004). Functional genomics of the dopaminergic system in hypertension. *Physiol. Genomics*, 19: 233–246.
110. GOLDSTEIN, MEZEY, YAMAMOTO, ET AL. (1995). Is there a third peripheral catecholaminergic system? Endogenous dopamine as an autocrine/paracrine substance derived from plasma DOPA and inactivated by conjugation. *Hypertens. Res.*, 18 Suppl 1: S93–99.
111. EISENHOFER (2001). The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. *Pharmacol. Ther.*, 91: 35–62.
112. CYR, SOTNIKOVA, GAINETDINOV, & CARON (2006). Dopamine enhances motor and neuropathological consequences of polyglutamine expanded huntingtin. *FASEB J.*, 20: 2541–2543.
113. GILSBACH, PREISSL, & HEIN (2011).  $\alpha$ -Adrenoceptors: three subtypes for a broad spectrum of activity. *Pharm. Unserer Zeit*, 40: 462–468.

114. HERMSDORF, DETTMER, & HOFMANN (1991). Differences in the accessibility of the beta-adrenergic receptor in isolated hepatocytes from foetal and adult rats. *Cell. Signal.*, 3: 299–303.
115. WANG, RAMOS, PASPALAS, ET AL. (2007). Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell*, 129: 397–410.
116. POZGAJOVÁ, SACHS, HEIN, & NIESWANDT (2006). Reduced thrombus stability in mice lacking the alpha2A-adrenergic receptor. *Blood*, 108: 510–514.
117. ROSENGREN, JOKUBKA, TOJJAR, ET AL. (2010). Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science*, 327: 217–220.
118. LAPPALAINEN, LONG, EGGERT, ET AL. (1998). Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55: 989–994.
119. VAN DE KAR, JAVED, ZHANG, ET AL. (2001). 5-HT2A receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J. Neurosci.*, 21: 3572–3579.
120. JØRGENSEN, WETTERSLEV, MØINICHE, & DAHL Epidural local anaesthetics versus opioid-based analgesic regimens for postoperative gastrointestinal paralysis, PONV and pain after abdominal surgery. *The Cochrane Library*,
121. HOYER, HANNON, & MARTIN (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71: 533–554.
122. JØRGENSEN, KNIGGE, KJÆR, & WARBERG (1999). Adrenocorticotrophic hormone secretion in rats induced by stimulation with serotonergic compounds. *J. Neuroendocrinol.*, 11: 283–290.
123. MILLAN, DEKEYNE, & GOBERT (1998). Serotonin (5-HT)2C receptors tonically inhibit dopamine (DA) and noradrenaline (NA), but not 5-HT, release in the frontal cortex in vivo. *Neuropharmacology*, 37: 953–955.
124. ROBERT & LEZOUALC'H (2008). Distinct functional effects of human 5-HT4 receptor isoforms on beta-amyloid secretion. *Neurodegener. Dis.*, 5: 163–165.
125. HOU, KANJE, LONGMORE, ET AL. (2001). 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors in the human trigeminal ganglion: co-localization with calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide synthase. *Brain Res.*, 909: 112–120.
126. DE PONTI & TONINI (2001). Irritable bowel syndrome: New agents targeting serotonin receptor subtypes. *Drugs*, 61: 317–332.
127. BOESS & MARTIN (1994). Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology*, 33: 275–317.
128. PASSANI, LIN, HANCOCK, ET AL. (2004). The histamine H3 receptor as a novel therapeutic target for cognitive and sleep disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 618–625.
129. ARRANG, GARBARG, & SCHWARTZ (1983). Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature*, 302: 832–837.
130. LEURS, CHAZOT, SHENTON, ET AL. (2009). Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H4 receptor. *Br. J. Pharmacol.*, 157: 14–23.
131. HSIEH, CHANDRAN, SALYERS, ET AL. (2010). H4 receptor antagonism exhibits anti-nociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 95: 41–50.
132. ZAMPELI & TILIGADA (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.*, 157: 24–33.
133. GUIMARÃES & MOURA (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.*, 53: 319–356.
134. GILSBACH & HEIN (2008). Presynaptic metabotropic receptors for acetylcholine and adrenaline/noradrenaline. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 261–288.
135. BREDE, WIESMANN, JAHNS, ET AL. (2002). Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure. *Circulation*, 106: 2491–2496.

136. GILSBACH, ALBARRÁN-JUÁREZ, & HEIN (2011). Pre- versus postsynaptic signaling by  $\alpha(2)$ -adrenoceptors. *Curr. Top. Membr.*, 67: 139–160.
137. ROBERTS, RIEMER, BOTTARI, ET AL. (1989). Hormonal regulation myometrial adrenergic responses: the receptor and beyond. *J. Dev. Physiol.*, 11: 125–134.
138. NG (2011). Regulation of glucose metabolism and the skeleton. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 75: 147–155.
139. DAWS (2009). Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol. Ther.*, 121: 89–99.
140. JOHNSON (1988). Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol. Rev.*, 68: 232–307.
141. DRESSER, LEABMAN, & GIACOMINI (2001). Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters. *J. Pharm. Sci.*, 90: 397–421.
142. KOEPESELL, SCHMITT, & GORBOULEV (2003). Organic cation transporters. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 150: 36–90.
143. SAGER & TORRES (2011). Proteins interacting with monoamine transporters: current state and future challenges. *Biochemistry*, 50: 7295–7310.
144. HOFFMAN, HANSSON, MEZEY, & PALKOVITS (1998). Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.*, 19: 187–231.
145. CHEN, MARGOLIS, GERSHON, ET AL. (2012). Reduced serotonin reuptake transporter (SERT) function causes insulin resistance and hepatic steatosis independent of food intake. *PLoS ONE*, 7: e32511.
146. BUZNIKOV, PETERSON, NIKITINA, ET AL. (2005). The pre-nervous serotonergic system of developing sea urchin embryos and larvae: pharmacologic and immunocytochemical evidence. *Neurochem. Res.*, 30: 825–837.
147. FUKUMOTO, BLAKELY, & LEVIN (2005). Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos. *Dev. Neurosci.*, 27: 349–363.
148. MEZEY, EISENHOFER, HANSSON, ET AL. (1998). Dopamine produced by the stomach may act as a paracrine/autocrine hormone in the rat. *Neuroendocrinology*, 67: 336–348.
149. ERIKSEN, JØRGENSEN, & GETHER (2010). Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J. Neurochem.*, 113: 27–41.
150. PÖRZGEN, BÖNISCH, HAMMERMANN, & BRÜSS (1998). The human noradrenaline transporter gene contains multiple polyadenylation sites and two alternatively spliced C-terminal exons. *Biochim. Biophys. Acta*, 1398: 365–370.
151. KITAYAMA, IKEDA, MITSUHATA, ET AL. (1999). Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing. *J. Biol. Chem.*, 274: 10731–10736.
152. LIN, CANALES, BJÖRGVINSSON, ET AL. (2011). Monoamine transporters: vulnerable and vital doorkeepers. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 98: 1–46.
153. NIES, KOEPESELL, WINTER, ET AL. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology*, 50: 1227–1240.
154. KOEPESELL & ENDOU (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch.*, 447: 666–676.
155. KEKUDA, PRASAD, WU, ET AL. (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J. Biol. Chem.*, 273: 15971–15979.
156. YABUUCHI, TAMAI, NEZU, ET AL. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 289: 768–773.
157. CIARIMBOLI (2008). Organic cation transporters. *Xenobiotica*, 38: 936–971.
158. ENGEL & WANG (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol. Pharmacol.*, 68: 1397–1407.

159. ENGEL, ZHOU, & WANG (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J. Biol. Chem.*, 279: 50042–50049.
160. BARNES, DOBRZYNSKI, FOPPOLO, ET AL. (2006). Distribution and functional characterization of equilibrative nucleoside transporter-4, a novel cardiac adenosine transporter activated at acidic pH. *Circ. Res.*, 99: 510–519.
161. ALFONSO, GRUNDAHL, DUERR, ET AL. (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science*, 261: 617–619.
162. EIDEN, SCHÄFER, WEIHE, & SCHÜTZ (2004). The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch.*, 447: 636–640.
163. LESCH, BENDEL, HEILS, ET AL. (1996). Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science*, 274: 1527–1531.
164. BRADLEY, DODELZON, SANDHU, & PHILIBERT (2005). Relationship of serotonin transporter gene polymorphisms and haplotypes to mRNA transcription. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 136B: 58–61.
165. STOLTENBERG, TWITCHELL, HANNA, ET AL. (2002). Serotonin transporter promoter polymorphism, peripheral indexes of serotonin function, and personality measures in families with alcoholism. *Am. J. Med. Genet.*, 114: 230–234.
166. FEINN, NELLISSERY, & KRANZLER (2005). Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 133B: 79–84.
167. GORWOOD, LANFUMEY, & HAMON (2004). Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes. *Med. Sci. (Paris)*, 20: 1132–1138.
168. CRABBE, PHILLIPS, FELLER, ET AL. (1996). Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors. *Nature Genet.*, 14: 98–101.
169. BOUWKNECHT, HIJZEN, VAN DER GUGTEN, ET AL. (2001). Absence of 5-HT<sub>1B</sub> receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT<sub>1B</sub> knockout mice. *Biol. Psychiatry*, 49: 557–568.
170. FISH, MCKENZIE-QUIRK, BANNAI, & MICZEK (2008). 5-HT<sub>1B</sub> receptor inhibition of alcohol-heightened aggression in mice: comparison to drinking and running. *Psychopharmacology (Berl.)*, 197: 145–156.
171. MICZEK & DE ALMEIDA (2001). Oral drug self-administration in the home cage of mice: alcohol-heightened aggression and inhibition by the 5-HT<sub>1B</sub> agonist anpirtoline. *Psychopharmacology*, 157: 421–429.
172. DE ALMEIDA, ROSA, SANTOS, ET AL. (2006). 5-HT<sub>1B</sub> receptors, ventral orbitofrontal cortex, and aggressive behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*, 185: 441–450.
173. LORAND & GRAHAM (2003). Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4: 140–156.
174. LIU, CERIONE, & CLARDY (2002). Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 2743–2747.
175. YEE, PEDERSEN, LE TRONG, ET AL. (1994). Three-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 7296–7300.
176. FESUS & PIACENTINI (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem. Sci.*, 27: 534–539.
177. IISMAA, MEARNS, LORAND, & GRAHAM (2009). Transglutaminases and Disease: Lessons From Genetically Engineered Mouse Models and Inherited Disorders. *Physiol. Rev.*, 89: 991–1023.
178. VOWINCKEL (2012). Die Protein-Monoaminylierung als regulatorischer Mechanismus in der Signaltransduktion. *Dissertation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Biochemie*, 1–151.
179. KOMÁROMI, BAGOLY, & MUSZBEK (2011). Factor XIII: novel structural and functional aspects. *J. Thromb. Haemost.*, 9: 9–20.

180. GRENARD, BATES, & AESCHLIMANN (2001). Evolution of Transglutaminase Genes: Identification of a Transglutaminase Gene Cluster on Human Chromosome 15q15. *J. Biol. Chem.*, 276: 33066–33078.
181. MAKAROVA, ARAVIND, & KOONIN (1999). A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. *Protein Sci.*, 8: 1714–1719.
182. CHEN & MEHTA (1999). Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31: 817–836.
183. AHVAZI, KIM, KEE, ET AL. (2002). Three-dimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J.*, 21: 2055–2067.
184. PINKAS, STROP, BRUNGER, & KHOSLA (2007). Transglutaminase 2 Undergoes a Large Conformational Change upon Activation. *PLoS Biol*, 5:
185. KIRÁLY, CSÓSZ, KURTÁN, ET AL. (2009). Functional significance of five noncanonical Ca<sup>2+</sup>-binding sites of human transglutaminase 2 characterized by site-directed mutagenesis. *FEBS J.*, 276: 7083–7096.
186. BELKIN (2011). Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J.*, 278: 4704–4716.
187. KUO, TATSUKAWA, & KOJIMA (2011). New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2. *FEBS J.*, 278: 4756–4767.
188. BRUCE & PETERS (1983). The subcellular localization of transglutaminase in normal liver and in glucagon-treated and partial hepatectomized rats. *Biosci. Rep.*, 3: 1085–1090.
189. KIRÁLY, DEMÉNY, & FÉSÜS (2011). Protein transamidation by transglutaminase 2 in cells: a disputed Ca<sup>2+</sup>-dependent action of a multifunctional protein. *FEBS J.*, 278: 4717–4739.
190. PARK, CHOI, & HA (2010). Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids*, 39: 619–631.
191. PIACENTINI, FARRACE, PIREDDA, ET AL. (2002). Transglutaminase overexpression sensitizes neuronal cell lines to apoptosis by increasing mitochondrial membrane potential and cellular oxidative stress. *J. Neurochem.*, 81: 1061–1072.
192. PIREDDA, AMENDOLA, COLIZZI, ET AL. (1997). Lack of “tissue” transglutaminase protein cross-linking leads to leakage of macromolecules from dying cells: Relationship to development of autoimmunity in MRLlpr/lpr mice. *Cell Death Differ.*, 4: 463–472.
193. YAMAGUCHI & WANG (2006). Tissue Transglutaminase Serves as an Inhibitor of Apoptosis by Cross-Linking Caspase 3 in Thapsigargin-Treated Cells. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 569–579.
194. THOMÁZY & FÉSÜS (1989). Differential expression of tissue transglutaminase in human cells. An immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 255: 215–224.
195. OLIVERIO, AMENDOLA, DI SANO, ET AL. (1997). Tissue transglutaminase-dependent posttranslational modification of the retinoblastoma gene product in promonocytic cells undergoing apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 17: 6040–6048.
196. FILIANO, TUCHOLSKI, DOLAN, ET AL. (2010). Transglutaminase 2 protects against ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.*, 39: 334–343.
197. FILIANO, BAILEY, TUCHOLSKI, ET AL. (2008). Transglutaminase 2 protects against ischemic insult, interacts with HIF1 $\beta$ , and attenuates HIF1 signaling. *FASEB J.*, 22: 2662–2675.
198. ODA, OHKI, MURASAWA, ET AL. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288: 1053–1058.
199. BOYD, MALSTROM, SUBRAMANIAN, ET AL. (1994). Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell*, 79: 341–351.
200. HAN & PARK (2000). Transglutaminase-dependent modulation of transcription factor Sp1 activity. *Mol. Cells*, 10: 612–618.
201. KUO, TATSUKAWA, MATSUURA, ET AL. (2012). Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J. Cell. Phys.*, 227: 1130–1137.
202. SHIMADA, SUZUKI, KIM, ET AL. (2001). Transactivation via RAR/RXR-Sp1 Interaction: Characterization of Binding Between Sp1 and GC Box Motif. *Mol. Endocrinol.*, 15: 1677–1692.

203. KOJIMA, KUO, TATSUKAWA, & HIROSE (2010). Induction of cross-linking and silencing of Sp1 by transglutaminase during liver injury in ASH and NASH via different ER stress pathways. *Dig. Dis.*, 28: 715–721.
204. AHN, KIM, HAHN, ET AL. (2008). Tissue transglutaminase-induced down-regulation of matrix metalloproteinase-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 376: 743–747.
205. TUCHOLSKI & JOHNSON (2003). Tissue transglutaminase directly regulates adenylyl cyclase resulting in enhanced cAMP-response element-binding protein (CREB) activation. *J. Biol. Chem.*, 278: 26838–26843.
206. BALLESTAR, BOIX-CHORNET, & FRANCO (2001). Conformational Changes in the Nucleosome Followed by the Selective Accessibility of Histone Glutamines in the Transglutaminase Reaction: Effects of Ionic Strength†. *Biochemistry*, 40: 1922–1929.
207. BALLESTAR, ABAD, & FRANCO (1996). Core Histones Are Glutaminyl Substrates for Tissue Transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 271: 18817–18824.
208. PENG, ZHANG, ZHANG, ET AL. (1999). Interaction of tissue transglutaminase with nuclear transport protein importin- $\alpha$ 3. *FEBS Lett.*, 446: 35–39.
209. TATSUKAWA, FUKAYA, FRAMPTON, ET AL. (2009). Role of Transglutaminase 2 in Liver Injury via Cross-linking and Silencing of Transcription Factor Sp1. *Gastroenterology*, 136: 1783–1795.e10.
210. GREENSPAN, PALESE, & KRYSAL (1988). Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. *J. Virol*, 62: 3020–3026.
211. MANN, VERMA, SETHI, ET AL. (2006). Overexpression of Tissue Transglutaminase Leads to Constitutive Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B in Cancer Cells: Delineation of a Novel Pathway. *Cancer Res.*, 66: 8788–8795.
212. DARDIK & INBAL (2006). Complex formation between tissue transglutaminase II (tTG) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2): Proposed mechanism for modulation of endothelial cell response to VEGF. *Exp. Cell. Res.*, 312: 2973–2982.
213. SINGH, LI, & CERIONE (1998). Identification of the Eukaryotic Initiation Factor 5A as a Retinoic Acid-stimulated Cellular Binding Partner for Tissue Transglutaminase II. *J. Biol. Chem.*, 273: 1946–1950.
214. SINGH, KUNAR, KAO, & BAKER (2001). Role of transglutaminase II in retinoic acid-induced activation of RhoA-associated kinase-2. *EMBO J.*, 20: 2413–2423.
215. AESCHLIMANN & THOMAZY (2000). Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connect. Tissue Res.*, 41: 1–27.
216. BARNES, BUNGAY, ELLIOTT, ET AL. (1985). Alterations in the distribution and activity of transglutaminase during tumour growth and metastasis. *Carcinogenesis*, 6: 459–463.
217. SAKAI, BUSBY, CLARKE, & CLEMMONS (2001). Tissue Transglutaminase Facilitates the Polymerization of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-1 (IGFBP-1) and Leads to Loss of IGFBP-1's Ability to Inhibit Insulin-like Growth Factor-I-stimulated Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.*, 276: 8740–8745.
218. NUNES, GLEIZES, METZ, & RIFKIN (1997). Latent Transforming Growth Factor- $\beta$  Binding Protein Domains Involved in Activation and Transglutaminase-dependent Cross-Linking of Latent Transforming Growth Factor- $\beta$ . *J. Cell Biol.*, 136: 1151–1163.
219. RITTER & DAVIES (1998). Identification of a Transforming Growth Factor- $\beta$ 1/Bone Morphogenetic Protein 4 (TGF- $\beta$ 1/BMP4) Response Element within the Mouse Tissue Transglutaminase Gene Promoter. *J. Biol. Chem.*, 273: 12798–12806.
220. VADER, DE RU, VAN DER WAL, ET AL. (2002). Specificity of Tissue Transglutaminase Explains Cereal Toxicity in Celiac Disease. *J. Exp. Med.*, 195: 643–649.
221. DIETERICH, EHNIS, BAUER, ET AL. (1997). Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat. Med.*, 3: 797–801.
222. LEE, KIM, CHOI, ET AL. (2004). Transglutaminase 2 Induces Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation via a Novel Pathway in BV-2 Microglia. *J. Biol. Chem.*, 279: 53725–53735.

