

DISSERTATION

Nicht-kanonische Pathways der Serotonin-Homöostase in
embryonalen und adulten Mäusen.

Non-canonic pathways involved in the homeostasis of serotonin in
embryonal and adult mice.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Mordhorst

Erstbetreuung: Prof. Dr. Michael Bader

Datum der Promotion: 30. Juni 2024

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Mordhorst A, Dhandapani P, Matthes S, Mosienko V, Rothe M, Todiras M, Self J, Schunck WH, Schütz A, Bader M, Alenina N.

Phenylalanine hydroxylase contributes to serotonin synthesis in mice. The FASEB Journal. 2021; 35:e21648. <https://doi.org/10.1096/fj.202100366R>

1 Inhaltsverzeichnis

VORWORT	3
2 TABELLEN- & ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
2.1 TABELLEN:	6
2.2 ABBILDUNGEN:	7
3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
4 ABSTRACT	10
4.1 DEUTSCH:	10
4.2 ENGLISCH:	11
5 EINLEITUNG	12
5.1 ENTDECKUNGSGESCHICHTE UND IDEENGESCHICHTLICHE EINFÜHRUNG IN GENETIK, STOFFWECHSEL UND PHYSIOLOGIE 5-HYDROXYTRYPTAMINS:	14
5.1.1 Entdeckung 5-Hydroxytryptamins unter den Namen Thrombocytin und Serotonin als Vasokonstriktor des Serums:	15
5.1.2 Entdeckung 5-Hydroxytryptamins unter dem Namen Enteramin als potenziell endokrin- aktive Substanz aus dem Dünndarm und Vereinigung der Konzepte:	16
5.1.3 Isolation 5-Hydroxytryptamins aus dem ZNS und potentielle Rolle als Neurotransmitter: 16	
5.1.4 Aufklärung des 5-Hydroxytryptamin-Stoffwechsels:	18
5.2 EVOLUTIONÄRE ENTSTEHUNG VERSCHIEDENER BIOCHEMISCHE WEGE DER 5-HT-SYNTHESE ALS TEIL DES HOCH KONSERVIERTEN INDOL-STOFFWECHSELS	20
5.2.1 Evolutionäre Konservierung & Phylogenetische Verteilung 5-HTs:	20
5.2.2 Konservierung 5-HTs als Teil des Indol-Stoffwechsels:	22
5.2.3 Enzymatische Mechanismen der Indol-5-Hydroxylierung in verschiedenen Spezies:	24
5.3 DAS PERIPHERE SEROTONERGE SYSTEM IN ADULTEN VERTEBRATEN:	29
5.3.1 Tryptophan – Aufnahme, Verteilung, Konkurrierende biosynthetische Wege & Einfluss auf 5-HT Spiegel:	30
5.3.2 Die Enterochromaffinen Zellen des Darms als Ursprung peripherer 5-HT Spiegel:	31
5.3.3 Verteilung enterischen 5-HTs über Thrombozyten im Körper:	34
5.3.4 Inaktivierung zirkulierenden 5-HTs:	35
5.3.5 Effekte peripheren 5-HTs auf Zielorgane:	37
5.4 DAS ZENTRALNERVÖSE SEROTONERGE SYSTEM IN ADULTEN VERTEBRATEN:	38
5.4.1 Zentralnervöses 5-HT ist unabhängig von peripheren serotonergen Einflüssen:	38
5.4.2 Zentralnervöse serotonerge Zellpopulationen:	39
5.4.3 Effekte zentralnervösen 5-HTs auf Verhalten und Physiologie:	40
5.5 DAS SEROTONERGE SYSTEM IN SICH ENTWICKELNDEN VERTEBRATEN:	48
5.5.1 Die Blut-Hirn-Schranke im sich entwickelnden Organismus:	49
5.5.2 Periphere serotonerge Zellpopulationen während der Entwicklung:	49
5.5.3 Zentralnervöse serotonerge Zellpopulationen während der Entwicklung:	50
5.5.4 5-HT als Morphogen im sich entwickelnden Organismus:	52
5.5.5 Hypothesen über transiente, extraembryonale Serotonin-Quellen:	63
6 FRAGESTELLUNG	70
6.1 SEROTONIN-SYNTHESE IN ABWESENHEIT EINER TPH IM ADULTEN ORGANISMUS:	70
6.2 SEROTONIN-HOMÖOSTASE IM EMBRYONALEN ORGANISMUS:	71
7 METHODIK	73
7.1 CHEMIKALIEN	73
7.2 ANTIKÖRPER	75
7.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	75
7.4 METHODEN	77
7.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG:	85
7.5.1 Projekt 1 - Metabolische Adaption durch PAH-Serotonin in Leber:	88

7.5.2	<i>Projekt 2 - Regulation der Nierenfunktion durch PAH-Serotonin</i>	92
7.5.3	<i>Projekt 3 - 5HTP Synthese durch Plazenta und Eihäute:</i>	93
7.5.4	<i>Projekt 4 - Serotonerge Genotypen und embryonale Amin-Transmitter:</i>	93
7.5.5	<i>Projekt 5 - Amintransmitter in Abhängigkeit vom mütterlichen Genotyp:</i>	96
7.5.6	<i>Projekt 6 - Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit serotonerger Genotypen:</i>	97
8	ERGEBNISSE	99
8.1	SEROTONIN-SYNTHESE IN ABWESENHEIT EINER TPH IM ADULTEN ORGANISMUS:	99
8.1.1	<i>Replikation der veröffentlichten Messwerte und Evaluation von Tph2-abhängig generiertem, peripherem 5-HT:</i>	99
8.1.2	<i>Evaluation von Kandidaten für eine TPH-unabhängige Indol-5-Hydroxylierung:</i>	100
8.1.3	<i>PAH hydroxyliert Tryptophan zu 5-HTP in vitro:</i>	101
8.1.4	<i>mPah generiert einen Anteil der murinen Serotonin Plasma-Spiegel in vivo:</i>	103
8.1.5	<i>Physiologische Bedeutung PAH-generierten Serotonins:</i>	106
8.2	SEROTONIN-HOMÖOSTASE IM EMBRYONALEN ORGANISMUS:	112
8.2.1	<i>Evaluation einer möglichen Sert-Expression durch die Plazenta:</i>	112
8.2.2	<i>Evaluation einer möglichen Serotonin-Produktion durch Plazenta und Dottersack:</i>	115
8.2.3	<i>Einfluss verschiedener Genotypen auf embryonale zentralnervöse 5HT-Spiegel:</i>	116
8.2.4	<i>Einfluss verschiedener Genotypen auf embryonale periphere 5HT-Spiegel:</i>	119
8.2.5	<i>Einfluss des maternalen Genotyps auf embryonale 5-HT Spiegel:</i>	121
8.2.6	<i>Einfluss serotonerger Genotypen auf die Gewichtsentwicklung:</i>	123
8.2.7	<i>Einfluss serotonerger Genotypen auf embryonale Katecholamin-Spiegel:</i>	124
8.2.8	<i>Einfluss des maternalen Genotyps auf embryonale Katecholamin-Spiegel:</i>	127
9	DISKUSSION	128
9.1	SEROTONIN-SYNTHESE IN ABWESENHEIT EINER TPH IM ADULTEN ORGANISMUS:	128
9.2	SEROTONIN-HOMÖOSTASE IM EMBRYONALEN ORGANISMUS:	130
10	LITERATURVERZEICHNIS	136
11	APPENDIX	166
12	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	167
13	ANTEILSERKLÄRUNG	168
14	LEBENS LAUF	169
15	PUBLIKATIONS LISTE	170
16	DANKSAGUNG	171
17	BESCHEINIGUNG STATISTIK	172

2 Tabellen- & Abbildungsverzeichnis

2.1 Tabellen:

TABELLE 1: TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER ENTDECKUNG SEROTONINS UND SEINES STOFFWECHSELS.	14
TABELLE 2: EXPRESSION SEROTONERGER GENPRODUKTE IN MURINEN EMBRYOBLASTÄREN UND TROPHOBLASTÄREN, SOWIE HUMANEN TROPHOBLASTÄREN GEWEBEN ANHAND DER LITERATUR.	67
TABELLE 3: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	91
TABELLE 4: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	92
TABELLE 5: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	92
TABELLE 6: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	93
TABELLE 7: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	94
TABELLE 8: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	95
TABELLE 9: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	96
TABELLE 10: VERWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN, TRANSFORMATIONEN UND EXAKTE P-WERTE.	97
TABELLE 11: DOIS DER VERÖFFENTLICHUNGEN ANHAND DERER ABILDUNG 2 GENERIERT WURDE.	166

2.2 Abbildungen:

ABBILDUNG 1: EINFÜHRUNG IN DIE CHEMIE SEROTONINS.	12
ABBILDUNG 2: EVOLUTIONÄRE KONSERVIERUNG SEROTONINS ÜBER SPEZIES UND DOMÄNEN.	20
ABBILDUNG 3: ÜBERBLICK ÜBER DEN INDOLSTOFFWECHSEL.	22
ABBILDUNG 4: DAS PERIPHERE SEROTONERGE SYSTEM.....	29
ABBILDUNG 5: DIE RAPHE-KERNE.....	38
ABBILDUNG 6: SEROTONERGES AXONWACHSTUM NACH LIDOV & MOLLIVER.	50
ABBILDUNG 7: DIE EXPRESSION VON SEROTONIN-REZEPTOREN IM MAUS-EMBRYO ANHAND DER LITERATUR...63	
ABBILDUNG 8: REPLIKATION VERÖFFENTLICHTER MESSWERTE UND HOMOLOGIE AAAHS.	99
ABBILDUNG 9: TRYPTOPHAN-5-HYDROXYLIERUNG DURCH MPAH IN VITRO.	101
ABBILDUNG 10: PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION ODER GENETISCHE ABLATION DER MPAH REDUZIERT 5-HT IM BLUT IN VIVO.....	103
ABBILDUNG 11: MÄUSE VOM GENOTYP Tph1 ^{-/-} -PAH ^{-/-} WEISEN KEINE MASSENSPEKTROMETRISCH ERFASSBARE SEROTONIN-NEO-SYNTHESE AUF.	104
ABBILDUNG 12: DIMENSIONSREDUKTION DER SPIEGEL LIPIDOMISCHER METABOLITE IM PLASMA VON TIEREN UNTERSCHIEDLICHER GENOTYPEN UNTER FASTEN UND NORMALER DIÄT.....	106
ABBILDUNG 13: ORGANKONZENTRATIONEN (NG/MG) DER EINZELMETABOLITE DER HAUPTKOMPONENTE 1 INNERHALB DER FÜTTERUNGEN IM VERGLEICH ZWISCHEN DEN GENOTYPEN.	109
ABBILDUNG 14: ORGANKONZENTRATIONEN (NG/MG) DES HAUPTMETABOLITEN DER HAUPTKOMPONENTE 3 INNERHALB DER GENOTYPEN IM VERGLEICH ZWISCHEN DEN FÜTTERUNGEN.	109
ABBILDUNG 15: PARAMETER DER KLINISCHEN CHEMIE IN TIEREN VERSCHIEDENER GENOTYPEN IN URIN UND BLUT.....	110
ABBILDUNG 16: SERT-EXPRESSION IN DER MURINEN PLAZENTA AN E14.5 ANHAND VON IMMUNOREAKTIVITÄT.	114
ABBILDUNG 17: IN VITRO 5-HTP-SYNTHESE DURCH TROPHOBLASTÄRE ORGANE IM VERGLEICH ZWISCHEN WILDTPYEN UND KNOCKOUT-KONTROLLE, SOWIE IM VERGLEICH ZU EINEM KNOCKOUT-GEHIRN.....	115
ABBILDUNG 18: ORGANKONZENTRATIONEN VON 5-HT UND 5-HIAA IN EMBRYONALEN KÖPFEN AN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSTAGEN UND IN EMBRYONEN VERSCHIEDENER GENOTYPEN.	116
ABBILDUNG 19: ORGANKONZENTRATIONEN VON 5-HT UND 5-HIAA IN EMBRYONALEN KÖRPERN AN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSTAGEN UND IN EMBRYONEN VERSCHIEDENER GENOTYPEN.	119
ABBILDUNG 20: ORGANKONZENTRATIONEN VERSCHIEDENER NEUROTRANSMITTERN IN VERSCHIEDENEN EMBRYOTRANSFER—MODELLEN IN EMBRYONEN AN ENTWICKLUNGSTAG E15.5.	122
ABBILDUNG 21: KÖRPERGEWICHT (G) VON EMBRYONEN VERSCHIEDENER GENOTYPEN AN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSTAGEN.	123
ABBILDUNG 22: ORGANKONZENTRATIONEN VON KATECHOLAMIN-TRANSMITTERN IN EMBRYONALEN KÖPFEN AN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSTAGEN UND IN VERSCHIEDENEN GENOTYPEN.	124
ABBILDUNG 23: ORGANKONZENTRATIONEN VON KATECHOLAMIN-TRANSMITTERN IN EMBRYONALEN KÖRPERN AN VERSCHIEDENEN ENTWICKLUNGSTAGEN UND IN VERSCHIEDENEN GENOTYPEN.	125

3 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
EECs	Enteroendocrine Cells, Enteroendokrine Zellen
Trp	Tryptophan
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5-HIAA	5-Hydroxyindolacetic acid, 5-Hydroxyindolessigsäure
AADC	Aromatic Aminoacid Decarboxylase, Aromatische Aminosäure Decarboxylase
Phe	Phenylalanin
rPah	Phenylalanin-Hydroxylase aus der Ratte
raTph	Tryptophan-Hydroxylase aus dem Kaninchen
cDNA	copy DNA
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
PEP	Phosphoenolpyruvat
E4P	Erythrose-4-Phosphat
I3GP	Indol-3-Glycerolphosphat
FDA	U.S. Food and Drug Administration
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
CYPs	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen
AAAHs	Aromatischen Aminosäure-Hydroxylasen
t5h	tryptophan-5-hydroxylase
ZNS	Zentrales Nervensystem
TH	Tyrosin-Hydroxylase
BH4	Tetrahydropterins
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
LNAAs	Large Neutral Amino Acids
CAAs	Competing Amino Acids
BBB	Blut-Hirn-Schranke
LAT	Large neutral amino acid transporter
ECs	Enterocytes, Enterozyten
SLCXAY	Solute Carrier Family X Member Y
FFAs	Free Fatty Acids, Freie Fettsäuren
TDO	Tryptophan-Dioxygenase
IDO	Indol-Dioxygenasen
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
GIT	Gastro-Intestinal Trakt
LDCVS	Large Dense Core Vesicles
SLMVs	Synaptic-like Microvesicles
CgA	Chromogranin A
Syn	Synaptophysin
LGR5	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
bHLHs	Basische Helix-Loop-Helix (Transkriptionsfaktoren)
HES	Hairy/Enhancer of Split

GLUTX	Glucosetransporter Typ X
K _{ATP}	ATP-sensitiver Kaliumkanal
FFAR	Free fatty acid receptor
	Transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal, Unterfamilie A, Transient Receptor
TRP	Potential Channels
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
EPSPs	Exzitatorische Postsynaptische Potentiale
CCK	Cholecystokinin
PYY	Peptid YY
SERT	Serotonin Reuptake Transporter
VMAT2	Vesikulären Monoamintransporter 2
vWF	Von Willebrand Faktor
Gplb	Glykoprotein Ib
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
5HT _x R	5HT _x -Rezeptor
MAO	Monoaminoxidase
NE	Noradrenalin
DA	Dopamin
OCT	Organic Cation Transporter
PMAT	Plasma Membrane Monoamine Transporter
DAT	Dopamin Transporter
NET	Noradrenalin Transporter
LSD	Lysergsäurediethylamid
pH	potentia hydrogenii
Lmx1b	LIM-Homöobox-Transkriptionsfaktor 1-beta
RN	Raphe-Kerne
DRN	Dorsale Raphe-Kerne
ssRNAseq	Einzelzell-RNA-Sequenzierung
Vglut3+	Vesikulärer Glutamat-Transporter 3
Trh	Thyreotropin-Releasing Hormon
Ngn3	Neurogenin 3
SHH	Sonic Hedgehog
FGF	Fibroblast growth factor
FOXA2	Forkhead-Box-Protein A2
Ascl1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
Mash1	ammalian Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
mfb	Mediales Vorderhirn Bündel
mtg	Mamillotegmentaler Trakt

4 Abstract

4.1 Deutsch:

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist eine wichtige und evolutionär alte Signalsubstanz, welche in einer Vielzahl rezenter Organismen und in den meisten Domänen des Lebens vorkommt. Prominent ist 5-HT vor Allem in seiner Wirkung als modulatorischer Neurotransmitter, jedoch besitzen die meisten Vertebraten auch ein, durch die Blut-Hirn-Schranke vom zentralnervösen System isoliertes, peripher-serotonerges System, welches den deutlich größeren der beiden Pools darstellt. Die Tryptophan-5-Hydroxylierung ist der Geschwindkeits-bestimmende Schritt der Serotonin-Synthese. Dieser wird in Gewebstieren nach gängigem Dogma von einer von zwei Tryptophanhydroxylasen (TPH1 & -2) vollzogen, welche jeweils nur in einem der serotonergen Systeme exprimiert werden. Mausmodelle, in denen beide Gene unterbrochen wurden, zeigen im Rahmen der Messunsicherheit keinerlei nachweisbares Serotonin mehr in zentralnervösen Geweben, allerdings etwa 10% des Ausgangsniveaus in einigen peripheren Geweben. Allen voran dem Blut als größtem Speicher des Körpers. In dieser Arbeit können wir durch verschiedene Verfahren *in vitro* und *in vivo* belegen, dass die Phenylalaninhydroxylase (PAH) diese Restvorkommen generiert und somit eine dritte TPH darstellt. Weiterhin wird ersten Hypothesen experimentell nachgegangen, welche physiologischen Aufgaben diese neue Quelle erfüllen könnte. Ein zweites Teilprojekt befasst sich mit der Gewebs-Homöostase in embryonalen Mäusen. In diesen nimmt Serotonin, neben seiner Rolle als Transmittersubstanz, eine in der Literatur hinreichend belegte Rolle als Morphogen ein. Embryonale Organismen stellen bezüglich 5-HT insofern einen Sonderfall dar, als dass, an Gestationstagen an denen der Embryo noch keine eigene Synthese aufweist, Hinweise auf extraembryonale Quellen für Serotonin existieren. Weiterhin ist anhand der Literatur fraglich, zu welchem Gestationstag die Blut-Hirn-Schranke die beiden, in adulten Organismen vorhandenen, serotonergen Systeme trennt und welchen quantitativen Einfluss die Systeme zuvor aufeinander haben. Diesen beiden Fragestellungen wird anhand geeigneter experimenteller Verfahren und Tiermodellen *in vivo* nachgegangen. Abschließend wird der Einfluss auf weitere Transmittersysteme und das Embryonalgewicht als Surrogatparameter des embryonalen Wachstums geprüft.

4.2 Englisch:

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important and evolutionarily ancient signaling substance that is present in a variety of recent organisms throughout most domains of life. Prominence is given to 5-HT primarily in its role as a modulatory neurotransmitter, but most vertebrates also possess a peripheral-serotonergic system, which is isolated from the central nervous system by the blood-brain barrier and represents the much larger of the two pools.

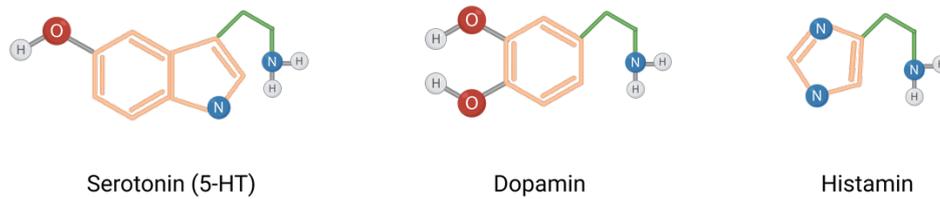
Tryptophan 5-hydroxylation is the rate-determining step in serotonin synthesis. According to common dogma, in most metazoans this is carried out by one of two tryptophan hydroxylases (TPH1 & -2), each of which is expressed in only one of the serotonergic systems. Mouse models in which both genes have been disrupted show, within the limits of measurement uncertainty, no detectable serotonin at all in central nervous tissues, but about 10% of baseline levels in some peripheral tissues. Most notably the blood as the body's largest store.

In this work, we are able to demonstrate by multiple methods *in vitro* and *in vivo* that the phenylalanine hydroxylase (PAH) generates these residual levels and thus represents a third TPH. Furthermore, initial hypotheses are being experimentally investigated as to what physiological roles this new source might fulfill.

A second subproject deals with the tissue homeostasis of 5-HT in embryonic mice. In these, serotonin, in addition to its role as a transmitter substance, has a role as a morphogen that has been adequately documented in the literature. Embryonic organisms also present a special case, since there is evidence in the literature for extraembryonic sources of serotonin, at gestational days when the embryo does not yet have its own synthesis. Furthermore, it is questionable from the literature at which gestational day the blood-brain barrier separates the two serotonergic systems present in adult organisms and what quantitative influence the systems have on each other beforehand. These two questions will be addressed using appropriate experimental procedures and animal models *in vivo*. Finally, the influence on further transmitter systems and the embryonic weight as surrogate parameters of embryonic growth will be examined.

5 Einleitung

a



b

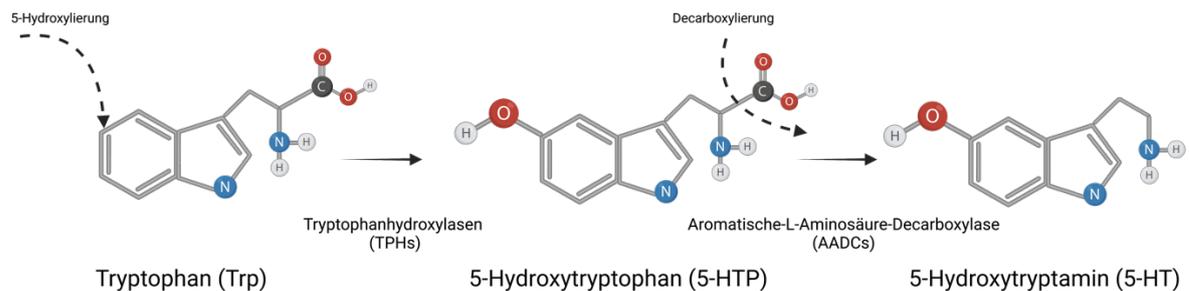


Abbildung 1: Einführung in die Chemie Serotonins.

a: Gegenüberstellung der Strukturformel Serotonins und der Amin-Transmitter Dopamin und Histamin. b: Biochemische Modifikationen Tryptophans auf dem Weg zum Serotonin.

Serotonin ist ein Neurotransmitter und Gewebshormon in Tieren, sowie ein Signalmolekül in einer Vielzahl anderer Organismen. Chemisch handelt es sich um 5-Hydroxytryptamin (5-HT, 3-(2-Aminoethyl)-1H-indol-5-ol; PubChemID: 5202). Es gleicht den anderen klassischen Amin-Transmittern wie Dopamin oder Histamin in seiner aliphatischen Ethylamin-Kette (Abbildung 1, jeweils grün dargestellt). Die Transmitter unterscheiden sich jedoch in ihrer zyklischen Stammstruktur: diese wird bei Serotonin durch Indol gebildet, bei Dopamin, als Vertreter der Katecholamine, von Dihydroxybenzol (auch Katechol) und bei Histamin von Imidazol (Abbildung 1a, jeweils gelb dargestellt).

Die Biosynthese Serotonins findet in Tieren klassischerweise ausgehend von der essenziellen Aminosäure Tryptophan statt. Diese wird zunächst in 5-Position des Indol-Rings durch Tryptophanhydroxylasen (TPHs) hydroxyliert und das entstehende Intermediat 5-Hydroxytryptophan wird durch Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylasen (AADCs) an der aliphatischen Kette decarboxyliert, wodurch 5-Hydroxytryptamin oder Serotonin entsteht (Abbildung 1b). Der Abbau erfolgt größtenteils über die Monoaminoxidase A (MAOA), die Serotonin am Ethylamin oxidativ

desaminiert, wobei über ein weiteres Intermediat 5-Hydroxyindolessigsäure (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) entsteht (Lovenberg et al., 1962; Udenfriend et al., 1956).

Serotonin entfaltet seine biologische Wirkung über seine spezifischen Rezeptoren. Es existieren in Maus und Mensch jeweils fünfzehn Rezeptoren, unterteilt in sieben Rezeptorfamilien. Damit besitzt 5-HT die größte Vielfalt an Rezeptoren unter den Amin-Transmittern und eine der größten unter allen bekannten Signalstoffen. Zum Vergleich: im Menschen sind fünf Dopamin-Rezeptoren bekannt (Barnes et al., 2021). Ein weiterer Wirkmechanismus 5-HTs ist die kovalente Modifikation intrazellulärer (etwa kleine GTPasen oder Histone) oder extrazellulärer (wie etwa Fibronectin) Proteine durch Transglutaminasen. Ein Prozess der „Serotonylierung“ genannt wird (Bader, 2019).

Klinisch tritt Serotonin vor allem durch seine Rolle in der Pathogenese der Depression bzw. durch den Wirkmechanismus moderner Antidepressiva, seine Rolle in der Pathophysiologie des Karzinoid-Syndroms bzw. seine Folgeerkrankungen, sowie durch den Wirkmechanismus moderner Antiemetika in Erscheinung. Dabei ist es jedoch an der Entstehung und Regulation pathologischer und physiologischer Prozesse in nahezu jedem Gewebe beteiligt (Jones et al., 2020).

5.1 Entdeckungsgeschichte und ideengeschichtliche Einführung in Genetik, Stoffwechsel und Physiologie 5-Hydroxytryptamins:

Author	Jahr	Monat	Ereignis
Ludwig & Schmidt	1868	1	Perfusion eines Hundemuskel mit Serum erhöht vaskulären Tonus
O'Connor	1912	1	Nicht adrenerger Bestandteil des Serums mit vasokonstriktiver Wirkung
Erspamer & Vialli	1937	1	Entdeckung "Enteramin" - Extrakt aus Mukosa als Konstriktor an Darm und Uterus
Erspamer	1940	1	Charakterisierung "Enteramin"
Erspamer	1942	1	Charakterisierung "Enteramin"
Rapport	1948	6	Chemische Isolierung und Charakterisierung eines Vasokonstriktors aus Kuh-Serum
Rapport	1948	9	Kristallisation "Serotonin"
Rapport	1949	10	Serotonin als 5-Hydroxytryptamin
Erspamer	1952	5	Enteramin als 5-Hydroxytryptamin
Rand & Reid	1951	9	Thrombocytin als 5-Hydroxytryptamin
Twarog & Page	1953	10	Erstmaliger Nachweis 5-Hydroxytryptamins im ZNS von Säugetieren
Amin & Gaddum	1954	1	Unabhängiger Nachweis 5-Hydroxytryptamins im ZNS von Säugetieren
Udenfriend	1956	3	Aufklärung des Pathways von Tryptophan über 5-HT zum 5-HIAA in Modellorganismen und Mensch
Lovenberg & Udenfriend	1962	1	Aufklärung des Pathways von 5-HTP zu 5-HT
Renson & Udenfriend	1961	10	Tryptophan-Hydroxylierung durch die Leber-Phenylalaninhydroxylase
Renson & Udenfriend	1962	7	Tryptophan-Hydroxylierung durch die Leber-Phenylalaninhydroxylase
Sato	1967	1	Tryptophan-Hydroxylierung durch Organ-Extrakte ohne Phenylalanin-hydroxylierenden Eigenschaften: Maligner Mastzelltumor d. Maus
Lovenberg	1967	1	Tryptophan-Hydroxylierung durch Organ-Extrakte ohne Phenylalanin-hydroxylierenden Eigenschaften: Hirnstamm, Zirbeldrüse & Karzinoid
Grenett	1987	1	Klonierung d. cDNA einer Tryptophan-Hydroxylase, welche mit mRNA in Zirbeldrüse aber nicht in Leber Hybridisiert
Stoll	1990	5	Klonierung d. cDNA einer Tryptophan-Hydroxylase, welche mit mRNA in Zirbeldrüse, Duodenum und Hirnstamm aber nicht in Leber Hybridisiert
Walther & Bader	2003	1	Knockout des Tryptophanhydroxylase Gens in Mäusen: Reduktion der 5-HT Spiegel in Peripherie aber nicht in ZNS
Alenina & Bader	2009	6	Knockout eines zweiten Tryptophanhydroxylase-Gens in Mäusen: Fehlende 5-HT Spiegel in ZNS, unveränderte Spiegel in Peripherie

Tabelle 1: Tabellarische Zusammenfassung der Entdeckung Serotonins und seines Stoffwechsels.

5.1.1 Entdeckung 5-Hydroxytryptamins unter den Namen Thrombocytin und Serotonin als Vasokonstriktor des Serums:

Gesellschaftlich bekannt ist 5-HT primär als Neurotransmitter für seine Rolle in der Regulation von weiten Anteilen menschlichen Erlebens und Verhaltens. In der Entdeckungsgeschichte des Moleküls trat es allerdings zunächst als Gewebshormon in Erscheinung. Bereits im Jahr 1868 konnte gezeigt werden, dass die Perfusion eines explantierten Hundemuskels mit Serum - der als Überstand verbleibenden Komponente des Blutes nach der Koagulation - den Tonus der im Muskel vorhandenen Gefäße erhöht (Ludwig, 1868). In einer 1910 erschienenen Veröffentlichung verglich Paul Trendelenburg die vasokonstriktive Wirkung des Serums mit der des, bereits entdeckten und chemisch rein synthetisierbaren, Adrenalins und stellte die Hypothese auf, die Wirkung des Serums gehe auf seinen Adrenalin-Gehalt zurück (Trendelenburg, 1910). Allerdings fiel O'Connor et al. im Jahr 1912 der Widerspruch auf, dass die Wirkung von Serum und reinem Adrenalin sich zwar an der Gefäßmuskulatur glich, allerdings nicht am Dünndarm. Dieses, ebenfalls glattmuskuläre, Organ wird durch Adrenalin relaxiert, während die Inkubation mit Serum zur Kontraktion führt. Die Notwendigkeit eines nicht-adrenergen Vasokonstriktors im Serum konnte er schließlich dadurch aufzeigen, dass die vasokonstriktive Wirkung des Serums fortbestand, wenn es aus adrenektomierten Kaninchen gewonnen wurde (O'Connor, 1912). Bereits den früheren Autoren war bewusst, dass die vasokonstriktive Wirkung des Serums sich nicht in Blutplasma - der als Überstand verbleibenden Komponente des, an der Koagulation gehinderten Blutes - wiederfand (Für Review siehe: Starke, 1998). Reid und Koautoren zeigten, dass der Vasokonstriktor in Blutplättchen gespeichert wurde und nach Koagulation oder künstlicher Zerstörung der Thrombozyten frei und damit pharmakologisch aktiv vorlag. Daher schlugen sie im Jahr 1943 den Namen „*Thrombocytin*“ vor (Reid, 1943). Rapport und Koautoren gelang in zwei, im Jahr 1948 veröffentlichten, Artikeln die Aufreinigung, chemische Charakterisierung und schließlich Kristallisation des Serum-Vasokonstriktors, für den sie ihrerseits den Namen „*Serotonin*“ in Anlehnung an den tonischen Effekt auf die glatte Gefäßmuskulatur vorschlugen (Rapport et al., 1948a, 1948b). Ein Jahr später veröffentlichten sie - zunächst als Hypothese - die bis heute gültige Summen- & Strukturformel Serotonins als 5-Hydroxytryptamin (Rapport, 1949).

5.1.2 Entdeckung 5-Hydroxytryptamins unter dem Namen Enteramin als potenziell endokrin-aktive Substanz aus dem Dünndarm und Vereinigung der Konzepte:

Die enterochromaffine Zellen des Darms (EECs) wurden im Menschen erstmalig um die Jahrhundertwende entdeckt (Schmidt, 1905). Die Namensgebung der, zunächst histologischen nicht anzufärbenden, Zellen erfolgte aufgrund einer in den Folgejahren festgestellten Affinität zu Chromsalzen. In einer Reihe von Veröffentlichungen in den Jahren 1914 bis 1928 charakterisierte Pierre Masson die neuentdeckte Zellpopulation mit der nach ihm benannten Färbetechnik und stellte auf dieser Grundlage die Hypothese auf, die Zellpopulation stelle ein eigenes, endokrines Organ dar und bilde die Ausgangsstruktur der endokrin aktiven karzinoiden Neoplasien (Masson, 1914, 1924; 1928; für Review siehe Modlin et al., 2006).

Die bisher noch nicht im Experiment nachgewiesene Hypothese einer endokrinen Aktivität erfuhr im Jahr 1937 durch einen Artikel von Erspamer et al. Unterstützung, welcher von einem Extrakt aus dieser Zellpopulation berichtete, der anhand von chemischen Farbstoffreaktionen am ehesten einen hohen Gehalt amino-indolischer Stoffe aufwies und in der Lage war am glattmuskulären Rattenuterus eine Kontraktion hervorzurufen. Benannt wurde die hypothetische Substanz, auf die diese Wirkung zurückgehen sollte „*Enteramin*“ (Erspamer, 1937). Nachdem von den Autoren Rand & Reid bereits im Jahr 1951 festgestellt wurde, dass die Thrombocytin genannte Substanz chemisch identisch mit Rapports Serotonin war (vgl. Abschnitt 5.1.1), konnten Erspamer und Koautoren im Jahr 1952 dieselbe Feststellung für ihr Enteramin machen (Erspamer & Asero, 1952; Rand & Reid, 1951).

5.1.3 Isolation 5-Hydroxytryptamins aus dem ZNS und potentielle Rolle als Neurotransmitter:

Erste Hinweise auf eine Rolle 5-HTs als Neurotransmitter wurden in den 1950er Jahren in Mollusken erbracht. In diesen wurde 5-HT erstmalig 1950 durch Erspamer und Koautoren nachgewiesen, da sie 5-HT in den Speicheldrüsen von gemeinen Kraken (*Octopus vulgaris*) fanden (Erspamer & Boretti, 1950). Die Evaluation der Wirkung 5-HTs auf die Physiologie des einfacheren Weichtieres *Venus mercenaria* zeigte schließlich eine Antagonisierung der Wirkung neuronalen Acetylcholins auf die Herzaktivität und legte eine Rolle 5-HTs als Neurotransmitter nahe (Welsh, 1953). Dies führte schließlich dazu, dass Twarog & Page in einer Veröffentlichung von 1953

– unter der Verwendung von *V. mercenaria*-Herzen als Bioassay – Hirnanteile von Vertebraten (Ratten und Hunden) auf eine vergleichbare, antagonistische Wirkung überprüften. In Proben, die biologische Aktivität zeigten, konnte auch 5-HT mittels Papierchromatografie nachgewiesen werden (Twarog & Page, 1953). Das Vorkommen 5-HTs im ZNS von Vertebraten wurde ein Jahr später durch eine Veröffentlichung von Amin und Koautoren, welche sich der vasoaktiven Wirkung von Hinextrakten widmete, bestätigt (Amin et al., 1954).

Bereits in den 1940er Jahren war die Substanz Lysergsäurediethylamid (LSD, Abbildung 3) aus dem in Mutterkornpilzen vorkommendem Ergotamin synthetisiert worden und die starke psychotrope Wirkung war durch den Entdecker Albert Hofmann in einem versehentlichen Selbstversuch festgestellt und dann durch Stoll et al. an Probanden verifiziert worden (Stoll & Hofmann, 1943; Stoll, 1947). Die Feststellung, dass LSD die Wirkung Serotonins am Ratten-Uterus antagonisiert, führte erstmalig zur Vermutung die durch LSD ausgelösten psychotropen Effekte könnten serotonerger Natur sein. In Abwesenheit eines etablierten biologischen Rezeptor-Konzepts sprach man zu diesem Zeitpunkt allerdings noch von LSD als Serotonin-Antimetaboliten und nicht als Partialagonist an verschiedenen 5HT-Rezeptoren (Gaddum & Hameed, 1954; Maehle, 2009; Quirke, 2006).

Die Veröffentlichung der Falck-Hillarp Reaktion im Jahr 1962, die die Umwandlung von histologisch fixierten Indolalkylaminen und Katecholaminen in fluoreszente Reaktionsprodukte beschreibt, ermöglichte die in Abschnitt 5.5.3 ausführlich beschriebene neuroanatomische Erkundung des zentralnervösen serotonergen Systems, allen voran durch Fuxe & Dahlström (Dahlstroem & Fuxe, 1964; Falck, 1962).

Somit war ein einheitliches Dogma geschaffen, nachdem 5-HT eine Signalsubstanz mit Vorkommen in Enterochromaffinen Zellen, Serum bzw. Thrombozyten und dem Gehirn von Vertebraten und nachweislicher Wirkung in glattmuskulären Organen, sowie hypothetisch dem Gehirn war. Azmitia et al. vermuten, der Name „*Serotonin*“ habe sich in den Folgejahren gegen die Alternativen durchgesetzt, da die Substanz erstmalig kommerziell unter diesem Namen durch die Firma Upjohn Pharmaceuticals vertrieben wurde (Whitaker-Azmitia, 1999).

5.1.4 Aufklärung des 5-Hydroxytryptamin-Stoffwechsels:

5.1.4.1 Aufklärung der am 5-Hydroxytryptamin-Stoffwechsel beteiligten Intermediate:

Was zum Zeitpunkt der Aufklärung der chemischen Struktur noch nicht wissenschaftlich etabliert war, war eine Route der biochemischen Synthese sowie des Abbaus im Menschen und seinen Modellorganismen.

Die Ergründung dessen erfolgte in den Jahren 1956 und 1962 durch Udenfriend und Lovenberg in zwei konsekutiven Veröffentlichungen. Hierbei wurde der Weg vom Tryptophan (Trp) über das 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) in Versuchstieren, sowie der Abbau von 5-HT zur 5-Hydroxyindolessigsäure (5-Hydroxyindolacetic acid, 5-HIAA) in einen am Karzinoid Syndrom erkrankten Patienten durch Kohlenstoff-14 markierte chemische Vorläufer untersucht (Lovenberg et al., 1962; Udenfriend et al., 1956).

Bereits in diesen Artikeln wurde als verantwortliches Enzym für den Schritt vom 5-HTP zum 5-HT die Aromatische Aminosäure Decarboxylase (aromatic amino acid decarboxylase, AADC, auch DOPA-Decarboxylase) diskutiert. Was bisher fehlte war ein verantwortliches Enzym für den, in den beiden Artikeln als Geschwindigkeitsbestimmend aufgefallenen, Schritt vom Trp zum 5-HTP. Einen ersten Erklärungsversuch lieferten zwei konsekutive Artikel von Renson und Udenfriend, welche die Hydroxylierung von Trp durch das Phenylalanin-hydroxylierende System der Leber und Konkurrenz zwischen Phenylalanin (Phe) und Trp nachweisen konnten (Renson et al., 1961; Renson et al., 1962). Diese Ergebnisse wurden allerdings im Jahr 1967 durch Veröffentlichungen von Sato und Lovenberg in Zweifel gezogen, in denen Trp-Hydroxylierung mit vergleichsweise höherer Effizienz durch Organ-Extrakte gezeigt wurde, in denen keine Phenylalanin-Hydroxylierung nachgewiesen werden konnte. Hierzu wurden zum einen Hirnstamm und Zirbeldrüse aus Ratten und Kaninchen verwendet und zum anderen ein serotonerges Mastrozytom aus der Maus (Lovenberg et al., 1967; Sato et al., 1967).

5.1.4.2 Aufklärung der an der 5-Hydroxytryptamin-Synthese beteiligten Gene & Enzyme:

Die genetischen Grundlagen der Serotonin-Synthese konnten erst über 20 Jahre nach Entdeckung der einzelnen metabolischen Schritte aufgeklärt werden.

Im Jahr 1987 verwendeten Grenett et al. einen Antikörper, der gegen die, zu diesem Zeitpunkt schon klonierte und charakterisierte, Phenylalanin-Hydroxylase aus der

Ratte (rPAH) gezogen wurde. Diesen setzte er gegen Klone ein, die eine Expressions-Bibliothek aus Kaninchen-Zirbeldrüsen exprimierten. Da die Zirbeldrüse, wie bereits durch Lovenberg et al. festgestellt, keine Phenylalanin-hydroxylierende Aktivität aufwies, versuchte man aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität des Antikörpers eine hypothetische Tryptophan-Hydroxylase (raTph) mit hoher Homologie zur Pah zu finden. Markierte copy DNA (cDNA) immunoreaktiver Klone zeigte schließlich Hybridisierung in Zirbeldrüse und Hirnstamm, allerdings nicht in der Leber (Grenett et al., 1987). Der bei Sato et al. zum Einsatz gekommene maligne Mastzelltumor der Maus erlaubte es schließlich auch einen Verantwortlichen *Tph*-Lokus im Mausgenom zu finden (Stoll et al., 1990).

Auf dieser Grundlage wurden etwa zehn Jahre später erste Knockout-Modelle der Maus veröffentlicht. Auffällig war dabei die starke, allerdings nicht vollständige, Reduktion der 5-HT Spiegel in Blut und Darm bei unveränderten Spiegeln im Gehirn (Cote et al., 2003; Walther, Peter, Bashammakh, et al., 2003). Dies legte mindestens einen weiteren Genlokus nahe. Ein solcher konnte 2008 und 2009 in zwei unabhängigen Mausmodellen inaktiviert werden (Alenina et al., 2009; Savelieva et al., 2008). Das duale Konzept einer TPH1, zuständig für die 5-HT Spiegel in der Peripherie und einer TPH2, zuständig für die 5-HT Spiegel im Gehirn, entstand. Während ein TPH2-Knockout Tier keinerlei nachweisbares Serotonin im Gehirn besaß, war allerdings weiterhin nicht erklärbar, dass weder der TPH1-Knockout noch der TPH1-TPH2-Doppelknockout in der Lage war die Serotonin-Spiegel im Blut unter 10% der Wildtyp-Spiegel zu senken (Savelieva et al., 2008).

5.2 Evolutionäre Entstehung verschiedener biochemische Wege der 5-HT-Synthese als Teil des hoch konservierten Indol-Stoffwechsels

5.2.1 Evolutionäre Konservierung & Phylogenetische Verteilung 5-HTs:

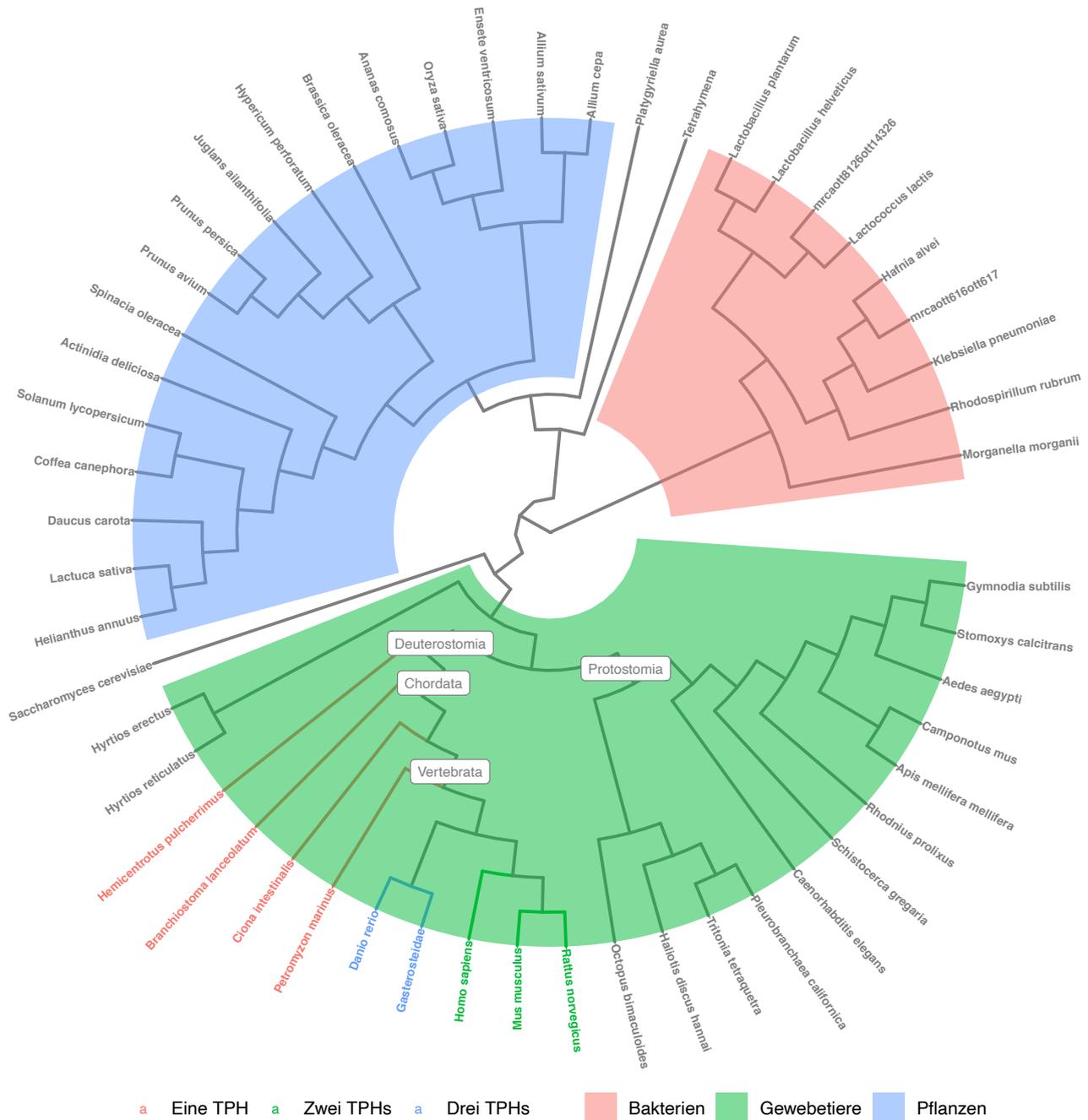


Abbildung 2: Evolutionäre Konservierung Serotonins über Spezies und Domänen.

Synthetischer Stammbaum zur Darstellung der phylogenetischen Verhältnisse von Spezies, in denen bisher Serotonin nachgewiesen werden konnte. Domänen sind farbig unterlegt. Die Anzahl der in Spezies nachgewiesenen TPHs ist durch farbigen Text dargestellt. Der Stammbaum stellt einen Auszug aus dem „Open Tree of Life“ durch die rot1 API anhand der Literatur dar (Michonneau et al., 2016). Die DOIs der zur Generierung verwendeten Literatur finden sich in Tabelle 11.

Betrachtet man stammesgeschichtlich in welchen Organismen 5-HT bisher nachgewiesen werden konnte, so ergibt sich das Bild, dass 5-HT phylogenetisch erheblich älter ist als das zentralnervöse oder periphere serotonerge System komplexer Gewebetiere.

Organismen, in denen 5-HT nachgewiesen werden konnte (für repräsentativen Auszug aus dem open tree of life siehe Abbildung 2), finden sich weit verteilt über die Domänen der Eukaryoten und Bakterien, allerdings nicht in der Domäne der Archäen (Shmukler & Nikishin, 2022).

5.2.2 Konservierung 5-HTs als Teil des Indol-Stoffwechsels:

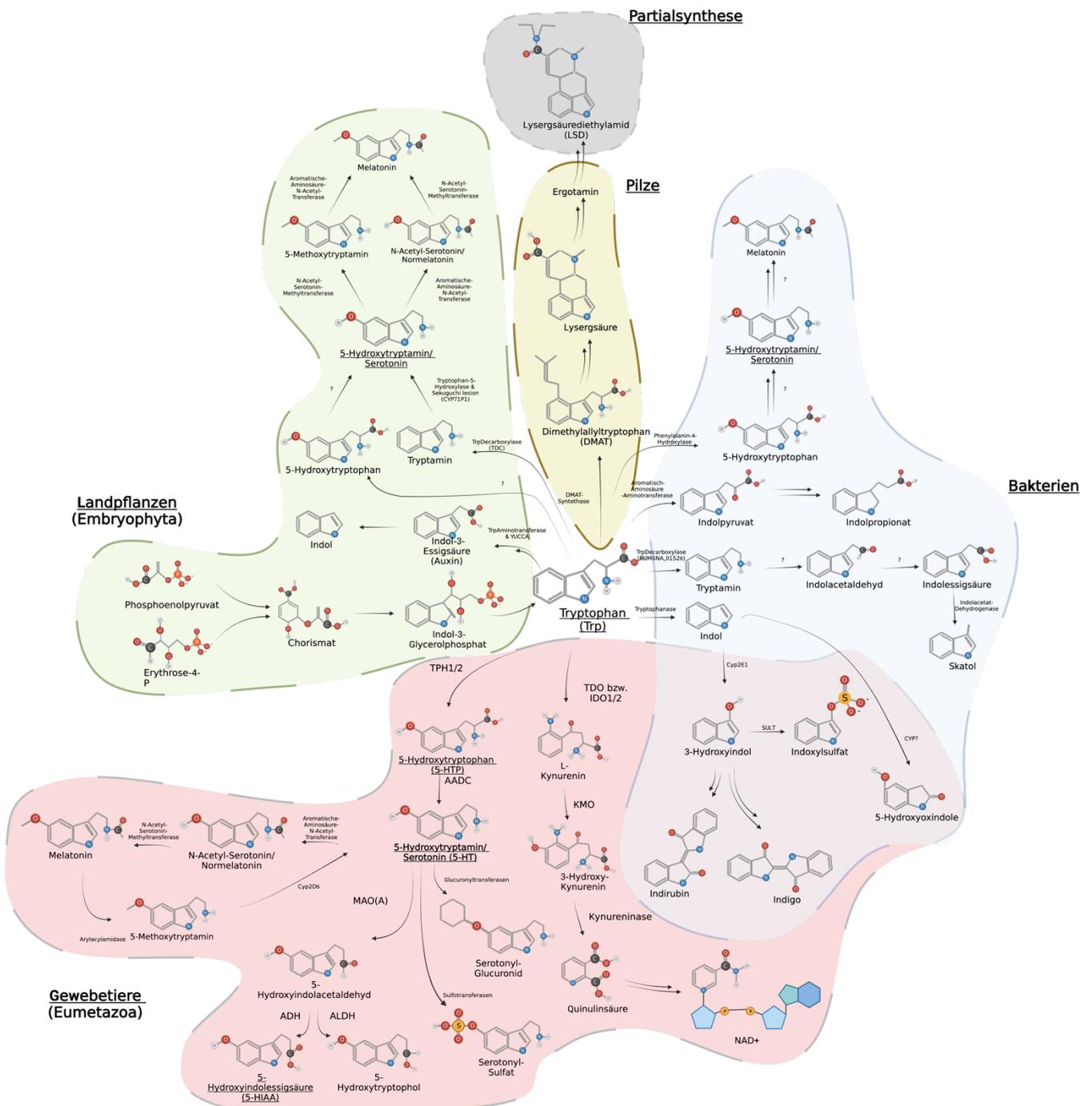


Abbildung 3: Überblick über den Indolstoffwechsel.

Die Abbildung zeigt exemplarisch den Stoffwechsel Indol-haltiger Moleküle in Landpflanzen, Pilzen, Bakterien und Tieren, sowie die halbsynthetische Erzeugung des Lysergsäurediethylamids anhand der Literatur (Agus et al., 2018; Cervenka et al., 2017; Crumeyrolle-Arias et al., 2008; Hardeland, 2010; Korasick et al., 2013; Krishnaswamy et al., 2004; Lee et al., 2015; Li et al., 2021; Maeda & Dudareva, 2012; Nichols, 2018; Roager & Licht, 2018; Williams et al., 2000). Die jeweiligen Domänen bzw. Reiche, in denen sich die gezeigten Reaktionen finden, sind farbig unterlegt. Wo bekannt, sind die Namen der beteiligten Enzyme neben dem Reaktionspfeil aufgeführt. Werden Intermediate bzw. chemische Schritte graphisch ausgelassen, findet sich ein Doppelpfeil.

Das ubiquitäre Vorkommen 5-Hydroxytryptamins führen Azmitia et al. auf dessen Stellung im Indol-Stoffwechsel zurück. Dieser stellt in nahezu allen Organismen wichtige Photo- und Redox-aktive Moleküle und Signalstoffe bereit und ist somit essenziell für die Existenz von Leben überhaupt (Azmitia, 2020). Das Wort Indol selbst beschreibt Benzopyrrol, eine bi- & heterozyklische, aromatische Verbindung mit der Summenformel C_8H_7N , welche als entscheidender chemischer Rest in vielen biologisch aktiven Molekülen und über nahezu alle Spezies hinweg vorkommt (Kumari & Singh, 2019). Im Jahr 2014 waren durch die FDA 17 indolische Verbindungen als Humanarzneimittel zugelassen. Die größte Gruppe stellten dabei Arzneimittel dar, die, wie 5-HT oder Melatonin, C3- und C5-disubstituiert waren (Vitaku et al., 2014). Die organisch-chemische Synthese Indols erfolgt industriell meist ausgehend von Benzol-Verbindungen, welche mit Stickstoff-haltigen funktionellen Gruppen substituiert sind, etwa Anilin, Nitrotoluol oder Nitrobenzol (Kumari & Singh, 2019).

Die Biosynthese Indol-haltiger Verbindungen in Lebewesen verläuft über den Shikimat-Weg. Dieser findet sich evolutionär konserviert über alle Prokaryoten und einfachen Eukaryoten, sowie in Pflanzen. In Gewebetieren ist er verloren gegangen, weshalb diese indolische Moleküle aus alimentär aufgenommenem Tryptophan synthetisieren müssen (Mir et al., 2015).

Im Shikimat-Weg entsteht aus Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (E4P), zwei Intermediaten des Zuckerstoffwechsels, Chorismat. Chorismat bildet den Ausgangspunkt für die Synthese einer Vielzahl biologisch wichtiger aromatischer Naturprodukte, unter anderem Phylloquinon (Vitamin K1), Folat (Vitamin B9), Tocopherole (E-Vitamine), sowie die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Der Indol-Stoffwechsel beginnt mit der Entstehung von Indol-3-Glycerolphosphat (I3GP) aus Chorismat. I3GP kann wiederum entweder in Tryptophan oder direkt zu Indol umgesetzt werden (Maeda & Dudareva, 2012).

In Bakterien wird Tryptophan zu verschiedenen Indolen katabolisiert. Diese dienen hier als wichtige Signalmoleküle. Zum einen in der Kommunikation innerhalb der Art, so sind Indole an der Regulation von antibiotischer Toleranz, Quorum sensing, Biofilm-Entwicklung und Regulation der Virulenz beteiligt, zum anderen dienen sie der Kommunikation über die Speziesgrenze hinweg. Im Boden lebende Bakterien etwa modulieren durch Indole Pflanzenwachstum und die Kommensalen des menschlichen alimentären Traktes produzieren indolische Liganden des Aryl-Hydrocarbon-

Rezeptors (AhR) der an der Regulation epithelialer Barrieren, des hepatischen Xenometabolismus und gastro-intestinaler Immunität beteiligt ist (Agus et al., 2018; Lee et al., 2015; Li et al., 2021; Roager & Licht, 2018).

In Pflanzen dienen sowohl Tryptophan als auch Indol als Ausgangspunkt für die Synthese von Auxinen wie Indol-3-Essigsäure, welche Wachstumsprozesse - etwa relativ zum einfallenden Sonnenlicht - regulieren (Korasick et al., 2013). Vom Tryptophan aus findet die Synthese von Phytoserotonin statt. Für dieses sind Aufgaben in Wachstum, Reproduktion und Seneszenz von Pflanzen beschrieben. Prominenz erhält es allerdings primär als Intermediat zum Phytomelatonin, einer der wichtigsten Antioxidanzien und ein bedeutender Faktor der Stress-Toleranz in Pflanzen (Gonçalves et al., 2022).

Indol selbst wird aus Mais als Reaktion auf den Angriff durch Herbivore freigesetzt (Lee et al., 2015).

5.2.3 Enzymatische Mechanismen der Indol-5-Hydroxylierung in verschiedenen Spezies:

Wie in Abschnitt 5.2.2 herausgearbeitet scheinen C3- und C5-Substitutionen des Indols mit besonderer biologischer Aktivität einherzugehen. Es ist daher auch einleuchtend, dass sich die C5-Hydroxylierung des Indols, welche auch den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der 5-HT Synthese in Vertebraten darstellt, evolutionär mehrfach entwickelt hat.

Die Hydroxylierung des Indol-Rings ist durch zwei prominente Enzymfamilien beschrieben: die Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (CYPs) und die Tetrahydropterin-abhängigen Aromatischen Aminosäure-Hydroxylasen (AAAHs) (Fitzpatrick, 1999).

5.2.3.1 Die Familie der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs):

Phytoserotonin nimmt wie bereits erwähnt in Pflanzen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl an Prozessen ein und lässt sich in einer Vielzahl von Spezies nachweisen. Die Konzentration in Geweben liegt dabei typischerweise höher als in Säugetieren (Erland et al., 2016). Interessanterweise scheinen die, wie im Folgeabschnitt herausgearbeitet wird, zwischen Eukaryoten und Prokaryoten konservierten, hoch-spezifischen AAAHs im Reich der Landpflanzen (*Embryophyta*) verloren gegangen zu sein. Stattdessen findet in Pflanzen ein alternativer biochemischer Weg Anwendung

bei dem es erst zur Decarboxylierung Tryptophans zu Tryptamin durch eine pflanzliche AADC kommt und anschließend eine 5-Hydroxylierung des Indol-Rings zu Serotonin. Die auch hier Geschwindigkeits-bestimmende Hydroxylierung wird von mikrosomalen Cytochrom-abhängigen Enzymen ausgeführt, im Reis sind dies die Genprodukte der Gene *sekiguchi lesion (cyp17p1)* und *tryptophan-5-hydroxylase (t5h)* (Fujiwara et al., 2010; Kang et al., 2007). Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass in *Hypericum perforatum* auch ein Syntheseweg beschrieben ist, in dem die 5-Hydroxylierung vor der Decarboxylierung stattfindet, ein verantwortliches Gen oder Genprodukt ist bisher nicht bekannt (Bhowal et al., 2021; Murch et al., 2000). Eine CYP-abhängige Indol-5-Hydroxylierung in Wirbeltieren konnte bisher nicht gefunden werden. Es gibt lediglich Hinweise auf eine Umsetzung Indols, als kommensales Stoffwechselprodukt, zu 5-Hydroxyoxindol in Mikrosomen aus ZNS und Leber von Schafen und Ratten (Crumeyrolle-Arias et al., 2008).

5.2.3.2 Die Familie der Tetrahydropterin-abhängigen Aromatischen Aminosäure-Hydroxylasen (AAAHs) und ihre Konservierung über verschiedene Spezies:

Die Familie der AAAHs stellt die kleinere der beiden Gruppe dar mit bedeutend weniger Vertretern, sie ist allerdings die Gruppe mit der höheren Substrat-Spezifität. Sie enthält Phenylalanine-Hydroxylasen (PAHs), Tyrosin-Hydroxylasen (THs) und Tryptophan-Hydroxylasen (TPHs). Allen Mitgliedern ist ein enzymatischer Mechanismus gemein in dem zweiwertiges, nicht-Häm-gebundenes Eisen und Tetrahydropterine als Kofaktoren eingesetzt werden und ein Atom molekularen Sauerstoffs auf das Substrat übertragen wird, während das andere Sauerstoff-Atom durch die Oxidation Tetrahydropterins (BH₄) zu Wasser reduziert wird (Fitzpatrick, 1999).

5.2.3.2.1 Vertebraten:

Die in Abschnitt 5.2 vorgestellte dichotome Serotonin-Synthese über eine TPH1 sowie -2 findet sich wahrscheinlich in allen Vertebraten, wobei nennenswert ist, dass in einigen Spezies der echten Knochenfische (*Teleosten*), etwa dem als Modellorganismus bedeutenden Zebrafisch (*Danio rerio*), eine Gen-Duplikatur zur Existenz dreier dezidierter Tryptophan-Hydroxylasen (*tph1a*, *tph1b*, *tph2*) geführt hat (Lv et al., 2020; Xu et al., 2019). Einen Grenzfall dieses Dogmas stellen weiterhin die kieferlose Vertebraten (*Cyclostomata*) Meerneunaugen (*Petromizus marinus*) dar. In ihnen wurde bisher genetisch nur eine TPH nachgewiesen. Allerdings weisen

periphere Serotonin-positive Zellen in denen Sonden gegen die bisher dokumentierte TPH-Kopie nicht hybridisieren auf die Existenz eines weiteren 5-HT synthetisierenden Enzyms, möglicherweise eines Paralogs wie in anderen Vertebraten, hin (Cornide-Petronio et al., 2013).

5.2.3.2.2 Wirbellose Chordata:

Innerhalb der wirbellosen *Chordata* finden sich phylogenetisch die *Cephalochordata* und die Manteltiere (*Tunicata*). In Lanzettenfischen (*Brancheostoma lanceolatum*) als Vertreter der *Cephalochordata* und in Schlauchseescheide (*Ciona intestinalis*) als Vertreter der Manteltiere wurde jeweils eine einzelne dezidierte TPH nachgewiesen (Candiani et al., 2012; Pennati et al., 2007). Cornide-Petronio et al. stellen daher die Vermutung auf, dass die Gen-Duplikation, welche der TPH-Dichotomie zugrunde liegt, evolutionär zwischen *Chordata* und *Vertebraten* zu verordnen ist (Cornide-Petronio et al., 2013).

5.2.3.2.3 Weitere Deuterostomier:

Die den *Chordata* übergeordnete Gruppe der Neumünder (*Deuterostomia*) enthält unter anderem noch die Stachelhäuter (*Echinodermata*). In Seeigeln (*Echinoidea*) als deren Vertretern wurde ebenfalls nur eine TPH gefunden (Yaguchi & Katow, 2003).

5.2.3.2.4 Protostomier:

Den Neumündern steht phylogenetisch die paraphyletische Stammgruppe der Urmünder (*Protostomia*) gegenüber. Während Serotonin in einer Vielzahl dieser Organismen in Vorkommen und Physiologie zumindest teilweise erfasst ist, sind die genauen biochemischen Synthesewege, sowie deren genetische Grundlage nur für die Stämme der *Arthropoden* und *Nematoden* am Beispiel der prominenten Modellorganismen *Drosophila melanogaster* sowie *Caenorhabditis elegans* beschrieben.