223. SKILL, GRIFFIN, EL NAHAS, ET AL. (2001). Increases in renal epsilon-(gamma-glutamyl)-lysine crosslinks result from compartment-specific changes in tissue transglutaminase in early experimental diabetic nephropathy: pathologic implications. *Lab. Invest.*, 81: 705–716.
224. TATSUKAWA & KOJIMA (2010). Recent advances in understanding the roles of transglutaminase 2 in alcoholic steatohepatitis. *Cell Biol. Int.*, 34: 325–334.
225. OH, PARK, BYOUN, ET AL. (2011). Epithelial transglutaminase 2 is needed for T cell interleukin-17 production and subsequent pulmonary inflammation and fibrosis in bleomycin-treated mice. *J. Exp. Med.*, 208: 1707–1719.
226. OLSEN, SAPINORO, KOTTMANN, ET AL. (2011). Transglutaminase 2 and its role in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 184: 699–707.
227. NARDACCI, LO IACONO, CICCOSANTI, ET AL. (2003). Transglutaminase Type II Plays a Protective Role in Hepatic Injury. *Am. J. Pathol.*, 162: 1293–1303.
228. SARANG, MOLNÁR, NÉMETH, ET AL. (2005). Tissue transglutaminase (TG2) acting as G protein protects hepatocytes against Fas-mediated cell death in mice. *Hepatology*, 42: 578–587.
229. STRNAD, HARADA, SIEGEL, ET AL. (2007). Transglutaminase 2 Regulates Mallory Body Inclusion Formation and Injury-Associated Liver Enlargement. *Gastroenterology*, 132: 1515–1526.
230. MASTROBERARDINO, IANNICOLA, NARDACCI, ET AL. (2002). “Tissue” transglutaminase ablation reduces neuronal death and prolongs survival in a mouse model of Huntington’s disease. *Cell Death Differ.*, 9: 873–880.
231. D’ELETTO, GRAZIA FARRACE, FALASCA, ET AL. (2009). Transglutaminase 2 is involved in autophagosome maturation. *Autophagy*, 5: 1145–1154.
232. MCCONOUGHAY, BASSO, NIATSETSKAYA, ET AL. (2010). Inhibition of transglutaminase 2 mitigates transcriptional dysregulation in models of Huntington disease. *EMBO Mol. Med.*, 2: 349–370.
233. CITRON, SANTACRUZ, DAVIES, & FESTOFF (2001). Intron-Exon Swapping of Transglutaminase mRNA and Neuronal Tau Aggregation in Alzheimer’s Disease. *J. Biol. Chem.*, 276: 3295–3301.
234. MURTHY, WILSON, LUKAS, ET AL. (1998). Cross-linking sites of the human tau protein, probed by reactions with human transglutaminase. *J. Neurochem.*, 71: 2607–2614.
235. PIREDDA, FARRACE, LO BELLO, ET AL. (1999). Identification of “tissue” transglutaminase binding proteins in neural cells committed to apoptosis. *FASEB J.*, 13: 355–364.
236. DUDEK & JOHNSON (1994). Transglutaminase facilitates the formation of polymers of the  $\beta$ -amyloid peptide. *Brain Res.*, 651: 129–133.
237. ABDALLA, LOTHER, EL MISSIRY, ET AL. (2009). Angiotensin II AT2 Receptor Oligomers Mediate G-protein Dysfunction in an Animal Model of Alzheimer Disease. *J. Biol. Chem.*, 284: 6554–6565.
238. ABDALLA, LOTHER, EL MISSIRY, ET AL. (2009). Dominant Negative AT2 Receptor Oligomers Induce G-protein Arrest and Symptoms of Neurodegeneration. *J. Biol. Chem.*, 284: 6566–6574.
239. SARKAR, CLARKE, & WAELSCH (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 25: 451–452.
240. CLARKE, MYCEK, NEIDLE, & WAELSCH (1959). The incorporation of amines into protein. *Arch. Biochem. Biophys.*, 79: 338–354.
241. MYCEK, CLARKE, NEIDLE, & WAELSCH (1959). Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 84: 528–540.
242. WAJDA, GINSBURG, & WAELSCH (1961). Incorporation of histamine into liver protein in vivo. *Nature*, 191: 1204–1205.
243. GINSBURG, WAJDA, & WAELSCH (1963). Transglutaminase and histamine incorporation in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 12: 251–264.
244. KONISHI & KAKIMOTO (1976). Formation of gamma-glutamylhistamine from histamine in rat brain. *J. Neurochem.*, 27: 1461–1463.
245. TSUJI, MATSUOKA, & NAKAJIMA (1977). Studies on formation of gamma-glutamylamines in rat brain and their synthetic and catabolic enzymes. *J. Neurochem.*, 29: 633–638.

246. FOLK, PARK, CHUNG, ET AL. (1980). Polyamines as physiological substrates for transglutaminases. *J. Biol. Chem.*, 255: 3695–3700.
247. FAN, CHAN, & RENNERT (1983). Polyamine metabolism in McCoy cells: II. Cellular origin of excreted polyamine conjugated proteins. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 15: 69–79.
248. CARIELLO, WILSON, & LORAND (1984). Activation of transglutaminase during embryonic development. *Biochemistry*, 23: 6843–6850.
249. FESUS, SZUCS, BARRETT, ET AL. (1985). Activation of transglutaminase and production of protein-bound gamma-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cells. *J. Biol. Chem.*, 260: 13771–13778.
250. AHMED, JEFFUS, BUKHARI, ET AL. (2008). Serotonin transamidates Rab4 and facilitates its binding to the C terminus of serotonin transporter. *J. Biol. Chem.*, 283: 9388–9398.
251. SZASZ & DALE (2002). Thrombospondin and fibrinogen bind serotonin-derivatized proteins on COAT-platelets. *Blood*, 100: 2827–2831.
252. ALBERIO & CLEMETSON (2004). All platelets are not equal: COAT platelets. *Curr. Hematol. Rep.*, 3: 338–343.
253. DALE (2005). Review Article: Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response. *J. Thromb. Haemost.*, 3: 2185–2192.
254. HUMMERICH & SCHLOSS (2010). Serotonin-more than a neurotransmitter: transglutaminase-mediated serotonylation of C6 glioma cells and fibronectin. *Neurochem. Int.*, 57: 67–75.
255. MARCOS, ADNOT, PHAM, ET AL. (2003). Serotonin Transporter Inhibitors Protect against Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 168: 487–493.
256. EDDAHIBI, HUMBERT, FADEL, ET AL. (2001). Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.*, 108: 1141–1150.
257. EDDAHIBI, MORRELL, D' ORTHO, ET AL. (2002). Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.*, 20: 1559–1572.
258. EDDAHIBI, HUMBERT, FADEL, ET AL. (2002). Hyperplasia of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Is Causally Related to Overexpression of the Serotonin Transporter in Primary Pulmonary Hypertension\*. *Chest*, 121: 975–985.
259. GUIGNABERT, RAFFESTIN, BENFERHAT, ET AL. (2005). Serotonin Transporter Inhibition Prevents and Reverses Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation*, 111: 2812–2819.
260. GUILLUY, EDDAHIBI, AGARD, ET AL. (2009). RhoA and Rho Kinase Activation in Human Pulmonary Hypertension - Role of 5-HT Signaling. *Am J Respir Crit Care Med*,
261. GUILLUY, ROLLI-DERKINDEREN, THARAUX, ET AL. (2007). Transglutaminase-dependent RhoA Activation and Depletion by Serotonin in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 2918–2928.
262. LIU, WEI, LASKIN, & FANBURG (2011). Role of protein transamidation in serotonin-induced proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 44: 548–555.
263. NI, GEDDES, PRIESTLEY, ET AL. (2008). The existence of a local 5-hydroxytryptaminergic system in peripheral arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 154: 663–674.
264. JOHNSON, THOMPSON, & WATTS (2010). Modification of Proteins by Norepinephrine is Important for Vascular Contraction. *Front. Physiol.*, 1:
265. BERNASSOLA, FEDERICI, CORAZZARI, ET AL. (2002). Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB J.*, 16: 1371–1378.
266. ABDUL, LOGOTHETIS, & HOOSEIN (1995). Growth-Inhibitory Effects of Serotonin Uptake Inhibitors on Human Prostate Carcinoma Cell Lines. *J. Urol.*, 154: 247–250.
267. LAVDAS, BLUE, LINCOLN, & PARNAVELAS (1997). Serotonin Promotes the Differentiation of Glutamate Neurons in Organotypic Slice Cultures of the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.*, 17: 7872–7880.

268. SINGH, PAN, KAO, ET AL. (2003). Tissue Transglutaminase Mediates Activation of RhoA and MAP Kinase Pathways during Retinoic Acid-induced Neuronal Differentiation of SH-SY5Y Cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 391–399.
269. CSOMÓS, NÉMET, FÉSÜS, & BALAJTHY (2010). Tissue transglutaminase contributes to the all-trans-retinoic acid-induced differentiation syndrome phenotype in the NB4 model of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 116: 3933–3943.
270. DAI, DUDEK, PATEL, & MUMA (2008). Transglutaminase-Catalyzed Transamidation: A Novel Mechanism for Rac1 Activation by 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> Receptor Stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326: 153–162.
271. DAI, DUDEK, LI, & MUMA (2011). Phospholipase C, Ca<sup>2+</sup>, and calmodulin signaling are required for 5-HT<sub>2A</sub> receptor-mediated transamidation of Rac1 by transglutaminase. *Psychopharmacology (Berl)*, 213: 403–412.
272. GIANNACCINI, BETTI, PALEGO, ET AL. (2009). Human Serotonin Transporter Expression During Megakaryocytic Differentiation of MEG-01 Cells. *Neurochem. Res.*, 35: 628–635.
273. BATTAGLINO, FU, SPÄTE, ET AL. (2004). Serotonin Regulates Osteoclast Differentiation Through Its Transporter. *J. Bone Miner. Res.*, 19: 1420–1431.
274. HUMBERT & SAUDOU (2002). Toward Cell Specificity in SCA1. *Neuron*, 34: 669–670.
275. GERBER, SEIPEL, GEORGIEV, ET AL. (1994). Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science*, 263: 808–811.
276. SEIPEL, GEORGIEV, & SCHAFFNER (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. *EMBO J.*, 11: 4961–4968.
277. WARAGAI, LAMMERS, TAKEUCHI, ET AL. (1999). PQBP-1, a Novel Polyglutamine Tract-Binding Protein, Inhibits Transcription Activation By Brn-2 and Affects Cell Survival. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 977–987.
278. PERUTZ, JOHNSON, SUZUKI, & FINCH (1994). Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 5355–5358.
279. TANAKA & HERR (1990). Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: Interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell*, 60: 375–386.
280. GERSTER, BALMACEDA, & ROEDER (1990). The cell type-specific octamer transcription factor OTF-2 has two domains required for the activation of transcription. *EMBO J.*, 9: 1635–1643.
281. TANAKA, CLOUSTON, & HERR (1994). The Oct-2 glutamine-rich and proline-rich activation domains can synergize with each other or duplicates of themselves to activate transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 6046–6055.
282. SCHEUCH, LAUTENSCHLAGER, GROHMANN, ET AL. (2007). Characterization of a Functional Promoter Polymorphism of the Human Tryptophan Hydroxylase 2 Gene in Serotonergic Raphe Neurons. *Biol. Psychiatry*, 62: 1288–1294.
283. TROTTIER, LUTZ, STEVANIN, ET AL. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378: 403–406.
284. OKAZAWA, SUDOL, & RICH (2001). PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Res. Bull.*, 56: 273–280.
285. NUKINA (2011). Neurodegeneration based on polyglutamine aggregation. *Rinsho Shinkeigaku*, 51: 976–978.
286. SHIMOHATA, ONODERA, & TSUJI (2000). Interaction of expanded polyglutamine stretches with nuclear transcription factors leads to aberrant transcriptional regulation in polyglutamine diseases. *Neuropathology*, 20: 326–333.
287. KOIDE, KOBAYASHI, SHIMOHATA, ET AL. (1999). A Neurological Disease Caused By an Expanded CAG Trinucleotide Repeat in The TATA-Binding Protein Gene: A New Polyglutamine Disease? *Hum. Mol. Genet.*, 8: 2047–2053.
288. NAKAMURA, JEONG, UCHIHARA, ET AL. (2001). SCA17, a novel autosomal dominant cerebellar ataxia caused by an expanded polyglutamine in TATA-binding protein. *Hum. Mol. Genet.*, 10: 1441–1448.
289. SPADA, WILSON, LUBAHN, ET AL. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352: 77–79.

290. SHAYWITZ & GREENBERG (1999). CREB: A Stimulus-Induced Transcription Factor Activated by A Diverse Array of Extracellular Signals. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 821–861.
291. YAMAMOTO, GONZALEZ, BIGGS, & MONTMINY (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 334: 494–498.
292. KWOK, LUNDBLAD, CHRIVIA, ET AL. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, 370: 223–226.
293. ARIAS, ALBERTS, BRINDLE, ET AL. (1994). Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature*, 370: 226–229.
294. YANG, OGRYZKO, NISHIKAWA, ET AL. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382: 319–324.
295. CHO, ORPHANIDES, SUN, ET AL. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 5355–5363.
296. SANDS & PALMER (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell. Signal.*, 20: 460–466.
297. GINTY, KORNHAUSER, THOMPSON, ET AL. (1993). Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science*, 260: 238–241.
298. SHENG, THOMPSON, & GREENBERG (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 252: 1427–1430.
299. DASH, KARL, COLICOS, ET AL. (1991). cAMP response element-binding protein is activated by Ca2+/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 5061–5065.
300. MATTHEWS, GUTHRIE, WAILES, ET AL. (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB-dependent gene expression. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 6107–6116.
301. ENSLEN, SUN, BRICKEY, ET AL. (1994). Characterization of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase IV. Role in transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, 269: 15520–15527.
302. CARLEZON, DUMAN, & NESTLER (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci.*, 28: 436–445.
303. SUN, ENSLEN, MYUNG, & MAURER (1994). Differential activation of CREB by Ca2+/calmodulin-dependent protein kinases type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes Dev.*, 8: 2527–2539.
304. BADING & GREENBERG (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science*, 253: 912–914.
305. ROSEN, GINTY, WEBER, & GREENBERG (1994). Membrane depolarization and calcium influx stimulate MEK and MAP kinase via activation of Ras. *Neuron*, 12: 1207–1221.
306. RUSANESCU, QI, THOMAS, ET AL. (1995). Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron*, 15: 1415–1425.
307. PENDE, FISHER, SIMPSON, ET AL. (1997). Neurotransmitter- and growth factor-induced cAMP response element binding protein phosphorylation in glial cell progenitors: role of calcium ions, protein kinase C, and mitogen-activated protein kinase/ribosomal S6 kinase pathway. *J. Neurosci.*, 17: 1291–1301.
308. WAYMAN, WEI, WONG, & STORM (1996). Regulation of type I adenylyl cyclase by calmodulin kinase IV in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 6075–6082.
309. KOUZARIDES (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.*, 19: 1176–1179.
310. COMERFORD, LEONARD, KARHAUSEN, ET AL. (2003). Small ubiquitin-related modifier-1 modification mediates resolution of CREB-dependent responses to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 986–991.
311. LAMARRE-VINCENT & HSIEH-WILSON (2003). Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 6612–6613.
312. DWARKI, MONTMINY, & VERMA (1990). Both the basic region and the “leucine zipper” domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J.*, 9: 225–232.

313. XING & QUINN (1994). Three distinct regions within the constitutive activation domain of cAMP regulatory element-binding protein (CREB) are required for transcription activation. *J. Biol. Chem.*, 269: 28732–28736.
314. FERRERI, GILL, & MONTMINY (1994). The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 1210–1213.
315. XING, GOPAL, & QUINN (1995). cAMP response element-binding protein (CREB) interacts with transcription factors IIB and IID. *J. Biol. Chem.*, 270: 17488–17493.
316. FELINSKI & QUINN (1999). The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein-associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding. *J. Biol. Chem.*, 274: 11672–11678.
317. FELINSKI, KIM, LU, & QUINN (2001). Recruitment of an RNA polymerase II complex is mediated by the constitutive activation domain in CREB, independently of CREB phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 1001–1010.
318. MAYR, GUZMAN, & MONTMINY (2005). Glutamine rich and basic region/leucine zipper (bZIP) domains stabilize cAMP-response element-binding protein (CREB) binding to chromatin. *J. Biol. Chem.*, 280: 15103–15110.
319. GONZALEZ, MENZEL, LEONARD, ET AL. (1991). Characterization of motifs which are critical for activity of the cyclic AMP-responsive transcription factor CREB. *Mol. Cell. Biol.*, 11: 1306–1312.
320. QUINN (1993). Distinct activation domains within cAMP response element-binding protein (CREB) mediate basal and cAMP-stimulated transcription. *J. Biol. Chem.*, 268: 16999–17009.
321. SALUJA, VASSALLO, & TANESE (1998). Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 5734–5743.
322. HOEFFLER, MEYER, WAEBER, & HABENER (1990). Multiple adenosine 3',5'-cyclic [corrected] monophosphate response element DNA-binding proteins generated by gene diversification and alternative exon splicing. *Mol. Endocrinol.*, 4: 920–930.
323. WAEBER, MEYER, LESIEUR, ET AL. (1991). Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing. *Mol. Endocrinol.*, 5: 1418–1430.
324. WAEBER & HABENER (1992). Novel testis germ cell-specific transcript of the CREB gene contains an alternatively spliced exon with multiple in-frame stop codons. *Endocrinology*, 131: 2010–2015.
325. RUPPERT, COLE, BOSHART, ET AL. (1992). Multiple mRNA isoforms of the transcription activator protein CREB: generation by alternative splicing and specific expression in primary spermatocytes. *EMBO J*, 11: 1503–1512.
326. BARTON, MUTHUSAMY, CHANYANGAM, ET AL. (1996). Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*, 379: 81–85.
327. SILVA, KOGAN, FRANKLAND, & KIDA (1998). CREB and memory. *Annu. Rev. Neurosci.*, 21: 127–148.
328. FRANKLIN & JOHNSON (1992). Suppression of programmed neuronal death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. *Trends Neurosci.*, 15: 501–508.
329. TAO, FINKBEINER, ARNOLD, ET AL. (1998). Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, 20: 709–726.
330. GAU, LEMBERGER, VON GALL, ET AL. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron*, 34: 245–253.
331. WALKER, GIRARDET, & HABENER (1996). Alternative exon splicing controls a translational switch from activator to repressor isoforms of transcription factor CREB during spermatogenesis. *J. Biol. Chem.*, 271: 20145–21050.
332. HANSON & RESHEF (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu. Rev. Biochem.*, 66: 581–611.