In beiden Organismen konnte je eine dezidierte TPH und PAH gefunden werden. Auffällig dabei ist, dass eine hohe Affinität der Enzyme gegenüber dem Substrat des jeweilig Anderen besteht. Eine genetische oder pharmakologische Störung der Aktivität des einen Enzyms, führt auch zu einem messbaren Sinken des Produktes des jeweilig anderen Enzyms. Zusammen mit der Verteilung auf neuronale und nicht-neuronale Gewebe liegt eine funktionelle Entsprechung der PAH gegenüber der TPH1 und der TPH der TPH2 in Vertebraten nah (Alcañiz & Silva, 1997; Coleman & Neckameyer, 2005; Loer et al., 1999; Sze et al., 2000).

5.2.3.2.5 Einfache Eukaryoten:

Schwämme stellen einen der einfachsten und ältesten Stämme der Gewebetiere (*Metazoa*) dar und werden nicht zu den echten Gewebetieren (*Eumetazoa*) gezählt. Auch in diesen simplen Vielzellern ist Serotonin nachweisbar (Salmoun et al., 2002). Allerdings ist in diesen Tieren bislang nur eine PAH aber weder eine TPH noch eine TH entdeckt worden (Wiens et al., 1998). Wiens et al. schlossen aus einem Vergleich der Homologie zwischen der ursprünglichen PAH des Schwamms *Geodia cydonium* und der rezenten rTPH und rTH, dass es zunächst zur Genduplikatur der PAH mit Entwicklung zur TH gekommen sein muss und dies etwa 500 Millionen Jahre zurückliegen und evolutionär auf dem Weg zur Entstehung der *Eumetazoa* geschehen sein muss. Die Entwicklung einer TPH aus der PAH sei demnach rezenter (Wiens et al., 1998).

In einzelligen Eukaryoten beispielsweise der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) kann Serotonin nachgewiesen werden und im Fall der Bäckerhefe ist sogar ein biochemischer Syntheseweg mit Abhängigkeit von Tryptophan im Nährmedium beschrieben, allerdings fehlen für diesen Organismus Hinweise auf das Vorkommen einer endogenen AAH (Mas et al., 2014; Sprenger et al., 1999; Zhang et al., 2016). Diese ist in den eukaryoten Einzellern *Dictyostelium discoideum* und *Tetrahymena* als PAH beschrieben (Csaba, 2015; Sanford & Orias, 1981; Siltberg-Liberles et al., 2008). Für die PAH aus *Dictyostelium discoideum* existieren außerdem experimentelle Beweise für eine hohe Affinität gegenüber Tryptophan und dem Umsatz von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) in vitro. Tyrosin wurde hierbei nicht zu DOPA umgesetzt (Siltberg-Liberles et al., 2008).

Diese Kreuzaffinität der PAH Tryptophan gegenüber scheint entsprechend von eukaryoten Einzellern bis zu Säugetieren konserviert, da die rPAH in vitro dasselbe Verhalten gegenüber Tryptophan bzw. Tyrosin zeigt (Fitzpatrick, 1999).

5.2.3.2.6 Prokaryoten

Ursprüngliche AAHs scheinen sogar über die Aufspaltung zwischen Prokaryoten und Eukaryoten hinweg konserviert zu sein. Hierauf weisen Homologien zwischen Vertebraten-AAHs und der PAH aus *Proteobacterien* hin, welche etwa aus *Chromobacterium violaceum* und *Pseudomonaden* kloniert wurde (Leiros et al., 2007). Es wurde lange angenommen, dass bakterielle PAHs lediglich eine Rolle im Phenylalanin-Katabolismus spielen, welcher auf die Gewinnung von Kohlenstoff und

Stickstoff abzielt. Allerdings zeigt eine neue Studie die Umsetzung von Tryptophan zu 5-HTP durch die PAH aus *Pseudomonas fluorescens* und die Unterbrechung der endogenen Melatonin Produktion in dieser Spezies durch genetische Deletion (Jiao et al., 2021). Dies könnte auch die Detektion von Serotonin in einer hohen Anzahl bakterieller Spezies erklären (Oleskin et al., 2016).

5.3 Das periphere serotonerge System in adulten Vertebraten:

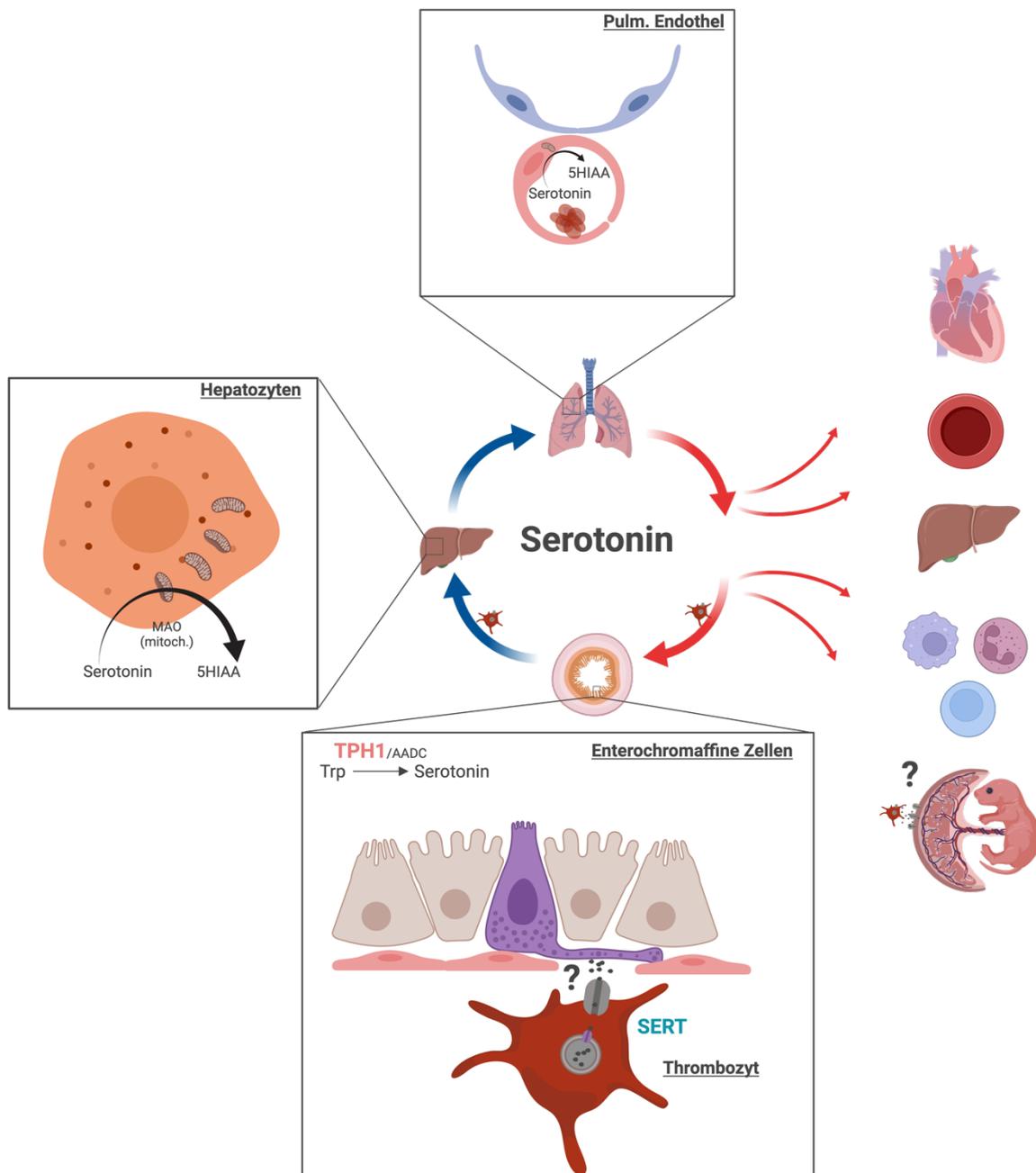


Abbildung 4: Das periphere serotonerge System.

Schematische Darstellung des peripher-serotonergen Kreislaufes von der Synthese in Enterochromaffinen Zellen, über die Abgabe ins Portalblut und die Aufnahme in Thrombozyten, zum Abbau in Leber und Lungen. Weiterhin sind Organe gezeigt, für die eine parakrine Freisetzung Thrombozyten-gebundenen Serotonins nachgewiesen werden konnte. Organe, die eine autokrine Synthese und Abgabe aufweisen, wie Fett, Brustdrüsen und endokrine Zellen des Pankreas, sind entsprechend nicht gezeigt (Amireault et al., 2013; Mammadova-Bach et al., 2018). Da die Abgabe enterischen Serotonins ins Portalblut über basale Fortsätze, sowie die Aufnahme über die Plazentaschranke zwar in der Literatur angenommen werden, aber noch nicht abschließend bewiesen sind, sind diese Prozesse mit einem Fragezeichen markiert.

5.3.1 Tryptophan – Aufnahme, Verteilung, Konkurrierende biosynthetische Wege & Einfluss auf 5-HT Spiegel:

Tryptophan ist nach molekularem Gewicht mit 204,23 g/mol die schwerste der zwanzig kanonischen Aminosäuren in Tieren, sowie eine von acht essenziellen Aminosäuren. Der menschliche Tryptophan Bedarf liegt zwischen 3.5 und 6 mg/kg/d und wird von der WHO mit 4 mg/kg/d angegeben (Agus et al., 2018; Richard et al., 2009). Beispiele für Lebensmittel, in denen eine große Menge Tryptophan vorkommt, sind Milch-Produkte, Fisch, Fleisch und Nüsse. Neben der Konzentration an Tryptophan pro Gewichtseinheit muss auch immer der Quotient zwischen Tryptophan und den anderen großen, neutralen Aminosäuren (large neutral amino acids, LNAAs; auch competing amino acids, CAAs) betrachtet werden, da diese um die Bindung an Transporter konkurrieren. Der höchste Anteil an Tryptophan in beiden Metriken besitzt Vollmilch (Richard et al., 2009).

Der Transport aus dem Darmlumen findet, genau wie der Transport über die Blut-Hirn-Schranke (blood-brain-barrier, BBB) oder der Rücktransport ins Blut aus dem renalen Tubulus, über die Large neutral amino acid transporter 1-4 (LAT1/ SLC7A5, LAT2/ SLC7A8, LAT3/ SLC43A1, LAT4/ SLC43A2), sowie den SLC6A19 statt (Cervenka et al., 2017; Kandasamy et al., 2018).

Nach Aufnahme über die apikale Zellmembran in Enterozyten (ECs) oder enterochromaffine Zellen im Dünndarm werden ca. 95% des aufgenommenen Tryptophans basolateral über SLC16A10 wieder an das Blut abgegeben. Circa 1-3% verbleiben in den enterochromaffinen Zellen und dienen hier der TPH1-abhängigen Serotonin-Synthese (Cervenka et al., 2017; Kandasamy et al., 2018). Das in das Blut abgegebene Trp wird zu 75-95% an Albumin gebunden (Richard et al., 2009). Dabei konkurriert es mit freien Fettsäuren (free fatty acids, FFAs) um die Bindung. Eine Erhöhung der FFA-Konzentration, etwa durch adrenergen Stimulus, geht entsprechend auch immer mit einer Freisetzung von Trp aus Albumin einher (Mc & Oncley, 1958).

Der Großteil des im Plasma vorhandenen Trp wird in der Leber über die Tryptophan-Dioxygenase (TDO) oder nach Interferon-Stimulus in Epithelien und Immunzellen über eine der beiden Indol-Dioxygenasen (IDO 1/2) über den Kynurenin-Pathway (Abbildung 3) katabolisiert. Dabei entstehen als Endprodukte eine Vielzahl biologisch aktiver Substanzen, prominenterweise das Redoxäquivalent NAD. Auf diesem Weg werden ca. 90-95% des aufgenommenen Trp verstoffwechselt (Cervenka et al., 2017).

Bezogen auf das Holoproteom über alle Taxa hinweg, macht Tryptophan mit ungefähr 2% den geringsten Anteil aller proteinogenen Aminosäuren aus (Bogatyreva et al., 2006).

Dies spiegelt sich auch in der Verteilung auf die Stoffwechselwege des mit der Nahrung aufgenommenen Tryptophans wider. Nur 1% des aufgenommenen Trp dienen, vor Allem in der Leber, der Proteinsynthese (Cervenka et al., 2017). Das Gehirn schöpft nur einen geringen Anteil des Plasma-Tryptophan aus, wovon wiederum ein geringer Anteil der TPH2-abhängigen Serotonin-Synthese zugeführt werden. Allerdings werden an der BBB hoch-affine Isoformen der LATs exprimiert, welche mit der starken Albumin-Bindung Tryptophans konkurrieren können (Boado et al., 1999).

Ein variabler einstelliger Prozentteil des mit der Nahrung aufgenommenen Tryptophans wird nicht im Dünndarm aufgenommen und gelangt ins Kolon, wo es bakterieller Degradation unterliegt und den in Abschnitt 5.2 beschriebenen Indol-Kreislauf speist (Agus et al., 2018).

Schwankungen in der alimentären Trp-Aufnahme scheinen in engem zeitlichem Rahmen primär die zentralnervöse Serotonin-Synthese zu betreffen und äußern sich im Menschen durch neuropsychiatrische Symptome (Carpenter et al., 1998; Richard et al., 2009).

Bei andauernder Unterversorgung tritt dann der Mangel an NAD als Produkt des Kynurenin-Stoffwechsels in den Vordergrund. Es kommt zu Pellagra, einem Syndrom aus Dermatitis, Diarrhoen und Delir. Dieses kann sowohl bei der direkten Unterversorgung mit Niacin (Vitamin B3) als Vorstufe des NADs, als auch durch Unterversorgung oder Verlust von Tryptophan, etwa renal im Rahmen der Hartnup-Erkrankung, auftreten (Hołubiec et al., 2021; Kandasamy et al., 2018).

5.3.2 Die Enterochromaffinen Zellen des Darms als Ursprung peripherer 5-HT Spiegel:

Etwa 95% des im Körper vorhandenen Serotonins wird TPH1-abhängig in den enteroendokrinen Zellen des gastro-intestinal Traktes synthetisiert und hier sowie im Blut gespeichert (Gershon & Tack, 2007).

5.3.2.1 Enterochromaffine Zellen als Teilpopulation der Enteroendokrinen Zellen:

Enteroendokrine Zellen, historisch auch APUD (amine precursor uptake and decarboxylation) Zellen oder neuroendokrine Zellen genannt, sind histoanatomisch Teil der gastro-intestinalen Mukosa und machen etwa 1% aller Epithelzellen über den gesamten gastro-intestinal Trakt (GIT) hinweg aus (Gunawardene et al., 2011; H. J. Li et al., 2011). Morphologisch zeichnen sie sich durch apikale sowie basale Zellfortsätze, sowie apikale Villi aus. Ultrastrukturell können, neuronalen Geweben ähnlich, large dense core vesicles (LDCVS) und synaptic-like microvesicles (SLMVs) beobachtet werden. Histologische Marker aller Subpopulationen sind Chromogranin A (CgA) und Synaptophysin (Syn) (Gunawardene et al., 2011). Aufgrund der Gemeinsamkeiten mit neuronalen Geweben und den neuroendokrinen Zellen des sympathischen Nervensystems wurde ontogenetisch lange die Neuralleiste als Ursprung der EECs angenommen. Mittlerweile ist allerdings durch lineage-tracing und genetische Ablations-Experimente in Mäusen und kultivierten Zellen hinreichend belegt, dass EECs auf LGR5-positive Stammzellen am Boden der mukosalen Krypten zurückgehen, welche auch die Stammzell-Population für die resorptiven Enterozyten und sezernierende, jedoch endokrin inaktive Zellreihen wie Becher- oder Paneth-Zellen darstellen. Damit steht ein endodermaler Ursprung fest (Engelstoft et al., 2013; H. J. Li et al., 2011). Das Erlangen Neuronen-ähnlicher Merkmale im Laufe der Differenzierung, hängt eng mit der Expression von basischen Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (bHLHs) zusammen, welche auch in der neuronalen Differenzierung eine Rolle spielen (H. J. Li et al., 2011). Im Zuge der Wanderung, von der sich am Kryptenboden befindlichen Stammzelle ausgehend, Lumen-wärts, kommt es bei sich sekretorisch differenzierenden Zellen zunächst zur Expression des bHLHs Math1. Die Weiterdifferenzierung zu einer Enteroendokrinen Zelle erfolgt durch die transiente Expression des bHLHs Neurogenin3 (Engelstoft et al., 2013). Auffällig in der Gewebeverteilung der EECs ist, dass diese solitär vorkommen. Dies wird über den Zellmembran-ständigen Notch-Rezeptor vermittelt. EECs exprimieren Notch-Liganden, wobei es bei Aktivierung des Notch-Rezeptors einer benachbarten Zelle in dieser zur Expression des hairy/enhancer of split (HES) kommt, welcher sich bHLHs gegenüber als transkriptioneller Repressor verhält (H. J. Li et al., 2011).

Nach vollständiger Differenzierung entstehen je nach Lokalisation verschiedene Zelltypen. Man unterscheidet zwischen Histamin, Gastrin oder Ghrelin sezernierenden, gastrischen EECs und intestinalen EECs, die eine Reihe von

Peptidhormonen mit vielfältigen Aufgaben in der metabolischen Regulation sezernieren. Zwischen den intestinalen Zellreihen scheint eine erhebliche Überschneidung in den sezernierten Peptiden zu bestehen. Weiterhin existieren pangastro-intestinale EECs. Diese werden unterteilt in Somatostatin-exprimierende D-Zellen und TPH1-abhängig Serotonin-synthetisierende enterochromaffine Zellen (Engelstoft et al., 2013).

Die Enterochromaffinen Zellen stellen die zahlenmäßig mit Abstand größte EEC-Population dar. Sie machen im proximalen Dünndarm etwa 70% aller EECs aus und sinken dann in ihrer Häufigkeit entlang des GIT auf etwa 40% im Rektum ab (Gunawardene et al., 2011).

5.3.2.2 Physiologie enteroendokriner Zellen mit Fokus auf enterochromaffinen Zellen:

Als sekretiver Stimulus für EECs sind eine Vielzahl von Reizen beschrieben, etwa Glucose, Fettsäuren verschiedener Länge, Gallensäuren, Geruchs- & Reizstoffe, sowie Produkte des Indol-Stoffwechsels (Gribble & Reimann, 2016). Dabei scheinen enteroendokrine Zellen eine elektrische erregbare Zellpopulation darzustellen. So ist für verschiedene EEC Subpopulationen das Auslösen eines Aktionspotentials nach GLUT2-abhängiger Glucose-Aufnahme und K_{ATP} -Aktivierung, ähnlich wie in pankreatischen beta-Zellen, und nach elektrogener Aufnahme von Aminosäuren beschrieben (Psichas et al., 2015). Spezifische Stimuli für die enterochromaffine Teilpopulation scheinen dabei Glucose via GLUT1, FFAs via FFAR 1 & 3, Irritantien via TRPA1, mikrobielle Fettsäuremetabolite via Olfr558, Einzelstrang-RNA (ssRNA) via Piezo1, sowie Dehnung via Piezo2 zu sein (Alcaino et al., 2018; Bellono et al., 2017; Martin et al., 2017; Sugisawa et al., 2020).

5.3.2.3 Modi der 5-HT Sekretion durch enterochromaffine Zellen:

Es sind vier Modi der Serotonin-Sekretion durch Enterochromaffine Zellen bekannt: luminal, parakrin, synaptisch und endokrin.

Die luminale und die parakrine Abgabe von 5-HT mit Effekten direkt auf die Darmwand ist im Rahmen von Inflammation und seröser Sekretion beschrieben (Gunawardene et al., 2011; Liu et al., 2021; Mawe & Hoffman, 2013). Ein Teil der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) des myenterischen Plexus der Darmwand lässt sich durch 5HT-Rezeptor-Antagonisten unterbinden, weiterhin können Propulsionen durch intraluminale 5-HT Gabe ausgelöst werden. Die daher lange angenommene Auslösung peristaltischer Reflexe nach Wanddehnung durch TPH1-abhängige

Serotonin Sekretion steht mittlerweile auf Grundlage von Knockout-Modellen gegenüber der TPH2-abhängigen Serotonin-Sekretion durch enterische Neurone in Frage, wobei eine modulierende Rolle TPH1-Serotonins in vivo diskutiert wird (Gershon, 2013; Mawe & Hoffman, 2013).

Die Präsenz von basalen Fortsätzen in enteroendokrinen Zellen ist seit langem bekannt und wurde erstmalig in der enterochromaffinen Teilpopulation entdeckt (Gunawardene et al., 2011; Wade & Westfall, 1985). Neuartige lichtmikroskopische Verfahren machten es in den letzten Jahren möglich, diese Fortsätze näher zu beurteilen, wobei eine hohe Ähnlichkeit zu synaptischen Boutons auffiel (Bohórquez & Liddle, 2011). Bellono et al. konnten 2017 nach Stimulation enterochromaffiner Zellen Potentiale in Neuronen der Darmwand ableiten, welche durch Serotonin-Antagonisten unterbunden werden konnten (Bellono et al., 2017). Für Cholecystokinin (CCK)- und Peptid YY (PYY)-positive enteroendokrine Subpopulationen sind solche spezifischen, in diesem Fall glutamatergen, Aktionspotentiale bereits bis auf die Ebene Rückenmarks-naher, vagaler Ganglien zurückverfolgt worden (Kaelberer et al., 2018). Damit liegt ein spezifischer synaptischer Modus der Sekretion zwischen Enteroendokrinen Zellen und Neuronen nahe.

Ob die endokrine Abgabe Serotonins durch basale Fortsätze direkt ins Blut des Portalkreislaufs geschieht oder nach Abgabe in die Lamina Propria durch Diffusion ist unklar (Liddle, 2018).

5.3.3 Verteilung enterischen 5-HTs über Thrombozyten im Körper:

Im Blut wird das gelöste 5-HT durch den hochaffinen Serotonin Reuptake Transporter (SERT), welcher auch das Ziel der meisten modernen Antidepressiva darstellt, in zirkulierende Thrombozyten aufgenommen (Mammadova-Bach et al., 2018). Innerhalb der Thrombozyten kommt es zur Sequestrierung in delta-Granula (dense-Granules) durch den Vesikulären Monoamintransporter 2 (VMAT2) (Holtje et al., 2003). Diese Granula endosomalen Ursprungs sind neben den alpha-Granula, welche eine Vielzahl an sekretorischen Peptiden speichern, und den Lysosomen eine der drei klassischen Granula-Spezies, welche in Thrombozyten vorkommen. Neben Serotonin enthalten sie Phosphate, Purin-Nukleotide und Ionen (Chen et al., 2018; Mammadova-Bach et al., 2018). Nach Stimulation eines Thrombozyten, typischerweise durch Interaktion von, an das Subendothel gebundenem, von Willebrand Faktor (vWF) und

dem Gplb, kommt es Potential-unabhängig zur IP₃-abhängigen Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern, welche wiederum zur Calcium-abhängigen Vesikel-Fusion und zur Exozytose von Serotonin führen (Mammadova-Bach et al., 2018). Dabei führt Serotonin, neben den Effekten an seinen vaskulären Zielzellen, zu einer positiven Rückkopplung mit vermehrter Fusion von Vesikeln am Thrombozyten. Dies geschieht entweder über die Aktivierung des 5HT_{2A}-Rezeptors (5HT_{2A}R) oder nach SERT-abhängiger Wiederaufnahme und durch kovalente Seronylierung kleiner G-Proteine mit Serotonin durch Transglutaminasen (Walther, Peter, Winter, et al., 2003). Entsprechend zeigen Sert^{-/-} Mäuse eine verlängerte Blutungszeit (Mammadova-Bach et al., 2018). Nach bisherigem Dogma führen Aktivierung und Degranulation auch zwangsläufig zur Aggregation mit anschließendem Abbau der Thrombozyten. Cloutier et al. konnten allerdings 2018 zeigen, dass durch Immunkomplexe aktivierte Thrombozyten nach Serotonin-Freisetzung wieder mit geleerten Granula in die Zirkulation zurückkehren (Cloutier et al., 2018). Somit sind nun auch Aggregations-unabhängige Funktionen von in Thrombozyten gespeichertem Serotonin denkbar.

Die Existenz von biologisch aktivem frei zirkulierendem Serotonin im Plasma, wird kontrovers diskutiert. So gehen einige Autoren in ihrer Hypothesen-Bildung zweifelsfrei von dessen Existenz aus (Hadden et al., 2017). In einer großen Meta-Analyse konnten für humane Plasma-Proben, aufgrund einer hohen Varianz zwischen den einzelnen einbezogenen Studien, keine einheitlichen Normwerte für Thrombozyten-armes Plasma bzw. freies Serotonin festgelegt werden. Es wurde vermutet, dass es bei der Entnahme von Blut aufgrund der Aktivierbarkeit von Thrombozyten durch Endothelschäden und Fremdoberflächen leicht zur Kontamination mit thrombozytärem 5-HT kommt. (Brand & Anderson, 2011).

5.3.4 Inaktivierung zirkulierenden 5-HTs:

Die Inaktivierung Plasma-Serotonins findet hauptsächlich in Lunge und Leber statt. Dabei wird 5-HT durch die Monoaminoxidase A (MAOA) in Zellen des pulmonalen Endothels, sowie durch MAOA in Hepatozyten eliminiert (Jones et al., 1976; Tyce et al., 1968; Youdim et al., 1980). Um über die mitochondrial lokalisierte Monoaminoxidase abgebaut zu werden, müssen 5-HT Moleküle zunächst nach intrazellulär aufgenommen werden. Diese Aufgabe wird in der Lunge von SERT

übernommen, dessen lokale Fehlregulation unter Anderem in der pulmonal-arteriellen Hypertonie und der neonatalen respiratorischen Anpassungsstörung impliziert ist (Castro et al., 2017; Narboux-Nême et al., 2008). Auch für die Leber ist in der Literatur eine SERT-Expression beschrieben. In Mäusen vom Genotyp *Sert*^{-/-} findet in Lunge und Leber ein Abfall der 5-HT Spiegel auf etwa 10% des Ausgangsniveaus statt. Dieses Muster zeigt sich auch in einigen peripheren Organen in denen SERT-Expression noch nicht konklusiv beschrieben wurde, etwa Aorta oder Milz (Kim et al., 2005; Narboux-Nême et al., 2008).

Für die Leber ist weiterhin eine hohe Expression von Uptake2-Transportern bekannt. Das Uptake2-System wurde erstmalig durch Iversen et al. im Jahr 1965 beschrieben (Iversen, 1965). Koepsell et al. definieren Uptake2 als polyspezifisches, niedrig-affines System zu Wiederaufnahme von 5-HT, Noradrenalin (NE), Dopamin (DA) und anderen biogenen Aminen, bestehend aus den Transportern OCT1-3 (SLC22A1-3) und PMAT (SLC29A4) (Koepsell, 2021). Damit steht es dem hoch-affinen und spezifischeren Transport durch SERT (SLC6A4), den Dopamin Transporter (DAT, SLC6A3) und den Noradrenalin Transporter (NET, SLC6A2), zusammen Uptake1, gegenüber.

Bei Fehlen des SERTs wäre erwartbar, dass es durch die fehlende thrombozytäre Speicherung und den fehlenden SERT-abhängigen Abbau zu einer Hyperserotoninämie mit entsprechenden Symptomen kommen würde. Überraschenderweise konnte in entsprechenden Knockout-Modellen in Maus und Ratte eine Erniedrigung der Spiegel unter das messbare bzw. sicher quantifizierbare Niveau festgestellt werden (Chen et al., 2001; Homberg et al., 2007). Damit sind die Spiegel deutlich niedriger als in Knockout-Modellen beider herstellender Enzyme. Chen et al. beobachteten zeitgleich eine leichte Erhöhung der 5-HT-Konzentration über alle Darmabschnitte hinweg, sowie eine Erhöhung der Expression der Uptake2-Transporter Oct1 und Oct3. Hieraus schlossen sie, dass das ins Portalblut abgegebene und nicht thrombozytär aufgenommene 5-HT direkt an Ort und Stelle über das Uptake2-System aufgenommen wird und in Zellen der Darmwand abgebaut wird (Chen et al., 2001). Verbleibendes Serotonin könnte weiterhin bei der Leber-Passage eliminiert werden.

5.3.5 Effekte peripheren 5-HTs auf Zielorgane:

Thrombozyten-gebunden zirkulierendes Serotonin ist in einer Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen impliziert. Hierzu gehören die Kontrolle der Erythropoese, die Regulation des Vasotonus, die Trophik des Endokards und der Herzklappen sowie die Endokardfibrose im Rahmen des Karzinoid Syndroms, die immunologische Kontrolle der viralen Hepatitis, die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie und die hepatische Gluconeogenese im Rahmen der Fastenadaptation und die Regulation hepatischer Lipidspiegel im Rahmen der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung (Choi et al., 2018; Jian et al., 2002; Lang et al., 2008; Lesurtel et al., 2006; Namkung et al., 2018; Sumara et al., 2012; Watts et al., 2012). Die Annahme zirkulierendes 5-HT würde die Knochenmasse regulieren hat sich mittlerweile als zumindest fehlerhaft herausgestellt (Cui et al., 2014; Yadav et al., 2008). Neben den im Blut zirkulierenden 5-HT Pools gibt es Hinweise auf TPH1-abhängige, lokale Produktion und parakrine Freisetzung in Fettzellen und im endokrinen Pankreas. In Adipozyten scheint dies der Regulation der Lipogenese/-lyse und dem phänotypischen Wechsel zwischen weißem und braunem adipösem Gewebe, sowie der damit verbundenen Thermogenese zu dienen (Crane et al., 2015; Oh et al., 2015). In den pankreatischen beta-Zellen wurde gezeigt, dass Serotonin als trophischer Faktor unter der Gestation wirkt und im Rahmen der Serotonylierung kleiner G-Proteine, ähnlich wie in Thrombozyten, essenziell für die Insulin-Sekretion ist (Kim et al., 2010; Paulmann et al., 2009).