333. MAYR & MONTMINY (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2: 599–609.
334. STRUTHERS, VALE, ARIAS, ET AL. (1991). Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature*, 350: 622–624.
335. FENTZKE, KORCARZ, LANG, ET AL. (1998). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J. Clin. Invest.*, 101: 2415–2426.
336. DESDOUETS, MATESIC, MOLINA, ET AL. (1995). Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 3301–3309.
337. D'AMICO, HULIT, AMANATULLAH, ET AL. (2000). The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, 275: 32649–32657.
338. WIERSTRA (2008). Sp1: Emerging roles-Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 372: 1–13.
339. PHILIPSEN & SUSKE (1999). A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.*, 27: 2991–3000.
340. COOK, GEBELEIN, & URRUTIA (1999). Sp1 and its likes: biochemical and functional predictions for a growing family of zinc finger transcription factors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 880: 94–102.
341. LOMBERK & URRUTIA (2005). The family feud: turning off Sp1 by Sp1-like KLF proteins. *Biochem. J.*, 392: 1–11.
342. COUREY, HOLTZMAN, JACKSON, & TJIAN (1989). Synergistic activation by the glutamine-rich domains of human transcription factor Sp1. *Cell*, 59: 827–836.
343. PASCAL & TJIAN (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev.*, 5: 1646–1656.
344. EMILI, GREENBLATT, & INGLES (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 1582–1593.
345. HE & WEINTRAUB (1998). Stepwise recruitment of components of the preinitiation complex by upstream activators in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 2876–2883.
346. BLACK, BLACK, AZIZKHAN-CLIFFORD, ET AL. (2001). Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer, Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J. Cell. Physiol.*, 188, 188: 143, 143–160, 160.
347. LI & DAVIE (2010). The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann. Anat.*, 192: 275–283.
348. LAGGER, DOETZLHOFER, SCHUETTENGROBER, ET AL. (2003). The tumor suppressor p53 and histone deacetylase 1 are antagonistic regulators of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1 gene. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 2669–2679.
349. SONG, UGAI, KANAZAWA, ET AL. (2001). Independent repression of a GC-rich housekeeping gene by Sp1 and MAZ involves the same cis-elements. *J. Biol. Chem.*, 276: 19897–19904.
350. LI, CHENG, ZHOU, ET AL. (2002). Interaction of Huntington disease protein with transcriptional activator Sp1. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 1277–1287.
351. HOLMES, ABRAHAM, CHEN, ET AL. (2003). Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J. Biol. Chem.*, 278: 41728–41733.
352. COOK & STURM (2008). POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. *Pigment Cell Res.*, 21: 611–626.
353. HE, TREACY, SIMMONS, ET AL. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature*, 340: 35–42.
354. YASUHARA, SHIBAZAKI, TANAKA, ET AL. (2007). Triggering neural differentiation of ES cells by subtype switching of importin-[alpha]. *Nat. Cell Biol.*, 9: 72–79.
355. BURGLIN & RUVKUN (2001). Regulation of ectodermal and excretory function by the *C. elegans* POU homeobox gene *ceh-6*. *Development*, 128: 779–790.

356. NAKAI, KAWANO, YUDATE, ET AL. (1995). The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.*, 9: 3109–3121.
357. ACAMPORA, POSTIGLIONE, AVANTAGGIATO, ET AL. (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.*, 13: 2787–2800.
358. GOSHU, JIN, LOVEJOY, ET AL. (2004). Sim2 Contributes to Neuroendocrine Hormone Gene Expression in the Anterior Hypothalamus. *Mol. Endocrinol.*, 18: 1251–1262.
359. OSTERBERG, WIEHLE, OEHLKE, ET AL. (2011). Sim1 Is a Novel Regulator in the Differentiation of Mouse Dorsal Raphe Serotonergic Neurons. *PLoS ONE*, 6:
360. CATENA, TIVERON, RONCHI, ET AL. (2004). Conserved POU Binding DNA Sites in the Sox2 Upstream Enhancer Regulate Gene Expression in Embryonic and Neural Stem Cells. *J. Biol. Chem.*, 279: 41846–41857.
361. TANAKA, KAMACHI, TANOUCI, ET AL. (2004). Interplay of SOX and POU Factors in Regulation of the Nestin Gene in Neural Primordial Cells. *Mol. Biol. Cell.*, 24: 8834–8846.
362. GHISLAIN & CHARNAY (2006). Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep.*, 7: 52–58.
363. CASTRO, SKOWRONSKA-KRAWCZYK, ARMANT, ET AL. (2006). Proneural bHLH and Brn Proteins Coregulate a Neurogenic Program through Cooperative Binding to a Conserved DNA Motif. *Devel. Cell*, 11: 831–844.
364. VIERBUCHEN, OSTERMEIER, PANG, ET AL. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463: 1035–1041.
365. PANG, YANG, VIERBUCHEN, ET AL. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, 476: 220–223.
366. LUJAN, CHANDA, AHLENIUS, ET AL. (2012). Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*,
367. SHI, SOHN, CHOI, ET AL. (2010). Brn2 Is a Transcription Factor Regulating Keratinocyte Differentiation with a Possible Role in the Pathogenesis of Lichen Planus. *PLoS ONE*, 5: e13216.
368. COOK, SMITH, SMIT, ET AL. (2005). Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 308: 222–235.
369. GOODALL, MARTINOZZI, DEXTER, ET AL. (2004). Brn-2 Expression Controls Melanoma Proliferation and Is Directly Regulated by  $\beta$ -Catenin. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 2915–2922.
370. THOMSON, MURPHY, BAKER, ET AL. (1995). The brn-2 gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene*, 11: 691–700.
371. EISEN, EASTY, BENNETT, & GODING (1995). The POU domain transcription factor Brn-2: elevated expression in malignant melanoma and regulation of melanocyte-specific gene expression. *Oncogene*, 11: 2157–2164.
372. KOBİ, STEUNOU, DEMBÉLÉ, ET AL. (2010). Genome-wide analysis of POU3F2/BRN2 promoter occupancy in human melanoma cells reveals Kitl as a novel regulated target gene. *Pigment Cell Res.*, 23: 404–418.
373. AROZARENA, SANCHEZ-LAORDEN, PACKER, ET AL. (2011). Oncogenic BRAF Induces Melanoma Cell Invasion by Downregulating the cGMP-Specific Phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell*, 19: 45–57.
374. KONDOH, UCHIKAWA, & KAMACHI (2004). Interplay of Pax6 and SOX2 in lens development as a paradigm of genetic switch mechanisms for cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.*, 48: 819–827.
375. KIM, MATSUDA, & CEPKO (2008). A core paired-type and POU homeodomain-containing transcription factor program drives retinal bipolar cell gene expression. *J. Neurosci.*, 28: 7748–7764.
376. WARAGAI, JUNN, KAJIKAWA, ET AL. (2000). PQBP-1/Npw38, a Nuclear Protein Binding to the Polyglutamine Tract, Interacts with U5-15kD/dim1p via the Carboxyl-Terminal Domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273: 592–595.

377. SUDOL & HUNTER (2000). NeW Wrinkles for an Old Domain. *Cell*, 103: 1001–1004.
378. SUDOL, SLIWA, & RUSSO (2001). Functions of WW domains in the nucleus. *FEBS Lett.*, 490: 190–195.
379. KOMURO, SAEKI, & KATO (1999). Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Res.*, 27: 1957–1965.
380. RICH, ASSIER, SKEPPER, ET AL. (1999). Disassembly of Nuclear Inclusions in the Dividing Cell—A Novel Insight into Neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 2451–2459.
381. YANAGISAWA, BUNDO, MIYASHITA, ET AL. (2000). Protein binding of a DRPLA family through arginine-glutamic acid dipeptide repeats is enhanced by extended polyglutamine. *Hum. Mol. Genet.*, 9: 1433–1442.
382. ZHANG, LINDBLOM, CHANG, ET AL. (2000). Evidence that Dim1 associates with proteins involved in pre-mRNA splicing, and delineation of residues essential for Dim1 interactions with hnRNP F and Npw38/PQBP-1. *Gene*, 257: 33–43.
383. REUTER, NOTTROT, FABRIZIO, ET AL. (1999). Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kd protein. *J. Mol. Biol.*, 294: 515–525.
384. KOMURO, SAEKI, & KATO (1999). Association of Two Nuclear Proteins, Npw38 and NpwBP, via the Interaction between the WW Domain and a Novel Proline-rich Motif Containing Glycine and Arginine. *J. Biol. Chem.*, 274: 36513–36519.
385. OKAZAWA, RICH, CHANG, ET AL. (2002). Interaction between Mutant Ataxin-1 and PQBP-1 Affects Transcription and Cell Death. *Neuron*, 34: 701–713.
386. SHILATIFARD (1998). Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J.*, 12: 1437–1446.
387. KLEEFSTRA, FRANKEN, ARENS, ET AL. (2004). Genotype-phenotype studies in three families with mutations in the polyglutamine-binding protein 1 gene (PQBP1). *Clin. Genet.*, 66: 318–326.
388. RAYMOND (2006). X linked mental retardation: a clinical guide. *J. Med. Genet.*, 43: 193–200.
389. KALSCHUEER, FREUDE, MUSANTE, ET AL. (2003). Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat. Genet.*, 35: 313–315.
390. MUSANTE, KUNDE, SULISTIO, ET AL. (2010). Common pathological mutations in PQBP1 induce nonsense-mediated mRNA decay and enhance exclusion of the mutant exon. *Hum. Mutat.*, 31: 90–98.
391. TAKAHASHI, MIZUGUCHI, SHINODA, ET AL. (2010). Polyglutamine tract-binding protein-1 binds to U5-15kD via a continuous 23-residue segment of the C-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1804: 1500–1507.
392. LENSKI, ABIDI, MEINDL, ET AL. (2004). Novel Truncating Mutations in the Polyglutamine Tract Binding Protein 1 Gene (PQBP1) Cause Renpenning Syndrome and X-Linked Mental Retardation in Another Family with Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 777–780.
393. LUBS, ABIDI, ECHEVERRI, ET AL. (2006). Golabi-Ito-Hall syndrome results from a missense mutation in the WW domain of the PQBP1 gene. *J. Med. Genet.*, 43: e30.
394. TAPIA, NICOLAESCU, McDONALD, ET AL. (2010). Y65C Missense Mutation in the WW Domain of the Golabi-Ito-Hall Syndrome Protein PQBP1 Affects Its Binding Activity and Deregulates Pre-mRNA Splicing. *J. Biol. Chem.*, 285: 19391–19401.
395. OKUDA, HATTORI, TAKEUCHI, ET AL. (2003). PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease-like phenotype. *Hum. Mol. Genet.*, 12: 711–725.
396. IWAMOTO, HUANG, & UEDA (2000). Genomic organization and alternative transcripts of the human PQBP-1 gene. *Gene*, 259: 69–73.
397. EGERTON, ASHE, CHEN, ET AL. (1992). VCP, the mammalian homolog of cdc48, is tyrosine phosphorylated in response to T cell antigen receptor activation. *EMBO J.*, 11: 3533–3540.
398. STUCHELL, GARRUS, MÜLLER, ET AL. (2004). The Human Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT-I) and Its Role in HIV-1 Budding. *J. Biol. Chem.*, 279: 36059–36071.

399. KATZMANN, BABST, & EMR (2001). Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell*, 106: 145–155.
400. VANDEMARK, HOFMANN, TSUI, ET AL. (2001). Molecular Insights into Polyubiquitin Chain Assembly: Crystal Structure of the Mms2/Ubc13 Heterodimer. *Cell*, 105: 711–720.
401. MCKENNA, HU, MORAES, ET AL. (2003). Energetics and Specificity of Interactions within Ub-Uev-Ubc13 Human Ubiquitin Conjugation Complexes†. *Biochemistry*, 42: 7922–7930.
402. BACHE, SLAGSVOLD, CABEZAS, ET AL. (2004). The Growth-Regulatory Protein HCRP1/hVps37A Is a Subunit of Mammalian ESCRT-I and Mediates Receptor Down-Regulation. *Mol. Biol. Cell.*, 15: 4337–4346.
403. KARJALAINEN, RINTANEN, LEHKONEN, ET AL. (2011). Echovirus 1 infection depends on biogenesis of novel multivesicular bodies. *Cell. Microbiol.*, 13: 1975–1995.
404. XU, LIANG, WANG, ET AL. (2003). HCRP1, a novel gene that is downregulated in hepatocellular carcinoma, encodes a growth-inhibitory protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 311: 1057–1066.
405. LI & COHEN (1996). tsg101: A Novel Tumor Susceptibility Gene Isolated by Controlled Homozygous Functional Knockout of Allelic Loci in Mammalian Cells. *Cell*, 85: 319–329.
406. LAI, HUANG, LIN, ET AL. (2009). Expression of the HCRP1 mRNA in HCC as an independent predictor of disease-free survival after surgical resection. *Hepatol. Res.*, 39: 164–176.
407. WITTINGER, VANHARA, EL-GAZZAR, ET AL. (2011). hVps37A Status Affects Prognosis and Cetuximab Sensitivity in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.*, 17: 7816–7827.
408. HASINA, PONTIER, FEKETE, ET AL. (2005). NOL7 is a nucleolar candidate tumor suppressor gene in cervical cancer that modulates the angiogenic phenotype. *Oncogene*, 25: 588–598.
409. MANKAME, ZHOU, & LINGEN (2010). Identification and characterization of the human NOL7 gene promoter. *Gene*, 456: 36–44.
410. ZHOU, DOÇI, & LINGEN (2010). Identification and functional analysis of NOL7 nuclear and nucleolar localization signals. *BMC Cell Biol.*, 11: 74.
411. DOÇI, MANKAME, LANGERMAN, ET AL. (2012). Characterization of NOL7 Gene Point Mutations, Promoter Methylation, and Protein Expression in Cervical Cancer. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 31: 15–24.
412. KINOR & SHAV-TAL (2011). The dynamics of the alternatively spliced NOL7 gene products and role in nucleolar architecture. *Nucleus*, 2: 229–245.
413. SEKIGUCHI, HAYANO, YANAGIDA, ET AL. (2006). NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res.*, 34: 4593–4608.
414. LI, LEE, MORADI, ET AL. (2009). Rational Extension of the Ribosome Biogenesis Pathway Using Network-Guided Genetics. *PLoS Biol.*, 7:
415. JUMBO-LUCIONI, AYROLES, CHAMBERS, ET AL. (2010). Systems genetics analysis of body weight and energy metabolism traits in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*, 11: 297.
416. DOBRIN, ZHU, MOLONY, ET AL. (2009). Multi-tissue coexpression networks reveal unexpected subnetworks associated with disease. *Genome Biol.*, 10: R55.
417. DEHENNAUT, SLOMIANNY, PAGE, ET AL. (2008). Identification of Structural and Functional O-Linked N-Acetylglucosamine-bearing Proteins in *Xenopus laevis* Oocyte. *Mol. Cell. Prot.*, 7: 2229–2245.
418. CALABRESE, MARZANO, URBANI, ET AL. (2011). Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 34: 982–993.
419. ZHANG, WANG, KAJINO, & GREENE (2000). VCP, a Weak ATPase Involved in Multiple Cellular Events, Interacts Physically with BRCA1 in the Nucleus of Living Cells. *DNA Cell Biol.*, 19: 253–263.
420. WU, LEFRANCOIS, MORALES, & HECHT (1999). Protein-Protein Interactions between the Testis Brain RNA-Binding Protein and the Transitional Endoplasmic Reticulum ATPase, a Cytoskeletal  $\gamma$  Actin and Trax in Male Germ Cells and the Brain†. *Biochemistry*, 38: 11261–11270.

421. HETZER, MEYER, WALTHER, ET AL. (2001). Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly. *Nature Cell Biol.*, 3: 1086–1091.
422. UCHIYAMA & KONDO (2005). p97/p47-Mediated Biogenesis of Golgi and ER. *J. Biochem.*, 137: 115–119.
423. DAI, CHEN, LONGO, ET AL. (1998). Involvement of Valosin-containing Protein, an ATPase Copurified with I $\kappa$ B $\alpha$  and 26 S Proteasome, in Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J. Biol. Chem.*, 273: 3562–3573.
424. YE, SHIBATA, KIKKERT, ET AL. (2005). Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 14132–14138.
425. ASAI, TOMITA, NAKATSUKA, ET AL. (2002). VCP (p97) regulates NF $\kappa$ B signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 296–304.
426. YAMAMOTO, TOMITA, HOSHIDA, ET AL. (2004). Expression of valosin-containing protein in colorectal carcinomas as a predictor for disease recurrence and prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 10: 651–657.
427. YAMAMOTO, TOMITA, URUNO, ET AL. (2005). Increased Expression of Valosin-Containing Protein (p97) Is Correlated With Disease Recurrence in Follicular Thyroid Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 12: 925–934.
428. KURAMITSU, ZHANG, WANG, & NAKAMURA (2011). Identification of differentially expressed proteins in tumour necrosis factor- $\alpha$ -resistant and -sensitive rat hepatoma cells. *Anticancer Res.*, 31: 2059–2063.
429. VALLE, MIN, BODAS, ET AL. (2011). Critical Role of VCP/p97 in the Pathogenesis and Progression of Non-Small Cell Lung Carcinoma. *PLoS ONE*, 6:
430. PAN, WANG, CHEN, ET AL. (2012). Functional proteomics reveals hepatotoxicity and the molecular mechanisms of different forms of chromium delivered by skin administration. *Proteomics*, 12: 477–489.
431. YANG (2011). Alteration of the proteome profile of the pancreas in diabetic rats induced by streptozotocin. *Int. J. Mol. Med.*,
432. LONG, KNOWLER, HANSON, ET AL. (1998). Evidence for genetic linkage to alcohol dependence on chromosomes 4 and 11 from an autosome-wide scan in an American Indian population. *Am. J. Med. Genet.*, 81: 216–221.
433. BACHMANOV, REED, LI, ET AL. (2002). Voluntary Ethanol Consumption by Mice: Genome-Wide Analysis of Quantitative Trait Loci and Their Interactions in a C57BL/6ByJ  $\times$  129P3/J F2 Intercross. *Genome Res.*, 12: 1257–1268.
434. NIELSEN, VIRKKUNEN, LAPPALAINEN, ET AL. (1998). A tryptophan hydroxylase gene marker for suicidality and alcoholism. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55: 593–602.
435. SUN, FANN, LANE, ET AL. (2005). A Functional Polymorphism in the Promoter Region of the Tryptophan Hydroxylase Gene Is Associated With Alcohol Dependence in One Aboriginal Group in Taiwan. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 29: 1–7.
436. CHUNG, KIM, SRIBNEY, ET AL. (2005). Tryptophan hydroxylase polymorphism is associated with age of onset of alcoholism related behaviors. *Alcohol*, 36: 1–3.
437. MCBRIDE, MURPHY, LUMENG, & LI (1989). Serotonin and ethanol preference. *Recent Dev. Alcohol.*, 7: 187–209.
438. BIRNBOIM & DOLY (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513–1523.
439. SANGER, NICKLEN, & COULSON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74: 5463–5467.
440. DALE, SCHNÖFELD, LANGEN, & STIEGER (1994). Increased solubility of trimethoprim-resistant type SI DHFR from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli* cells overproducing the chaperonins GroEL and GroES. *Protein Eng.*, 7: 925–931.
441. MARION M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

442. SMITH, KROHN, HERMANSON, ET AL. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 150: 76–85.
443. NAGATSU, SAWADA, & YAMAGUCHI (1983). Tryptophan hydroxylase system in brain tissue slices assayed by high-performance liquid chromatography. *Neurochem. Int.*, 5: 603–609.
444. JOHNSON, PETERSEN-JONES, THOMPSON, ET AL. (2012). Vena Cava and Aortic Smooth Muscle Cells Express Transglutaminases 1 and 4 in addition to Transglutaminase 2. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*,
445. PHILLIPS, HEN, & CRABBE (1999). Complications associated with genetic background effects in research using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 147: 5–7.
446. WOLFER, CRUSIO, & LIPP (2002). Knockout mice: simple solutions to the problems of genetic background and flanking genes. *Trends Neurosci.*, 25: 336–340.
447. BULMAN-FLEMING, BRYDEN, & ROGERS (1997). Mouse paw preference: effects of variations in testing protocol. *Behav. Brain Res.*, 86: 79–87.
448. PAULMANN (2008). Aufklärung der Funktion von Serotonin in Beta-Zellen des Pankreas - Die Serotonylierung kleiner GTPasen moduliert die Insulinsekretion. *Dissertation an der Freien Universität Berlin, Fachbereich Biologie*, 1–121.
449. BACHMANOV, TORDOFF, & BEAUCHAMP (1996). Ethanol Consumption and Taste Preferences in C57BL/6ByJ and 129/J Mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20: 201–206.
450. BACHMANOV, TORDOFF, & BEAUCHAMP (2001). Sweetener Preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J Mice. *Chem. Senses*, 26: 905–913.
451. ISHIWATARI & BACHMANOV (2012). NaCl Taste Thresholds in 13 Inbred Mouse Strains. *Chem. Senses*,
452. HALL, CARTWRIGHT, FLEMING, & SCHWALBE (2011). Importance of glycosylation on function of a potassium channel in neuroblastoma cells. *PLoS ONE*, 6: e19317.
453. SJÖLINDER, UHLMANN, & PONSTINGL (2002). DelGEF, a homologue of the Ran guanine nucleotide exchange factor RanGEF, binds to the exocyst component Sec5 and modulates secretion. *FEBS Lett.*, 532: 211–215.
454. KISILEVSKY & MANLEY (2012). Acute-phase serum amyloid A: perspectives on its physiological and pathological roles. *Amyloid*, 19: 5–14.
455. SATO, FUJII, KONOMI, ET AL. (2011). Overexpression of SPACIA1/SAAL1, a newly identified gene that is involved in synoviocyte proliferation, accelerates the progression of synovitis in mice and humans. *Arthritis & Rheumatism*, 63: 3833–3842.
456. SYRZYCKA, MCEACHERN, KINNEARD, ET AL. (2007). The pink gene encodes the Drosophila orthologue of the human Hermansky-Pudlak syndrome 5 (HPS5) gene. *Genome*, 50: 548–556.
457. NACCARATI, PARDINI, LANDI, ET AL. (2012). Polymorphisms in miRNA Binding Sites of Nucleotide Excision Repair Genes and Colorectal Cancer Risk. *Carcinogenesis*,
458. BECKINGHAM & RYDER (2001). Investigation of liver and biliary disease. *BMJ*, 322: 33–36.
459. SAKA, AKHIGBE, ISHOLA, ET AL. (2011). Hepatotherapeutic effect of Aloe vera in alcohol-induced hepatic damage. *Pak. J. Biol. Sci.*, 14: 742–746.
460. KARWEINA (2011). Die serotonerge Abhängigkeit bei Alkoholismus und anderen psychiatrischen Krankheiten. *Diplomarbeit an der Technischen Universität Berlin, Fachbereich Biotechnologie*, 1–98.
461. HINZE (2011). Einfluss biogener Monoamine auf die Leberregeneration. *Master thesis an der Universität zu Lübeck, Fachbereich Molecular Life Sciences*, 1–74.
462. XU, HUI, ALBANIS, ET AL. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut*, 54: 142–151.
463. HENSCHEN (2005). Konstitutive Aktivierung von G-Proteinen durch Monoaminylisierung in der Insulinsekretion. *Diplomarbeit an der Technischen Fachhochschule Berlin, Fachbereich Biotechnologie*, 1–54.
464. WALTHER (2006). Der Einfluss von Ethanol auf den Metabolismus von Serotonin. *Diplomarbeit an der Technischen Fachhochschule Berlin, Fachbereich Biotechnologie*, 1–64.

465. BELKNAP, CRABBE, & YOUNG (1993). Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl.)*, 112: 503–510.
466. PARSIAN & ZHANG (1999). Human chromosomes 11p15 and 4p12 and alcohol dependence: possible association with the GABRB1 gene. *Am. J. Med. Genet.*, 88: 533–538.
467. BANKI (1978). 5-Hydroxytryptamine content of the whole blood in psychiatric illness and alcoholism. *Acta Psychiatr. Scand.*, 57: 232–238.
468. PIVAC, MÜCK-SELER, MUSTAPIĆ, ET AL. (2004). Platelet serotonin concentration in alcoholic subjects. *Life Sci.*, 76: 521–531.
469. FILS-AIME, ECKARDT, GEORGE, ET AL. (1996). Early-onset alcoholics have lower cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid levels than late-onset alcoholics. *Arch. Gen. Psychiatry*, 53: 211–216.
470. RATSMA, VAN DER STELT, & GUNNING (2002). Neurochemical Markers of Alcoholism Vulnerability in Humans. *Alcohol and Alcoholism*, 37: 522–533.
471. WASIELEWSKI & HOLLOWAY (2001). Alcohol's interactions with circadian rhythms. A focus on body temperature. *Alcohol Res. Health.*, 25: 94–100.
472. SCHMITZ, SEPANDJ, PICHLER, & RUDAS (1996). Disrupted melatonin-secretion during alcohol withdrawal. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 20: 983–995.
473. MURIALDO, FILIPPI, COSTELLI, ET AL. (1991). Urine melatonin in alcoholic patients: a marker of alcohol abuse? *J. Endocrinol. Invest.*, 14: 503–507.
474. YOSHIMOTO, KOMURA, & KAWAMURA (1992). Occurrence in Vivo of 5-Hydroxytryptophol in the Brain of Rats Treated with Ethanol. *Alcohol and Alcoholism*, 27: 131–136.
475. SOME, SVENSSON, HÖÖG, & HELANDER (2000). Studies on the interaction between ethanol and serotonin metabolism in rat, using deuterated ethanol and 4-methylpyrazole. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 385–391.
476. DE ARRUDA CAMARGO, DE ARRUDA CAMARGO, & SAAD (2010). On a possible dual role for the lateral septal area 5-HT(1A) receptor system in the regulation of water intake and urinary excretion. *Behav. Brain Res.*, 215: 122–128.
477. RONDANELLI, OPIZZI, FALIVA, ET AL. (2011). Relationship between the absorption of 5-hydroxytryptophan from an integrated diet, by means of Griffonia simplicifolia extract, and the effect on satiety in overweight females after oral spray administration. *Eat. Weight Disord.*
478. HALLADAY, WAGNER, SEKOWSKI, ET AL. (2006). Alterations in alcohol consumption, withdrawal seizures, and monoamine transmission in rats treated with phentermine and 5-hydroxy-L-tryptophan. *Synapse*, 59: 277–289.
479. MOON, CHOI, YOO, ET AL. (2010). 5-hydroxy-L-tryptophan Suppressed Food Intake in Rats Despite an Increase in the Arcuate NPY Expression. *Exp. Neurobiol.*, 19: 132–139.
480. HALFORD, HARROLD, BOYLAND, ET AL. (2007). Serotonergic drugs: effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Drugs*, 67: 27–55.
481. YU, FUJIMURA, HAYASHI, ET AL. (2001). Mechanisms in regulating the release of serotonin from the perfused rat stomach. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 280: G1099–1105.
482. MAZDA, YAMAMOTO, FUJIMURA, & FUJIMIYA (2004). Gastric distension-induced release of 5-HT stimulates c-fos expression in specific brain nuclei via 5-HT3 receptors in conscious rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 287: G228–235.
483. BRÜNING, GAUTAM, BURKS, ET AL. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, 289: 2122–2125.
484. FANBURG & LEE (1997). A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am. J. Physiol.*, 272: L795–806.
485. NAGAO, AKAHOSHI, KAMORI, ET AL. (2011). Liver regeneration is promoted by increasing serotonin content in rat liver with secondary biliary cirrhosis. *Hepatol. Res.*, 41: 784–794.
486. BEAUDRY, HADENGUE, CALLEBERT, ET AL. (1994). Blood and plasma 5-hydroxytryptamine levels in patients with cirrhosis. *Hepatology*, 20: 800–803.
487. COULIE, TACK, BOUILLON, ET AL. (1998). 5-Hydroxytryptamine-1 receptor activation inhibits endocrine pancreatic secretion in humans. *Am. J. Physiol.*, 274: E317–320.

488. COMAI, COSTA, RAGAZZI, ET AL. (2005). The effect of age on the enzyme activities of tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rats. *Clin. Chim. Acta*, 360: 67–80.
489. BLUM & HOPT (2003). Hepatocellular carcinoma. Pathogenesis and multicentricity. *Chirurg*, 74: 709–716.
490. SCATENA (2012). Mitochondria and cancer: a growing role in apoptosis, cancer cell metabolism and dedifferentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 942: 287–308.
491. STONE, SUTHERLAND, & MUSGROVE (2012). Inhibitors of cell cycle kinases: recent advances and future prospects as cancer therapeutics. *Crit. Rev. Oncog.*, 17: 175–198.
492. DANG (2012). Notch, apoptosis and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 727: 199–209.
493. PRICE, CALDWELL, & HEWITT (2006). The effect of EGF and the comitogen, norepinephrine, on the proliferative responses of fresh and cryopreserved rat and mouse hepatocytes. *Cryobiology*, 53: 182–193.
494. MELIEN, NILSSEN, DAJANI, ET AL. (2002). Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of ERK in hepatocytes by norepinephrine and prostaglandin F<sub>2</sub> alpha: role of calmodulin and Src kinases. *BMC Cell Biol.*, 3: 5.
495. LIN, LU, WANG, ET AL. (2011). Apigenin attenuates dopamine-induced apoptosis in melanocytes via oxidative stress-related p38, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase and Akt signaling. *J. Dermatol. Sci.*, 63: 10–16.
496. JANA, SINHA, CHANDA, ET AL. (2011). Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: Implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1812: 663–673.
497. BOESS, KAMBER, ROMER, ET AL. (2003). Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. *Toxicol. Sci.*, 73: 386–402.
498. LIND, MACGREGOR, HEATH, ET AL. (2012). Association Between In Vivo Alcohol Metabolism and Genetic Variation in Pathways that Metabolize the Carbon Skeleton of Ethanol and NADH Reoxidation in the Alcohol Challenge Twin Study. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*,
499. CAPUTO, VIGNOLI, LEGGIO, ET AL. (2012). Alcohol use disorders in the elderly: A brief overview from epidemiology to treatment options. *Exp. Geront.*, 47: 411–416.
500. MORMONE, GEORGE, & NIETO (2011). Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.*, 193: 225–231.
501. SHEN & CAO (2012). Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, 4: 1157–1169.
502. MARQUARDT, GALLE, & TEUFEL (2012). Hepatocellular carcinoma: molecular pathogenesis and novel targets for therapy. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, 137: 855–860.
503. HAVIV, BRADLEY, KALVIN, ET AL. (2005). Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *J. Med. Chem.*, 48: 2838–2846.
504. ELLENRIEDER (2008). TGF $\beta$ -Regulated Gene Expression by Smads and Sp1/KLF-Like Transcription Factors in Cancer. *Anticancer Res.*, 28: 1531–1539.
505. GRZELAKOWSKA-SZTABERT & DUDKOWSKA (2011). Paradoxical action of growth factors: antiproliferative and proapoptotic signaling by HGF/c-MET. *Growth Factors*, 29: 105–118.
506. NORKINA, DOLGANIUC, SHAPIRO, ET AL. (2007). Acute alcohol activates STAT3, AP-1, and Sp-1 transcription factors via the family of Src kinases to promote IL-10 production in human monocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 82: 752–762.
507. CHOI, KIM, CHO, ET AL. (2011). Malondialdehyde inhibits an AMPK-mediated nuclear translocation and repression activity of ALDH2 in transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404: 400–406.
508. CHANG & YOSHIDA (1994). Cloning and characterization of the gene encoding mouse mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Gene*, 148: 331–336.
509. STEWART, DIPPLE, STEWART, & CRABB (1996). The role of nuclear factor NF-Y/CP1 in the transcriptional regulation of the human aldehyde dehydrogenase 2-encoding gene. *Gene*, 173: 155–161.

510. PINAIRE, CHOU, STEWART, ET AL. (1999). Activity of the human aldehyde dehydrogenase 2 promoter is influenced by the balance between activation by hepatocyte nuclear factor 4 and repression by peroxisome proliferator activated receptor delta, chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor, and apolipoprotein regulatory protein-1. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 463: 115–121.
511. EDENBERG & BROWN (1992). Regulation of human alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenetics*, 2: 185–196.
512. PENG & COON (2000). Promoter function and the role of cytokines in the transcriptional regulation of rabbit CYP2E1 and CYP2E2. *Arch. Biochem. Biophys.*, 382: 129–137.
513. MAJOR, HAWLEY, SAINI, ET AL. (1985). Brain and liver monoamine oxidase type A and type B activity in alcoholics and controls. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 9: 6–9.
514. ANSORGE, TANNEBERGER, DAVIES, ET AL. (2004). Analysis of the murine 5-HT receptor gene promoter in vitro and in vivo. *Eur. J. Neurosci.*, 20: 363–374.
515. THANSEEM, ANITHA, NAKAMURA, ET AL. (2012). Elevated transcription factor specificity protein 1 in autistic brains alters the expression of autism candidate genes. *Biol. Psychiatry*, 71: 410–418.
516. JESSEN, PHILLIPS, HOVNANIAN, & RICE (2000). Role of Sp1 response element in transcription of the human transglutaminase 1 gene. *J. Invest. Dermatol.*, 115: 113–117.
517. HAN, RORKE, ADHIKARY, ET AL. (2012). Suppression of AP1 Transcription Factor Function in Keratinocyte Suppresses Differentiation. *PLoS ONE*, 7:
518. KRIG, CHANDRARATNA, CHANG, ET AL. (2002). Gene-Specific TCDD Suppression of RAR $\alpha$ - and RXR-Mediated Induction of Tissue Transglutaminase. *Toxicol. Sci.*, 68: 102–108.
519. BAUGÉ, CAUVARD, LECLERCQ, ET AL. (2011). Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta. *Arthritis Res. Ther.*, 13: R23.
520. MAEDA, HIRAYAMA, KOBAYASHI, ET AL. (2007). Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab. Dispos.*, 35: 394–401.
521. ALI, BAJAJ, GOPINATH, & KUMAR (2009). Characterization of the human SLC22A18 gene promoter and its regulation by the transcription factor Sp1. *Gene*, 429: 37–43.
522. WATSON, KIERNAN, DEAVALL, ET AL. (2001). Transcriptional activation of the rat vesicular monoamine transporter 2 promoter in gastric epithelial cells: regulation by gastrin. *J. Biol. Chem.*, 276: 7661–7671.
523. STAHL (2004). A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). *Pflugers Arch.*, 447: 722–727.
524. ODAIB, SHNEIDER, BENNETT, ET AL. (1998). A defect in the transport of long-chain fatty acids associated with acute liver failure. *N. Engl. J. Med.*, 339: 1752–1757.
525. CANKORUR-CETINKAYA, DERELI, ERASLAN, ET AL. (2012). A Novel Strategy for Selection and Validation of Reference Genes in Dynamic Multidimensional Experimental Design in Yeast. *PLoS ONE*, 7:
526. KOUNELAKIS, ZERVAKIS, GIAKOS, ET AL. (2012). On the Relevance of Glycolysis Process on Brain Gliomas. *EEE Trans. Inf. Technol. Biomed.*,
527. HANNAN, SANIJ, HEIN, ET AL. (2011). Signaling to the ribosome in cancer—It is more than just mTORC1. *IUBMB Life*, 63: 79–85.
528. KOBAYASHI, SASAKI, OSHIMA, ET AL. (2006). Activation of the ribosomal protein L13 gene in human gastrointestinal cancer. *Int. J. Mol. Med.*, 18: 161–170.
529. CRONA, HARRAL, ADNOT, ET AL. (2009). Gene expression in lungs of mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *BMC Pulm. Med.*, 9: 19.
530. LIANG, O'REILLY, LIU, ET AL. (2004). Sp1 regulates expression of MET, and ribozyme-induced down-regulation of MET in fibrosarcoma-derived human cells reduces or eliminates their tumorigenicity. *Int. J. Oncol.*, 24: 1057–1067.