5.4 Das zentralnervöse serotonerge System in adulten Vertebraten:

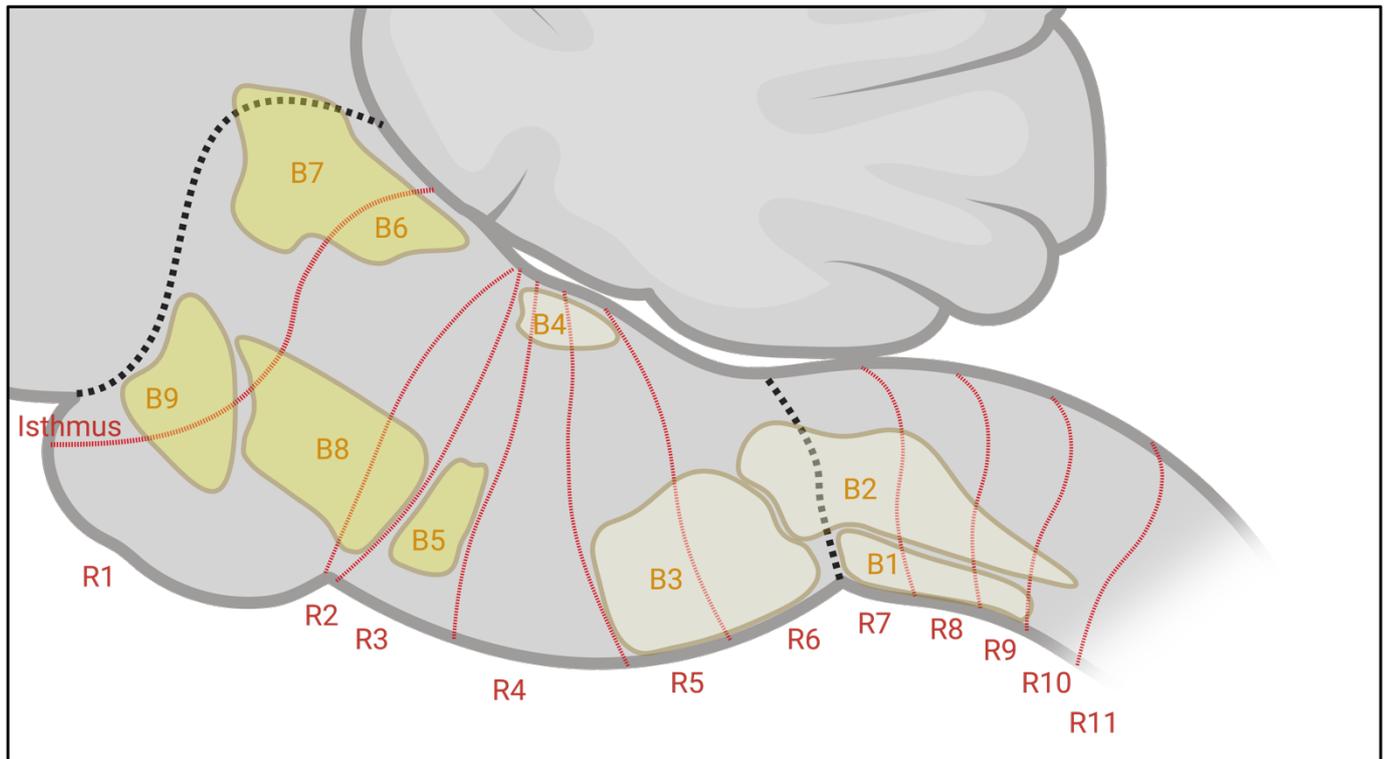


Abbildung 5: Die Raphe-Kerne.

Schematische Darstellung eines Sagittalschnittes aus einem murinen Hirnstamm. Die Kerngebiete nach Fuxe und Dahlström sind aufgeführt und zur Orientierung in Projektion auf die Rhombomere gezeigt (Dahlström & Fuxe, 1964; Soiza-Reilly & Gaspar, 2020). Die Rolle der Rhombomere in der Entwicklung der Raphe-Kerne wird in Abschnitt 5.5 besprochen.

Die Menge des im Gehirn gespeicherten Serotonins beträgt nur ca. 5% des im gesamten Körper gespeicherten 5-HTs und auch die Anzahl der serotonergen Neurone ist mit 26.000 in der Maus und ca. 400.000 im Menschen gegenüber der Gesamtzahl der Neurone im ZNS der jeweiligen Organismen, ca. 12 Milliarden in der Maus und ca. 86 Milliarden im Menschen, verschwindend gering (Gershon & Tack, 2007; Herculano-Houzel, 2009; Spencer & Deneris, 2017).

5.4.1 Zentralnervöses 5-HT ist unabhängig von peripheren serotonergen Einflüssen:

Das zentralnervöse Serotonin-System stellt, wie die bereits in Abschnitt 5.1 eingeführte Dichotomie zwischen den zwei paralogen TPH Isoformen nahelegt, eine - im adulten Organismus - vom peripheren Serotonin-System abgetrennte und damit unabhängige Entität dar. Neben der TPH-Dichotomie beruht dies auf der Blut-Hirn-Schranke, welche nach gängigem Dogma Serotonin, und auch anderen Neurotransmittern wie Dopamin, gegenüber undurchlässig ist (Hardebo & Owman, 1980). Dies konnte unter Anderem von Axelrod & Inscoe im Jahr 1963 durch die

Injektion von ^{14}C -markiertem und damit radioaktivem Serotonin in Mäusen gezeigt werden. Das ZNS reicherte nahezu keine Radioaktivität an, was nicht nur für eine geringere Anreicherung von Serotonin, sondern auch von seinen biologisch inaktiven Abbau-Produkten spricht (Axelrod & Inscoe, 1963). Zudem ist, wie bereits in Abschnitt 5.1 erwähnt, das Gehirn von Tph2-negativen Ratten und Mäusen im Rahmen der Messunsicherheit Serotonin-frei (Alenina et al., 2009).

Ursächlich dafür sind unter anderem die physikochemischen Eigenschaften Serotonins, welches bei physiologischem pH großteilig in vollständig protonierter und damit kationischer Form vorliegt. Dies macht wiederum eine passive Diffusion unwahrscheinlich, zumal für die BBB in Mäusen gezeigt werden konnte, dass sie keinerlei Expression von Uptake1 oder -2 aufweist (Andre et al., 2012; Mazak & Noszal, 2017).

Weiterhin konnte eine hohe Expression von MAOs und Serotonin-katabolisierender Glucuronyl- & Sulfotransferasen durch die Endothelien und Astrozyten der Grenzflächen des Gehirns gezeigt werden, wobei in Abwesenheit von Hinweisen auf aufnehmende Transporter bisher unklar ist, wie Serotonin diesen intrazellulär lokalisierten Enzymen zugeführt wird (Hardebo & Owman, 1980; Ouzzine et al., 2014).

5.4.2 Zentralnervöse serotonerge Zellpopulationen:

Als Markergene zur Identifikation zentralnervöser serotonerger Zellpopulationen kommen die TPH2 als 5-HT produzierendes Enzym und die Kombination aus SERT und VMAT2 als entscheidende Faktoren des Reuptakes in Frage. SERT und VMAT2 werden allerdings transient auch in TPH2-negativen Zellpopulationen exprimiert (siehe Abschnitt 5.5). Spencer et al. erweitern diese drei Kandidaten daher noch um die Gene der Monoaminoxidase-B (MAO-B), des OCT3, der AADC und einiger wichtiger Gene aus dem Biotermin-Stoffwechsel für die Bereitstellung des Kofaktors der TPHs und sprechen von der „5-HT gene battery“ (Spencer & Deneris, 2017). Die Expression aller dieser Gene wird vom Transkriptionsfaktor PET1 als terminalem Selektor direkt reguliert (Spencer & Deneris, 2017). In adulten Mäusen, in denen beide PET1-Allele genetisch unterbrochen wurden, findet eine starke Reduktion von 5-HT positiven Neuronen im ZNS statt (siehe auch Folgeabschnitt).

Allerdings bleiben ca. 30% serotonerge Neurone erhalten (Hendricks et al., 2003).

In diesen Neuronen könnte das Fehlen von PET1 durch Lmx1b und/oder Gata3 kompensiert werden, da auch diese die Expression der Markergene beeinflussen und, wie auch PET1, in ausdifferenzierten serotonergen Neuronen exprimiert werden (Kiyasova & Gaspar, 2011; Spencer & Deneris, 2017).

Die erste umfassende Beschreibung monoaminergere Kerngebiete im Hirnstamm und ihrer Neurone wurde 1964 durch Dahlstroem und Fuxe veröffentlicht. Bereits hier zeigte sich, dass sich deren Somata im ZNS nur an wenigen, anatomisch eng umschriebenen Lokalisationen finden. Die Kerngebiete serotonerger Neurone verlaufen entlang der Mittellinie und werden Raphe-Kerne - von *Raphe* – Naht (griech.) - genannt. Dahlstroem & Fuxe nahmen eine Einteilung anhand prominenter anatomischer Gruppierungen vor. So unterteilten sie in die Kern-Gruppen B1-9, sowie in jeweils eine übergeordnete rostrale (B5-9) und kaudale (B1-4) Gruppe (siehe Abbildung 5) (Dahlstroem & Fuxe, 1964). Durch den jeweiligen Verlauf der Projektionen in Richtung Großhirn bzw. Rückenmark, werden rostrale bzw. kaudale Gruppe auch als „aszendierend“ bzw. „deszendierend“ bezeichnet. Diese Klassifikation wurde 1992 von Jacobs und Azmitia in ihrer Auflösung vertieft und um standardisierte anatomische Namen erweitert (Jacobs & Azmitia, 1992).

Moderne lineage-tracing Experimente, welche durch die Verwendung von Rekombinasen unter der Kontrolle der Promotoren von Markergenen bleibende Änderungen im Genom vornehmen und so auch eine bereits abgelaufene transiente Expression von Markergenen erfassen, konnten zeigen, dass diese beiden neuroanatomischen Klassifikationssysteme eine große Übereinstimmung mit der molekularen Anatomie Pet1-positiver Neurone besitzen (Okaty et al., 2019).

5.4.3 Effekte zentralnervösen 5-HTs auf Verhalten und Physiologie:

Entgegen der erwähnten geringen Zellzahl serotonerger Neurone im ZNS und dem geringen Anteil zentralnervösen 5-HTs an der im Körper gespeicherten Gesamtmenge, sind die Effekte zentralnervöser, serotonerger Manipulationen auf Verhalten und Physiologie frappierend und extrem komplex. So beschreiben die folgenden Abschnitte anhand der Literatur wie globale Eingriffe teils paradoxe Effekte zur Folge haben und die Wirkung zentralnervösen 5-HTs entsprechend auf Ebene von neuronaler Subpopulation (spatial) und Entwicklungszeitpunkt (temporal) betrachtet werden muss.

5.4.3.1 Effekte globaler Manipulationen zentralnervöser 5-HTs:

Im Folgenden werden Effekte besprochen, welche durch Veränderungen auf Ebene der globalen zentralnervösen 5-HT Spiegel hervorgerufen werden. Dabei wird zunächst zwischen Erhöhung und Senkung unterschieden:

5.4.3.1.1 Globale Erhöhung zentralnervöser 5-HTs:

Experimentell lassen sich die globalen 5-HT Spiegel im ZNS entweder durch pharmakologische oder durch genetische Manipulation erhöhen.

Die pharmakologische Manipulation wiederum ist auf zwei Arten möglich:

Die Erste Variante stellt die Supplementation der biochemischen Vorstufen Trp und 5-HTP dar, die im Gegensatz zu 5-HT selbst die BBB passieren können (Turner et al., 2006). Hierbei ist 5-HTP, durch die frühe Sättigung der TPH2 und die ubiquitäre Expression der AADC, die erheblich effektivere Variante. So erhöht eine einmalige, hoch dosierte Injektion von 5-HTP die 5-HT Spiegel im gesamten ZNS für wenige Stunden um ein Mehrfaches, gefolgt von einem raschen Absinken auf das Ausgangsniveau über etwa 12h (Mosienko et al., 2015; Pratelli & Pasqualetti, 2019).

Die zweite Möglichkeit stellt die Inhibition der Monoaminoxidase A dar. Der moderne MAOA-Inhibitor Moclobemid erhöht 5-HT sowohl bei moderaten wie auch bei hoch dosierten intraperitonealen Injektionen in Raphe, Cortex und basolateraler Amygdala konsistent um das 5-10 fache (Zhukovsky et al., 2017).

Beide Varianten führen Dosis-abhängig zur Ausprägung eines oder mehrerer neuromuskulärer oder vegetativer (Dysregulation der Körpertemperatur, Piloerection, Salivation, Hyperhidrosis) Symptome, sowie Veränderungen in Wahrnehmung und Denken bzw. damit assoziiertem Verhalten (in Menschen: Halluzinationen, Denkstörungen; in Nagern: „head twitches“, „head weaving“, niedrige Körperhaltung). Diese werden im Vollbild als „Serotonin Syndrom“ bezeichnet. Weder die Supplementation von Vorstufen noch die Inhibition der MAOA ist spezifisch für zentralnervöse 5-HT Spiegel. Allerdings konnten die beschriebenen Effekte durch die kombinierte Injektion von 5-HTP und nicht ZNS-gängigen AADC-Inhibitoren als zentralnervösen Ursprungs bestätigt werden (Haberzettl et al., 2013).

Die genetische Erhöhung des globalen, zentralnervösen 5-HTs ist durch die Deletion des Gens der Monoaminoxidase A in Mäusen möglich. Cases et al. berichteten 1995 ein Mausmodell indem es durch die versehentliche Integration des Interferon-beta Gens in den MAOA-Lokus zu einer Unterbrechung desselben kam. Dies führte zu

einer Erhöhung von 5-HT im ZNS auf ca. 200% der Wildtierspiegel in adulten Tieren. Die Spiegel von Noradrenalin und Dopamin waren nur geringfügig erhöht (Cases et al., 1995). In behavioristischen Assays zeigten adulte Tiere eine erhöhte spontan-motorische Aktivität, sowie ein verringertes Ansprechen auf Stress-Reize. Weiterhin konnte eine erhöhte Aggression festgestellt werden (Bortolato et al., 2008).

5.4.3.1.2 Globale Senkung zentralnervösen 5-HTs:

Die pharmakologische Senkung globalen, zentralnervösen 5-HTs ist auf zwei Arten beschrieben:

Reserpin und Wirkungs-verwandte Substanzen binden VMATs in Neuronen und neuroendokrinen Zellen und inhibieren die vesikuläre Speicherung von Monoaminen, dies führt zunächst zu erhöhten intrazellulären Spiegeln und schließlich zum Abbau der „entspeicherten“ Monoamine über die mitochondrialen MAOs und damit letztlich zur Depletion der Transmitter (Harriott et al., 2018). Eine einzelne intraperitoneale Injektion von 2mg/KG kann in Mäusen zu einem Absinken der hippocampalen 5-HT Spiegel auf etwa ein Viertel des Ausgangsniveaus führen (Gao et al., 2013). Berichtete Effekte auf Physiologie und Verhalten sind Hypothermie, Ptosis und Depressions-artiges Verhalten anhand von Hypomotilität in entsprechenden Assays. Paradoxe Weise sind auch antidepressive Effekte durch Reserpin in Mausmodellen berichtet (Gao et al., 2013; Strawbridge et al., 2022).

Eine weitere Möglichkeit stellt die Inhibition der neuronalen TPH2 dar, wobei allerdings kein Inhibitor verfügbar ist, welcher nicht gleichzeitig Affinität gegenüber der peripheren TPH1 besitzt (Matthes & Bader, 2018). Der am häufigsten in Tiermodellen verwendete Inhibitor ist para-Chlorophenylalanine (pCPA). Der Effekt pCPAs auf die 5-HT Spiegel im ZNS ist initial gering, so ist ein 10-tägige, hochdosiertes Injektionsschema notwendig, um diese um etwa 80% zu senken. Berichtete Effekte einer pCPA-Administration in Nagern sind verminderte Depressions-assoziierte Hypomobilität im Tail-Suspension-Test (TST), verminderte Stressreaktion, verminderte Aggression zwischen Männchen und verminderte Präpulsinhibition auf akustischen Reiz (Kulikova & Kulikov, 2019).

Eine Möglichkeit der genetischen Depletion von 5-HT ist die Unterbrechung des VMAT2. Erste Mausmodelle dessen wurden 1997 in zwei unabhängigen Veröffentlichungen gezeigt. *Vmat2*^{-/-} Jungtiere von heterozygoten Elterntieren werden in normalen Mendelschen Verhältnissen geboren, die homozygoten Jungtiere

versterben allerdings vollständig innerhalb der ersten Lebensstage. Weiterhin zeigen sie bereits bei Geburt eine starke Wachstumsverzögerung und keinerlei Wachstum innerhalb ihrer wenigen Lebensstage. Es konnten eine stark verringerte locomotorische Aktivität, Hypothermie und nahezu kein Trinkverhalten an der Mutter beobachtet werden. Die Spiegel von 5-HT, NE und DA im ZNS sind bis an die Nachweisgrenze vermindert (Fon et al., 1997; Wang et al., 1997). In $Vmat2^{flx/flx};Sert^{+/Cre}$ Tieren, in denen die Expression des VMAT2-Transporters unter der Kontrolle des SERT-Promotors unterbrochen wird und so in serotonergen und transient-serotonergen, allerdings nicht anderen monoaminergen Neuronen fehlt, sind die 5-HT Spiegel in Cortex, Striatum und Hirnstamm bis an die Nachweisgrenze abgesenkt, während Katecholaminspiegel nahezu unverändert sind. Behavioristisch zeigt sich hier eine starke Reduktion spontan-motorischer Aktivität, eine Erhöhung Stress-induzierte lokomotorischer Aktivität, eine verminderte Angstreaktion, sowie verminderte Depressions-assoziierte Hypomobilität im TST. Diese Effekte können durch die Gabe eines MAOIs aufgehoben werden (Narboux-Nême et al., 2011). Die in nicht-konditionalen Modellen beobachtbare prenatale Mortalität ist hier aufgehoben. Allerdings zeigt sich in den normalgewichtigen geborenen Jungtieren eine postnatale Retardierung der Gewichtsentwicklung mit Verringerung des Fettgewebes, allerdings ohne Veränderung im Trinkverhalten am Muttertier. Diese verbessert sich um den zweiten Entwicklungsmonat auf nahezu normale Werte und ist durch Gabe eines MAOIs normalisierbar (Narboux-Neme et al., 2013).

Die vollständige Unterbrechung des TPH2-Gens stellt eine weitere Möglichkeit der genetischen Verringerung der zentralnervösen 5-HT Spiegel dar. Sie führt zu einer Verringerung um mindestens 95%. In Würfen heterozygoter Elterntiere werden die Jungtiere in normalen Mendelschen Verhältnissen geboren, allerdings ist die postnatale Letalität der $Tph2^{-/-}$ Jungtiere in den ersten Lebensmonaten mit bis zu 50% - in Abhängigkeit des genetischen Hintergrundes – sehr hoch. Die Lebenserwartung von homozygoten Tieren, die das Erwachsenenalter erreicht haben, ist normal. Ähnlich wie in $Vmat2^{flx/flx};Sert^{+/Cre}$ Mäusen werden die Jungtiere normalgewichtigen geboren, bleiben postnatal allerdings in der Gewichtsentwicklung zurück und bilden weniger Fettgewebe als Wildtypen. Es findet wie in den $Vmat2^{flx/flx};Sert^{+/Cre}$ Tieren eine großteilige Normalisierung des Körpergewichts statt, allerdings erst im dritten bis vierten Lebensmonat und damit erheblich später. Die Verminderung des Körperfettanteils bleibt auch im Erwachsenenalter erhalten und weder die

Verwendung von Wildtyp-Tieren als Ammen noch die Veränderung von Größe oder Zusammensetzung des Wurfes ändert den metabolischen Phänotyp. Als weitere vegetative Phänomene können eine verminderte Fähigkeit zur Thermoregulation in kalten Umgebungen, eine verminderte Fähigkeit die Atemfrequenz als Reaktion auf Hypoxie zu erhöhen und eine Umkehr der zirkadianen Veränderungen in Blutdruck und Herzfrequenz beobachtet werden. In $Tph2^{-/-}$ Tieren sind mehrere phänotypische Veränderungen im Verhalten berichtet. Am konsistentesten zeigt sich aggressives Verhalten gegen Artgenossen im resident-intruder-paradigm in beiden Geschlechtern, sowie in männlichen Tieren auch gegen Menschen. In Männchen konnte weiterhin eine Erhöhung der Anzahl der Aufsitz-Versuche auf andere Männchen beobachtet werden, was zunächst als Beeinflussung der Sexualpräferenz interpretiert wurde, mittlerweile aber eher als Dominanz-Verhalten gedeutet wird. Diese Veränderungen im Verhalten scheinen durch akute oder chronische Substitution mit 5-HTP, teilweise oder vollständig aufhebbar. Weibliche Tiere vernachlässigen ihre Jungtiere und zeigen weiterhin Aggression und kannibalistisches Verhalten diesen gegenüber. Sowohl in Bezug auf Angst- wie auch auf Depressions-assoziiertem Verhalten konnte noch kein einheitlicher Phänotyp etabliert werden, da zueinander gegenteilig ausfallende Veröffentlichungen vorliegen (Mosienko et al., 2015; Pratelli & Pasqualetti, 2019).

Es existieren zwei Mausmodelle, in denen die TPH2-Aktivität aufgrund eines Polymorphismus herabgesetzt ist:

Die C1473G-Mutation stellt einen Polymorphismus dar, welcher in einigen experimentell verwendeten Inzucht-Linien vorkommt. In Tieren der BALB/cJ-Linie, welche diesen Polymorphismus trägt, zeigen sich um etwa 50% verringerte, zentralnervöse 5-HT Spiegel und ein Depressions-assoziiertes Phänotyp im forced swim test (FST), sowie verringerte Aggressionen gegenüber anderen Männchen.

Die G1449A-Mutation wurde zunächst in Menschen mit einer diagnostizierten Depression beobachtet und dann als Knockin-Modell in den murinen $Tph2$ -Lokus übertragen. Tiere mit dieser Mutation zeigen um etwa 80% reduzierte zentralnervöse 5-HT Spiegel. Es findet sich ein reproduzierbarer Phänotyp im Verhalten, welcher sich durch verstärkte Aggression und verstärktes Angst- und Depressions-assoziiertes Verhalten auszeichnet (Kulikova & Kulikov, 2019; Pratelli & Pasqualetti, 2019).

Wie bereits in Abschnitt 5.4 erwähnt, stellt $Pet1$ den terminalen Regulator in zentralnervösen serotonergen Zellen dar. $Pet1^{-/-}$ Mäuse wurden erstmalig 2003

berichtet. In ihnen findet eine Reduktion 5-HT positiver Zellen von etwa 70% über alle serotonergen Nuklei hinweg statt, 5-HT ist im gesamten ZNS etwa um 85% reduziert. Homozygote Jungtiere heterozygoter Eltern werden in normalen Mendelschen Verhältnissen geboren, zeigen postnatal keine makroskopischen Auffälligkeiten und keine erhöhte postnatale Mortalität. Es ist ein ausgeprägter behavioristischer Phänotyp zu beobachten, welcher sich primär durch Aggression und Angst-assoziiertem Verhalten äußert. Weibchen rekapitulieren einen Teil des im $Tph2^{-/-}$ Modell beobachtbaren, vernachlässigenden Verhaltens gegenüber Jungtieren, zeigen aber keine Aggression oder kannibalistisches Verhalten diesen gegenüber (Hendricks et al., 2003; Muzerelle et al., 2021).

5.4.3.2 Effekte spatio-temporaler Manipulationen zentralnervösen 5-HTs:

Zusammenfassend lässt sich über die in Abschnitt 5.3.2.1 angeführten Ergebnisse sagen, dass die globale Veränderung der zentralnervösen 5-HT Spiegel einen Effekt auf die spontane motorische Aktivität, Wahrnehmung bzw. damit assoziiertem Verhalten, Aggression, Angst-assoziiertem Verhalten, Depressions-assoziiertem Verhalten, zirkadiane Änderungen der Physiologie, Wachstum und Thermoregulation hat.

Allerdings besteht lediglich im Falle der spontanen motorischen Aktivität ein Effekt, welcher über alle angeführten Modelle hinweg Konsistenz besitzt. Die Erhöhung globalen zentralnervösen 5-HTs, sei es durch die Supplementation mit chemischen Vorstufen oder den MaoA-Knockout, führt zu verstärkter spontaner motorischer Aktivität, die Verminderung globalen zentralnervösen 5-HTs im $Vmat2^{fix/fix};Sert^{+/Cre-}$ Modell führt zu einer Reduktion.

Insbesondere im Fall von komplexen Verhaltensmustern wie Aggression und Depressions-assoziiertem Verhalten bestehen teilweise stark gegensätzliche Beobachtungen in den verwendeten Modellen. So tritt verstärkte Aggression, sowohl im MaoA-Knockout als auch im Tph2-Knockout auf. Die C1473G-Mutation (50% 5-HT Reduktion) verringert aggressives Verhalten in Mäusen, die G1449A-Mutation (80% 5-HT Reduktion) erhöht es. Sowohl nach Reserpin-Administration als auch im Tph2-KO können sowohl antidepressive als auch depressogene Effekte beobachtet werden. Begründungen für diese paradoxen Effekte sind, wenn man von methodischen Unzulänglichkeiten absieht, auf zwei Ebenen denkbar:

5.4.3.2.1 Effekte spatialer Manipulation serotonergen Tonus:

Von den vierzehn bekannten Genen, die in Mäusen für 5-HT Rezeptoren kodieren, werden alle im ZNS exprimiert, während über alle Organe der Peripherie verteilt nur 11 dieser Rezeptoren nachgewiesen werden konnten (Barnes et al., 2021).

Dabei kommt es im ZNS zu einer gleichzeitigen Expression mehrerer Rezeptoren im selben Zielgebiet auf zellulärer Ebene oder auf Ebene von neuronalen Signalkreisen. Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass in neuronalen Post-Synapsen serotonerger Zielgebiete zeitgleich meist zwei bis drei 5-HT-Rezeptoren exprimiert werden, typischerweise in einer Kombination aus exzitatorischen und inhibitorischen Rezeptoren (Barnes et al., 2021). Auch auf der Signalkreis-Ebene findet häufig eine gegenläufige Expression von 5-HT-Rezeptoren statt, so werden in Cortex, Hippocampus und Amygdala 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren sowohl auf glutamatergen Pyramidenzellen wie auch auf den sie inhibierenden GABAergen Interneuronen exprimiert. Auch die Raphe-Neuronen selbst stehen unter solch einer Feedback-Kontrolle. So finden sich die 5-HT_{1A}- und 5-HT_{1D}-Rezeptoren sowohl an den post-synaptischen Zielzellen als auch auf den sie innervierenden Raphe-Neuronen selbst, wo sie die Sekretion von 5-HT inhibieren (Barnes et al., 2021).

Es zeigt sich, dass das zentralnervöse serotonerge System in verschiedenen Subsystemen des ZNS komplexe Signalkreise bildet in denen verschiedene Spiegel an extrazellulärem 5-HT, entsprechend der Affinitäten der exprimierten Rezeptoren, gegensätzliche Effekte auslösen können. Entsprechend ziehen pharmakologische Studien mit Liganden an 5-HT-Rezeptoren teils ähnlich paradoxe Ergebnisse nach sich wie die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene, globale Manipulation des serotonergen Tonus (Barnes et al., 2021).

Diese Limitation wurde zuletzt vermehrt durch die direkte Manipulation von Subpopulation von Raphe-Neuronen umgangen. Dies kann etwa durch optogenetische oder chemogenetische Aktivierung oder Inhibition, durch ins Zielgebiet injizierte virale Vektoren oder durch die konditionale Expression von Toxin-Rezeptoren geschehen. So konnten Subpopulationen identifiziert werden, welche auf eine Vielzahl von Zielgebieten projizieren und direkt Verhalten beeinflussen, welches mit Aggression, Angst und Stressreaktion assoziiert ist (Marcinkiewicz et al., 2016; Niederkofler et al., 2016; Ren et al., 2018).

Insbesondere der dorsale Raphe-Kern unterlag in den letzten Jahren auch vermehrt einer Untersuchung durch aufwändige, transkriptomische Techniken wie der

Einzelzell-RNA-Sequenzierung (single-cell RNA sequencing, ssRNAseq). Durch diese Ergebnisse zeigt sich, dass Raphe-Subpopulationen durch ein individuelles Profil von Transkriptionsfaktoren und Ko-Transmittern voneinander abgrenzbar sind (Huang et al., 2019; Okaty et al., 2020; Ren et al., 2019). Auch die axonale Projektion und damit die Beteiligung an Signalkreisen scheint direkt mit diesen beiden Faktoren zu korrelieren. Dies wird in Zukunft den Zugang zu einzelnen Subpopulationen serotonerger Neurone über konditionelle genetische Modelle erleichtern (Commons, 2020).

5.4.3.2.2 Effekte temporaler Manipulation serotonergen Tonus:

Wie in Abschnitt 5.4.3.1 besprochen konnte in erwachsenen *MaoA*^{-/-} Mäusen ein Phänotyp beobachtet werden, welcher sich durch starke Aggression äußert. Dies steht in einem gewissen Widerspruch zum sehr ähnlichen Phänotyp in *Tph2*^{-/-} Mäusen. Interessanterweise scheint das Auftreten von Aggressionen in *MaoA*^{-/-} Tieren seinen Ursprung in der Entwicklung des ZNS zu haben und nicht Folge der akuten Erhöhung der 5-HT Spiegel zu sein, da eine Administration von MAOIs in erwachsenen Tieren diesen Phänotyp nicht hervorbringt, die Administration von MAOIs in Jungtieren allerdings schon (Bortolato et al., 2008).

Um die Effekte 5-HTs auf die Hirnentwicklung von seiner akuten Funktion als Neurotransmitter abzugrenzen sind mehrere induzierbare Knockout-Modelle des *Tph2*-Gens in Mäusen entwickelt worden. In diesen sind beide Kopien des *Tph2*-Gens von loxP-Sequenzen flankiert, wodurch das Gen von einer Cre-Rekombinase entfernt wird, welche entweder direkt adenoviral transfiziert oder aber unter der Kontrolle des Estrogen-Rezeptors durch Tamoxifen-Administration induziert wird (Kriegebaum et al., 2010; Pelosi et al., 2015; Song et al., 2016; Whitney et al., 2016). Tiere bei denen die genetische Unterbrechung der *Tph2* erst im Erwachsenenalter induziert werden zeigen die aus dem konstitutiven *Tph2*-KO bekannte Umkehr der zirkadianen Rhythmik und, gegenläufig zum *Vmat2*^{fix/fix}:*Sert*^{+Cre}-Modell, ein hyperaktives Verhalten (Whitney et al., 2016). Dies deutet für die anderen phänotypischen Effekte des konstitutiven *Tph2*-KOs eher auf eine Ursache in der embryonalen oder post-natalen Entwicklung hin. Die Rolle 5-HTs als Morphogen in diesen Entwicklungsphasen wird in Abschnitt 5.5.4 besprochen.

5.5 Das serotonerge System in sich entwickelnden Vertebraten:

Die embryonale und fetale Entwicklung von Organismen kann entweder über den Gestationszeitpunkt oder anhand morphologischer Kriterien erfasst werden. Im Menschen wird morphologisch die Carnegie Klassifikation herangezogen, in Mäusen die Theiler Klassifikation (Hill, 2007; Otis & Brent, 1954). Die Gestationszeit in Mäusen und Menschen ist mit 21 Tagen, respektive 9 Monaten sehr unterschiedlich lang, allerdings verläuft die Reihenfolge, in der die Gewebe innerhalb der Embryonalentwicklung bzw. Organogenese angelegt werden und reifen stark vergleichbar, weshalb es zwischen den Stadieneinteilungen Entsprechungen gibt. Die Organogenese im Menschen endet nach ca. 9 Entwicklungswochen, den überwiegenden Anteil der intrauterinen Entwicklung nimmt damit die Fetalzeit ein. In Mäusen ist die Organogenese erst mit dem 16. Entwicklungstag abgeschlossen, also kurz vor Geburt (Otis & Brent, 1954). Damit findet ein überwiegender Anteil der Fetalzeit und damit der Reifung der angelegten Organe in Mäusen postnatal statt. Dies konnten auch mit transkriptomischen Techniken durch den Vergleich von Expressionprofilen zwischen Mensch und Maus bestätigt werden (Xue et al., 2013). Eine Sonderstellung nimmt hierbei die Hirnentwicklung ein. In Menschen verdoppelt sich das Volumen des ZNS innerhalb der ersten zwei Lebensjahre und nimmt dann bis zum Ende der Pubertät weitere ca. 40% zu, um sich dann zwischen dem 15. und dem 20. Lebensjahr zu stabilisieren. Dies korreliert eng mit der Zunahme der Dichte der weißen Substanz im Corpus Callosum. In Mäusen findet ein noch frappierenderes Wachstum innerhalb der ersten 20 postnatalen Tage statt, bei dem sich das Volumen des ZNS verachtfacht. Sowohl Hirnvolumen als auch die Dichte der weißen Substanz im Corpus Callosum stabilisieren sich um den 25. postnatalen Tag. Die Anzahl der Synapsen verhundertfach sich zwischen dem vierten und dem 21. postnatalen Tag und erreicht in den Folgetagen finale Werte (Semple et al., 2013). Serotonerge Neurone im Speziellen erlangen in Mäusen mit dem 28. postnatalen Tag ihre finale Morphologie und axonale Länge (Maddaloni et al., 2017). Aufgrund dieser Tatsachen betrachten wir im Folgenden die Entwicklung der Maus als Modellorganismus des Menschen bis zur dritten postnatalen Woche.

5.5.1 Die Blut-Hirn-Schranke im sich entwickelnden Organismus:

Daneman et al. konnten 2010 durch die Injektion von Biotin in die Zirkulation von Embryonen und junge postnatalen Ratten und Mäusen zeigen, dass bereits an E15 durch die Interaktion von Endothelzellen und Perizyten eine funktionelle BBB im sich entwickelnden ZNS induziert wird. Dies löste das bisherige Dogma ab, dass die erst postnatal einwandernden Astrozyten hierfür notwendig seien. Allerdings konnte bis in postnatale Entwicklungsstadien hinein ein Übertritt von Biotin an definierten Stellen, etwa den zirkumventrikulären Organen, ins Hirnparenchym beobachtet werden (Daneman et al., 2010).

Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass in Ratten und Mäusen bis in die frühe postnatale Entwicklung hinein Amin-Neurotransmitter wie Serotonin und Dopamin aus der Zirkulation im Gehirn angereichert werden bzw. aus dem Gehirn in die Zirkulation übertreten (Lavrent'eva et al., 2007; Loizou, 1970; Miyaguchi et al., 1999; Ugrumov, 2010).

Daher nehmen wir im Folgenden, trotz fehlender Daten über den quantitativen Einfluss übertretenden Serotonins auf den jeweilig anderen Pool *in vivo*, zunächst eine Durchlässigkeit der BBB gegenüber Serotonin in der Embryonalentwicklung und frühen postnatalen Entwicklung an und betrachten den zentralnervösen und den peripheren serotonergen Pool als korrespondierend.

5.5.2 Periphere serotonerge Zellpopulationen während der Entwicklung:

Wie bereits in Abschnitt 5.3.2.1 besprochen ist das Dogma, die Enterochromaffinen Zellen des Darms würden der Neuralleiste entstammen, mittlerweile widerlegt. Sie und alle enteroendokrinen Zellen stellen ein Derivat des definitiven Endoderms - in Abgrenzung zum extraembryonalen bzw. viszeralem Endoderm etwa in der Maus - dar und teilen in Ursprung und Differenzierung einige Eigenschaften mit den endokrinen Zellen der pankreatischen Inseln.

Eine Ausnahme bilden einige TPH1-positiven Zellen des gastrischen Corpus. Interessanterweise konnten Li et al. 2014 zeigen, dass eine Subpopulation dieser EECs c-Kit abhängig aus dem Knochenmark in den GIT einwandern. (Li et al., 2014). Diese Zellpopulation exprimiert in einer Bulk-RNA-Sequenzierung typische Mastzell-Marker. Dies ist konsistent mit der historisch relevanten, in Abschnitt 5.1.4.2 besprochenen, Klonierung einer TPH aus einem murinen Mastozytomen (Li et al.,

2014; Stoll et al., 1990). Über eine Entsprechung im Menschen gibt es miteinander in Konflikt stehende Daten (Mawe & Hoffman, 2013).

Die Vorläufer aller anderen EECs entstehen in Mäusen nach Schluss des embryonalen Darmrohrs um den 9. Gestationstag (E9) und zeigen Expression des, auch in der adulten Zellpopulation noch exprimierten, TFs Ngn3. Diese setzt im embryonalen Pankreas an E9.5 ein und in den enteroendokrinen Vorläufern vereinzelt an E12.5 (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002). Während es im Pankreas allerdings nahezu zeitgleich zur Expression von Insulin kommt, proliferieren die Ngn3-positiven Zellen im Darm zunächst (Gradwohl et al., 2000; Jenny et al., 2002). Die Größe dieser Zellpopulation erreicht ihren Höhepunkt um E15. Zum selben Zeitpunkt sind erstmalig die Proteine NeuroD1 & Chromogranin A, sowie TPH1-Transkripte nachweisbar (Cote et al., 2007; Jenny et al., 2002). Die Autoren Brancheck und Gershon fanden histologisch die ersten Serotonin-immunoreaktiven Zellen an E16 im Dünndarm und E18 im Magen (Brancheck & Gershon, 1989).

5.5.3 Zentralnervöse serotonerge Zellpopulationen während der Entwicklung:

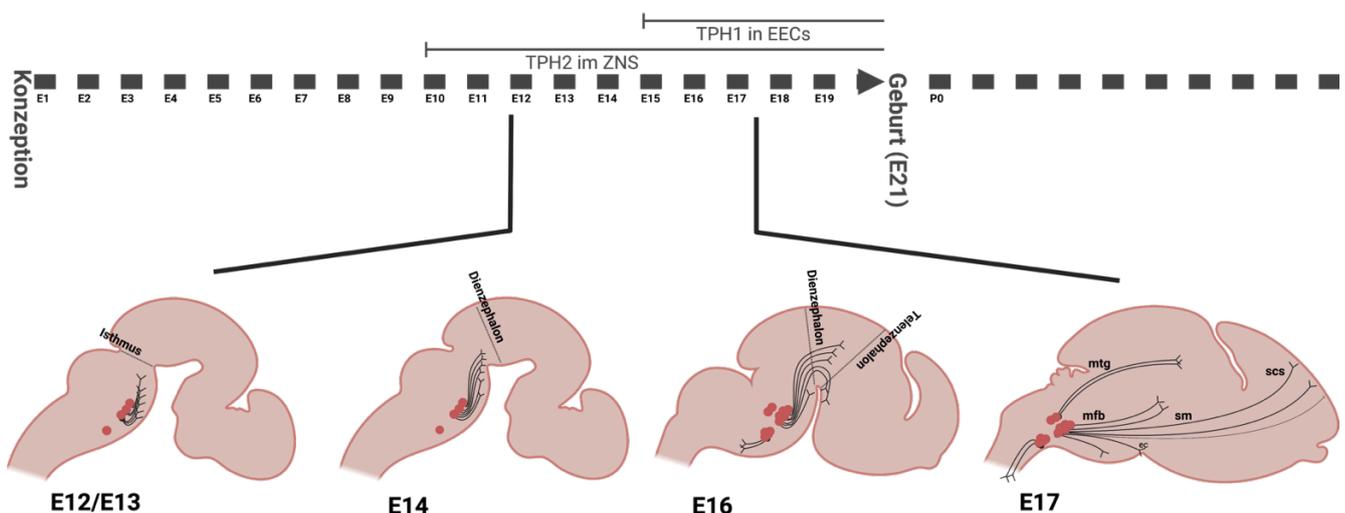


Abbildung 6: Serotonerges Axonwachstum nach Lidov & Molliver.

Gezeigt sind schematische Sagittalschnitte aus einem murinen ZNS während der zweiten Gestationshälfte. Abkürzungen: Mediales Vorderhirn Bündel (mfb), Mamillotegmentaler Trakt (mtg), Suprakallosale Striae (scs), Striae Medullaris (sm) (Lidov & Molliver, 1982a, 1982b).

Klassisch besteht der Hirnstamm aus Mittelhirn (Mesencephalon), Brücke (Pons) und verlängertem Rückenmark (Medulla oblongata) und wird anatomisch in Abgrenzung zum Zwischenhirn (Diencephalon) und zum eigentlichen Rückenmark (Medulla spinalis) betrachtet. Betrachtet man die Expression von Transkriptionsfaktoren während der Hirnentwicklung von Säugetieren so zeigt sich, dass der embryologische

Ursprung des Mesencephalons allerdings näher an dem des Vorderhirns (Prosencephalon) ist, da beide unter dem Einfluss der Expression von Otx2 entstehen. Diese endet schlagartig am Isthmus, der Grenze zum Pons und zum embryologischen Rautenhirns (Rhombencephalon), welcher sich unter dem Einfluss von den nur hier exprimierten TFs FGF8 und GBX2 formt. Es schließen sich 11 sogenannte Rhombomere (siehe auch Abbildung 5) an, welche die großteilig auch makroskopisch erkennbare segmentale Differenzierung des Rhombencephalons unter dem Einfluss von Hox-Genen repräsentieren (Watson et al., 2019).

Die Progenitoren serotonerger Neurone im Hirnstamm entstehen in der Maus unter dem Einfluss der Chorda dorsalis bzw. des durch sie exprimierten Morphogens Sonic Hedgehog (SHH). Auch embryologisch spielt die Unterteilung in rostrale (B5-9) und kaudale (B1-4) Gruppe der Raphe Kerne mit der Grenze an Rhombomer 4 eine entscheidende Rolle. Die rostrale Gruppe differenziert sich am Gestationstag E10 unter dem Einfluss von FGF8 welches durch den Isthmus sezerniert wird und die kaudale Gruppe am Gestationstag E11 unter dem Einfluss von FGF4 aus dem paraxialen Mesoderm (Kiyasova & Gaspar, 2011). Unter dem Einfluss von FOXA2 sowie NKX-TFs kommt es dann zur Induktion der in Abschnitt 5.4.2 bereits beschriebenen terminalen Regulatoren GATA2 & -3, LMX1B und schließlich PET1. Insbesondere GATA3 scheint dabei in seiner Aktivität zusätzlich vom proneuralen helix-loop-helix TF *Ascl1* / *Mash1* abzuhängen. *Ascl1*/*Mash1*-negative Maus-Embryonen zeigen an E11.5 keinerlei nachweisbare serotonerge Neurone (Kiyasova & Gaspar, 2011; Spencer & Deneris, 2017). In Mäusen können *Pet1*-kodierende Transkripte erstmalig an E11 im Rhombencephalon nachgewiesen werden, wo sie mit SERT-Transkripten kolokalisieren (Pfaar et al., 2002). Fast zeitgleich zeigen sich erste TPH2-kodierende Transkripte, wobei die ersten Serotonin-immunoreaktiven Neurone an E11.5 nachgewiesen werden konnten (Cheng et al., 2003; Cote et al., 2007; Wallace & Lauder, 1983).

Wegweisende Arbeiten zur Entwicklung serotonerger Neurone und ihrer Projektionen wurden durch die Autoren Lidov & Molliver sowie Aitken & Tork in den 1980er Jahren angefertigt. Lidov und Molliver sprechen von drei Phasen des axonalen Wachstums: Der Phase der initialen Axon-Elongation (E13-E15), der Phase der Entwicklung selektiver Pathways (E16-19) und die Phase der terminalen Feldentwicklung (E19-P21) (Lidov & Molliver, 1982a).

An den Gestationstagen E12 und E13 beobachteten sie die serotonerge Zellpopulation als bereits prominentes rostrales und schwach ausgeprägtes kaudales Cluster, entsprechend den ascendierenden und descendierenden Kerngruppen. Bis zum Ende von E13 sind nur vereinzelte Axone bis in die Isthmus-Region vorgedrungen und keine darüber hinaus.

An E14 kommt es zur weiteren Proliferation innerhalb der beiden Kerngebiete. Die Projektionen der ascendierenden Kerngruppe erreichen die kaudale Grenze des Diencephalons. An E15 sind erstmalig prominente descendierende Projektionen der kaudalen Kerngruppe sichtbar. Am 16. Gestationstag kommt es erneut zu starker Proliferation in beiden Kerngruppen. Innerhalb der rostralen Kerngruppe wird ein dorsales und ein ventrales Subcluster sichtbar, korrespondierend mit dem späteren Ncl Raphe dorsalis und Ncl Raphe medianus. Die Axone der rostralen Gruppe durchqueren das Diencephalon bis zur Grenze zum Telencephalon und spalten sich dort auf. Die Autoren sprechen vom Eintritt in die Phase der selektiven Pathways. Das Wachstum verläuft in Bündeln, welche mit bestehenden anatomischen Leitungsbahnen verlaufen: dem medialen Vorderhirn Bündel (mfb), dem Mamillotegmentalen Trakt (mtg), den Suprakallosalen Striae, der Capsula externa und den Striae Medullaris (Abbildung 6) (Aitken & Tork, 1988; Deneris & Gaspar, 2018; Lidov & Molliver, 1982a, 1982b).

In der Phase der terminalen Feldentwicklung findet die endgültige Innervation der Zielstrukturen statt. Diese Phase beginnt perinatal und erstreckt sich fast über den gesamten ersten Monat der postnatalen Entwicklung, läuft aber nicht in allen Zielstrukturen gleichzeitig ab. So werden Thalamus, Amygdala und Septum bereits im Laufe der ersten postnatalen Woche terminal innerviert, während dies für Substantia nigra, Ncl. Caudatus und Ncl. Suprachiasmaticus erst im Laufe der zweiten und dritten postnatalen Woche geschieht (Deneris & Gaspar, 2018; Maddaloni et al., 2017).

5.5.4 5-HT als Morphogen im sich entwickelnden Organismus:

Erste Hinweise auf die mögliche Rolle Serotonins als Morphogen stammen aus Stachelhäutern, also einfachen Tieren ohne Chorda dorsalis. Bereits in den 1970er Jahren konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Seeigel- Embryonen mit Serotonin die Furchungsteilungen verhindert und die Inkubation mit Serotonin-Rezeptor-Antagonisten die Gastrulation (Deeb, 1972; Gustafson & Toneby, 1970).

Die zellbiologischen Grundlagen dessen sind bis heute nicht geklärt. Allerdings konnten einerseits während der Furchung messbare Ionenströme durch 5-HT und 5HT₃R-Agonisten ausgelöst werden konnten, andererseits scheint die Inhibition der Furchung cAMP-abhängig zu sein und ein Homologon des metabotropen 5HT₄Rs wird in Seeigel-Embryonen exprimiert (Nikishin et al., 2012; Shmukler & Tosti, 2002).

Eine Rolle der 5HT₃- und 5HT₄-Rezeptoren in der frühen embryonalen Entwicklung scheint bis in ovipare Vertebraten konserviert. So konnten Fukumoto et al. 2005 zeigen, dass diese beiden Rezeptoren in der Festlegung der Links-Rechts-Achse in Krallenfrosch und Huhn beteiligt sind und ihre pharmakologische Manipulation zu Lateralisationsdefekten führt. Interessanterweise scheint die Serotonin-Synthese hierbei nicht in den Embryonen selbst, sondern im mütterlichen Organismus abzulaufen (Fukumoto et al., 2005).

In der Maus als wichtigstem Modellorganismus des Menschen können 5HT₇- & 5HT_{1D}-Rezeptoren bereits in unbefruchteten Oozyten nachgewiesen werden, wobei nach der Befruchtung eine Expression des 5HT₇-Rezeptors bis ins 4-Zell-Stadium und des 5HT_{1D}-Rezeptors bis ins Blastozysten-Stadium nachgewiesen werden konnte (Amireault & Dubé, 2005; Vesela et al., 2003). Antagonisierung des 5HT_{1D}-Rezeptors in kultivierten 2-Zell- Embryonen führt zu Retardierung der Entwicklung (Vesela et al., 2003).

Ob Serotonin in Präimplantations-Embryonen der Maus einen maternalen oder embryonalen Ursprung hat ist nicht bekannt, allerdings konnte in pronukleären Maus-Zygoten immunozytochemisch eine TPH nachgewiesen werden (Walther & Bader, 1999).

In späteren Embryonalstadien der Maus scheint Serotonin als Morphogen vor Allem in drei Kategorien von Zellpopulationen eine Rolle zu spielen:

In Derivaten der Neuralleisten, dem sich entwickelnden Herzen und dem sich entwickelnden ZNS:

5.5.4.1 Derivate der Neuralleisten und das sich entwickelnde Herz:

Die Zellen der Neuralleisten entstehen während der Neurulation im dorsalen Neuralrohr. Man unterscheidet grob in einen kranialen Anteil der Neuralleisten (cranial neural crest cells, cNCCs), welcher in der Kraniofazialen Entwicklung Ausgangsstruktur für Nerven, Knochen und Knorpel darstellt, einen Rumpf-Anteil (trunk neural crest cells, tNCCs), welcher große Teile des peripheren Nervensystems

(PNS) sowie des Nebennierenmarks bildet, einen sakralen Anteil (sacral neural crest cells, sNCCs) welcher das enterische Nervensystem (ENS) ausbildet, sowie einen kardialen Anteil (cardiac neural crest cells, caNCCs) der an der Herzentwicklung teilnimmt (Bhatt et al., 2013).

Hiervon stehen mindestens drei der vier Anteile innerhalb der Embryonalentwicklung unter serotonerger Einfluss.

cNCCs machen im Laufe der Embryonalentwicklung beträchtliche Änderungen in Morphologie und Lokalisation durch. Migrierende cNCCs zeigten in der Maus am E9 beträchtliche Immunfluoreszenz für den 5HT_{1A}-Rezeptor. Ein Zellmigrationsassay zeigte *ex vivo* eine Beeinflussung der Motilität durch ansteigende 5-HT Konzentrationen im Medium. Dieser Effekt konnte durch einen 5HT_{1A}-Antagonisten unterbunden werden (Moiseiwitsch & Lauder, 1995). Ebenfalls am 9. Gestationstag gipfelt in cNCCs auch die Expression des 5HT_{2B}-Rezeptors. Pharmakologische Inhibition zu diesem Zeitpunkt führt zu kraniofazialen Malformationen (Choi et al., 1997).

An E12 zeigen cNCC-Derivate in der kraniofaziale Region starke 5-HT-Immunoreaktivität entsprechend einer Aufnahme nach intrazellulär (Lauder et al., 1988). Dies könnte möglicherweise über den SERT-Transporter geschehen, dessen Expression an E12 erstmalig in diesen Geweben nachgewiesen wurde (Narboux-Nême et al., 2008). Wird dieser an den Gestationstagen E9 bis E12 pharmakologisch durch Sertralin inhibiert, bilden Mausembryonen kraniofaziale Malformationen aus und zeigen histologisch eine verstärkte Apoptose und verminderte Proliferation von cNCCs (Shuey et al., 1992). Mäuse, welche in utero Citalopram ausgesetzt sind, zeigen postnatal eine erhöhte Rate an ektopen Suturen, Zahnfehlbildungen, Schnauzendeformationen und Kraniosynostosen. Exposition gegenüber Sertralin in utero erhöhte die Rate an Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (Cabrera et al., 2020; Cray et al., 2014; Durham et al., 2019).

In den primordialen enterischen Ganglien als Derivat der sNCCs und Vorläufer des enterischen Nervensystems wird an E15 der 5HT_{2B}-Rezeptor exprimiert, diese Expression fehlt in der adulten Zellpopulation. In vitro sorgt 5HT₂-Agonismus in aus Neuralleisten stammenden neuronalen Progenitoren für neuronale Differenzierung, während 5HT₂-Antagonismus diese unterbindet (E. Fiorica-Howells et al., 2000).

Li et al. konnten in vitro zeigen, dass in primären Kulturen dieser Progenitoren die Zugabe von 5-HT zum Medium Proliferation und dopaminerge Differenzierung

auslöst. In adulten Mäusen war die Anzahl der dopaminergen Neurone im ENS von Tieren mit dem Genotyp *Tph2^{-/-}* verringert, aber nicht im ENS von Tieren mit dem Genotyp *Tph1^{-/-}*. Die Anzahl dopaminergener Neurone in adulten *Sert^{-/-}* Tieren, die am ehesten erhöhte, lokal-enterische 5-HT Spiegel besitzen, war erhöht (Z. Li et al., 2011). Damit scheint die trophische Wirkung 5-HTs in dieser Zellpopulation auch *in vivo* eine Rolle zu spielen und zumindest in adulten Tieren auf neuronales 5-HT zurückzugehen.

Das Nebennierenmark stellt ein Derivat der tNCCs dar. Kameneva et al. konnten kürzlich zeigen, dass die Proliferation von Vorläuferzellen zwischen dem 11. und dem 13. Gestationstag hier 5HT₃-abhängig negativ reguliert wird (Kameneva et al., 2022). CaNCCs steuern Zellen zu den endokardialen Kissen bei, welche in der Embryonalentwicklung die Binnenräume des Herzens formen. Ob diese Zellen auch die Zielstruktur serotonerger Modulation in der Embryonalentwicklung sind, ist nicht bekannt. Allerdings konnte in murinen Ganz-Embryo-Kulturen gezeigt werden, dass ein Teil des endokardialen Gewebes zwischen E9 und E12 intrazellulär Serotonin anreichert, was durch MAO-Inhibition verstärkt und durch SSRIs unterbunden werden konnte (Yavarone, Shuey, Tamir, et al., 1993). Dies ist in ungefähre Übereinstimmung mit der erstmaligen kardialen Expression des SERTs in einer Reporter-Linie an E10 (Pavone et al., 2007).

Effekte durch serotonerge Modulation der kardialen Entwicklung sind auf Phänotyp-Ebene recht heterogen. Der 5HT_{2B}-Rezeptor wird in der Maus ab E8 am ehesten in myokardialer Lokalisation exprimiert (Choi et al., 1997). Eine genetische Deletion dieses Rezeptors führt um den zehnten Entwicklungstag zu kardialen Malformationen und hochfrequentem intrauterinem Tod in der zweiten Gestationshälfte (Nebigil et al., 2000). Allerdings ist nicht klar, ob dies auch die Notwendigkeit von Serotonin-Signalling zu diesen Entwicklungstagen impliziert, da dieser Rezeptor *in vitro*, anhand der invers-agonistischen Wirkung von klassischen Antagonisten in Abwesenheit von 5-HT, Hinweise auf eine hohe Autoaktivität zeigt (De Deurwaerdère et al., 2020).

Für *Tph1*- und *Sert*-Knockoutmodelle wird jeweils ein stark ausgeprägter kardialer Phänotyp berichtet, allerdings ist dieser in anderen Modellen desselben Gens nicht ausgeprägt (Bengel et al., 1998; Cote et al., 2003; Pavone et al., 2009; Walther, Peter, Bashammakh, et al., 2003).

5.5.4.2 *Das sich entwickelnde ZNS:*

Wie in Abschnitt 5.5 besprochen findet die Synaptogenese vieler serotonerger Zielstrukturen in Menschen und Nagern erst postnatal und damit deutlich nach Einsetzen der zentralnervösen Serotonin-Produktion statt (Semple et al., 2013).

Die ersten serotonergen Synapsen, zwischen einsprießenden Raphe-Axonon und protoneuronalen Cajal-Retzius Zellen, können in Mäusen erst ab E17 und damit unmittelbar perinatal beobachtet werden (Janusonis et al., 2004). In Ratten kann an E18 Synaptogenese von serotonergen Axonterminalen im Neuropil der Substantia nigra und an E19 in Locus coeruleus und in den Raphe Nuclei beobachtet werden (Lauder et al., 1982).

Aufgrund der frühen embryonalen Expression von Bestandteilen des serotonergen Systems in Abwesenheit ausgeprägter synaptischer Signalübertragung, kam schon in den 1970er Jahren die Idee auf Serotonin könnte auch im embryonalen ZNS die Rolle eines Morphogens übernehmen (Lauder & Krebs, 1978).

In vitro und ex vivo sind eine Vielzahl von direkten Effekten 5-HTs auf die Zellteilung, Migration und Differenzierung von neuronalen Zellpopulationen über verschiedene Entwicklungszeitpunkte und Spezies nachgewiesen. Ein umfassendes Review hierzu bildet die Veröffentlichung von Wirth et al. (Wirth et al., 2017). Für embryonale und frühe postnatale Entwicklungszeitpunkte der Maus konnten als direkte morphogene Effekte 5-HTs die Verstärkung des Wachstums von Neuriten in primären Kulturen aus Cortex und Striatum an E15 via dem 5HT₇R nachgewiesen werden, die Verstärkung des Wachstums von Neuriten in primären Kulturen aus dem ventro-posterioren Thalamus an E15 via den 5HT_{1B/2A/2C/3}Rs, die Erhöhung der Migrationsgeschwindigkeit GABAerger Interneurone in corticalen, organotypischen Schnitten an E17 und E18 via dem 5HT₆R, die Verminderung der Migrationsgeschwindigkeit glutamaterger Neurone in corticalen, organotypischen Schnitten an E17 und E19 via dem 5HT₆R, die Verstärkung des axonalen und dendritischen Wachstums in primären hippocampalen Kulturen an E18 via dem 5HT₄R, die Verstärkung des Auswachsens von Dendriten in hippocampalen, organotypischen Schnitten an P1 via dem 5HT₇R, sowie die Verstärkung der Synaptogenese in hippocampalen, organotypischen Schnitten an P15, via dem 5HT_{1A}R (Agrawal et al., 2019; Kobe et al., 2012; Lotto et al., 1999; Mogha et al., 2012; Persico et al., 2006; Riccio et al., 2009; Speranza et al., 2013).

Weiterhin konnten indirekte morphogene Effekte auf eine Vielzahl embryonaler Neuronenpopulationen, unter anderem Raphe-Neuronen selbst, über das Neurotrophin BDNF nachgewiesen werden, dessen Expression über die 5HT_{1A/2R}s gesteigert wird (Homberg et al., 2014).

Auch in vivo bilden sich eine Vielzahl dieser Effekte ab. So konnte gezeigt werden, dass die reversible Inhibition aller maternalen und embryonalen TPHs durch Injektionen von pCPA in trächtige Ratten zwischen E12 und E17, zu einer signifikanten Reduktion des Hirngewichtes führt, die auch am letzten Messpunkt an P80 noch ausgeprägt war (Vitalis et al., 2007).

Lauder et al. verglichen nach pCPA-Injektion an E8 und E9 in schwangeren Ratten durch die Injektion radioaktiv markierten Thymidins an den Gestationstagen 11 bis 16 die Entwicklung von Raphe-innervierten und nicht-innervierten Hirnanteilen. Dabei fiel auf, dass in den embryonal früh Raphe-innervierten Regionen des posterioren Diencephalons, sowie in den dopaminergen und serotonergen Kerngebieten des Hirnstamms, nach TPH-Inhibition eine initiale Proliferationsverzögerung um den 13. Entwicklungstag, mit überschießender Proliferation in den Folgetagen auftrat. In den, in der weiteren Embryonalentwicklung nie serotonerg innervierten, Gebieten des anterioren dorsalen Diencephalon trat ein nahezu gegensätzlicher Effekt mit Hyperproliferation um den 14. Entwicklungstag und großteiliger Normalisierung bis zum 16. Entwicklungstag auf (Lauder & Krebs, 1978; Lauder et al., 1982).

Vitalis et al. nutzten ein vergleichbares Injektionsschema in schwangeren Ratten an den Entwicklungstagen E12 bis E16/17. Sie fanden anhand von kortikaler Bromdesoxyuridin-Inkorporation, unveränderte Proliferation an E16.5, aber eine signifikante Proliferations-Minderung an P8. Diese führte zu einer, selbst an P80 noch nachweisbaren, Minderung der kortikalen Dicke im somatosensorischen Kortex um ca. 22% in Layer II-IV. Weiterhin zeigten sich ultrastrukturell eine verspätete Migration und Differenzierung von Interneuronen und eine verminderte dendritische Komplexität in Pyramidenzellen (Vitalis et al., 2007).

Ein für die proliferativen Effekte 5-HTs in der Hirnentwicklung von Nagern verantwortlicher Rezeptor ist bisher nicht bekannt. Allerdings fanden Bonnin et al. Expression von 5-HT_{1A}Rs im Cortex selbst und 5-HT_{1F}Rs in den kortikalen proliferativen Zonen (Ventrikuläre Zone, Ganglionische Eminenz) an E14-E16 und Akbari et al. konnten zeigen, dass prinatale Kokain-induzierte Mikrozephalien durch 5HT_{1A}-Agonisten reversibel sind (Akbari et al., 1994; Bonnin et al., 2006).

Aufgrund dieser Ergebnisse, sowie den proliferativen Effekten von 5HT_{1A}-Agonisten im adulten Hippocampus, vermuten Vitalis et al. eine Rolle von 5HT_{1Rs} und des 5HT_{1ARs} im Speziellen (Vitalis et al., 2013).

Im agyrischen Cortex von Mäusen und Ratten wird an E13.5 der 5HT_{2AR} nicht exprimiert. Im gyrenzephalen Cortex von Frettchen und Mäusen findet an entsprechenden Entwicklungstagen allerdings eine Expression in basalen Progenitoren statt und Rezeptor-Stimulation führt zu proliferativen Effekten. Dieser Phänotyp lässt sich in Mäusen durch in utero Elektroporation einer Genkopie angleichen. Xing et al. nennen als eine mögliche Deutung, die differenzielle Expression des 5HT_{2ARs} könnte eine evolutionäre Begründung für die im Vergleich höhere kortikale Oberfläche des Menschen Nagern gegenüber darstellen (Xing et al., 2020).

Wie in Abschnitt 5.4.3.2.2 diskutiert, rekapituliert ein im adulten Tier induzierter Tph2-Knockout nicht alle behavioralen und physiologischen Veränderungen des konstitutiven Tph2-Knockouts.

Interessanterweise konnten initiale Studien in Tph2^{-/-} Mäusen keine kortikalen oder subkortikalen histologischen Auffälligkeiten beobachten und es konnten keine Unterschiede in den Spiegeln anderer Transmitter in Homogenaten ganzer, adulter Gehirne festgestellt werden (Alenina et al., 2009; Gutknecht et al., 2008; Savelieva et al., 2008).

Dies wurde jedoch wenige Jahre später durch weitere Veröffentlichungen in Frage gestellt. Die Autoren fanden unter anderem eine Verminderung Tyrosin-Hydroxylase positiver, noradrenerger Neurone im Locus Coeruleus bei signifikanter Verminderung der Noradrenalin-Spiegel in Raphe, Hippocampus, Frontalkortex und Thalamus, sowie Dopamin-Spiegel im Hippocampus und Frontalkortex in adulten Tieren; eine verminderte Anzahl GABAerger Interneurone in der Amygdala bei erhöhten GABA-Spiegel im Hippocampus in adulten Tieren und, entsprechend der pCPA-Studie von Vitalis et al., eine signifikante Verminderung der Dicke des somatosensorischen Kortex in den Layern II-IV an P7 und P14, sowie eine signifikante Verminderung im Hirngewicht an P14 (Gutknecht et al., 2012; Mosienko et al., 2015; Narboux-Neme et al., 2013; Waider et al., 2013). Die Veränderungen der Noradrenalin- und Dopamin-Spiegel finden sich nicht in Gehirnen in denen der Tph2-Knockout erst im adulten Tier induziert wurde (Whitney et al., 2016)

Weiterhin konnte ein Einfluss des Tph2-Knockouts auf das Bestehen von serotonergen Axonterminalen selbst beobachtet werden, welcher allerdings auch an P60, also nach dem Abschluss der terminalen Feldinnervation, noch durch induzierten Tph2-Knockout reproduziert werden kann, also eher Ausdruck adulter Plastizität in Abhängigkeit serotonergen Stimulus darstellt (Migliarini et al., 2013; Pratelli et al., 2017).