531. ZHANG, ZHI, LIU, ET AL. (2009). Induction of p21(CIP1/WAF1) expression by human T-lymphotropic virus type 1 Tax requires transcriptional activation and mRNA stabilization. *Retrovirology*, 6: 35.
532. NOCITO, DAHM, JOCHUM, ET AL. (2007). Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*, 133: 608–618.
533. RUDELL, OAKLEY, HUSSAIN, ET AL. (2006). A Role for Serotonin (5-HT) in Hepatic Stellate Cell Function and Liver Fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 169: 861–876.
534. CHEN, LI, PAN, ET AL. (2001). Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J. Neurosci.*, 21: 6348–6361.
535. GOZANI, PATTON, & REED (1994). A novel set of spliceosome-associated proteins and the essential splicing factor PSF bind stably to pre-mRNA prior to catalytic step II of the splicing reaction. *EMBO J.*, 13: 3356–3367.
536. SHAV-TAL & ZIPORI (2002). PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett.*, 531: 109–114.
537. KAMEOKA, DUQUE, & KONARSKA (2004). p54nrb associates with the 5' splice site within large transcription/splicing complexes. *EMBO J.*, 23: 1782–1791.
538. SHAV-TAL, BLECHMAN, DARZACQ, ET AL. (2005). Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol. Biol. Cell*, 16: 2395–2413.
539. DONG, SWEET, CHALLIS, ET AL. (2007). Transcriptional Activity of Androgen Receptor Is Modulated by Two RNA Splicing Factors, PSF and p54nrb. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 4863–4875.
540. KANEKO, ROZENBLATT-ROSEN, MEYERSON, & MANLEY (2007). The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev.*, 21: 1779–1789.
541. GRIFFIN, CASADIO, & BERGAMINI (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem J.*, 368: 377–396.
542. VOWINCKEL, STAHLBERG, PAULMANN, ET AL. (2012). Histaminylation of glutamine residues is a novel posttranslational modification implicated in G-protein signaling. *FEBS Lett.*,
543. BOTQUIN, HESS, FUHRMANN, ET AL. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.*, 12: 2073–2090.
544. VAN LEEUWEN, STRATING, COX, ET AL. (1995). Mutation of the Oct-1 POU-specific recognition helix leads to altered DNA binding and influences enhancement of adenovirus DNA replication. *Nucleic Acids Res.*, 23: 3189–3197.
545. BLAUD, VOSSEN, JOSEPH, ET AL. (2004). Characteristic patterns of N Oct-3 binding to a set of neuronal promoters. *J. Mol. Biol.*, 339: 1049–1058.
546. REMÉNYI, TOMILIN, SCHÖLER, & WILMANN (2002). Differential activity by DNA-induced quaternary structures of POU transcription factors. *Biochem. Pharmacol.*, 64: 979–984.
547. MIYATA, VALLETTE-KASIC, SAVEANU, ET AL. (2006). Identification and functional analysis of the novel S179R POU1F1 mutation associated with combined pituitary hormone deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 4981–4987.
548. SMIT, SMITH, PARSONS, ET AL. (2000). Domains of Brn-2 that mediate homodimerization and interaction with general and melanocytic transcription factors. *Eur. J. Biochem.*, 267: 6413–6422.
549. SMITH, BRIGHTWELL, SMIT, ET AL. (1998). Redox regulation of Brn-2/N-Oct-3 POU domain DNA binding activity and proteolytic formation of N-Oct-5 during melanoma cell nuclear extraction. *Melanoma Res.*, 8: 2–10.
550. PANDYA, ISLAM, KUMAR, ET AL. (2010). DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence. *J. Chem. Sci.*, 122: 247–257.
551. PRUITT, BUSSMAN, MASLOV, ET AL. (2004). Hox/Pbx and Brn binding sites mediate Pax3 expression in vitro and in vivo. *Gene Expr. Patterns*, 4: 671–685.

552. WONG & MURPHY (2003). Adenoviral-mediated over-expression of Brn2 in the rat paraventricular nucleus: no effect on vasopressin or corticotrophin releasing factor RNA levels. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 200: 165–175.
553. NIETO, JOSEPH, STELLA, ET AL. (2007). Differential effects of phosphorylation on DNA binding properties of N Oct-3 are dictated by protein/DNA complex structures. *J. Mol. Biol.*, 370: 687–700.
554. SUNABORI, TOKUNAGA, NAGAI, ET AL. (2008). Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J. Cell Sci.*, 121: 1204–1212.
555. KUNDE, MUSANTE, GRIMME, ET AL. (2011). The X-chromosome-linked intellectual disability protein PQBP1 is a component of neuronal RNA granules and regulates the appearance of stress granules. *Hum. Mol. Genet.*, 20: 4916–4931.
556. PINCUS & WAELSCH (1968). The specificity of transglutaminase. II. Structural requirements of the amine substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 126: 44–52.
557. ZHANG, LESORT, GUTTMANN, & JOHNSON (1998). Modulation of the in situ activity of tissue transglutaminase by calcium and GTP. *J. Biol. Chem.*, 273: 2288–2295.
558. MERCADO & KILIC (2010). Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Mol. Interv.*, 10: 231–241.
559. LIU, KAMITAKAHARA, KIM, & AGUILERA (2008). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate responsive element binding protein phosphorylation is required but not sufficient for activation of corticotropin-releasing hormone transcription. *Endocrinology*, 149: 3512–3520.
560. NOZAWA, MORI, KIMURA, & SEKI (2005). Characterization of a transglutaminase from scallop hemocyte and identification of its intracellular substrates. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 140: 395–402.
561. MISHRA, MELINO, & MURPHY (2007). Transglutaminase 2 kinase activity facilitates protein kinase A-induced phosphorylation of retinoblastoma protein. *J. Biol. Chem.*, 282: 18108–18115.
562. TIRABOSCHI, TARDITO, KASAHARA, ET AL. (2004). Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. *Neuropsychopharmacology*, 29: 1831–1840.
563. SATPATHY, SHAO, EMERSON, ET AL. (2009). Tissue Transglutaminase Regulates Matrix Metalloproteinase-2 in Ovarian Cancer by Modulating cAMP-response Element-binding Protein Activity. *J. Biol. Chem.*, 284: 15390–15399.
564. KANG, LEE, CHUNG, & KIM (2004). Overexpression of transglutaminase 2 accelerates the erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia K562 cell line through PI3K/Akt signaling pathway. *FEBS Lett.*, 577: 361–366.
565. ZUBENKO, JONES, ESTEVEZ, ET AL. (2009). Identification of a CREB-dependent serotonergic pathway and neuronal circuit regulating foraging behavior in *Caenorhabditis elegans*: a useful model for mental disorders and their treatments? *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 150B: 12–23.
566. LIU & GRAYBIEL (1996). Spatiotemporal dynamics of CREB phosphorylation: transient versus sustained phosphorylation in the developing striatum. *Neuron*, 17: 1133–1144.
567. DUDMAN, EATON, RAJADHYAKSHA, ET AL. (2003). Dopamine D1 receptors mediate CREB phosphorylation via phosphorylation of the NMDA receptor at Ser897-NR1. *J. Neurochem.*, 87: 922–934.
568. SATO-BIGBEE, PAL, & CHU (1999). Different neuroligands and signal transduction pathways stimulate CREB phosphorylation at specific developmental stages along oligodendrocyte differentiation. *J. Neurochem.*, 72: 139–147.
569. SULLIVAN & CHANG (1999). Review: emotional and behavioral functioning in phenylketonuria. *J. Pediatr. Psychol.*, 24: 281–299.
570. CHEN & WOO (2005). Complete and persistent phenotypic correction of phenylketonuria in mice by site-specific genome integration of murine phenylalanine hydroxylase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102: 15581–15586.

571. MONSMA, MCVITTIE, GERFEN, ET AL. (1989). Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*, 342: 926–929.
572. ANTONYAK, LI, REGAN, ET AL. (2009). Tissue transglutaminase is an essential participant in the epidermal growth factor-stimulated signaling pathway leading to cancer cell migration and invasion. *J. Biol. Chem.*, 284: 17914–17925.
573. WANG, LIU, CHUNG, ET AL. (1998). Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology*, 28: 744–750.
574. VITALIS & PARNAVELAS (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Dev. Neurosci.*, 25: 245–256.
575. SIEGEL & KHOSLA (2007). Transglutaminase 2 Inhibitors and their Therapeutic Role in Disease States. *Pharmacol. Ther.*, 115: 232–245.
576. TURNER, LOFTIS, & BLACKWELL (2006). Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol. Ther.*, 109: 325–338.
577. BYERLEY, JUDD, REIMHERR, & GROSSER (1987). 5-Hydroxytryptophan: a review of its antidepressant efficacy and adverse effects. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 7: 127–137.
578. GIJSMAN, VAN GERVEN, DE KAM, ET AL. (2002). Placebo-controlled comparison of three dose-regimens of 5-hydroxytryptophan challenge test in healthy volunteers. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 22: 183–189.
579. STERNBACH (1991). The serotonin syndrome. *Am. J. Psychiatry*, 148: 705–713.
580. TSUZUKI, OBARU, SETOYAMA, & SHIMADA (1987). Structural organization of the mouse mitochondrial aspartate aminotransferase gene. *J. Mol. Biol.*, 198: 21–31.
581. BERGERON, BAGU, & TREMBLAY (2011). Transcription of platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  in Leydig cells involves specificity protein 1 and 3. *J. Mol. Endocrinol.*, 46: 125–138.
582. FENG, ZHANG, & XING (2012). Low-power laser irradiation (LPLI) promotes VEGF expression and vascular endothelial cell proliferation through the activation of ERK/Sp1 pathway. *Cell. Signal.*, 24: 1116–1125.
583. VAN DER GUN, DE GROOTE, KAZEMIER, ET AL. (2011). Transcription factors and molecular epigenetic marks underlying EpCAM overexpression in ovarian cancer. *Br. J. Cancer*, 105: 312–319.
584. SPEER, SZENTHE, KÓSA, ET AL. (2006). Myocardial infarction is associated with Sp1 binding site polymorphism of collagen type 1A1 gene. *Acta Cardiol.*, 61: 321–325.
585. CHEW, SAMIAN, NAJIMUDIN, & TENGGU-MUHAMMAD (2003). Molecular characterisation of six alternatively spliced variants and a novel promoter in human peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305: 235–243.
586. WASILUK, MCCULLOCH, BANTON, & DUNN (2006). Sp1 elements regulate transcriptional activity within the murine Toll-like receptor 4 promoter. *Surg Infect (Larchmt)*, 7: 489–499.
587. SUZUKI, YASUNAMI, MATSUDA, ET AL. (1996). Structural organization and chromosomal assignment of the mouse embryonic TEA domain-containing factor (ETF) gene. *Genomics*, 36: 263–270.
588. LEE, PARK, SHIN, ET AL. (2011). Accessible chromatin structure permits factors Sp1 and Sp3 to regulate human TGFBI gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 409: 222–228.
589. MOON, JUNG, CHOI, ET AL. (2003). Platelet-derived growth factor induces p21/WAF1 promoter in vascular smooth muscle cells via activation of an Sp1 site. *FEBS Lett.*, 552: 130–134.
590. BASHA, INGERSOLL, SANKPAL, ET AL. (2011). Tolfenamic acid inhibits ovarian cancer cell growth and decreases the expression of c-Met and survivin through suppressing specificity protein transcription factors. *Gynecol. Oncol.*, 122: 163–170.
591. CHEN, WANG, & HUNG (2009). Transcriptional activation of Skp2 by BCR-ABL in K562 chronic myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.*, 33: 1520–1524.
592. LA, FERNANDO, WANG, ET AL. (2009). Zinc protoporphyrin regulates cyclin D1 expression independent of heme oxygenase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 284: 36302–36311.
593. TATSUKAWA, SANO, FUKAYA, ET AL. (2011). Dual induction of caspase 3- and transglutaminase-dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cancer*, 10: 4.

594. LEE, SUH, EDENBERG, & HUR (2002). POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1. *J. Biol. Chem.*, 277: 26761–26768.
595. WONG, OU, CHEN, & SHIH (2002). Activation of human monoamine oxidase B gene expression by a protein kinase C MAPK signal transduction pathway involves c-Jun and Egr-1. *J. Biol. Chem.*, 277: 22222–22230.
596. MEDVEDEV, SAUNDERS, MATSUURA, ET AL. (1999). Regulation of the transglutaminase I gene. Identification of DNA elements involved in its transcriptional control in tracheobronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 274: 3887–3896.
597. LIU, TEE, PORRO, ET AL. (2007). Activation of tissue transglutaminase transcription by histone deacetylase inhibition as a therapeutic approach for Myc oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104: 18682–18687.
598. GRÜNDEMANN & SCHÖMIG (2000). Gene structures of the human non-neuronal monoamine transporters EMT and OCT2. *Hum. Genet.*, 106: 627–635.
599. HEILS, WICHEMS, MÖSSNER, ET AL. (1998). Functional characterization of the murine serotonin transporter gene promoter in serotonergic raphe neurons. *J. Neurochem.*, 70: 932–939.
600. FOTI, STROUP, & CHIANG (1998). Basic transcription element binding protein (BTEB) transactivates the cholesterol 7 alpha-hydroxylase gene (CYP7A). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253: 109–113.
601. KIM, SEO, SUNG, ET AL. (2004). Characterization of Ets-binding sequence of human transglutaminase 3 gene promoter. *Exp. Dermatol.*, 13: 529–534.
602. DUBBINK, CLEUTJENS, VAN DER KORPUT, ET AL. (1999). An Sp1 binding site is essential for basal activity of the human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4) promoter. *Gene*, 240: 261–267.

## VI Anhang

### A Oligonukleotide

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
Kcnc1-fw	TGG CTC CTG GGT TAG AAG AG
Kcnc1-rev	GCG CTG GGT CCT AAA AAG C
Hps5-fw	CCC TTG TTT CAG GTC GTT TG
Hps5-rev	CCC AGC TCT TGA GGA CAA AG
Tph1_NheI_fw	TAG TGA GGG TGG GGT GGA TA
Tph1_NheI_rev	CAC TGG GGG CTC ATA GAG AC T
Tph1_SacI_fw	ACA CAT CCC AGG AAA TGG AA
Tph1_SacI_rev	ACC CAC AAT CAG GGA GGA TT
Tph1_SphI_fw	CAC CCT TTC ATT GGA ACC TG
Tph1_SphI_rev	TAT GCA TGT GGG TGT TTT GC
Tph1_KpnI_fw	ATC AAT GAC GGT GCT GAG G
Tph1_KpnI_rev	GGG GCA GTT TCC TCA ATG
Tph1up1_fw	GGA ATG GCC AAC GAA ATA GA
Tph1up1_rev	AAG TGC CCC AGA TGA CAG AC
Tph1up2_fw	TGG TAT CCC CCA AAC AAA AA
Tph1up2_rev	CTG GGA CCC ATA TTG AGG AA
Brn2pos-fw	GAG AGG AAT TTG CAT TTC CAC CGA CCT TCC
Brn2-pos-rev	CGA AGG TCG GTG GAA ATG CAA ATT
RPL13A-fw	GGG GGG CCG AAG ATG GCG GAG GTG
RPL13A-rev	GGG GGG CAC CTC CGC CAT CTT CGG
TGM1_fw	GTA TGA GTA CGA CGA GCT GAT AGT G
TGM1_rev	AAT TCT CCC AGA CTC ATT AAG AAC A
TGM2_fw	TGT AGA CAG TCT CAC CTT CAG TGT C
TGM2_rev	ATG TCT AGG ATC CCA TCT TCA AAC T
TGM3_fw	GCT GAG AGA GAA GAG TAT GTT CAG G

---

TGM3_rev	TCG TAG TAC ACA TCC ACA CTG AGA T
TGM4_fw	AAC TGT GTG ACC TCA ATA AGA CCT C
TGM4_rev	GAT AAA TTT CTT GGG TCC AGT TTT T
TGM5_fw	GGT GTT TCT GAA GGC TCT GC
TGM5_rev	CGG ATC AGC TTG TCT GTT GA
TGM6_fw	GTG GAC ATC ACT GAC CTC TAC AAG
TGM6_rev	TTG TCC TCT GTC AGG TCT TCT TTA T
TGM7_fw	ATC ATA GAC ATC TGC TTT GAG ATC C
TGM7_rev	CCA TAT TTT GTC TCG TTT CTG AGT T
FXIII_fw	AAG TCC CCG AGG CGC ACA GA
FXIII_rev	TCT TGC AGG TTG ACG CCC CG
DAT_fw	CTG GTG TCT GGA AGA TCT GC
DAT_rev	GAG AAG CAC ACC TGG GTG GC
NET_fw	GCC ACG GTA TGG ATT GAT GC
NET_rev	TGA AGA GTT TCC GGT GTC GC
PMAT_fw	GGG CTC TGG CCA GCA CTG TG
PMAT_rev	ACG TGC CCA GCT GGC ATC AC
SERT_fw	CTC CTC CTT CAC GGA CCA GC
SERT_rev	TGT CAC CCA CAC CAC CTT GC
OCT2_fw	GCC CAC CAC CGT GGA CGA TG
OCT2_rev	CGA TGG ACG AGC CAG GCG TC
OCT3_fw	CTC CCC AAA TGA GGA AAT GC
OCT3_rev	GCC ATG GTT ATC CCT AGT CT
GAPDH_fw	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
GAPDH_rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
VMAT1_fw	GGA TCT TCA TTT TCA TCT GTT GC
VMAT1_rev	CAC CGA CCC ATC TTG TTG GC
VMAT2_fw	TGT GGC TGG GAT GGG CAT GC
VMAT2_rev	GTT TGC AAA GCA GAT GGA GC
SLC22A1_fw	GCA GAC CTG TTC CGC ACG CC
SLC22A1_rev	ACA CCG CAA ACA AAA TGA GGG GC

---

SLC22A4_fw	CCA GCT ACA AGA CAC TGT CCT GAG AAC G
SLC22A4_rev	CAG GTA GAC GTC CTG GCT GAA CTC C
SLC22A5_fw	TCG TGC GCC CTA TGT AAG GCC AG
SLC22A5_rev	GAA GGC GGT CAC CTC GTC GT
SLC22A16_fw	GAC CAC GTG GGG CAC TTC GG
SLC22A16_rev	CAC AAG ACC ACC CGG CGT CC
PQBP1-fw	GCA TCC TCA AAC ATC TGG AGC C
PQBP1-rev	GAG TAT GAG CTA GGG TCC ATG G
PQBP2-fw	CCT CCA CAG TTT CCT CAG GAA AAA CC
PQBP2-rev	GTT CTG AGA GTT CTG GAA ATG CAT CAG G
PQBP3-fw	GGA GGA GCT GAC TTT CGC CAG C
PQBP3-rev	CCA TCC ACC GTC TTT TAA ACC TCT TGG
PQBP5-fw	GGC TTT CTG ATA GGA AGA AGA GAG C
PQBP5-rev	TGT GGC AAA CAA GCC ATG CAC TG
TERA2-fw	CCA ATC GGT TAA TTG TTG ATG AAG CCA T
TERA2-rev	CAG GAA GTA CGG CTT AAG GTA TAC C
qActB-fw	CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA
qActB-rev	AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA
qRPL13-fw	CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA
qRPL13-rev	TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A
qmGapdh-fw	AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG
qmGapdh-rev	CAG TCT TCT GGG TGG CAG

---



## B Expression ausgewählter Gene in der Leber von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

**Tabelle 11: Die Expression ausgewählter Gene in der Leber von *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Dargestellt sind die Identifikationsnummer (ID) der Ensemble-Datenbank und der Protein- und Gennamen des jeweils exprimierten Gens. Weiterhin ersichtlich ist der *FoldChange*, der im Falle eines negativen Wertes angibt, dass die Expression des jeweiligen Gens in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren erhöht ist. Umgekehrt ist im Falle eines positiven Wertes die Expression des jeweiligen Gens in den *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren gegenüber den *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren erniedrigt. Ein Signifikanzwert (p-Wert) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant und von  $0,09 > p \geq 0,05$  als statistischer Trend befunden. Die drei Pools des jeweiligen Genotyps sind mit A-C bezeichnet, wobei + für *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere und - für *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere steht. Die Werte, die den Pools der Genotypen zugeordnet sind, zeigen den Logarithmus zur Basis 2 (log2) der relativen Genexpressionen an. Die fett markierten Gene kodieren für TF. Die grau hinterlegten Zeilen weisen auf Gene, die unter der transkriptionellen Kontrolle von SP1 stehen. Die dazugehörigen Quellen finden sich in der Spalte Literatur. Die Gene wurden nach ihrer Funktion in Klassen eingeteilt und aufsteigend nach dem p-Wert sortiert.