Sowohl die Veränderungen im Hirngewicht, als auch in den hippocampalen Noradrenalin-Spiegeln und der Dicke des Somatosensorischen Cortex an P7 und P14 finden sich auch im $Vmat2^{flx/flx}::Sert^{+/Cre-}$, allerdings nicht im $Vmat2^{flx/flx}::Pet^{+/Cre-}$ -Modell (Narboux-Neme et al., 2013; Narboux-Nême et al., 2011).

Ein weiteres Enzym, welches in den Studien von Lauder et al. und Vitalis et al. durch die, Isotypen-gegenüber unspezifische, Wirkung pCPAs gehemmt wurde ist die Tph1 in Muttertier und Embryo.

Cote et al. beobachteten an E12.5 eine Reduktion des Längenwachstums, Veränderungen der Hirnmorphologie, sowie eine Hypoproliferation neuronaler Vorläufer in der Region des vierten Ventrikels anhand Bromdesoxyuridin-Inkorporation in Abhängigkeit des TPH1-Status des Muttertieres, aber nicht des Embryos selbst (Cote et al., 2007).

Wie in Abschnitt 5.4.3.2.2 diskutiert, scheint der aggressive Phänotyp in $MaoA^{-/-}$ Mäusen seinen Ursprung in der Hirnentwicklung zu haben, da dieser durch MAOI Injektionen in neonatalen aber nicht in adulten Mäusen repliziert werden kann. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die biologische Grundlage des aggressiven Verhaltens im Vorderhirn liegt, da $MaoA^{-/-}$ Mäuse, in denen unter einem Vorderhirn-spezifischen Promotor eine $MaoA$ -Kopie abgelesen wird, diesen Phänotyp nicht zeigen (Chen et al., 2007).

Ein direkter Effekt 5-HTs auf die kortikale Entwicklung in vivo ist ein antiproliferativer Effekt auf neuronale Progenitoren in der Subventrikulären Zone. Dieser trat in $MaoA^{-/-}$ - $MaoB^{-/-}$ Tieren auf, welche stark erhöhte 5-HT Spiegel in der späten Embryonalzeit und frühen postnatalen Zeit aufweisen (7.5-fach erhöht an E14/E17, 12-fach erhöht an P2, 3-fach erhöht an P15). Dieser Effekt war durch pCPA-Administration zwischen E14 und E19 normalisierbar (Cheng et al., 2010).

Wie bereits erwähnt, wurde das erste $MaoA^{-/-}$ Mausmodell 1995 von Cases et al. berichtet. In diesem kam es, neben der 2-fachen Erhöhung im Erwachsenenalter, zu

einer 9-fachen Erhöhung von 5-HT im ZNS von neugeborenen Tieren (Cases et al., 1995).

In einer Folgepublikation konnten sie erstmalig MaoA-abhängige, morphologische Veränderungen im Cortex nachweisen. Es zeigte sich, dass in diesem Mausmodell die typische Ausbildung des Barrel Cortex unterbrochen war. Dieser Phänotyp konnte durch die pharmakologische Inhibition der Serotonin-Synthese während eines postnatalen kritischen Fensters verhindert werden (Cases et al., 1996).

Der Barrel Cortex ist ein Anteil des somatosensorischen Cortex von Nagern indem die Schnurrhaare topisch repräsentiert sind und welcher histologisch eine typische, den Schnurrhaaren entsprechende, Form aufweist. Diese Region maturiert erheblich um den Geburtstermin, ein Vorgang der innerhalb der ersten sechs postnatalen Tage („kritisches Fenster“) abgeschlossen ist (Osterheld-Haas et al., 1994).

Thalamokortikale Axone (TCAs) stellen eine ipsilaterale Verbindung zwischen thalamischen Kerngebieten und topisch zugehörigen Arealen des Neokortex dar. Sie verlassen in der Maus an E13 den Thalamus und wachsen in die Capsula interna, durchqueren das Subpallium an E14 und erreichen ihre jeweilige kortikale Region an E16, innervieren jedoch ihre Zielstrukturen in Layer IV erst einige Tage später um den Geburtstermin (Garel & López-Bendito, 2014). Die Form der neokortikalen Barrel wird dabei innerhalb der Hirnentwicklung von den einsprießenden TCAs induziert und entspricht der topischen Repräsentation innerhalb des Thalamus, deren Formation der kortikalen Repräsentation einige Tage vorangeht. In MaoA^{-/-} Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Bildung der Barrel nicht stattfindet, da von Seiten der TCAs keine terminale Verzweigung stattfindet und von Seiten der Layer IV Neurone keine dendritische Orientierung in Richtung des Zentrums der Barrel (Rebsam et al., 2002). Die wachsenden TCAs halten innerhalb der Capsula interna und später im Subpallium eine topische Organisation aufrecht, welche von guidance-Faktoren wie Netrin oder EphrinA abhängt (Garel & López-Bendito, 2014). Die Reaktion des Wachstums von TCAs auf Netrin wiederum wird durch den Stimulus von 5HT_{1B}Rs und 5HT_{1D}Rs auf den TCAs selbst moduliert und ein partieller *in utero* knockdown dieser Rezeptoren führt zu einer Veränderung ihrer Organisation im Pallium (Bonnin et al., 2007). Die Veränderung der Zytoarchitektur im somatosensorischen Cortex von MaoA^{-/-} Tieren scheint auf die Überstimulation dieser beiden Rezeptoren zurückzugehen, da ein zusätzlicher Knockout des 5HT_{1B}Rs oder 5HT_{1D}Rs in MaoA^{-/-} Tieren den histologischen Phänotyp normalisiert (Rebsam et al., 2002; Salichon et al., 2001).

TCAs zeigen um dem Geburtstermin eine starke Aufnahme 5-HTs nach intrazellulär (D'Amato et al., 1987). Dies geschieht durch die transiente Expression von SERT und VMAT2 in Abwesenheit einer TPH der Expression einer MAO (Lebrand et al., 1998; Vitalis et al., 2002). Dieses Expressionsmuster, welches Reuptake ermöglicht, allerdings keine bekannten Arten von Eigenproduktion oder Abbau wird als Hinweis auf die Nutzung 5-HTs als „geliehener Transmitter“ gesehen (Lebrand et al., 1996). Ein ähnliches Verhalten ist von einer dopaminergen Neuronenpopulation bekannt, welche in der Lage ist, GABA als Kotransmitter zu sezernieren (Tritsch et al., 2014). Allerdings wurde bislang kein direkter Nachweis serotonerger Kotransmission aus TCAs veröffentlicht.

Da in Vorderhirn spezifischen MaoA-Knockin Tieren auf MaoA^{-/-} Hintergrund, die MaoA im Cortex aber nicht in den TCAs exprimieren, normale Barrel Fields entstehen, liegt die Annahme nah, dass 5-HT Aufnahme durch TCAs nicht für die Entwicklung dieser notwendig ist (Chen et al., 2007). Allerdings zeigen Sert^{-/-} Tiere identisch dysmorphe Barrel wie MaoA^{-/-} Tiere und die konditionelle Deletion des SERT-Transporters aus VGlut2-positiven Neuronen zeigt, dass dieser Phänotyp abhängig von der SERT-Expression durch TCAs ist (Chen et al., 2015; Persico et al., 2006). Auch dieser Effekt auf die Morphologie des somatosensorischen Cortex scheint abhängig vom 5HT_{1B}R, da MaoA^{-/-}-Sert^{-/-}-5HT_{1B}R^{-/-} Mäuse eine normalisierte Morphologie aufweisen (Salichon et al., 2001). Weiterhin scheint die Modulation der Migration kortikaler Interneurone über den 5HT₆R eine Rolle zu spielen (Riccio et al., 2011; Riccio et al., 2009). Durch die Beteiligung des SERT liegt auch eine klinische Relevanz nahe, da SSRIs häufig auch während der Schwangerschaft eingenommen werden. Und in der Tat konnten nach der Gabe von Fluoxetin während des kritischen Fensters Veränderungen im Feinbau des somatosensorischen Cortex in Ratten beobachtet werden. Die grobe Morphologie der Barrel blieb allerdings erhalten (Lee, 2009).

Eine ähnliche Regulation, in Abhängigkeit von Sert bzw. Sert, Vmat2, MaoA und vom 5HT_{1B}R, scheint in der Maturation des auditorischen Cortex und des Retinotectalen Trakts zum Tragen zu kommen (Pan et al., 2021; Upton et al., 1999). Die Deletion des SERT in glutamatergen, thalamischen Neuronen, die zum Prefrontalkortex oder zum Hippocampus projizieren, zog keine beobachtbare morphologische Veränderung in diesen Arealen nach sich (Chen et al., 2016).

Weitere transiente SERT-Expression, beginnt zwischen E15 und P0 in Kortex, Hippocampus Hypothalamus und Hirnstamm (Narboux-Nême et al., 2008). Auch die transiente Koexpression von Sert und Vmat2 ist in Subpopulationen kortikaler Pyramidenzellen beschrieben (Wong et al., 2022). Die Funktion dieser Expressionsmuster ist bisher wenig erforscht. Allerdings wird Sert mit dem 5HT₇R in glutamatergen Neuronen des Prefrontalkortex koexprimiert und frühe postnatale Fluoxetin-Administration führt zu 5HT₇R-abhängiger Hyperkonnektivität von Bahnen, die zu den Raphe Nuklei projizieren und 5HT₇R-abhängig zu anhaltend verändertem Affekt (Olusakin et al., 2020). Für die Sert/Vmat2-koexprimierende Population kortikaler Pyramidenzellen scheint die in TCAs lang vermutete Hypothese des geliehenen Transmitters nun in einer aktuellen Veröffentlichung bewiesen worden zu sein. Diese Population scheint 5-HT zu nutzen, um das Überleben 5HT_{3A}R-positiver Interneurone zu regulieren (Wong et al., 2022).

Weitere Effekte der Deletion des Sert sind eine veränderte Zytoarchitektur in kortikolimbischen Arealen (infralimbischer Kortex und basolaterale Amygdala) in Mäusen, eine halbierte Anzahl 5-HT positiver Somata in den Raphe Kernen in Mäusen und Ratten und eine veränderte Verteilung TH-positiver dopaminerge Axone aus dem ventralen tegmental Areal im Prefrontalkortex (Garcia et al., 2019; Lira et al., 2003; Wellman et al., 2007).

5.5.5 Hypothesen über transiente, extraembryonale Serotonin-Quellen:

5.5.5.1 Preklinische und klinische Hinweise für eine maternale oder trophoblastäre 5-HT Quelle während der Embryonalentwicklung:

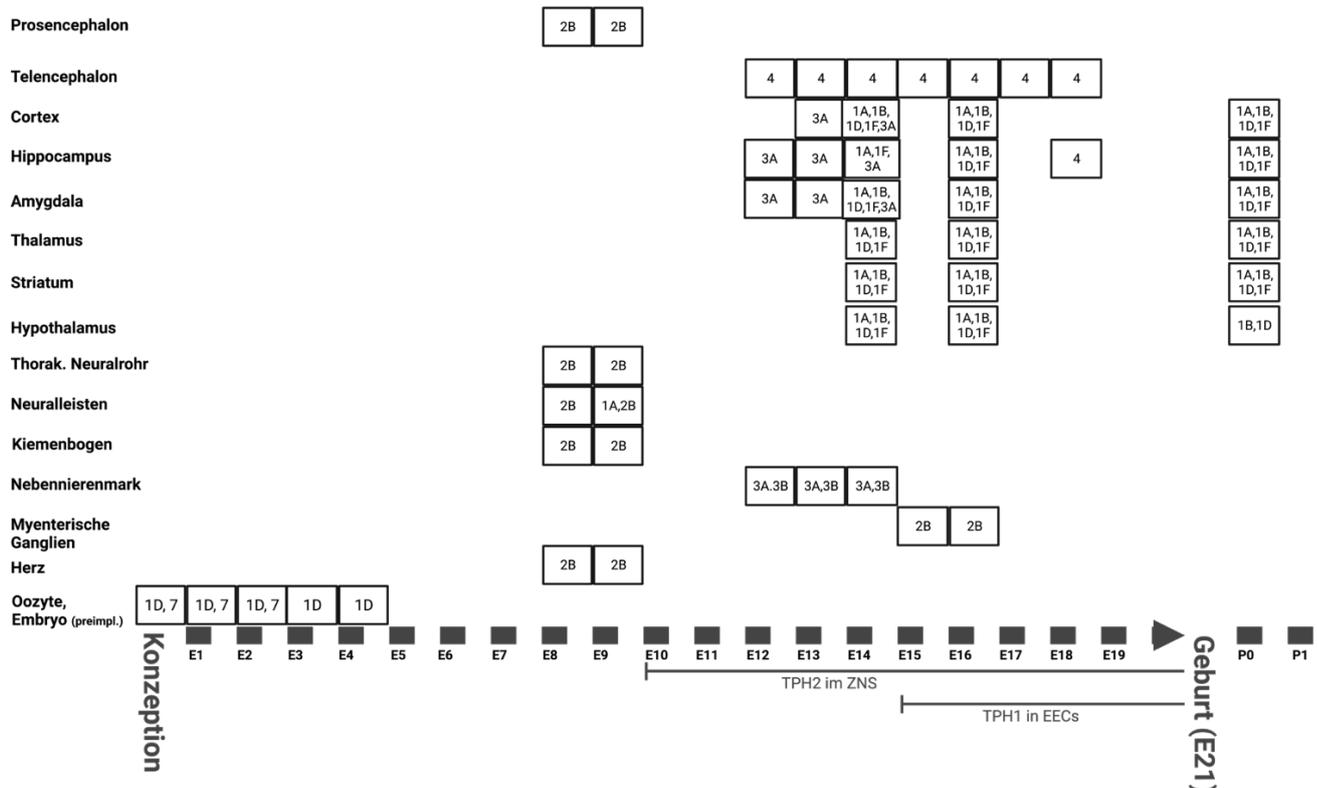


Abbildung 7: Die Expression von Serotonin-Rezeptoren im Maus-Embryo anhand der Literatur.

Literatur: (Agrawal et al., 2019; Amireault & Dubé, 2005; Amireault & Dubé, 2005; Bonnin et al., 2006; Chittajallu et al., 2013; Choi et al., 1997; Dubé & Amireault, 2007; Elena Fiorica-Howells et al., 2000; Hernandez & Janušonis, 2010; Kameneva et al., 2022; Moiseiwitsch & Lauder, 1995; Nebigil et al., 2001; Ritter et al., 2021; Vesela et al., 2003; Vucurovic et al., 2010; Walther & Bader, 1999).

Betrachtet man die Ausbildung spezifischer serotonerger Zielstrukturen über die Embryonalentwicklung und vergleicht diese zeitlich mit der Expression von TPHs und dem axonalen Wachstum serotonerger Neurone (siehe Abbildung 6) so fällt auf, dass die Ausbildung der Zielstrukturen einer serotonergen Versorgung häufig mehrere Entwicklungstage vorangeht.

Abbildung 7 zeigt die Expression von Serotonin-Rezeptoren im Maus-Embryo über den Verlauf der Schwangerschaft. Die erste nachweisbare Expression einer TPH findet sich in der Maus an Tag 10.5 der Embryonalentwicklung, an dem die naszente Population der Raphe Neurone erstmalig TPH2 exprimiert (Cote et al., 2007). Vernachlässigt man die Expression von 5HTRs im Preimplantations-Embryo, so findet die früheste Expression eines Serotonin-Rezeptors an Tag 8 statt, an dem der Embryo

den 5HT_{2B}-Rezeptor in Prosenzephalon, Herz, Kiemenbögen und Neuralleisten exprimiert (Choi et al., 1997). Ab Tag 9 wird zudem in cNCCs der 5HT_{1A}R exprimiert (Moiseiwitsch & Lauder, 1995). Da, wie in Abschnitt 5.5.1 diskutiert, die BBB zu diesem Entwicklungszeitpunkt wahrscheinlich kein Hindernis für die Passage von Serotonin-Molekülen darstellt, wären diese beiden, 5HTR-exprimierenden Zellpopulationen grundsätzlich auch in der Lage Stimuli durch ZNS-Serotonin zu erhalten. Das ZNS könnte in Bezug auf Serotonin, wie durch Ugrumov et al. vorgeschlagen, ein endokrines Organ darstellen, welches über neurohämale Organe die Peripherie mit Signalmolekülen versorgt (Ugrumov, 2010). Dies könnte auch die Expression des 5HT₃R in der sich entwickelnden adrenalen Medulla ab E13.5, also etwa zwei Tage vor dem Einsetzen der intestinalen Tph1-Expression erklären (Kameneva et al., 2022).

Allerdings tritt die erste tatsächliche 5-HT-Immunoreaktivität im Ncl. Raphe erst an E11.5 und damit noch einen Tag nach der TPH2 Expression auf (Wallace & Lauder, 1983). Dies legt nahe, dass die enzymatische Generation von Serotonin in relevanten Mengen erst zwei bzw. drei Entwicklungstage nach der ersten Expression von ersten Rezeptoren auftritt.

Ähnlich frappierend sind die Beobachtungen von Lauder et al. (1982b) über trophische Effekte in sich entwickelnden ZNS nach Applikation des TPH-Inhibitor pCPA, wenn man sie in einen zeitlichen Kontext setzt: Zunächst fällt auf, dass die trophischen Effekte welche an E13 im posterioren und an E14 im anterioren Dienzephalon beobachtet wurden deutlich vor Eintreffen ersten serotonerger Projektionen in diesen anatomischen Gebieten auftritt (Lauder et al., 1982). Zu diesem Zeitpunkt sollten serotonerge Projektionen nach Lidov & Molliver erst bis zum Isthmus vorgedrungen sein (Lidov & Molliver, 1982b). Unter der Annahme frei diffundierenden Serotonins, welches unabhängig von Synapsen vorliegt, sind diese beiden jedoch Beobachtungen schlüssig vereinbar.

Allerdings fand die Applikation von pCPA an E8 statt, also etwa drei Entwicklungstage vor Beginn der TPH2-Expression. PCPA besitzt eine Plasmahalbwertszeit (HWZ) von ca. 10h, womit ~6 HWZs zwischen der Applikation und dem Einsetzen der Expression liegen (Davies & Nicholson, 1978).

Damit liegt nahe, dass die beobachteten Effekte auf der Inhibition einer anderen früher exprimierten Quelle zurückgehen.

Zu einer ähnlichen Feststellung aufgrund von anderen Indizien kommen Bonnin et al. in einer Veröffentlichung von 2011. Sie maßen die Serotonin-Konzentration im Prosenzephalon von Mäusen zwischen E10.5 und E15.5, also vor dem Eintreffen serotonerger Projektionen ab E16.5 und vor der ersten beobachteten serotonergen Synapse an E17.5. Auffällig war, dass diese in diesem Zeitraum zwischen Pet1-KO-Mäusen, welche nur 30% der normalen Menge an Raphe Neuronen besitzen, und Wildtyp-Mäusen gleich war und erst nach diesem Zeitpunkt signifikante Unterschiede aufwies. Hieraus schlussfolgerten sie es sei eine extraembryonale Serotonin-Quelle notwendig und fanden Tph1- und AADC-Expression, sowie enzymatische 5-HT Generation in der Plazenta ab E10.5 mit einem Gipfel bei E14.5. Um eine mögliche maternale Quelle auszuschließen, erzeugten die Autoren Schwangerschaften in denen das trächtige Muttertier den Genotyp $Sert^{-/-}$ und die Embryonen den Genotyp $Sert^{+/-}$ besaßen und maßen prosenzephalere Serotonin-Spiegel an E12.5. Da homozygot SERT-negative Mäuse nahezu keine nachweisbaren Serotonin-Spiegel im Blut besitzen, sollte im Fall einer maternalen Serotonin-Quelle für das embryonale Prosenzephalon hier ein starker Abfall zu beobachten sein, dieser Effekt blieb allerdings aus (Bonnin et al., 2011). Interessanterweise zeigte allerdings auch die Plazenten aus diesen Schwangerschaften, entsprechend dem maternalen Blut, keine nachweisbaren Serotonin-Spiegel (Supplementary Table 1 in Bonnin et al. 2011). Dies spricht eher gegen eine TPH1-abhängige Serotonin-Produktion in der Plazenta, da der SERT-Phänotyp hier keinen Einfluss zeigen sollte.

Argumente für die Existenz einer maternalen Serotonin-Quelle während der Entwicklung finden sich in einer Veröffentlichung von Cote et al. Wie in Abschnitt 5.5.4.1.2 erwähnt, beobachteten sie an E12.5 eine Reduktion des Längenwachstums sowie eine Hypoproliferation neuronaler Vorläufer in der Region des vierten Ventrikels in $Tph1^{-/-}$ -Schwangerschaften. Dieser Effekt war abhängig vom Genotyp der Mutter und unabhängig vom Genotyp des Embryos (Cote et al., 2007).

Eine zumindest transiente TPH1-abhängige Quelle embryonalen ZNS-Serotonins, entweder in der Mutter oder in trophoblastischen Strukturen wie der Plazenta, würde auch verschiedene TPH1-abhängige behaviorale Phänotypen erklären. So zeigen $Tph1^{-/-}$ Mäuse einen veränderten Gang und $Tph1^{-/-}$ Ratten eine verminderte Stress-Reaktion (Sbrini et al., 2022; Suidan et al., 2013).

In Menschen konnte eine Assoziation zwischen erhöhten Aufmerksamkeits-Defizit/Hyperaktivitäts-Scores und TPH1-Mutationen in der Mutter festgestellt werden.

Eine solche Assoziation konnte weder für den TPH1-Genotyp des Vaters oder des Kindes noch für den TPH2-Genotypen von Mutter, Vater oder Kind gezeigt werden (Halmoy et al., 2010).

Eine generelle Assoziation von Polymorphismen der peripheren TPH-Isoform mit neuropsychiatrischen Erkrankungen konnte in Menschen im Fall von Depressionen, Suizidalität, instabiler Persönlichkeitsstörung vom Typ Borderline und Essstörungen hergestellt werden (Galfalvy et al., 2009; Kim et al., 2009; Wang et al., 2011; Wilson et al., 2009). Eine Assoziation zum maternalen serotonergen System besteht in Menschen zwischen Polymorphismen im mütterlichen SERT-Gen und der Symptomlast in kindlichen Fällen von ADS/ADHS, sowie von mütterlichen, peripheren 5-HT Spiegel und der Symptomlast in kindlichen Fällen von Autismus (Hanswijk et al., 2021; Montgomery et al., 2018).

Dass die von Migliarini et al. beobachteten Effekte eines Tph2-Knockouts auf die serotonerge Innervation zentralnervöser Zielstrukturen erst im Rahmen der terminalen Feldinnervation ab P5 auftreten, könnte sich durch eine vorher für TPH2-Serotonin kompensierende Quelle außerhalb des embryonalen bzw. postnatalen ZNS erklären lassen (Migliarini et al., 2013). Etwa durch eine trophoblastäre oder maternale Tph1. Auch könnte dies erklären, warum die von Savelieva et al. beobachteten behavioralen Effekte des Tph2-Knockouts in Tph1^{-/-}- Tph2^{-/-} Tieren verstärkt waren (Savelieva et al., 2008).

5.5.5.2 Plazentale Expression serotonerger Genprodukte:

Spezies	Lokalisation	Gen/-produkt	Expressionort	Gestationsalter	Technik	Veröffentlichung
Maus	Embryonal	TPH2	Raphe Ncl.	ab E10.5	ISH	Cote, F. 2007
Maus	Embryonal	TPH2	Myenterischer Plexus	ab E12.5	ISH	Cote, F. 2007
Maus	Embryonal	TPH1	Zirbeldrüse	ab E14.5	ISH	Cote, F. 2007
Maus	Embryonal	TPH1	Darm	ab E15.5	ISH	Cote, F. 2007
Maus	Extraembryonal	TPH1	Plazenta	E10.5-14.5, abnehmend bis E18.5	IHC	Bonnin, A. 2011
Maus	Extraembryonal	TPH1	Dottersack	ab E12.5	IHC	Wu, H. H. 2016
Maus	Extraembryonal	SERT	Plazenta	E 12.5 und 18.5 (zunehmend)	Northernblot, ISH	Verhaagh, S. 2001
Maus	Extraembryonal	SERT	Plazenta	E13.5	IHC	Kliman et al., 2018
Maus	Extraembryonal	SERT	Plazenta	E 14	qPCR	Bonnin, A. 2011
Maus	Extraembryonal	Oct3	Plazenta	E12.5 und 18.5 (abnehmend)	Northernblot	Verhaagh, S. 2001
Maus	Extraembryonal	Oct3	Plazenta	E10.5 bis E19.5 (zunehmend)	qPCR, MALDI/TOF	Lee, N. 2013
Mensch	Extraembryonal	TPH1	Plazenta	10.-12. SsW, 39.-41.SsW	IHC/qPCR	Laurent et al., 2017
Mensch	Extraembryonal	TPH2	Plazenta	10.-12. SsW, 39.-41.SsW	IHC/qPCR	Laurent et al., 2017
Mensch	Extraembryonal	SERT	Plazenta	7.-15. SsW	IHC	Kliman et al., 2018
Mensch	Extraembryonal	Oct3	Plazenta	7.-15. SsW	IHC	Kliman et al., 2018
Mensch	Extraembryonal	Oct3	Plazenta	6.-12. SsW, 13.-25. Ssw	qPCR, MALDI/TOF	Lee, N. 2013

Tabelle 2: Expression serotonerger Genprodukte in murinen embryoblastären und trophoblastären, sowie humanen trophoblastären Geweben anhand der Literatur.

In Tabelle 2 ist die intraembryonale und extraembryonale Expression von Genen und deren Genprodukten, welche Serotonin herstellen oder es in den Embryo transportieren könnten, aus der Literatur zusammengefasst.

Hypothesen über extraembryonale Serotonin-Quellen lassen sich grob in TPH-abhängige Produktion in den Trophoblasten-Derivaten Dottersack und Plazenta und plazentale Aufnahme aus maternalen Spiegeln über die Transporter SERT und OCT3 unterteilen.

Hierbei stehen die Daten innerhalb derselben Spezies zu denselben Gestationstagen teilweise in erheblichem Widerspruch zueinander.

So weisen Kliman et al., Verhaag et al. und Bonnin et al. zwischen E12.5 und E18.5 SERT-Expression in der murinen Plazenta nach, während Wu et al. diese nicht finden. Die von Wu et al. und Bonnin et al. gefundene TPH1-Expression in der murinen Plazenta zwischen E10.5 und E14.5, können Kliman et al. an E13.5 wiederum nicht finden (Bonnin et al., 2011; Kliman et al., 2018; Verhaagh et al., 2001; Wu et al., 2016). Über die Expression des Oct3 in murinen Plazenten in der zweiten Gestationshälfte scheint weitgehende Einigkeit zu bestehen (Lee et al., 2013; Verhaagh et al., 2001; Wu et al., 2016).

Da insbesondere Antikörper-basierte Verfahren unter unspezifischer Bindung leiden können und Genexpression auch in Abwesenheit von Enzym-Aktivität erfolgen kann, versprechen funktionelle Assays eine höhere Aussagekraft.

Die funktionelle Erfassung von trophoblästerer TPH-Aktivität an E12.5 und E14.5 nahmen Bonnin et al. und Wu et al durch die Inkubation von Plazenta- bzw. Dottersack-Homogenaten mit Tryptophan und den Kofaktoren der AAHs vor. Bonnin et al. führten weiterhin die Kannülierung maternaler und embryonaler Venen und Arterien mit gegenläufiger Perfusion von Substrat und Kofaktoren und Embryo-seitiger Messung durch. In beiden Versuchen wurde 5HTP-Generation de novo festgestellt (Bonnin et al., 2011; Wu et al., 2016).

Die Aufnahme Serotonins durch murine Plazenta-Explantate wurde funktionell erstmalig von Yavarone et al. 1993 zwischen E9 und E12 erfasst. Die Autoren konnten zeigen, dass 5-HT-Immunoreaktivität in der Plazenta zu diesen Entwicklungstagen abhängig von der Konzentration von 5-HT im Medium und durch SSRI-Inkubation unterdrückbar ist (Yavarone, Shuey, Sadler, et al., 1993).

Kliman et al. kamen in einem ähnlichen Versuchsaufbau mit murinen E13.5 Plazenten und humanen Ersttrimester-Plazenten zu dem Ergebnis, dass SSRI-Inkubation zur Verminderung der plazentalen Anreicherung von 5-HT führt und OCT3-Inhibition zur Anreicherung innerhalb der Plazenta auf embryonaler Seite (Kliman et al., 2018).

In postnatal entnommenen primären Kulturen zweier Zellpopulationen der humanen Plazenta konnte in trophoblastären Zellen Serotonin-Aufnahme mit einer Michaelis-Menten-Kinetik entsprechend dem SERT-Transporter und in fetalen endothelialen Zellen entsprechend der Kinetik des Uptake2-Transports nachgewiesen werden (Baković et al., 2021).

In einem beidseitigen Perfusions-Versuch, ähnlich dem von Bonnin et al. (2011), konnte mit postnatal gewonnenen, humanen und Ratten-Plazenten gezeigt werden,

dass zu diesem Entwicklungszeitpunkt primär eine Aufnahme von kindlicher Seite in die Plazenta erfolgt, welche durch OCT3-Inhibition unterdrückbar war (Karahoda et al., 2020).

Weiter verkompliziert wird die Erfassung von Serotonin-Produktion bzw. -Transport durch die Tatsache, dass die Plazenta hohe Mengen der 5-HT degradierenden MAOA exprimiert, weshalb Produktion oder Aufnahme nicht mit tatsächlich an den Embryo abgegebenen Mengen korrelieren müssen (Verhaagh et al., 2001; Wu et al., 2016).

Die Kontrolle plazentaler 5-HT Spiegel durch MAO scheint von hoher physiologischer Bedeutung, da in Ratten die Plazenta-nahe Injektionen des MAO-Inhibitor Pargylin zu Aborten führt und die MAO-Expression in der Plazenta von Gestose-Patientinnen vermindert ist (Barnea et al., 1986; Koren et al., 1965).