Ensemble ID	Proteinname	Gennamen	<i>FoldChange</i>	pWert	+ A	+ B	+ C	- A	- B	- C	Literatur
<b>I Gene, die leberrelevante Blutwerte widerspiegeln</b>											
ENSMUSG00000021794	glutamate dehydrogenase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95753]	<i>Glud1</i>	-0,321	0,049	10,029	10,192	10,347	10,464	10,538	10,530	
ENSMUSG00000029368	albumin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87991]	<i>Alb</i>	0,286	0,074	18,752	18,733	18,981	18,436	18,602	18,570	
ENSMUSG00000028766	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87983]	<i>Alpl</i>	-0,507	0,136	6,923	6,819	6,543	7,136	7,216	7,453	
ENSMUSG00000031672	glutamate oxaloacetate transaminase 2, mitochondrial [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95792]	<i>Got2</i>	-0,237	0,330	9,474	9,001	9,083	9,341	9,408	9,522	
ENSMUSG00000031700	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915391]	<i>Gpt2</i>	-0,160	0,652	11,550	11,191	11,058	11,132	11,471	11,676	[40]
ENSMUSG00000025190	glutamate oxaloacetate transaminase 1, soluble [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95791]	<i>Got1</i>	-0,039	0,688	11,207	11,376	11,769	11,085	11,457	11,926	[580]

ENSMUSG000 00022546	glutamic pyruvic transaminase, soluble [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95802]	<i>Gpt</i>	-0,056	0,750	11,547	11,401	11,174	11,302	11,564	11,423	[40]
<b>II Gene, die mit einem Leberschaden bzw. -karzinom assoziiert sind</b>											
ENSMUSG000 00029231	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97530]	<i>Pdgfra</i>	-0,598	0,000	5,293	5,130	5,510	5,877	5,739	6,112	[581]
ENSMUSG000 00028019	platelet-derived growth factor, C polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859631]	<i>Pdgfc</i>	-0,573	0,003	4,726	4,531	4,973	5,306	5,044	5,599	
ENSMUSG000 00024962	vascular endothelial growth factor B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106199]	<i>Vegfb</i>	-0,431	0,011	6,999	7,009	6,976	7,340	7,496	7,440	[582]
ENSMUSG000 00019997	connective tissue growth factor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95537]	<i>Ctgf</i>	-0,874	0,024	6,622	6,472	6,821	7,508	7,102	7,927	[351]
ENSMUSG000 00045394	epithelial cell adhesion molecule [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106653]	<i>Epcam</i>	-0,780	0,027	3,546	4,201	4,193	4,406	4,727	5,148	[583]
ENSMUSG000 00026029	caspase 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1261423]	<i>Casp8</i>	-0,472	0,066	7,493	7,393	7,400	7,758	8,098	7,846	
ENSMUSG000 00031628	caspase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107739]	<i>Casp3</i>	-0,354	0,067	6,590	6,489	6,560	7,125	6,809	6,767	
ENSMUSG000 00031480	thrombospondin, type I, domain 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929096]	<i>Thsd1</i>	-0,525	0,071	5,215	4,966	5,258	5,589	5,786	5,640	
ENSMUSG000 00000791	interleukin 12 receptor, beta 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104579]	<i>Il12rb1</i>	-0,459	0,083	5,247	5,615	5,671	5,429	6,262	6,218	
ENSMUSG000 00024563	MAD homolog 2 ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108051]	<i>Smad2</i>	-0,315	0,128	7,182	7,320	7,090	7,294	7,610	7,634	[338]
ENSMUSG000 00022346	myelocytomatosis oncogene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97250]	<b><i>Myc</i></b>	-0,618	0,130	5,592	5,812	5,864	5,835	6,898	6,391	[338]
ENSMUSG000 00023944	heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96247]	<i>Hsp90ab1</i>	0,569	0,131	13,057	13,177	13,985	12,907	12,562	13,044	

ENSMUSG000 00021270	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class A member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96250]	<i>Hsp90aa1</i>	0,575	0,206	5,959	6,329	6,507	5,484	6,235	5,349	[40]
ENSMUSG000 00030168	adiponectin receptor 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:93830]	<b>Adipor2</b>	-0,412	0,218	11,311	11,029	11,481	11,555	11,899	11,602	[40]
ENSMUSG000 00001506	collagen, type I, alpha 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88467]	<i>Col1a1</i>	-0,901	0,260	5,223	4,665	4,358	5,741	4,809	6,400	[584]
ENSMUSG000 00020048	heat shock protein 90, beta (Grp94), member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98817]	<i>Hsp90b1</i>	0,237	0,361	12,130	12,368	12,754	11,767	12,525	12,249	[40]
ENSMUSG000 00022383	peroxisome proliferator activated receptor alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104740]	<b>Ppara</b>	0,023	0,700	9,786	9,611	9,462	9,745	9,508	9,536	[585]
ENSMUSG000 00039005	toll-like receptor 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96824]	<i>Tlr4</i>	-0,269	0,715	4,813	4,948	4,443	5,206	4,051	5,755	[586]
ENSMUSG000 00054422	fatty acid binding protein 1, liver [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95479]	<i>Fabp1</i>	-0,030	0,721	14,726	14,941	14,723	14,754	15,100	14,627	
ENSMUSG000 00024778	Fas (TNF receptor superfamily member 6) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95484]	<i>Fas</i>	0,054	0,747	7,161	7,079	6,904	6,815	7,138	7,028	
ENSMUSG000 00026457	adiponectin receptor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919924]	<b>Adipor1</b>	-0,018	0,856	10,051	10,015	9,984	9,928	10,011	10,165	
ENSMUSG000 00025499	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96224]	<i>Hras1</i>	0,008	0,952	9,060	9,076	9,129	8,833	9,264	9,144	
<b>III Gene, die mit der Leberproliferation bzw. -regeneration assoziiert sind</b>											
ENSMUSG000 00021548	cyclin H [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913921]	<i>Ccnh</i>	-0,325	0,006	7,134	7,016	6,873	7,451	7,302	7,246	
ENSMUSG000 00032440	transforming growth factor, beta receptor II [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98729]	<i>Tgfb2</i>	-1,100	0,007	7,128	7,142	6,940	8,226	8,085	8,198	[519]
ENSMUSG000 00030796	TEA domain family member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104904]	<b>Tead2</b>	-0,529	0,007	3,943	3,581	3,603	4,406	4,197	4,111	[587]

ENSMUSG00000030782	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102784]	<i>Tgfb1i1</i>	0,374	0,009	4,895	4,655	4,699	4,585	4,225	4,317	
ENSMUSG00000035493	transforming growth factor, beta induced [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99959]	<i>Tgfb1</i>	-0,753	0,009	7,987	7,837	8,216	8,598	8,694	9,005	[588]
ENSMUSG00000020053	insulin-like growth factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96432]	<i>Igf1</i>	0,197	0,010	12,211	12,383	12,185	11,978	12,218	11,994	[40]
ENSMUSG00000023067	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104556]	<i>Cdkn1a</i>	-1,693	0,038	5,323	5,399	6,549	7,384	7,405	7,561	[589]
ENSMUSG00000007659	BCL2-like 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88139]	<i>Bcl2l1</i>	-0,431	0,043	8,062	7,949	7,932	8,446	8,250	8,541	
ENSMUSG00000002068	cyclin E1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88316]	<i>Ccne1</i>	-0,351	0,061	5,529	5,783	5,704	5,821	6,016	6,233	[338]
ENSMUSG00000021936	mitogen-activated protein kinase 8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346861]	<i>Mapk8</i>	-0,251	0,070	7,376	7,111	7,222	7,487	7,426	7,549	
ENSMUSG00000001034	mitogen-activated protein kinase 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346347]	<i>Mapk7</i>	-0,745	0,071	5,082	5,056	4,980	5,868	5,419	6,066	
ENSMUSG00000057329	B-cell leukemia/lymphoma 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88138]	<i>Bcl2</i>	-0,725	0,073	4,027	4,135	3,450	4,924	4,448	4,415	[590]
ENSMUSG00000028864	hepatocyte growth factor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96079]	<i>Hgf</i>	-0,452	0,079	5,477	5,615	5,902	5,863	6,327	6,159	
ENSMUSG00000042688	mitogen-activated protein kinase 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1354946]	<i>Mapk6</i>	-0,431	0,081	7,479	7,360	7,255	7,765	7,676	7,947	
ENSMUSG00000063065	mitogen-activated protein kinase 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346859]	<i>Mapk3</i>	-0,270	0,083	7,678	7,367	7,573	7,802	7,778	7,849	[40]
ENSMUSG00000024558	mitogen-activated protein kinase 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444559]	<i>Mapk4</i>	-0,742	0,084	4,516	3,878	4,861	5,109	5,069	5,301	

ENSMUSG000 00022610	mitogen-activated protein kinase 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353438]	<i>Mapk12</i>	-0,207	0,084	5,676	5,733	5,396	5,931	5,813	5,683	
ENSMUSG000 00007613	transforming growth factor, beta receptor I [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98728]	<i>Tgfb1</i>	-0,377	0,084	7,362	7,217	7,387	7,509	7,671	7,916	[519]
ENSMUSG000 00020326	cyclin G1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102890]	<i>Ccng1</i>	-0,512	0,086	8,062	8,024	8,499	8,765	8,663	8,693	[40]
ENSMUSG000 00035476	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913974]	<i>Tab3</i>	-0,379	0,086	5,911	5,593	5,874	6,118	6,201	6,196	
ENSMUSG000 00024286	cyclin Y [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915224]	<i>Ccny</i>	-0,210	0,090	8,397	8,296	8,499	8,538	8,642	8,643	
ENSMUSG000 00002603	transforming growth factor, beta 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98725]	<i>Tgfb1</i>	-0,630	0,098	6,297	6,238	6,325	7,101	6,443	7,205	
ENSMUSG000 00063704	mitogen-activated protein kinase 15 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2652894]	<i>Mapk15</i>	-0,736	0,115	6,889	6,639	6,043	7,284	7,174	7,322	
ENSMUSG000 00053436	mitogen-activated protein kinase 14 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346865]	<i>Mapk14</i>	-0,128	0,129	9,670	9,556	9,583	9,704	9,765	9,725	
ENSMUSG000 00001280	trans-acting transcription factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98372]	<b><i>Sp1</i></b>	-0,289	0,134	7,449	7,199	7,142	7,562	7,441	7,656	
ENSMUSG000 00052684	Jun oncogene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96646]	<b><i>Jun</i></b>	-0,589	0,170	6,955	7,136	6,849	7,207	7,507	7,992	[517]
ENSMUSG000 00054115	S-phase kinase-associated protein 2 (p45) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1351663]	<i>Skp2</i>	-0,344	0,184	4,991	4,966	4,880	5,572	4,975	5,322	[591]
ENSMUSG000 00020366	mitogen-activated protein kinase 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346862]	<i>Mapk9</i>	-0,283	0,193	8,730	8,376	8,443	8,720	8,816	8,863	
ENSMUSG000 00015755	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915902]	<i>Tab2</i>	-0,316	0,198	8,452	8,260	8,256	8,532	8,490	8,893	

ENSMUSG000 00053137	mitogen-activated protein kinase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1338024]	<i>Mapk11</i>	-0,317	0,203	4,429	4,201	4,033	4,406	4,688	4,521	
ENSMUSG000 00022414	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1913763]	<i>Tab1</i>	-0,395	0,218	5,099	4,589	4,917	5,068	5,307	5,415	
ENSMUSG000 00027490	E2F transcription factor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:101941]	<b><i>E2f1</i></b>	-0,473	0,230	5,099	4,894	4,917	5,429	4,975	5,927	[338]
ENSMUSG000 00070348	cyclin D1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88313]	<i>Ccnd1</i>	-0,573	0,296	8,233	7,439	7,141	8,054	8,113	8,367	[592]
ENSMUSG000 00021250	FBJ osteosarcoma oncogene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95574]	<b><i>Fos</i></b>	-0,182	0,379	3,943	4,287	4,720	4,443	4,252	4,801	[517]
ENSMUSG000 00029999	transforming growth factor alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98724]	<i>Tgfa</i>	-0,262	0,384	7,018	6,935	6,500	7,023	6,981	7,234	
ENSMUSG000 00027342	proliferating cell nuclear antigen [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97503]	<i>Pcna</i>	-0,110	0,611	5,710	5,803	5,534	5,702	5,670	6,005	[40]
ENSMUSG000 00027109	trans-acting transcription factor 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1277166]	<b><i>Sp3</i></b>	-0,047	0,623	8,075	7,890	7,790	8,041	7,855	7,999	
ENSMUSG000 00063358	mitogen-activated protein kinase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346858]	<i>Mapk1</i>	-0,032	0,652	9,630	9,524	9,552	9,554	9,655	9,592	[40]
ENSMUSG000 00009376	met proto-oncogene [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96969]	<i>Met</i>	0,089	0,674	8,810	8,731	8,399	8,659	8,361	8,652	[505]
ENSMUSG000 00020122	epidermal growth factor receptor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95294]	<i>Egfr</i>	0,065	0,731	12,291	11,952	12,268	11,987	12,201	12,127	[593]
ENSMUSG000 00003031	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104565]	<i>Cdkn1b</i>	-0,014	0,852	8,146	8,224	8,145	8,207	8,107	8,242	[338]
ENSMUSG000 00025499	Harvey rat sarcoma virus oncogene 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96224]	<i>Hras1</i>	0,008	0,952	9,060	9,076	9,129	8,833	9,264	9,144	

## IV Gene, die mit dem Alkoholmetabolismus assoziiert sind

ENSMUSG000 00020248	nuclear transcription factor-Y beta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97317]	<b>Nfyb</b>	-0,356	0,000	7,329	7,490	7,230	7,693	7,852	7,572	
ENSMUSG000 00010025	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353452]	<b>Aldh3a2</b>	-0,720	0,011	11,396	10,960	11,079	12,038	11,829	11,727	
ENSMUSG000 00029455	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99600]	<b>Aldh2</b>	-0,558	0,011	13,888	14,033	13,944	14,398	14,522	14,619	[511]
ENSMUSG000 00090306	alcohol dehydrogenase 6 (class V), pseudogene 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1918999]	<b>Adh6-ps1</b>	-1,299	0,044	6,981	6,583	6,994	8,087	8,437	7,929	
ENSMUSG000 00024885	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1914939]	<b>Aldh3b1</b>	-1,243	0,061	4,018	4,011	3,891	5,092	4,802	5,755	
ENSMUSG000 00021238	aldehyde dehydrogenase family 6, subfamily A1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915077]	<b>Aldh6a1</b>	-0,263	0,075	11,129	11,074	10,972	11,247	11,368	11,348	
ENSMUSG000 00024431	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95824]	<b>Nr3c1</b>	-0,343	0,075	9,041	8,935	8,806	9,206	9,290	9,316	
ENSMUSG000 00025007	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1888908]	<b>Aldh18a1</b>	-0,670	0,119	4,373	4,342	4,033	4,915	4,648	5,194	
ENSMUSG000 00024747	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347050]	<b>Aldh1a7</b>	-0,343	0,137	10,383	10,309	10,057	10,478	10,656	10,645	
ENSMUSG000 00030551	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1352452]	<b>Nr2f2</b>	-0,257	0,362	7,732	7,728	7,130	7,838	7,704	7,820	
ENSMUSG000 00017950	hepatic nuclear factor 4, alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:109128]	<b>Hnf4a</b>	-0,110	0,357	11,830	11,929	12,029	11,847	12,223	12,047	
ENSMUSG000 00028138	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87929]	<b>Adh5</b>	0,025	0,393	11,738	12,040	11,902	11,687	12,061	11,857	[594]

ENSMUSG000 00037797	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1349472]	<i>Adh4</i>	0,202	0,423	9,984	9,493	9,543	9,840	10,049	9,736	
ENSMUSG000 00032897	nuclear transcription factor-Y gamma [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107901]	<i>Nfyc</i>	0,181	0,463	6,204	5,547	5,383	5,622	5,555	5,415	
ENSMUSG000 00023994	nuclear transcription factor-Y alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97316]	<i>Nfya</i>	-0,162	0,525	7,347	6,885	7,169	7,113	7,375	7,399	
ENSMUSG000 00074207	alcohol dehydrogenase 1 (class I) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87921]	<i>Adh1</i>	-0,146	0,538	13,749	13,464	13,506	13,537	13,937	13,684	[14]
ENSMUSG000 00055301	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87926]	<i>Adh7</i>	-0,068	0,555	8,215	7,827	7,870	8,090	8,003	8,022	
ENSMUSG000 00025479	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:88607]	<i>Cyp2e1</i>	0,127	0,590	16,282	15,839	16,294	15,951	16,113	15,969	[512]
ENSMUSG000 00025911	alcohol dehydrogenase, iron containing, 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923437]	<i>Adhfe1</i>	0,204	0,616	10,816	10,394	10,349	9,929	10,631	10,389	
ENSMUSG000 00049090	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444835]	<i>Zadh2</i>	0,107	0,738	10,438	9,893	9,882	9,782	9,975	10,136	
ENSMUSG000 00002250	peroxisome proliferator activator receptor delta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:101884]	<i>Ppard</i>	-0,044	0,842	6,334	6,288	5,983	6,152	6,173	6,411	
ENSMUSG000 00035561	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919785]	<i>Aldh1b1</i>	0,034	0,849	9,725	9,742	9,491	9,421	9,682	9,7504	
<b>V Gene, die mit dem 5-HT-Metabolismus assoziiert sind</b>											
ENSMUSG000 00025037	monoamine oxidase A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96915]	<i>Maoa</i>	-0,334	0,392	6,312	5,793	6,290	6,539	6,706	6,151	[515]

ENSMUSG000 00020182	dopa decarboxylase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:94876]	<i>Ddc</i>	0,031	0,897	7,857	7,784	7,302	7,403	7,926	7,521	
ENSMUSG000 00040147	monoamine oxidase B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96916]	<i>Maob</i>	-0,012	0,954	10,585	10,223	10,583	10,404	10,594	10,427	[595]
<b>VI Transglutaminasen und assoziierte TF</b>											
ENSMUSG000 00022218	transglutaminase 1, K polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98730]	<i>Tgm1</i>	-0,465	0,011	6,913	7,239	7,053	7,335	7,803	7,462	[596]
ENSMUSG000 00037820	transglutaminase 2, C polypeptide [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98731]	<i>Tgm2</i>	-0,411	0,057	8,770	8,471	8,923	9,076	9,088	9,234	[597]
ENSMUSG000 00001288	retinoic acid receptor, gamma [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97858]	<b><i>Rarg</i></b>	0,160	0,327	6,024	6,053	5,745	5,654	5,884	5,805	
ENSMUSG000 00017491	retinoic acid receptor, beta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97857]	<b><i>Rarb</i></b>	0,284	0,459	6,290	6,045	5,939	5,391	5,984	6,047	
ENSMUSG000 00037992	retinoic acid receptor, alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97856]	<b><i>Rara</i></b>	-0,048	0,931	7,506	7,484	6,595	7,231	6,889	7,609	
ENSMUSG000 00028163	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97312]	<b><i>Nfkb1</i></b>	0,0002	0,999	8,300	7,933	7,914	8,099	7,857	8,193	
<b>VII Fettsäure- und Monoamintransporter</b>											
ENSMUSG000 00002944	CD36 antigen [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107899]	<i>Cd36</i>	-1,207	0,007	7,496	6,724	7,284	8,645	8,127	8,352	
ENSMUSG000 00030382	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347100]	<i>Slc27a5</i>	0,385	0,031	13,010	12,992	12,906	12,491	12,641	12,621	
ENSMUSG000 00023073	solute carrier family 10, member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1201406]	<i>Slc10a2</i>	1,250	0,032	8,799	8,197	8,619	7,089	7,205	7,569	

ENSMUSG000 00027932	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347358]	<i>Slc27a3</i>	0,844	0,061	4,954	4,395	4,656	3,676	3,817	3,979	
ENSMUSG000 00018900	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1329012]	<i>Slc22a5</i>	-0,537	0,078	6,378	6,288	6,531	7,204	6,796	6,807	
ENSMUSG000 00025094	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106677]	<i>Slc18a2</i>	-0,208	0,111	4,681	4,201	4,281	4,744	4,520	4,521	[522]
ENSMUSG000 00059316	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347347]	<i>Slc27a4</i>	-0,441	0,128	7,415	7,250	7,674	7,669	8,041	7,951	
ENSMUSG000 00027359	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1347099]	<i>Slc27a2</i>	0,148	0,159	13,148	13,169	12,941	12,877	13,037	12,901	
ENSMUSG000 00000154	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1336884]	<i>Slc22a18</i>	-0,236	0,176	9,256	9,097	9,202	9,317	9,550	9,397	[521]
ENSMUSG000 00032883	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1921455]	<i>Acs3</i>	0,116	0,196	7,861	7,702	7,771	7,637	7,594	7,756	
ENSMUSG000 00018796	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:102797]	<i>Acs1</i>	-0,440	0,204	11,937	11,867	11,917	12,131	12,782	12,129	
ENSMUSG000 00020334	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1353479]	<i>Slc22a4</i>	0,287	0,320	5,215	5,386	4,741	4,915	4,727	4,840	[520]
ENSMUSG000 00022199	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 17 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1926225]	<i>Slc22a17</i>	-0,295	0,430	4,456	4,495	4,193	4,516	4,428	5,085	

ENSMUSG000 00023829	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108111]	<i>Slc22a1</i>	0,062	0,512	11,784	11,655	11,694	11,577	11,611	11,758	
ENSMUSG000 00036330	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106684]	<i>Slc18a1</i>	0,138	0,536	5,580	5,386	4,944	5,351	4,983	5,163	
ENSMUSG000 00031278	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1354713]	<i>Acs14</i>	-0,138	0,577	8,779	8,877	8,581	8,510	9,135	9,008	
ENSMUSG000 00033147	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 15 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3607704]	<i>Slc22a15</i>	-0,129	0,610	4,973	5,017	4,988	4,683	5,268	5,415	
ENSMUSG000 00023828	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1333817]	<i>Slc22a3</i>	-0,292	0,625	6,918	5,951	5,649	6,208	6,578	6,608	[598]
ENSMUSG000 00038267	solute carrier family 22, member 23 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920352]	<i>Slc22a23</i>	-0,075	0,782	9,267	8,654	8,855	8,862	8,982	9,160	
ENSMUSG000 00024981	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919129]	<i>Acs15</i>	-0,037	0,811	10,322	9,962	10,133	10,093	10,181	10,254	
<b>VIII Polyglutamin-bindende Proteine</b>											
ENSMUSG000 00015846	retinoid X receptor alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98214]	<i>Rxra</i>	-0,271	0,026	11,092	10,889	11,074	11,307	11,251	11,313	
ENSMUSG000 00031600	vacuolar protein sorting 37A (yeast) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1261835]	<i>Vps37a</i>	-0,211	0,345	8,602	8,201	8,628	8,550	8,737	8,778	
ENSMUSG000 00063200	nucleolar protein 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917328]	<i>Nol7</i>	0,205	0,385	8,256	7,911	8,175	7,820	8,075	7,831	[524]
ENSMUSG000 00028452	valosin containing protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:99919]	<i>Vcp</i>	-0,166	0,405	6,205	6,354	6,283	6,485	6,205	6,652	

ENSMUSG000 00061458	nucleolar protein 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2684913]	<i>Nol10</i>	0,091	0,585	6,377	6,294	6,372	6,045	6,455	6,268	
ENSMUSG000 00031157	polyglutamine binding protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859638]	<i>Pqbp1</i>	-0,059	0,802	7,909	7,926	7,943	7,565	8,269	8,121	
<b>IX Niedrig exprimierte Gene von Interesse</b>											
ENSMUSG000 00050534	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96284]	<i>Htr5b</i>	0,567	0,020	2,231	1,866	2,156	1,423	1,798	1,330	
ENSMUSG000 00041380	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96281]	<i>Htr2c</i>	0,436	0,030	3,494	3,831	3,774	3,318	3,192	3,279	
ENSMUSG000 00079103	transglutaminase 7 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 2151164]	<i>Tgm7</i>	-0,679	0,059	1,402	2,138	1,724	2,950	2,485	1,868	
ENSMUSG000 00020838	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96285]	<i>Slc6a4</i>	0,556	0,061	3,204	3,277	3,532	3,234	2,291	2,819	[599]
ENSMUSG000 00070687	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1D [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96276]	<i>Htr1d</i>	1,010	0,068	4,680	4,342	3,298	3,6110	3,538	2,140	
ENSMUSG000 00028747	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 1196627]	<i>Htr6</i>	-0,481	0,105	1,402	1,531	2,026	2,596	1,798	2,010	
ENSMUSG000 00028240	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 106091]	<i>Cyp7a1</i>	0,581	0,270	11,408	11,196	10,313	9,288	11,089	10,796	[600]
ENSMUSG000 00027403	transglutaminase 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 3044321]	<i>Tgm6</i>	-0,300	0,277	2,464	2,653	2,026	3,051	2,736	2,259	
ENSMUSG000 00034997	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 109521]	<i>Htr2a</i>	0,519	0,307	2,231	2,468	2,275	3,051	1,272	1,094	[515]
ENSMUSG000 00039106	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96283]	<i>Htr5a</i>	-0,213	0,391	3,267	3,219	2,488	3,318	3,135	3,162	

## VI ANHANG

211

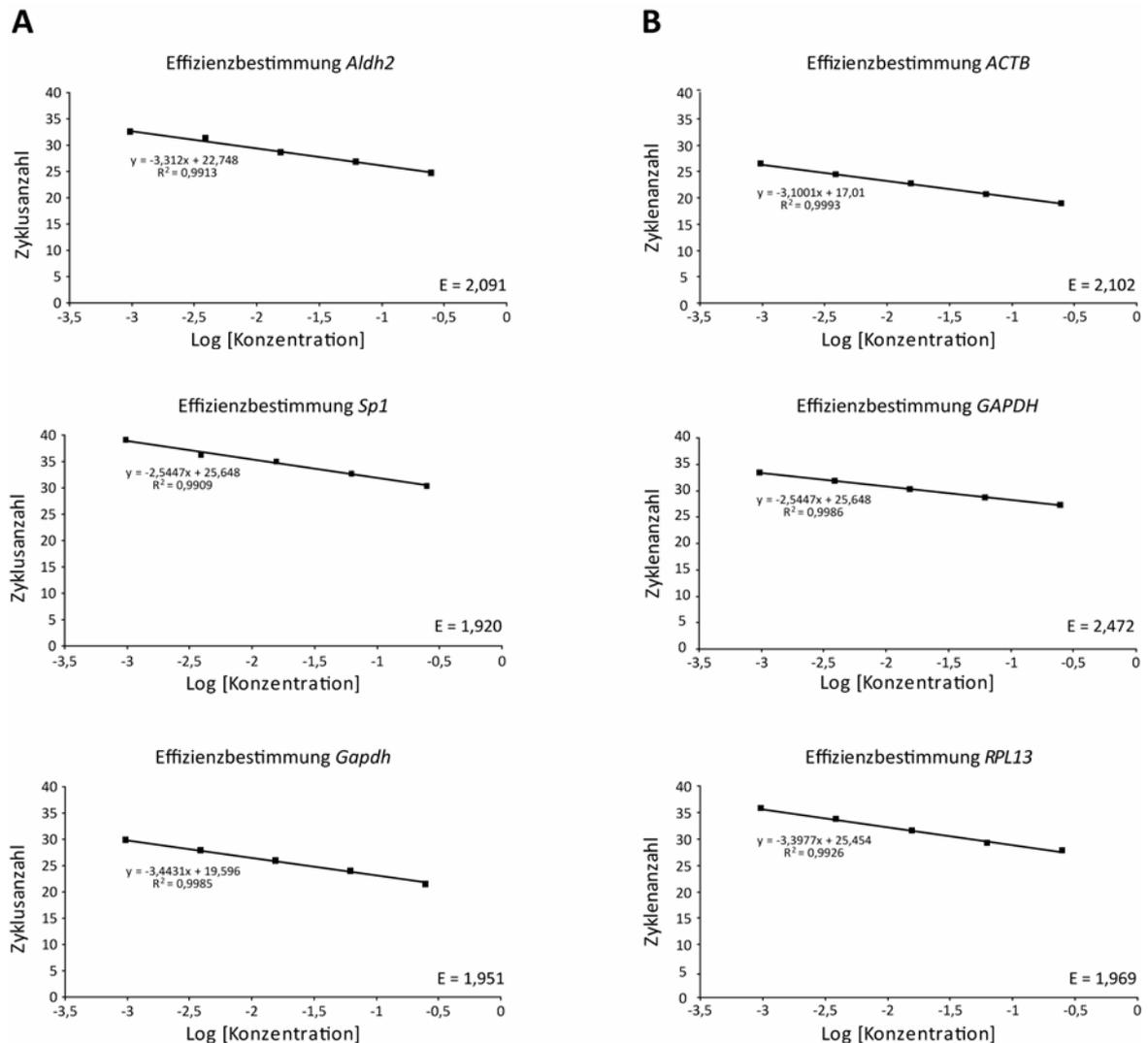
ENSMUSG000 00026322	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 109246]	<i>Htr4</i>	0,252	0,488	3,267	2,257	3,118	3,234	2,391	2,259	
ENSMUSG000 00053675	transglutaminase 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 1921426]	<i>Tgm5</i>	0,175	0,610	2,840	2,817	2,488	3,318	2,291	2,010	
ENSMUSG000 00026228	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 109323]	<i>Htr2b</i>	0,128	0,631	1,172	1,624	0,742	1,346	0,919	0,889	
ENSMUSG000 00027401	transglutaminase 3 (E polypeptide, protein- glutamine-gamma-glutamyltransferase) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 98732]	<i>Tgm3</i>	0,083	0,644	2,464	2,468	2,386	2,126	2,574	2,368	[601]
ENSMUSG000 00032269	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96282]	<i>Htr3a</i>	0,120	0,688	2,464	2,653	2,757	1,927	2,485	3,099	
ENSMUSG000 00008590	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 3B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 1861899]	<i>Htr3b</i>	0,132	0,705	1,954	2,138	1,343	2,300	1,643	1,094	
ENSMUSG000 00024798	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 7 (adenylate cyclase-coupled) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 99841]	<i>Htr7</i>	0,126	0,736	1,792	2,468	3,240	2,456	2,657	2,010	
ENSMUSG000 00050822	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 2385330]	<i>Slc29a4</i>	0,053	0,791	2,099	2,564	2,386	2,456	2,065	2,368	
ENSMUSG000 00025787	transglutaminase 4 (prostate) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 3027002]	<i>Tgm4</i>	0,039	0,838	3,879	3,433	3,862	3,677	3,562	3,817	[602]
ENSMUSG000 00050783	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1F [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 99842]	<i>Htr1f</i>	-0,065	0,866	1,954	2,257	1,106	1,697	2,485	1,330	
ENSMUSG000 00021721	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 1A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 96273]	<i>Htr1a</i>	0,017	0,958	3,385	3,792	2,757	3,737	2,811	3,334	[514]
ENSMUSG000 00021732	fibroblast growth factor 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 1099809]	<i>Fgf10</i>	-0,009	0,971	2,028	2,564	2,856	2,259	2,7967	2,420	

---

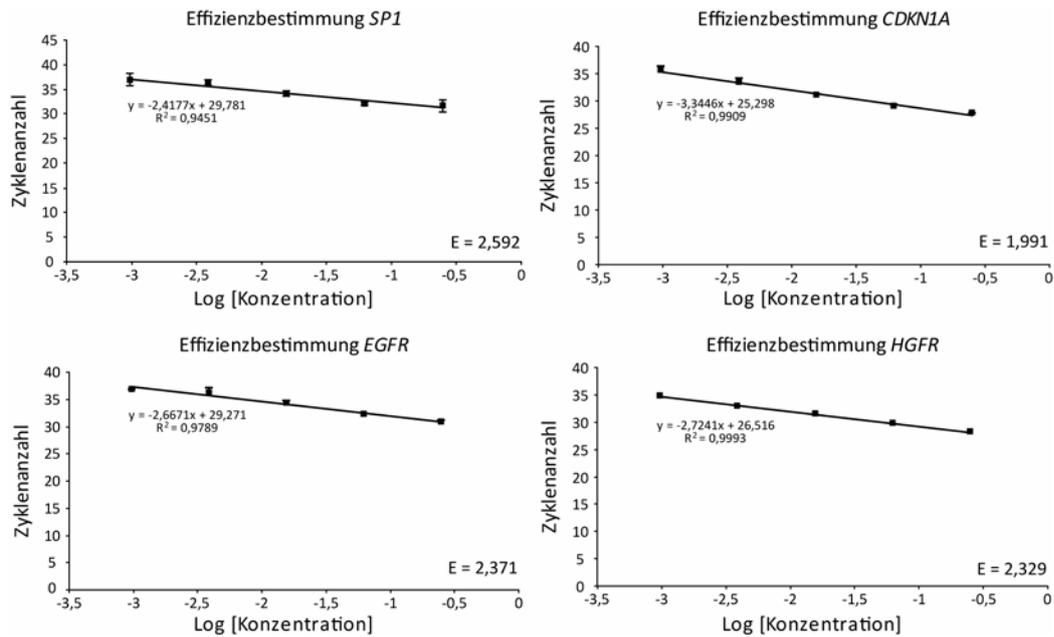
**X Zielgen für qPCR-Analyse**

ENSMUSG000 00057666	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI: 95640]	<i>Gapdh</i>	-0,451	0,147	5,839	6,708	6,577	6,648	7,123	6,710
------------------------	--	--------------	--------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

## C Effizienzbestimmung der Oligonukleotide für die quantitative Polymerasekettenreaktion



**Abbildung 56: Effizienzbestimmung der spezifischen Oligonukleotide für die Bestätigungsanalyse der Hochdurchsatzsequenzierung und für die Referenzgene der Analyse der HepG2-Zellen nach Ethanolbehandlung.** Die Effizienzen der verwendeten Oligonukleotidpaare wurden mit Hilfe der Steigung einer erstellten Standardgeraden berechnet. Für die Standardgerade wurden die ermittelten Ct-Werte über die logarithmischen Konzentrationen der eingesetzten cDNA aufgetragen. Die Steigung der Geraden diente zur Berechnung der Effizienz (E). Ein Wert von zwei stellt eine Effizienz von 100 % dar. Die Werte der jeweiligen Effizienz sind in der rechten, unteren Ecke des jeweiligen Diagramms dargestellt. Die Bestimmung der Effizienzen bei jeder cDNA-Konzentration wurde in Triplikaten mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. **(A)** Effizienzen der Oligonukleotide zur Verifizierung der Gene *Aldh2* und *Sp1* und des Referenzgens *Gapdh* in der Mausleber. Für die Effizienzbestimmung wurde die cDNA von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren verwendet. **(B)** Effizienzen der kommerziellen Oligonukleotidpaare für die Referenzgene  $\beta$ -AKTIN (*ACTB*), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) und das ribosomale Protein L13 (*RPL13*)



**Abbildung 57: Effizienzbestimmung der spezifischen Oligonukleotide für die Analyse der nach der Behandlung von HepG2-Zellen betrachteten Zielgene.** Die Effizienzen der kommerziellen Oligonukleotidpaare für die Zielgene SP1, CDKN1A, EGFR und HGFR wurden mit Hilfe der Steigung einer erstellten Standardgeraden berechnet. Für die Standardgerade wurden die ermittelten Ct-Werte über die logarithmische Konzentration der eingesetzten cDNA aufgetragen. Die Geradengleichung und der Determinationskoeffizient ( $R^2$ ) sind unter der Geraden dargestellt. Die Steigung der Geraden diente zur Berechnung der Effizienz (E). Die Werte der jeweiligen Effizienz sind in der rechten, unteren Ecke des jeweiligen Diagramms dargestellt. Jede cDNA-Konzentration wurde in Triplikaten in die Bestimmung eingesetzt.