6 Fragestellung

Zusammenfassend befasst sich diese Arbeit mit bisher unbekanntem Mechanismen der Homöostase von 5-HT in verschiedenen Kompartimenten adulter und embryonaler Mäuse, als wichtigstem Modellorganismus des Menschen. Genauer beschäftigen wir uns mit folgenden Fragestellungen:

6.1 Serotonin-Synthese in Abwesenheit einer TPH im adulten Organismus:

Wie aus Abschnitt 5.1.4.1 der Einleitung hervorgeht wurde, nach der initialen Isolierung und Aufklärung der Struktur 5-HTs, Ende der 1940er Jahre, bereits in den 1950er und 1960er Jahren der biochemische Weg der Synthese vom Trp über 5-HTP zum 5-HT und des Abbaus zum 5-HIAA beschrieben. Wie allerdings der Folgeabschnitt zeigt, konnten Knockout-Modelle der, für den Geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes der Tryptophan-5-Hydroxylierung verantwortlichen TPHs in Mäusen die 5-HT Spiegel nicht in allen Kompartimenten unter die Nachweisgrenze absenken. Während Knockout-Modelle der Tph2 die Spiegel im Gehirn vollständig erklären konnten, waren weder Tph1^{-/-} noch Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-} Modelle in der Lage mehr als 90% der Spiegel im biologisch hoch relevanten Reservoir des Blutes zu erklären. In Abschnitt 5.3.5 sind physiologische Prozesse aufgeführt, welche über peripheres Serotonin reguliert werden. Dieses stammt dabei entweder aus lokalen Quellen und wirkt autokrin oder aus dem Blut und wirkt endokrin.

Daher lautet die erste, in dieser Arbeit behandelte Fragestellung:

Welche TPH1- und -2-unabhängigen Synthese-Wege 5-HTs finden sich in Mäusen, welchen Anteil am Serotonin-Reservoir des Blutes haben diese und welche physiologische Rolle spielen sie nach auto- oder endokriner Freisetzung?

Abschnitt 5.2 beschreibt die evolutionäre Verteilung und Konservierung von 5-HT als Molekül und der Indol-5-Hydroxylierung als chemisch allgemeinerer Form der Tryptophan-5-Hydroxylierung. Die Konservierung 5-HTs über weite Anteile der Domänen der Eukaryoten und Bakterien hinweg führt zu Entstehung mehrerer Wege der Indol- bzw Tryptophan-5-Hydroxylierung. Es zeigt sich aus der Literatur, dass es zwei Enzymfamilien gibt, aus denen Kandidaten für die TPH-unabhängige 5-HT Synthese in Mäusen in vivo in Frage kommen:

1. Die Familie der Familie der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs)
2. Die Familie der Tetrahydropterin-abhängigen Aromatischen Aminosäure-Hydroxylasen (AAAHs)

Aus diesen wollen wir einen Kandidaten auswählen und experimentell evaluieren.

6.2 Serotonin-Homöostase im embryonalen Organismus:

Wie aus Abschnitt 5.5.4 hervorgeht, besitzt 5-HT im embryonalen Organismus, neben seiner Rolle als Neurotransmitter und Gewebshormon, die Rolle eines Morphogens. Diese morphogenen Effekte 5-HT sind in Mausembryonen auf Niveau von Transmitter, Rezeptor und synthetisierendem Enzym beschrieben. Diese Arbeit befasst sich primär mit Embryonen ab der Midgestation also nach Abschluss von Gastrulation und Neurulation und fetalen Organismen bis zur Geburt (eine Erläuterung der Embryonal- & Fetalzeit in Mäusen findet sich in Abschnitt 5.5). Während dieses Zeitraumes finden sich Effekte auf die Entwicklung von Derivaten der Neuralleisten, dem sich entwickelnden Herzen und dem sich entwickelnden ZNS. Das ZNS als Reservoir ist hierbei, wie aus Abschnitt 5.5.1 hervorgeht, wahrscheinlich nicht durch die Blut-Hirn-Schranke von peripheren Reservoiren abgeschirmt. Wie Abschnitt 5.5.5 beschreibt, gibt es deutliche Hinweise auf extraembryonale Serotonin-Quellen neben der intra-embryonalen TPH-abhängigen Synthese. Als Kandidaten extraembryonaler Serotonin-Quellen kommen grundsätzlich Aufnahme aus der maternalen Peripherie und Produktion durch trophoblastäre Strukturen wie Eihäute oder Plazenta in Frage.

Daraus leitet sich unsere zweite Fragestellung ab:

Welchen Einfluss besitzen die embryonale, zentralnervöse und periphere 5-HT Synthese und extra-embryonale Serotonin-Quellen auf die embryonalen zentralnervösen und peripheren 5-HT Spiegel?

Die Evaluation von trophoblastärer Synthese oder trophoblastärer Aufnahme maternalen 5-HTs ist in der Literatur auf Niveau von Genexpression und funktionellen Assays ex vivo bereits erfolgt (siehe Tabelle 2). Dabei liegen allerdings, wie in Abschnitt 5.5.5.2 zusammengefasst, miteinander in Konflikt stehende Resultate vor. Daher wollen wir diese Daten in einem ersten Arbeitsschritt reproduzieren und

reevaluieren.

Auch der Einfluss embryonaler zentralnervöser 5-HT Produktion auf die Peripherie und umgekehrt, bzw. die tatsächliche Querbarkeit der BBB, ist bisher nicht quantitativ erfasst. Daher wollen wir in dieser Arbeit den quantitativen Einfluss verschiedener maternalen und kindlicher Genotypen serotonerger Gene auf embryonale zentralnervöse und periphere 5-HT Spiegel zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten *in vivo* bestimmen.

7 Methodik

7.1 Chemikalien

Ameisensäure	Merck (Darmstadt)
Ammoniumeisen(II)-sulfat	Merck (Darmstadt)
Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt)
Carprofen	MDC animal facility
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dithioerithrol	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Dopamin (LC-Grade)	Merck (Darmstadt)
Eosin	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Futtermittel: 0,25% Natrium	Ssniff (Soest)
Futtermittel: S0087- E745	Ssniff (Soest)
Hämatoxylin (Mayer)	Merck (Darmstadt)
HCG	MDC animal facility
Heparin	MDC animal facility
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
isotonische Kochsalzlösung	MDC animal facility
Katalase	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
KCl	Roth (Karlsruhe)
Ketamin	MDC animal facility
KH_2PO_4	Roth (Karlsruhe)
Metamizol	MDC animal facility
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Na_2HPO_2	Roth (Karlsruhe)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
Noradrenalin (LC-Grade)	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Normal Donkey Serum	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)

NSD1015	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt)
PFA	Roth (Karlsruhe)
PMSG	MDC animal facility
Tris-Acetat	Roth (Karlsruhe)
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)
Xylazin	MDC animal facility
Xylocain-Gel (2 %)	MDC animal facility
Xylol	Roth (Karlsruhe)
α - Methyl-L-Phenylalanin	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
(\pm)-6-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin-Dihydrochlorid	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
$^{13}\text{C}_{11}$ -L-Tryptophan	Cambridge Isotope (Tewksbury, Massachusetts, USA)
5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA, LC-Grade)	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
5-Hydroxytryptamin (5-HT, LC-Grade)	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
5-Hydroxytryptophan (5-HTP, LC-Grade)	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)

7.2 Antikörper

Antigen/Epitop	(Chromophor)	Verdünnung	Hersteller	Lot-#/RRID
5-HTP	-	1:250	Immunostar, USA	AB_572215 (RRID)
rSERT	-	1:500	Advanced Targeting Systems, USA	96-20 (Lot-#)
mSERT	-	1:500	Frontiers Institute, Japan	HTT-Go-Af970 (Lot-#)
Anti-MouseFc	Cy3	1:200	Merck	AP160C (Lot-#)
Anti-GoatFc	Cy3	1:200	Merck	AP180C (Lot-#)

7.3 Puffer und Lösungen

PBS

	ddH ₂ O
140 mM	NaCl
10mM	KCl
6,4 mM	Na ₂ HPO ₂
2 mM	KH ₂ PO ₄
pH	7,4

PFA (4%)

200 ml	PBS
8 g	Paraformaldehyd
pH	7,4

Extraktionspuffer

	ddH ₂ O
710 µM	Ascorbinsäure
2,4 %	Perchlorsäure

Tris-Acetat Puffer (pH 7,5)

ddH₂O
150 mM Tris-Acetat
pH 7,5

Tris-Acetat Puffer (pH 6,4)

ddH₂O
150 mM Tris-Acetat
pH 6,4

Kalium-Phosphatpuffer

ddH₂O
10 mM KH₂PO₄
pH 5

Preinkubationspuffer

Tri-Acetat Puffer
2 mg/ml Katalase
25 mM Dithioerithrol
100 µM Ammonium Eisen(II)-sulfat

Assaypuffer (mit Tryptophan)

ddH₂O
1 mM Tryptophan
250 µM (±)-6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid
2 mM NSD1015
15 mM Tris-Acetat Puffer (pH 6,4)

Assaypuffer (ohne Tryptophan)

ddH₂O
250 µM (±)-6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin-dihydrochlorid
2 mM NSD1015
15 mM Tris-Acetat Puffer (pH 6,4)

7.4 Methoden

Tierhaltung:

Die in unseren Experimenten verwendeten Mäusen wurden an der MDC animal facility in individuell ventilierten Käfigen (Tecniplast, Italien) unter standardisierten Pathogen-freien Bedingungen (spezifisch Pathogen-frei nach FELASA, jedoch *Helicobacter* spp., Pasteurellen spp. und Noroviren) und in Übereinstimmung mit dem TierSchG gehalten. Die Tiere wurden, den Anforderungen der Art entsprechend, in Gruppen gehalten. Die Haltung fand bei einer Temperatur von $21 \pm 2^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $65 \pm 5\%$ statt. Ein künstlicher zwölfstündiger Hell-Dunkel-Zyklus wurde aufrechterhalten. Der Zugang zu Wasser erfolgte für alle Tiere ad libitum. Den Tieren wurde Beschäftigung in Form von Nestbaumaterial und Unterschlupfmöglichkeiten zur Verfügung gestellt.

Alle Experimente fanden nach erfolgtem und genehmigtem Tierversuchsantrag in Abstimmung mit dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin statt (Anträge: G0068/19 und G0047/14).

Im Folgenden eine Auflistung der Linien der verwendeten Mausmodelle:

Linie	DOI d. Originalpublikation	Im Folgenden bezeichnet als:
C57BL/6N	-	Wildtyp, WT
B6.129(Cg)-TPH1 ^{tm1Bdr} /N	10.1126/science.1078197	Tph1 ^{-/-} , TPH1-KO
B6.129(Cg)-TPH2 ^{tm1Bdr} /N	10.1073/pnas.0810793106	Tph2 ^{-/-} , TPH2-KO
B6.Pah ^{enu2}	10.1093/genetics/134.4.1205	Pah ^{-/-} , PAH-KO
B6.129(Cg)-Slc6a4 ^{tm1Kpl} /J	10.1124/mol.53.4.649	Sert ^{-/-} , SERT-KO
B6.Slc22a3 ^{tm1Dpb}	10.1128/MCB.21.13.4188-4196.2001	Oct3 ^{-/-} , OCT3-KO
B6.129-Unc13d ^{tm1(BNie)} /J	10.1111/jth.12293	Munc ^{-/-} , MUNC-KO

Alle verwendeten Tiere wurden, sofern nicht bereits auf diesem Hintergrund erzeugt, für mindestens 10 Generationen auf den C57BL/6N-Hintergrund rückgezüchtet.

Zwischen den Linien Tph1^{-/-} und Tph2^{-/-}, Tph1^{-/-} und Pah^{-/-}, sowie Tph1^{-/-} und Sert^{-/-} wurden durch Kreuzung Doppelknockout-Linien erzeugt. Die abgekürzten Linienbezeichnungen setzen sich aus den Bezeichnungen der Einzellinien zusammen.

Alle Tiere wurden mit einer Art-gerechten Standard-Diät gefüttert (0,25% Natrium, Ssniff, Soest, Deutschland). Eine Ausnahme bilden die Linien Pah^{-/-} und Tph1^{-/-}- Pah^{-/-}, welche unter Phenylalanin-freier Diät (S0087- E745, Ssniff, Soest, Deutschland) gehalten wurden. Tiere dieser Linien, die experimentell dazu verwendet wurden den Effekt erhöhter Phenylalanin/Phenylketon-Spiegel auf 5-HT Spiegel zu erfassen, wurden nach der Geburt zunächst Phenylalanin-frei ernährt und erst als erwachsenes Tier und 4 Wochen vor dem Experiment auf Phenylalanin-haltige Nahrung umgestellt. Damit soll ein vulnerables Zeitfenster umgangen und Schaden und Leid am Tier vermieden werden (Andolina et al., 2011; Pascucci et al., 2008).

Injektion pharmakologisch und/oder metabolisch aktiver Substanzen in Mäuse:

α- Methyl-L-Phenylalanin:

Der PAH-Inhibitor α- Methyl-L-Phenylalanin (α- MPA, Sigma-Aldrich, Germany) in einer Dosierung von 0,43mg/g Körpergewicht oder isotonische Kochsalzlösung als Vehikel-Kontrolle wurden intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das Injektionsschema umfasste eine Injektion alle 12 Stunden für 2,5 Tage.

Das Experiment wurde 4 Stunden nach der letzten Injektion durch Narkose und Organentnahme finalisiert.

¹³C₁₁-L-Tryptophan:

Die Tiere wurden zur Depletion endogenen Tryptophans 18 Stunden gefastet (Sano et al., 2014). ¹³C₁₁-L-Tryptophan in einer Dosierung von 30mg/kg Körpergewicht oder isotonische Kochsalzlösung als Vehikel-Kontrolle wurden intraperitoneal injiziert. Das Experiment wurde 4 Stunden nach der letzten Injektion durch Narkose und Organentnahme finalisiert.

Gewebeentnahme:

Die eingesetzte Narkose richtete sich nach der zu beantwortenden Fragestellung und orientierte sich an der Richtlinie „Schmerztherapie bei Versuchstieren“ der GV-Solas (Stand 22.05.2015). Die eingesetzte Narkose ist ein höher konzentriertes Ketamin/Xylazin-Narkose (90-150mg/kg Körpergewicht Ketamin und 6-8mg/kg Körpergewicht Xylazin; i.p). Die dadurch erzeugte Hypnose ist so tief, dass auch kurzzeitig auftretende Schmerzen (z.B. durch den Rippenschnitt) vom Tier nicht mehr bewusst wahrgenommen werden kann. Nach Sicherstellung der chirurgischen Toleranz wurde das Herz, durch eine Laparotomie mit anschließender Eröffnung des Zwerchfells und Rippenkastens, freigelegt und es wurden maximal 1 ml Blut daraus entnommen. Danach wurde das Tier mit PBS/Heparin durch den linken Ventrikel perfundiert, um das Blut aus den Geweben zu entfernen, wobei spätestens hier in einer Zeitspanne von wenigen Sekunden der Tod eintrat.

Gewebeextraktion – Phenylethylamine und Indolalkylamine:

Blut:

Es wurde, nach Narkose und Thorakotomie, der linke Ventrikel punktiert. 300µl Vollblut wurden in eine 1ml Spritze, welche mit 100µl Heparin (300U/ml) vorbefüllt war, aus dem linken Ventrikel aufgezogen. Das heparinisierte Blut wurde in ein, mit 10µl Perchlorsäure (70%, perchloric acid, PCA) und 5µl Ascorbinsäure (10mg/ml, ascorbic acid, AA) präpariertes Eppendorf Tube ausgestoßen und auf einem Vortex vermengt.

Das Gemisch wurde bei 20.000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand sofort bei -80°C eingefroren.

Solides Gewebe:

Das Gewebe wurde nach der Entnahme gewogen und dann sofort bei -80°C in, bereits mit genormten Keramikugeln vorbefüllten, für den Zellaufschluss geeigneten, Tubes gefroren. Zur Extraktion wurden diese für etwa 15 Minuten auf Eis angetaut und dann in einem Verhältnis von 300µl/100mg mit Extraktionspuffer versetzt und sofort homogenisiert. Das Gemisch wurde bei 20.000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand sofort bei -80°C eingefroren.

Gewebeextraktion – Lipide:

Die Lipidextraktion wurde nach der Methode von Folch vorgenommen (Eggers & Schwudke, 2016). Dazu wurden 50µl Plasma oder 20 mg Gewebe in 100µl ddH₂O homogenisiert. Es wurden 200µl Methanol hinzugegeben und das Gemisch wurde auf dem Vortex vermengt. Dem Gemisch wurden nun 400µl Chloroform hinzugegeben, auf dem Vortex vermengt und für eine Inkubationszeit von 30 min auf einem Schüttler belassen. Nach Zentrifugation bei 3.000g für 10 Minuten wurde die untere, lipophile Phase in ein neues Gefäß überführt und unter Fluss eines Inertgases (N₂) bis zur Trockenheit eingengt. Die verbleibende und nun solide Phase wurde in 100µl Ethanol aufgenommen und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

Klinische Chemie aus Heparin-Plasma und Urin:

Es wurde, nach Narkose und Thorakotomie, der linke Ventrikel punktiert. 300µl Vollblut wurden in eine 1ml Spritze, welche mit 100µl Heparin (300U/ml) vorbefüllt war, aus dem linken Ventrikel aufgezogen. Das Gemisch wurde bei 3.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand bei 4°C gelagert.

Urin wurde durch Blasenpunktion gewonnen, ebenfalls bei 3.000g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und bei 4°C gelagert.

Die Messung der Parameter der klinischen Chemie erfolgte auf einem Beckman Coulter AU480.

Enzym-Assay zur 5-HTP Generation in Organlysaten:

Das Assay stellt eine adaptierte Version einer bereits durch unser Labor publizierten Methode dar (Matthes et al., 2019; Walther & Bader, 1999). Gefrorene Organe wurden in einem 75mM Tris-Acetat-Puffer (pH 7.5) in einem Verhältnis von 500µl/100mg homogenisiert und anschließend mit Ultraschall vollständig aufgeschlossen. Lysate wurden für 5 Minuten auf einer Zentrifuge bei 3.000g und 4°C von Trübungen befreit. 80µl Überstand wurden transferiert und mit 20µl Preinkubationspuffer versetzt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 30°C und 600 Runden/Minute unter Lichtabschirmung geschüttelt. 400µl Assay-Puffer wurden hinzugegeben und das Gemisch wurde 30 Minuten bei 37°C und 600 Runden/Minute unter Lichtabschirmung geschüttelt. Die Reaktion wurde mit 12µl PCA versetzt, auf dem Vortex vermischt und so gestoppt. Das Gemisch wurde bei 20.000g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und der Überstand sofort bei -80°C eingefroren.

Enzym-Assay zur 5-HTP Generation in primären Hepatozyten:

Murine primäre Hepatozyten wurden isoliert und in Williams E Medium auf KollagenA-beschichteten Petrischalen über Nacht kultiviert. Sie wurden für 12 Stunden mit Serum-Entzug (serum starvation) behandelt. Das Assay wurde durch die Inkubation mit Tryptophan (250µM Endkonzentration) und 6-Methyl-5,6,7,8-Tetrahydropterine (250µM Endkonzentration) durchgeführt und durch die Waschung der Zellen mit PBS und Fixation mit PFA (4%) beendet. Zur Auswertung wurden die Zellen für 30 Minuten mit normal donkey serum (3% Endkonzentration) inkubiert und dann mit dem Anti-5HTP Erstantikörper (1:250 Endverdünnung) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreifach in PBS gewaschen (je 15 Minuten) und dann mit dem Zweitantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift in PBS wurden sie mit dem Vectashield Mounting Medium (inklusive DAPI) inkubiert und durch Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Histologische Aufarbeitung von Gewebeproben:

Organe wurden zur histologischen Aufarbeitung über Nacht in 4% PFA fixiert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden (70%-100%) Ethanol-Reihe dehydriert und in Paraffin inkubiert (durch den Thermo Scientific STP120) und schließlich in Paraffin eingebettet. Erkaltete Paraffin-Blöcke wurden auf einem Mikrotom (Fisher Scientific HM355S) geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgenommen.

Vor der Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und rehydriert (3x Xylol, 3x 96% Ethanol, 90% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol, 30% Ethanol; je 5 Minuten) und 10 Minuten in PBS gewaschen.

Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die Schnitte für drei Minuten in Hämatoxylin (Mayer) inkubiert und dann nach optischen Kriterien in mehreren Waschschriften zu je drei Minuten in Leitungswasser gewaschen. Es folgt eine Inkubation in Eosin für 3 Minuten und schließlich in Isopropanol und Toluol für je 3 Minuten.

Antikörper basierte Färbungen wurden für alle Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:100 bis 1:1000 ausprobiert und schließlich in einer Verdünnung von 1:500 vorgenommen. Es wurden jeweils Kontrollen mitgeführt in denen Schnitte ausschließlich mit dem Zweitantikörper inkubiert wurden, diese zeigten kein nennenswertes Signal.

Bestimmung von Schwangerschaft und Gestationsalter:

Tiere wurden über Nacht verpaart und bei Auffinden eines vaginalen Plugs getrennt und die Weibchen gewogen. Die Verpaarung dauerte maximal vier Tage. Die Weibchen wurden von den Böcken getrennt, falls es in diesem Zeitraum nicht zu einem Plug kommt. In diesem Fall wurde ggf. nach ein paar Tagen Ruhepause erneut verpaart, jedoch nicht öfter als insgesamt drei Mal. Der morgen zu dem erstmalig ein Plug aufgefunden wurde, wurde in Übereinstimmung mit der Literatur im Fall einer Schwangerschaft als E0.5 festgelegt.

Die Tiere wurden ab dem angenommenen E8 täglich gewogen und bei einer Gewichtssteigerung von über 9% wurde eine Schwangerschaft angenommen.

Vasektomie von Böcken:

30 Minuten vor der Operation wurden die Männchen subkutan mit 5 mg/kg Carprofen injiziert. Für die Narkose wurden 100 mg/kg Ketamin/ 10 mg/kg Xylazin intraperitoneal appliziert. Der Eingriff dauerte maximal 10 Minuten pro Tier und wurde wie folgt durchgeführt:

Etwa zwei Zentimeter oberhalb des Penis wurde ein knapp 1 cm langer Schnitt durch Haut und Bauchfell gesetzt und der Hoden an dem daran befindlichen Fettpolster so weit herausgezogen, dass auch der Samenleiter zugänglich wurde. Der Bauchschnitt wurde dem skrotalen Zugang vorgezogen, da der Zugriff auf die beiden Samenleiter einfacher ist und man sie besser unterscheiden kann.

Mit einer Mikroschere wurde ein möglichst langes Stück des ersten Samenleiters herausgeschnitten und die Enden kauterisiert, bevor der Hoden vorsichtig zurück in die Bauchhöhle gedrückt wird. Die Prozedur wurde für den zweiten Samenleiter wiederholt, das Bauchfell mit einem Stich vernäht und die Haut mit einem Metallclip verschlossen.

Zur Linderung des postoperativen Wundschmerzes und der Vermeidung von Entzündungen wurde eine Jodtinktur sowie 2 % Xylocain-Gel auf die Naht gegeben und 100 mg/kg Körpergewicht Metamizol über das Trinkwasser für 3 Tage (berechnet auf 15 ml Trinkvolumen pro Tag) verabreicht.

Generierung und Entnahme von Zygoten:

Um die Eizellproduktion anzuregen, wurden die Weibchen wie folgt superovuliert:

Das Gestagen PMSG (pregnant mare serum gonadotropin; 5 IU/30mg BW) wurde intraperitoneal injiziert. Zwei Tage später wurde das zweite Gestagen HCG (human chorionic gonadotropin; 5 IU/30mg BW) injiziert. Die Weibchen wurden am Tag der zweiten Injektion mit Männchen verpaart und jeden Morgen wurde untersucht, ob eine Kopulation stattgefunden hat und ein vaginaler Plug vorliegt. Am Tag des Plugs wurden Eizellen gewonnen. Dieser Tag stellt auch hier den E0.5 dar. Vor der Entnahme der Eizellen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Eileiter entnommen. Aus den Eileitern wurden die Eizellen gespült und bei 37°C kultiviert.

Embryotransfer:

Um eine Scheinträchtigkeit zu induzieren, wurden die Ammenmütter mit vasktomierten Böcken verpaart und täglich auf Plugs untersucht.

Die Verpaarung dauerte maximal 4 Tage. Die Weibchen wurden von den Böcken getrennt, falls es in diesem Zeitraum nicht zu einem Plug kommt. In diesem Fall wurde ggf. nach ein paar Tagen Ruhepause erneut verpaart, jedoch nicht öfter als insgesamt 3 Mal. Falls ein Plug festgestellt wurde, werden am selben Tag befruchtete Eizellen in die Ammen transferiert. Dies geschah wie folgt:

Dreißig Minuten vor dem Eingriff wurden die Tiere mit 5 mg/kg des Analgetikums Carprofen subkutan injiziert. Die Ammen wurden mit 100 mg/kg Ketamin und 10 mg/kg Xylazin anästhesiert (i.p.). Eine Laparotomie, Schnittlänge: 0,5 cm wurde durchgeführt. Es wurden 10-15 Eizellen unilateral in das Infundibulum implantiert. Die Wunde wurde mit einer Naht verschlossen. Der Eingriff wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Linderung des postoperativen Wundschmerzes und der Vermeidung von Entzündungen wurden eine Jodtinktur sowie 2 % Xylocain-Gel auf die Naht gegeben und 100 mg Metamizol pro kg Körpergewicht über das Trinkwasser für 3 Tage (berechnet auf 15 ml Trinkvolumen pro Tag).

HPLC-FD:

Die Bestimmung von Tryptophan, 5-HTP, 5-HT, 5-HIAA, sowie Dopamin und Noradrenalin wurde, mit Ausnahme der Proben, welche auch auf Isotopen-markierte Metabolite untersucht wurden, über Hochleistungsflüssigchromatographie mit Fluoreszenzdetektion (HPLC-FD) vorgenommen. Proben wurden über eine C18-

Säule (LipoMare C18, AppliChrom, Oranienburg; ProtoSIL 120 C18 SH, VDS Optilab, Berlin) umkehrphasenchromatographisch aufgetrennt. Als mobile Phase kam dabei ein 10mM Kalium-Phosphatpuffer (pH 5,0) mit 5% Methanol zum Einsatz. Die Auftrennung fand bei 20°C statt. Die Flussrate wurden zwischen 0.8 und 1ml/min konstant gehalten und eine Messung dauerte 15 Minuten. Als Anregungswellenlänge wurde 295nm benutzt und Signal wurde bei 345nm detektiert. Quantifizierung erfolgte über Eichreihen mit einer Spanne von zwei Zehnerpotenzen um den quantifizierten Bereich. Die Proben wurden vor der seriellen Einspritzung bei 4°C im Gerät aufbewahrt. Um für eventuell trotzdem auftretende Degradierung rechnerisch zu kontrollieren wurden die Proben zu einem, alle fünf Messungen erfassten, Standard normalisiert. Die Auswertung der Signalintensität der chromatographischen Spektren erfolgte anhand der Peak-Höhe und wurde in der Software CLASS-VP (Shimadzu, Tokyo, Japan) vorgenommen.

HPLC-MS/MS:

Isotopen-markierte Tryptophan-Metabolite, sowie lipidomische Signaturen wurden tandem-massenspektrometrisch analysiert. Nach Auftrennung über eine Phenomenex Synergi Hydro-RP Säule (150 × 2 mm, 4 µm, Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) wurde das Stoffgemisch über eine AJS electrospray ion source (Agilent Technologies Santa Clara, CA) ionisiert. Als flüssige Phase wurde ein Gradient aus 0,1% Ameisensäure und Methanol (0,5%-40% in 6,5 Minuten; Steigerung bis auf 95% bis Minute 7) verwendet. Die Flussrate betrug 0,4ml/min und die Messzeit 15 Minuten. Die Analyse der Ionen und ihrer Transitionen fand auf einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer (Agilent 6470/1290) statt. Eichreihen wurden auch für ¹³C-markierte Metabolite anhand ihrer ¹²C-Äquivalente im Bereich 0,2 bis 200ng/ml erstellt. Die Analyse der Totalionenchromatogramme fand in der Agilent Mass Hunter Software statt.

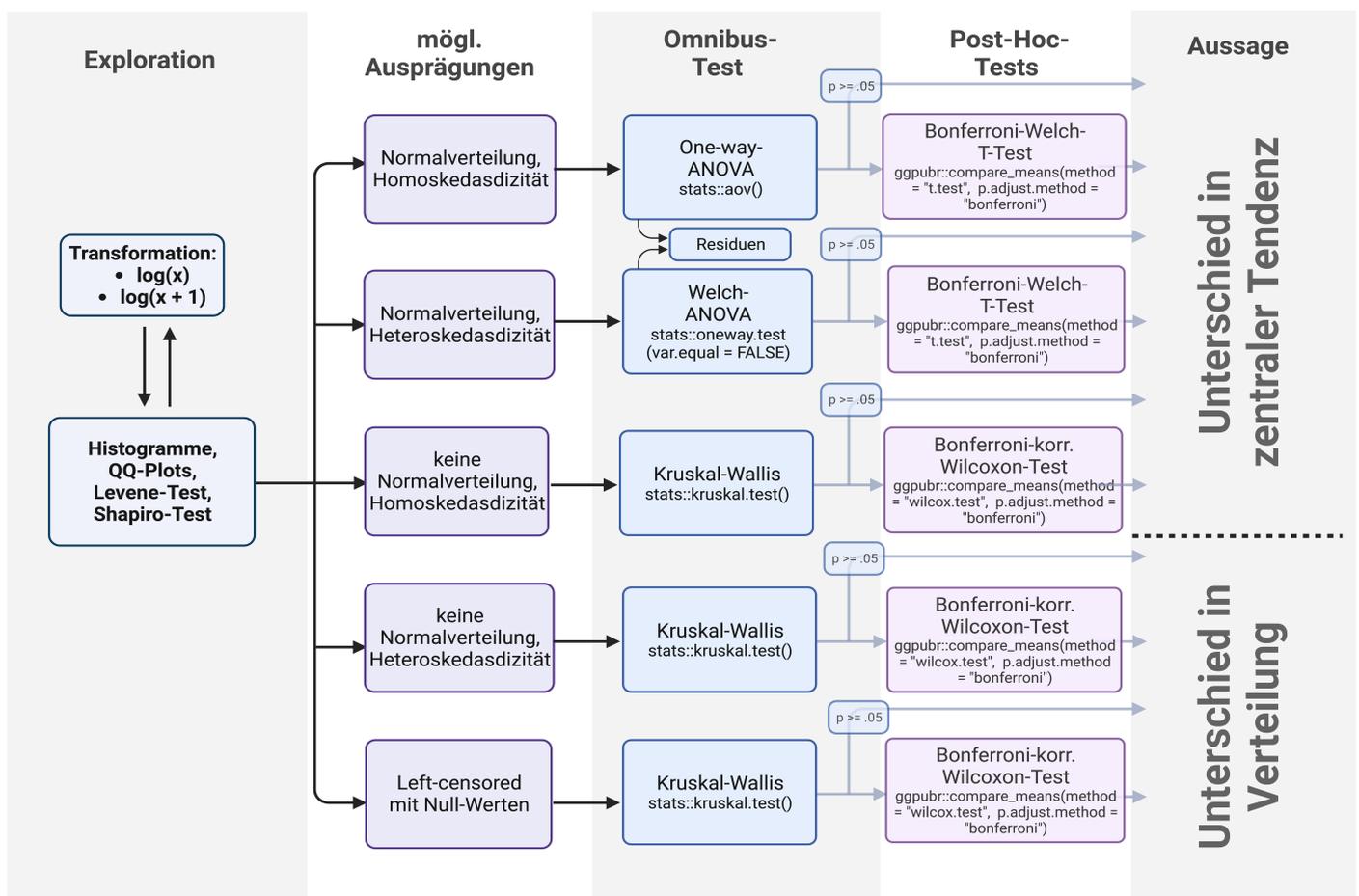
Schematische Zeichnungen:

Schematische Zeichnungen wurden in den BioRender Umgebung erstellt (BioRender.com).