## D Zusammenfassung

Studien an verschiedenen humanen ethnischen Gruppen bringen intronische Polymorphismen der peripheren Form der Tryptophan-Hydroxylase (TPH1) direkt mit einem gesteigerten Risiko für die Entwicklung eines Alkoholismus und außerdem mit einem frühen Eintrittsalter in die Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang. Zusätzlich gibt es humane und murine Genkopplungsstudien, die eine erhöhte Ethanolpräferenz mit den Chromosomenabschnitten in Verbindung bringen, auf denen jeweils *TPH1* (11p15) und *Tph1* (7qB4) liegen.

Um diese Beobachtung zu verifizieren und deren molekularen Hintergrund aufzuklären, wurden *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ohne und nach vorheriger Konditionierung Ethanollösungen unterschiedlicher Konzentrationen zur Wahl angeboten und die Flüssigkeitsaufnahme mit der von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Mäusen mit ebenfalls homogen gemischtem genetischen Hintergrund verglichen. *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere nahmen dabei von Ethanollösungen aller Konzentrationen signifikant mehr auf. Die freiwillige Ethanolaufnahme von *Tph1*<sup>+/-</sup>-Tieren mit homogen gemischtem genetischen Hintergrund nach Präkonditionierung lag ebenfalls signifikant über der von *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tieren und verdeutlicht die Relevanz des Gendefekts als Ursache des beobachteten Phänotyps. Die gesteigerte Ethanolaufnahme von *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren, die über elf Generationen auf dem Inzuchtstamm C57BL/6J zur Hybridlinie rückgekreuzt waren, konnte über die Wiederherstellung des peripheren Serotonin-Pools mittels Supplementierung mit 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) auf das Niveau der *Tph1*<sup>+/+</sup>-Tiere abgesenkt werden. Mittels Überprüfung genetischer Variationstypen über die Analyse veränderter Restriktionsendonukleaseschnittstellen oder Sequenzierung von Einzelnukleotidpolymorphismen konnte gezeigt werden, dass *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere der elften Rückkreuzung bis 6 kb *downstream* und 308 kb *upstream* von *Tph1* auf Chromosom 7 den C57BL/6J- und dazwischen den 129/SvEvBrd-Haplotyp aufweisen.

Eine Hochdurchsatz-Sequenzierung des Lebertranskriptoms beider Genotypen mit einem SOLiD4-System zeigte eine Erhöhung der *Aldh2*-Expression in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren, die aufgrund des verbesserten Ethanolabbaus den erhöhten Konsum dieses Genotyps erklären könnte. Diese erhöhte Expression konnte mittels qPCR verifiziert werden. Weiterhin zeigte sich eine Fehlregulation von insgesamt 1111 Genen, unter denen zahlreiche Leberproliferations-assoziierte Gene zu finden waren. Dieser Befund bekräftigt eine Studie, die in *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tieren eine gestörte Leberregeneration nachweist. Die Betrachtung unterschiedlicher serologisch-klinischer leberrelevanter Parameter beider Genotypen im Anschluss an den präkonditionierten Ethanoltrinkanordnung ergab keine Verstärkung der bereits vorhandenen Leberfunktionsstörung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Tiere. Auch die Behandlung verschiedener hepatischer Zelllinien mit unterschiedlichen biogenen Monoaminen oder Ethanol ergab keinen eindeutigen Einfluss auf die Proliferationsrate, die anhand der mitochondrialen Aktivität und der DNA-Menge quantifiziert wurde.

Um zu untersuchen, ob die differentielle Genexpression in der Leber der *Tph1*<sup>+/+</sup>- und *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse auf eine Seronylierung von Transkriptionsfaktoren (TF) zurückzuführen sei, welche analog zu der Modifikation von GTPasen eine physiologische Funktion ausüben könnte, wurden verschiedene TF *in vitro* exemplarisch monoaminyliert und mittels EMSA- und Affinitätsexperimenten untersucht. Es zeigte sich neben der Modifikation aller untersuchter TF, dass eine Monoaminylierung inhibitorisch z.B. auf die Bindung von BRN2 an seine Zielsequenz wirkt und die Interaktion von drei TF zu dem Polyglutamin-bindenden Protein 1, das als Suppressor der Aktivität des TF BRN2 bekannt ist, durch die Modifikation unabhängig von der Länge des Polyglutaminabschnitts verstärkt wird.

Unabhängig vom zugrunde liegenden molekularen Mechanismus für den erhöhten freiwilligen Ethanolkonsum und die Leberfunktionsstörung der *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, scheint die Verabreichung von 5-HTP ein lohnenswerter, untersuchungswürdiger, neuer Therapieansatz bei der Suchttherapie und einer verbesserten Leberregeneration von Alkoholikern mit Polymorphismen in *TPH1* zu sein.

## E Abstract

Intronic polymorphisms of the peripheral isoform of tryptophan hydroxylase (TPH1) are associated with the development of alcoholism and even with the age of onset of alcoholism related behaviour in different human ethnic groups. Furthermore, genetic linkage studies in human and mice have shown a relation of an increased voluntary ethanol intake to the chromosomal section harbouring *TPH1* (11p15) and accordingly *Tph1* (7qB4).

To clarify the role of TPH1 in the context of voluntary ethanol intake behaviour and the molecular background of this association *Tph1*<sup>+/+</sup> and *Tph1*<sup>-/-</sup> mice with homogenic genetic background were subjected to a two-bottle choice paradigm avoidance test with and without prior conditioning to ethanol. Using increasing concentrations of alcoholic solutions *Tph1*<sup>-/-</sup> mice had a higher intake of all applied concentrations compared to the wildtype. With prior conditioning *Tph1*<sup>+/+</sup> mice with homogenic genetic background had a significant higher intake of ethanol as well, emphasizing the gene defect as the reason for the seen phenotype. Through administration of the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan (5-HTP) *Tph1*<sup>-/-</sup> mice (backcrossed to C57BL/6J, 11<sup>th</sup> generation) exhibit a voluntary ethanol intake comparable to the *Tph1*<sup>+/+</sup> (C57BL/6J) mice intake. The genetic background of the backcrossed *Tph1*<sup>-/-</sup> mice on chromosome 7 was analyzed by utilizing altered restriction endonuclease sites and sequencing analysis of single nucleotide polymorphisms. The mice showed the genotype of the strain 129/SvEvBrd in between 6 kb *downstream* and 308 kb *upstream* of *Tph1* and the C57BL/6J genotype outside of this section.

The high-throughput sequencing of the liver transcriptome of both genotypes using the SOLiD4 technology exhibited an increase in the gene expression of *Aldh2* in the *Tph1*<sup>-/-</sup> mice. The enhanced gene expression could be verified using qPCR and might be the main reason for the increased voluntary ethanol intake. Additionally, the liver of the *Tph1*<sup>-/-</sup> mice displayed an altered gene expression of 1111 genes altogether, of which several genes are associated to hepatocyte proliferation. This finding confirms a former study showing a disturbed liver regeneration in *Tph1*<sup>-/-</sup> mice. The serological-clinical liver-related parameters were taken subsequent to the preconditioned avoidance test, but offered no enhancement of the existing disturbance of liver function in *Tph1*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, hepatic cell lines were treated with different biogenic monoamines and ethanol and the proliferation rate quantified on the basis of mitochondrial activity and the amount of DNA. None of the treatments revealed an explicit influence on hepatocyte proliferation.

Knowing that the seronylation of small GTPases has functional influence on the activity of this enzymes, different transcription factors (TF) were analyzed *in vitro* for the ability to be modified with biogenic monoamines by transglutaminase 2. Subsequently, the functional influence of the modification was analyzed using EMSA and pull-down experiments. All investigated TF were modified *in vitro* and the modification e.g. inhibited the binding of BRN2 to its recognition site. Furthermore, the interaction of three monoaminylated TF with the polyglutamine-binding protein 1 (PQBP1) increased length-independently. PQBP1 is known to act as a suppressor in BRN2-mediated transcriptional activation in the context of two different gene promoters.

Independent from the underlying molecular mechanism of the voluntary higher intake of ethanol and the disturbed liver regeneration in *Tph1*<sup>-/-</sup> mice, the administration of 5-HTP could be a new therapy approach that is worthy of detailed examination. In alcoholic patients with polymorphisms in *TPH1*, 5-HTP could improve the therapy of the addiction itself and also of the alcohol-related liver damages.

## F Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem direkten Betreuer Dr. Diego J. Walther bedanken, der es mir ermöglicht hat diese Arbeit in einem produktiven und zeitgleich entspannten Arbeitsumfeld durchzuführen und mir mit fachlichem und persönlichem Rat zur Seite stand. Ich danke weiterhin Prof. Dr. Martin Vingron und Prof. Dr. H.-Hilger Ropers für die Möglichkeit innerhalb der Max-Planck-Gesellschaft zu promovieren und den Gutachtern meiner Doktorarbeit Prof. Dr. Stefan Mundlos und Prof. Dr. Thomas Schmülling für die Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen hervorragenden Kollegen. Damit ist sowohl meine Arbeitsgruppe gemeint, die diese Promotion zu einer ganz besonderen Zeit gemacht haben, als auch die AG Sperling und AG Seitz, insbesondere Jenny, Marcel, Dani und Robert, die immer für eine Ablenkung im Arbeitsalltag zu haben waren. Hervorheben möchte ich hierbei aus meiner AG vor allem Jakob, Nils, Maik und Paul, die mir immer im Labor zur Seite standen und mich bis heute begleiten und unterstützen. Weiterhin danke ich meinen süßen Mädels, die mich mit Sport- und Tanzaktivitäten auf Trab halten. Aber auch Sabine gilt mein herzlicher Dank dafür, dass sie den Laden am Laufen gehalten hat, und natürlich den zahlreichen Studenten, die im Laufe der Jahre etliche Pipettenspitzen für diese Arbeit umgewälzt haben. Außerdem danke ich dem edlen Papierspender.

Ich danke ganz herzlich meinen tollen Freunden inner- und außerhalb der Hoppers, mit denen man so herrlich Quatsch machen und feiern kann. Insbesondere danke ich meinen Wollankstraßenjungs, der Neukölln-Crew und meinen Mädels, die mir erst in den letzten Jahren so richtig ans Herz gewachsen sind. Ganz großer Dank gilt Katja, welche immer ein offenes Ohr für mich hat und mir die Promotionszeit mit zahlreichen Mensabesuchen versüßte. Nicht zu vergessen auch die Fusioncrew, die für jeden Spaß zu haben ist und einfach weiß, wie der Hase läuft.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie für die stetige moralische als auch finanzielle Unterstützung danken. Ohne Euch wäre das Leben oft schwerer gewesen. Daher widme ich diese Arbeit meinen unvergleichlichen Großeltern Kurt Kleemann (\*1924 - †2011) und Kordula Kleemann (\*1920 - †2012), die deren Abschluss leider nicht mehr miterleben konnten.

## **G Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wurden die Angaben zum Lebenslauf aus der *online*-Version der Dissertation entfernt.

## H Publikationen

Scheuch K, Lautenschlager M, Grohmann M, **Stahlberg S**, Kirchheiner J, Zill P, Heinz A, Walther DJ, Priller J, *Biol. Psychiatry* **62** (11), 1288 (2007). Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons.

Walther DJ, **Stahlberg S**, Vowinckel J. *FEBS J.* **278**, 4740–4755, 1742 (2011) Novel roles for biogenic monoamines: From monoamines in transglutaminase-mediated posttranslational protein modification to monoaminylation deregulation diseases. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08347.x. Epub 2011 Nov 21.

Roepcke S, **Stahlberg S\***, Klein H, Schulz MH, Theobald L, Gohlke S, Vingron M, Walther DJ, *BMC Genomics* **62** (12), 624 (2011). A tandem sequence motif acts as a distance-dependent enhancer in a set of genes involved in translation by binding the proteins NonO and SFPQ. \*geteilte Erstautorenschaft

Vowinckel J, **Stahlberg S**, Paulmann N, Bluemlein K, Grohmann M, Ralser M, and Walther DJ, *FEBS Lett.* **586** (21), 3819 (2012). Histaminylation of glutamine residues is a novel posttranslational modification implicated in G-protein signaling. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.027

Schumacher S, **Stahlberg S**, Seitz H, and Walther DJ, *J. Biol. Chem.*, eingereicht (2012). Fine tuning of CREB by Transglutaminase 2 and Protein Kinase A.

Krumbiegel C, Hammer P, **Stahlberg S**, Vowinckel J, Beyerlein P, and Walther DJ, *in Bearbeitung* (2012). Bioinformatic definition of glutamine-rich protein domains.

**Stahlberg S**, Vowinckel J, Hinze F, and Walther DJ, *in Bearbeitung* (2012). *Tetrahymena thermophila* as model organism for protein monoaminylation.

**Stahlberg S**, Vowinckel J, Grohmann M, Theobald L, Gohlke S, and Walther DJ, *in Bearbeitung* (2012). The functional monoaminylation of transcription factors.

**Stahlberg S**, Vowinckel J, Karweina D, Hinze F, and Walther DJ, *in Bearbeitung* (2012). The serotonylation of transcription factors as mechanism in the aetiology of alcoholism.

## **I Selbständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit gem. § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie, diese Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen in Anspruch genommen zu haben. Alle Experimente und Analysen wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Hochdurchsatz-Sequenzierung mit einem SOLiD 4-System und die damit verbundene Sequenzdatenanalyse erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe Diagnostische Bioinformatik von Prof. Dr. Peter Beyerlein an der Technischen Hochschule Wildau erfolgte. Einzelexperimente der Proliferations- und der Expressionsanalysen der verschiedenen Zelllinien wurden im Rahmen von durch mich betreute Diplom- und Masterarbeiten durchgeführt. Ich versichere, dass diese Arbeit in dieser oder anderer Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Silke Stahlberg

Berlin, November 2012

## J Abkürzungen

5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HIAL	5-Hydroxyacetaldehyd
5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
5-HTOL	5-Hydroxytryptophol
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5HTR	Serotonin-Rezeptor
AA	Aminosäure
AADC/DDC	L-Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
AC	Adenylat-Cyclase
Acsl	<i>Long-Chain Fatty Acyl-Coenzym A-Synthetase</i>
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AdipoR2	Adiponektinrezeptor 2
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASC	Ascorbinsäure
ASH	Alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat-Aminotransferase
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Btd	<i>Buttonhead-Box</i>
bZIP	Basischer Leucinzipper
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Kinase
CBP	CREB-bindenden Protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CoA	Coenzym A
CREB	cAMP <i>response element</i> -bindendes Protein
CRH	Corticotropin- <i>releasing</i> Hormon
CTA	Cysteamin

---

CTD	Carboxyterminale Domäne
CTGF	<i>Connective tissue</i> -Wachstumsfaktor
DA	Dopamin
DAR	Dopamin-Rezeptor
DAT	Dopamin-Transporter
DBD	DNA-bindende Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGAT	Diacylglycerol-Acyltransferase
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholat
DTT	Dithiothreitol
E2F1	E2F Transkriptionsfaktor 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
ETF	<i>TEA domain family member 2</i>
FABP	Fettsäure-bindendes Protein
FBS	Fötale Rinderserum
FFA	Freie Fettsäure
FIBS	Fibronectin- und Integrinbindestelle
$\gamma$ -GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
G3P	Glycerol-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GluR1	Glutamatrezeptor 1
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HA	Histamin
HAR	Histamin-Rezeptor
HCRP1	<i>Hepatocellular carcinoma-related Protein 1</i>

---

HD	Chorea Huntington
HDGF	<i>Hepatoma-derived</i> Wachstumsfaktor
HGF	Hepatocyten-Wachstumsfaktor
HPC	Hepatitische Vorläuferzelle
HRP	Meerrettichperoxidase
HSC	Hepatische Sternzelle
Hsp	Hitzeschockproteine
ID	Inhibitorische Domäne
IGF	Insulin- <i>like</i> Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IVC	<i>Individually Ventilated Cage</i>
KID	Kinase-induzierbare Domäne
KLF	Krüppel- <i>like</i> Faktor
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanine
L-FABP	Leberfettsäure-Bindeprotein
MAO	Monoamin-Oxidase
MDC	Monodansylcadaverin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MODY	<i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
mRNA	<i>Messenger</i> -Ribonukleinsäure
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NE	Noradrenalin
NEFA	Nicht-veresterte freie Fettsäure
NET	Noradrenalin-Transporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOL	Nukleoläres Protein
NonO	<i>Non pou domain containing octamer binding protein</i>
NPC	Nicht-parenchymaler Zelltyp
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Met	Hepatocyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
MITF	<i>Microphthalmia-associated</i> Transkriptionsfaktor
OCT	Organischer Kationentransporter
OD	Optische Dichte

---

PAP	Phosphatidat-Phosphohydrolase
PA-SMC	Pulmonäre, arterielle glatte Gefäßmuskelzelle
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PH	Pulmonäre Hyperplasie
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PK	Protein-Kinase
PMAT	Plasmamembran-Monoamintransporter
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA-Polymerase II
PPAR $\alpha$	<i>Peroxisome Proliferator Activated-Rezeptor <math>\alpha</math></i>
PQBP1	Polyglutaminbindendes Protein 1
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
RA	All- <i>trans</i> -Retinolsäure
RB	Retinoblastom-Protein
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SMBS	Natriummetabissulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERT	Serotonin-Transporter
SFPQ/PSF	<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>
SMC	Glatte Gefäßmuskelzelle
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SP1	<i>Specificity</i> Protein 1
SPF	<i>Specific pathogen free</i>
TAF	TBP-assoziierter Faktor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TERA	<i>Transitional</i> Endoplasmatisches Retikulum ATPase
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TGM	Transglutaminase

---

TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
U	<i>Unit</i> , enzymatische Einheit
UV	Ultraviolettes Licht
VEGF	<i>Vascular Endothelial</i> Wachstumsfaktor
VLDL	<i>Very-low-density</i> Lipoprotein
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VPS37A	<i>Vacuolar Protein Sorting 37 Homolog</i>
(v/v)	Verhältnis von Volumen zu Volumen
(w/v)	Verhältnis von Masse zu Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

Des Weiteren wurde die laut IUPAC (*International Union Of Pure And Applied Chemistry*) und IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) festgelegte Nomenklatur für physikalische Größen, chemische Elemente, (Maß-)Einheiten, Präfixe von Einheiten und Abkürzungen von Nukleotiden und Aminosäuren verwendet.