7.5 Statistische Auswertung:

Die statistische Auswertung wurde in R (4.2.0) vorgenommen.

In diesem Projekt geht es um die Analyse von massen- und fluoreszenzspektrometrischen sowie spektrophotometrischen Daten aus den Organen von Mäusen verschiedener Genotypen und Behandlungen. Weiterhin werden in einem Experiment Embryonalgewichte untersucht. Als gruppierende Variable kommt in einem Teilprojekt der Entwicklungstag innerhalb der Embryonalentwicklung hinzu. Damit liegen unabhängige Variablen vor die nominal skaliert bzw. diskret sind (Genotyp, Behandlung) und es werden Effekte auf metrisch skalierte bzw. kontinuierliche Messwerte untersucht (Organ-Konzentration verschiedener Moleküle, Embryonalgewichte). Jeder Messpunkt innerhalb eines Parameters stammt in unserem Aufbau aus einer eigenen Maus. Damit sind die Messungen unabhängig.



Aussagen sollen anhand von Hypothesentests erfolgen. P-Werte sind nicht konfirmatorisch zu werten. Das obenstehende Diagramm zeigt das grundlegende

Vorgehen und das Vorgehen bei der Auswahl der jeweiligen Tests. Nicht aufgeführt ist die Nutzung einer Hauptkomponentenanalyse zur Dimensionsreduktion bei einem Teilprojekt. Grundlegend werden die Datensätze zunächst grafisch durch Histogramme exploriert. Es wird geachtet auf:

1. Verteilung
2. Skew
3. Abschätzung d. Varianzheterogenität zwischen den zu vergleichenden Gruppen und der Abhängigkeit d. Varianz von Mittelwert
4. Ausreißer

Verdachtsfälle werden weiter durch Shapiro-Wilk- und Levene-Tests weiter exploriert. Da non-parametrische Tests nur unter Homoskedastizität eine Aussage über die Unterschiedlichkeit der Populationsmittelwerte treffen (Kroeger et al., 2021), wird, falls weder Normalität noch Homoskedastizität vorliegt, durch Transformation versucht einen der beiden Fälle eintreten zu lassen.

In jedem angestellten Vergleich werden alle einbezogenen Datenpunkte auf dieselbe Art transformiert.

Als Transformationen kommen monotonen Verfahren in Frage, also Verfahren, die die "Rangfolge" der Datenpunkte erhalten (notwendig für non-parametrische Tests).

Als Transformation von spektrometrischen und insbesondere massenspektrometrischen Daten kommt in den meisten Veröffentlichungen

$$\log(x + c)$$

(gemeint ist der natürliche Logarithmus mit der Basis e) zum Einsatz, da diese Daten häufig eine log-normale Verteilung aufweisen (Mertens, 2017).

Daher greifen auch wir auf dieses Verfahren zurück

Dabei setzen wir allgemein $c = 0$.

Weiterhin wird dieses Transformationsverfahren mit der Idee der Varianzstabilisierenden Transformation genutzt.

Der Einfluss von Transformationen auf Homoskedastizität und Normalität wird anschließend abermalig durch Shapiro-Wilk- und Levene-Tests untersucht.

Ist auch durch Transformation keiner der beiden Fälle eingetreten, werden non-parametrische Tests durchgeführt, aber das Ergebnis wird entsprechend nicht im Rahmen eines Mittelwert-Unterschiedes, sondern im Rahmen eines Unterschiedes der Verteilungen bzw. deren Lage im Text diskutiert.

Einen Sonderfall stellen Messungen dar, welche Nullwerte enthalten, da der natürliche Logarithmus von Null nicht definiert ist. Hier kommt eine Konstante von $c = 1$ zum Einsatz, da so Nullwerte als solche erhalten bleiben.

$$\log(0 + 1) = \log(1) = 0$$

Diese Werte bilden weiterhin nicht unbedingt die tatsächliche Abwesenheit von Molekülen ab. Sie stellen primär ein Absinken der Konzentration des zu messenden Moleküls im Lösungsmittel unter das untere Detektions- bzw. Quantifikationsniveau (LLOD/LLOQ) des Messgerätes dar.

Da die zu vergleichenden Daten alle auf denselben Geräten mit denselben LLODs/LLOQs gemessen wurden, können hier non-parametrische Hypothesentests zum Einsatz kommen, welche die Rangfolge der Messpunkte anstatt der tatsächlichen Werte beachten (Helsel, 2005).

Als Hypothesen-Tests kommen, entsprechend dem Standard, der in den allermeisten Vergleichsveröffentlichungen gesetzt wird, bei mehr als zwei Stufen pro Faktor ein zwei-stufiges Verfahren mit einem Omnibus-Test (`stats::aov()`, `stats::oneway.test()` oder `stats::kruskal.test()`) und bei Ablehnen der Nullhypothesen als posthoc-Test die nach Bonferroni korrigierten Varianten der multiple-pairwise-T- und Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests (`ggpubr::compare_means(p.adjust.method = "bonferroni")`) als wrapper um `stats::t.test()` und `stats::wilcoxon.test()` zum Einsatz. Dabei werden T-Tests nach Welch (`stats::t.test(var.equal = FALSE)`), auch unter Vorliegen von Homoskedastizität verwendet, da die Einschätzung der Varianzgleichheit abschließend durch den Levene-Test erfolgt ist und ansonsten die, mit sinkender Stichprobengröße ebenfalls sinkende, Power des Levene-Tests in hohem Maße die Wahrscheinlichkeiten für Typ-I- & -II-Fehler durch Student's-T-Tests beeinflussen würde (Delacre et al., 2017).

7.5.1 Projekt 1 - Metabolische Adaption durch PAH-Serotonin in Leber:

Massenspektrometrisch erfasste, lipidomische Signaturen aus den Lebern von Mäusen verschiedener Genotypen und Fütterungen.

Dimensionen des Datensatzes: 43 relevante Parameter x 2 Fütterungen als gruppierende oder unabhängige Variable x 3 Genotypen als gruppierende oder unabhängige Variable x 4-5 biologische Replikate pro Gruppe.

Abhängige Variablen: Konzentration lipidomischer Metabolite (bezogen aufs Organgewicht, metrisch skaliert).

Unabhängige Variablen: 2 Faktoren: Genotyp (3 Stufen, nominal skaliert) und Fütterung (2 Stufen, nominal skaliert).

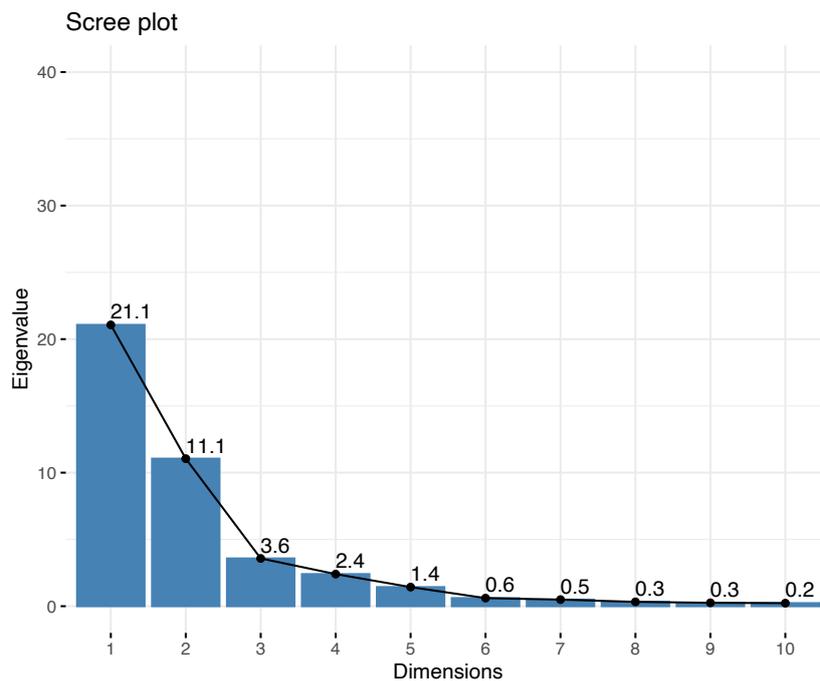
Dimensionsreduktion:

Problem:

1. Zu hohe Anzahl Parameter für Interpretation durch Menschen.
2. $p \gg n$ verzerrt Aussagekraft statistischer Verfahren.

Lösung: Auswahl derjenigen Subsets an Dimensionen, welche die Varianz zwischen den Genotypen und zwischen den Fütterungen erklären, durch Hauptkomponentenanalyse.

Wahl d. Anzahl v. Hauptkomponenten:



Scree-Plot zeigt, dass die Achsen 1-5 die Kaiser-Guttman-Regel erfüllen und ein Eigenvalue von > 1 besitzen (mehr Varianz erklären als die Ausgangs-Achsen).

Auswahl d. Hauptkomponenten anhand von Fragestellung:

Anhand von Abbildung 12a.

1. Varianz zwischen Genotypen anhand der Hauptkomponente 1 erklärt.
2. Varianz zwischen Fütterungen anhand der Hauptkomponente 3 erklärt.
3. (Hauptkomponenten 2, 4 & 5 nicht im Rahmen der Hypothese erklärbar)

Auswahl interessanter Ursprungsachsen anhand d. Hauptkomponenten:

Anhand von Abbildung 12b und 12c.

$$\text{Cos}^2 = \cos \left(\angle(\overrightarrow{PC}, \overrightarrow{\text{Ursprungsachse}}) \right)^2$$

1. je geringer der Winkel desto höher der Cos2-Wert.
2. je besser die Repräsentation der Ursprungsachse anhand der Hauptkomponente desto höher der Co2-Wert.
3. die Summer der Cos2-Werte einer Ursprungsachse über alle Hauptkomponenten hinweg ergibt 1.

(Abdi, H. and Williams, L.J. (2010) Principal Component Analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, 2, 433-459)

Auswahl von Metaboliten entlang von Hauptkomponente 1 & -3 anhand des Cos2, willkürlich gewählter Grenzwert $\text{cos}^2 > 0.5$ (mindestens die Hälfte der Varianz entlang des ausgewählten Metaboliten soll durch die Hauptkomponente erklärt werden):

1. Hauptkomponente 1: entspricht 23 Metaboliten, Beschränkung auf erste 12 anhand Literatur-Recherche.
2. Hauptkomponente 3: entspricht einem Metaboliten.

Hypothesentests - Metabolite entlang Hauptkomponente 1:

Metabolit	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
Gefüttert				
C18:1 (n:9)	2.04×10^{-6}	Parametrisch	Mittelwert	none
C14:0	2.66×10^{-6}	Parametrisch	Mittelwert	none
C16:0	4.00×10^{-6}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
FFA Total	3.24×10^{-5}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C22:5 (n:3)	2.09×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C18:2 (n:6)	2.01×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C22:5 (n:6)	9.88×10^{-5}	Parametrisch	Mittelwert	none
C20:5 (n:3)	1.97×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C20:4 (n:6)	2.34×10^{-7}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C16:1 (n:7)	2.39×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
C18:0	9.09×10^{-9}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C20:4 (n:3)	2.55×10^{-10}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
Gefastet				
C18:1 (n:9)	8.38×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C14:0	1.08×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C16:0	9.17×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
FFA Total	2.03×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
C22:5 (n:3)	7.29×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
C18:2 (n:6)	7.28×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C22:5 (n:6)	2.91×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
C20:5 (n:3)	1.98×10^{-2}	Parametrisch	Mittelwert	none
C20:4 (n:6)	1.74×10^{-6}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C16:1 (n:7)	1.40×10^{-1}	Non-Parametrisch	Mittelwert	log(x)
C18:0	3.07×10^{-3}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
C20:4 (n:3)	3.07×10^{-3}	Non-Parametrisch	Mittelwert	log(x)

Tabelle 3: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

Hypothesentests - Metabolite entlang Hauptkomponente 3:

	P.VALUE	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
Genotyp	Fast vs. Fed			
WT	0.00350	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
TPH1	0.00007	Parametrisch	Mittelwert	none
TPH1-PAH	0.08600	Parametrisch	Mittelwert	none

Tabelle 4: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

7.5.2 Projekt 2 - Regulation der Nierenfunktion durch PAH-Serotonin

Spektrofotometrisch erfasste Parameter d. klinischen Chemie aus dem Blut und dem Urin von Mäusen verschiedener Genotypen.

Dimensionen d. Datensatzes: 4 relevante Parameter x 2 Organe als gruppierende Variable x 3-6 biologische Replikate pro Gruppe (durch Messfehler unterschiedlich zwischen den jeweiligen Parametern).

Abhängige Variablen: Parameter der klinischen Chemie (metrisch skaliert).

Unabhängige Variablen: 1 Faktor: Genotyp (3 Stufen, nominal skaliert).

Hypothesentests - Parameter d. klinischen Chemie:

	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
Parameter				
Urin				
Calcium	1.44×10^{-1}	Parametrisch	Mittelwert	log(x)
Creatinine	3.63×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
Glucose	5.07×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
Natrium	2.59×10^{-1}	Parametrisch	Mittelwert	none
Plasma				
Calcium	6.65×10^{-2}	Parametrisch	Mittelwert	none
Creatinine	8.05×10^{-1}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
Glucose	2.59×10^{-1}	Parametrisch	Mittelwert	none
Natrium	1.83×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none

Tabelle 5: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

7.5.3 Projekt 3 - 5-HTP Synthese durch Plazenta und Eihäute:

Fluoreszenzspektrometrisch erfasste 5-HTP-Konzentrationen im Lösungsmittel von Organ-Homogenaten, welche, innerhalb eines spezifischen Enzym-Assays, mit entsprechenden Kofaktoren und Tryptophan als Substrat inkubiert wurden.

Dimensionen des Datensatzes: 1 relevanter Parameter x 3 Organe x 1-2 Genotypen pro Organ x 3-6 biologische Replikate.

Abhängige Variable: 5-HTP-Konzentration (metrisch skaliert).

Unabhängige Variablen: 1 Faktor: Kombination aus Genotyp und Organ (5 Stufen; nominal skaliert).

OMNIBUS.P		HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
Parameter	Hypothesentest			
5-HTP Synthese	8.60×10^{-1}	Paramterisch	Mittelwert	log(x)

Tabelle 6: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

7.5.4 Projekt 4 - Serotonerge Genotypen und embryonale Amin-Transmitter:

Fluoreszenzspektrometrisch erfasste Organkonzentrationen von Serotonin, 5-HIAA, Dopamin und Noradrenlin in den Köpfen und Körpern von Embryonen mit dem Entwicklungsalter E12.5, E14.5, E15.5 oder E17.5 aus Schwangerschaften in denen Embryo und Muttertier jeweils den Genotyp Wildtyp, TPH1-KO, TPH1-SERT-KO, TPH2-KO, SERT-KO oder OCT3-KO besitzen.

Dimensionen d. Datensatzes: 4 relevante Parameter x 2 Organe als gruppierende Variable x 4 Entwicklungstage als gruppierende Variable x 5-6 Genotypen (ein fehlender Genotyp an E15.5) x 4-5 biologische Replikate pro Gruppe.

Abhängige Variable: Konzentration (bezogen auf Organgewicht) von Amin-Transmitter (metrisch skaliert).

Unabhängige Variable: 1 Faktor: Genotyp (5-6 Stufen, nominal skaliert).

Hypothesentests - Embryonaler Kopf:

	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
5-HT				
E12.5	6.85×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	3.41×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	4.22×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	5.30×10^{-3}	Non-Parametrisch	Mittelwert	$\log(x + 1)$
5-HIAA				
E12.5	3.56×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	2.93×10^{-8}	Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	1.05×10^{-2}	Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	2.63×10^{-5}	Parametrisch	Mittelwert	none
Dopamin				
E12.5	1.76×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	3.72×10^{-8}	Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	3.07×10^{-2}	Non-Parametrisch	Verteilung	none
E17.5	5.19×10^{-3}	Non-Parametrisch	Verteilung	none
Noradrenalin				
E12.5	3.52×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	4.78×10^{-4}	Non-Parametrisch	Mittelwert	$\log(x + 1)$
E15.5	2.48×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	7.84×10^{-3}	Non-Parametrisch	Verteilung	none

Tabelle 7: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

Hypothesentests - Embryonaler Körper:

	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
5-HT				
E12.5	1.11×10^{-1}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	9.53×10^{-5}	Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	1.09×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	$\log(x + 1)$
E17.5	1.50×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
5-HIAA				
E12.5	6.69×10^{-3}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	4.99×10^{-5}	Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	1.42×10^{-1}	Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	1.27×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	$\log(x + 1)$
Dopamin				
E12.5	3.94×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	3.57×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	$\log(x + 1)$
E15.5	8.03×10^{-2}	Non-Parametrisch	Verteilung	none
E17.5	2.38×10^{-2}	Non-Parametrisch	Verteilung	none
Noradrenalin				
E12.5	4.85×10^{-3}	Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	4.79×10^{-4}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	3.32×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	9.58×10^{-3}	Non-Parametrisch	Verteilung	none

Tabelle 8: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

7.5.5 Projekt 5 - Amintransmitter in Abhängigkeit vom mütterlichen Genotyp:

Fluoreszenzspektrometrisch erfasste Organkonzentrationen von Serotonin, 5-HIAA, Dopamin und Noradrenalin in den Köpfen und Körpern von Embryonen mit dem Entwicklungsalter E15.5 aus vier verschiedenen Embryotransfer-Modellen.

Dimensionen d. Datensatzes: 4 relevante Parameter x 2 Organe als gruppierende Variable x 4 Embryotransfer-Modelle x 7-9 biologische Replikate pro Gruppe.

Abhängige Variablen: Konzentration (bezogen auf Organgewicht) von Amin-Transmitter (metrisch skaliert).

Unabhängige Variablen: 1 Faktor: Transfermodell (4 Stufen, nominal skaliert).

Hypothesentests - Amintransmitter in Abhängigkeit von mütterlichem Genotyp:

Organ	Metabolite	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
Embr. Kopf					
	5-HT	2.20×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
	5-HIAA	1.56×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
	Dopamin	5.42×10^{-1}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
	Noradrenalin	1.67×10^{-2}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
Embr. Körper					
	5-HT	2.96×10^{-1}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
	5-HIAA	1.75×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
	Dopamin	6.42×10^{-4}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
	Noradrenalin	2.91×10^{-3}	Non-Parametrisch	Verteilung	none

Tabelle 9: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

7.5.6 Projekt 6 - Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit serotonerger Genotypen:

Gewicht von Embryonen mit dem Entwicklungsalter E12.5, E14.5, E15.5 oder E17.5 aus Schwangerschaften in denen Embryo und Muttertier jeweils den Genotyp Wildtyp, TPH1-KO, TPH1-SERT-KO, TPH2-KO, SERT-KO oder OCT3-KO besitzen.

Dimensionen d. Datensatzes: 1 relevanter Parameter x 4 Entwicklungstage als gruppierende Variable x 5-6 Genotypen (ein fehlender Genotyp an E15.5) x 4-5 biologische Replikate pro Gruppe.

Abhängige Variable: Embryonalgewicht in Gramm (metrisch skaliert).

Unabhängige Variable: 1 Faktor: Genotyp (5-6 Stufen, nominal skaliert)

Hypothesentests - Gewichtsentwicklung in Abhängigkeit serotonerger Genotypen:

Entwicklungsalter	OMNIBUS.P	HYPOTHESENTEST	VERGLEICH	TRANSFORMATION
E12.5	3.83×10^{-11}	Parametrisch	Mittelwert	none
E14.5	9.41×10^{-4}	Non-Parametrisch	Mittelwert	none
E15.5	7.90×10^{-4}	Parametrisch	Mittelwert	none
E17.5	2.91×10^{-6}	Parametrisch	Mittelwert	none

Tabelle 10: Verwendete statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte.

8 Ergebnisse

8.1 Serotonin-Synthese in Abwesenheit einer TPH im adulten Organismus:

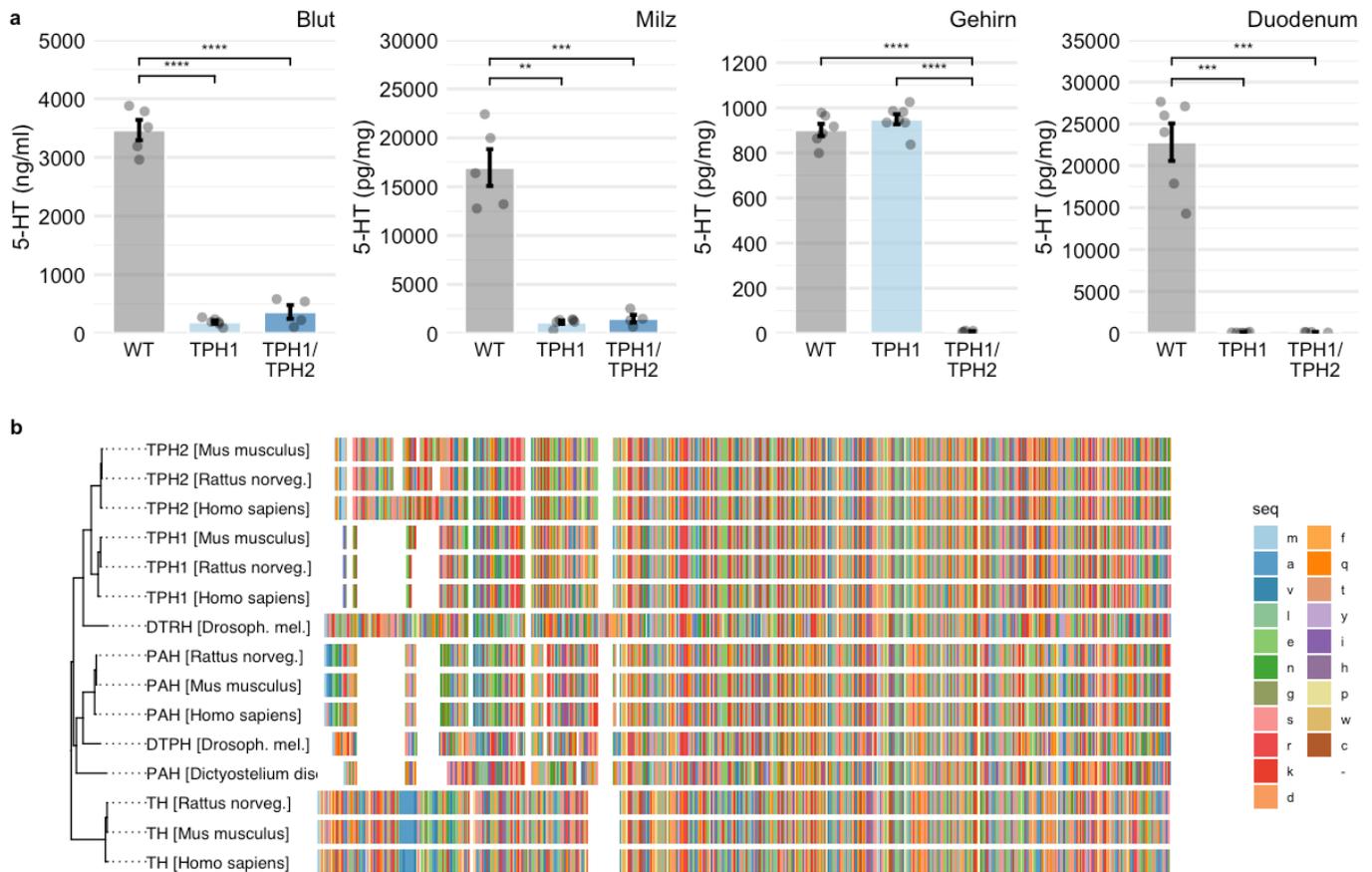


Abbildung 8: Replikation veröffentlichter Messwerte und Homologie AAAHs.

a: Messungen von Serotonin in Blut, Milz, Gehirn und Duodenum von Mäusen des Genotyps WT, *Tph1*^{-/-} und *Tph1*^{-/-} *Tph2*^{-/-}. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$ *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ ***: $p \leq 0.001$ ****: $p \leq 0.0001$.
b: Darstellung der Sequenzhomologie zwischen Proteinen der AAAH-Familie. Multiple sequence alignment nach der „ClustalW“-Methode und phylogenetische tree estimation nach der „maximum likelihood“-Methode. Diese Grafik stellt ein Zitat der „Figure 1“ aus Mordhorst et al. (2021) mit der Erlaubnis des Verlages John Wiley and Sons (Lizenz-Nummer: 5301871127076) dar.

8.1.1 Replikation der veröffentlichten Messwerte und Evaluation von *Tph2*-abhängig generiertem, peripherem 5-HT:

Da der Effekt der genetischen Unterbrechung der *Tph1* auf die 5-HT Plasma-Spiegel in Nagern zwischen den veröffentlichten Tiermodellen leicht variant berichtet wird, replizierten wir zunächst Messungen in Blut, Milz, Gehirn und Duodenum in dem von uns verwendeten Tiermodellen des *Tph1*- und *Tph1-Tph2*-Knockouts (Cote et al., 2003; Savelieva et al., 2008; Walther & Bader, 2003). Wir konnten eine stabile Verminderung der Serotonin-Spiegel im Blut auf etwa 10% nachweisen, welche sich

zwischen Tph1- und Tph1-Tph2-Knockout nicht signifikant unterschied. Dasselbe zeigte sich auch in der Milz als wichtigstem Organ des Thrombozyten-Abbaus. Im Duodenum konnten wir in beiden Modellen kein Serotonin sicher quantifizieren und nahezu kein 5-HT detektieren (Abbildung 8a). Dass kein Unterschied zwischen beiden Modellen über alle drei Organe hinweg besteht, zeigt, dass der Beitrag von Tph2-abhängig generiertem 5-HT, aus dem Gehirn oder aus dem myenterischen Plexus, zu vernachlässigen ist.

8.1.2 Evaluation von Kandidaten für eine TPH-unabhängige Indol-5-Hydroxylierung: Wie in Abschnitt 6.1 diskutiert, sind in der Literatur zwei TPH-unabhängige Wege der Indol-5-Hydroxylierung zum Serotonin berichtet sind. Zum einen durch Cytochrom-abhängige Monooxygenasen (CYPs) mit Tryptamin als Edukt und 5-HT als Produkt in Pflanzen. Zum anderen durch andere AAHs mit Tryptophan als Edukt und 5-Hydroxytryptophan als Produkt in einer Vielzahl nicht-pflanzlicher Eukaryoten und einigen Bakterien.

Da, wie aus Abschnitt 5.2.3 hervorgeht, der enzymatische Prozess der CYP-abhängigen 5-HT Synthese nur in Landpflanzen beschrieben ist, 5-HTP Synthese über AAHs allerdings über viele Gewebetiere hinweg beschrieben ist und bis hinein in Bakterien konserviert scheint, erachteten wir weitere AAHs als den vielversprechenderen Kandidaten.

Daher entschieden wir uns zunächst dafür die Familie der AAHs zu evaluieren.

Diese Enzymfamilie ist, wie in Abschnitt 5.2.3 diskutiert, in Vertebraten mit 2-3 Isoformen der Tryptophan-Hydroxylase und einer Phenylalanin-Hydroxylase, sowie einer Tyrosin-Hydroxylase vertreten.

Um zwischen der PAH und der TH den wahrscheinlicheren Kandidaten auszuwählen, verglichen wir die Sequenz-Homologie zwischen TPH-, PAH- und TH-Proteinen aus Menschen, Ratte und Maus, sowie der DTRH und der DTPH aus *Drosophila melanogaster* und der PAH aus *Dictyostelium discoideum* für die jeweils hohe Affinität zu Phenylalanin und zu Tryptophan berichtet wurden (Abbildung 8b). Hierbei zeigte

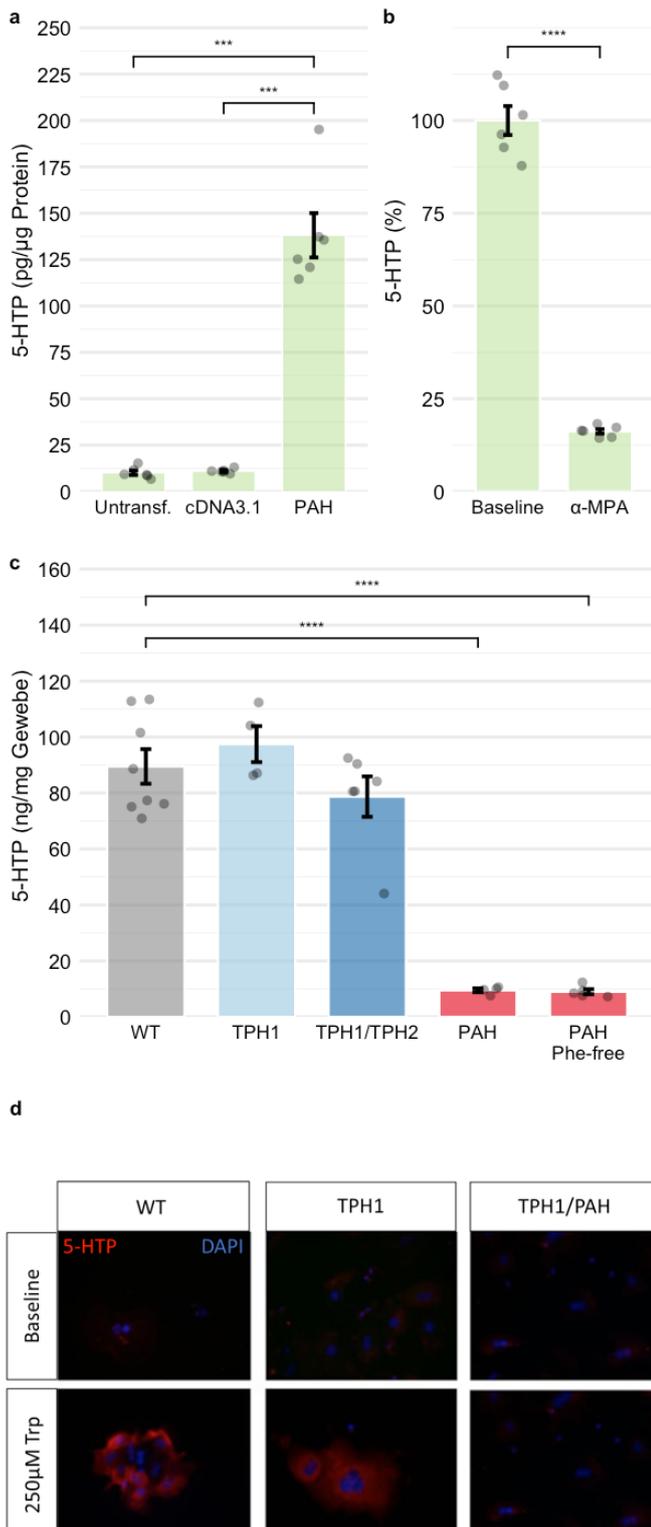


Abbildung 9: Tryptophan-5-Hydroxylierung durch mPah in vitro.

a: in vitro Generation von 5-HTP durch Lysate aus HEK293 Zellen, welche mit einem mPAH-exprimierenden Vektor transfiziert sind. **b:** 5-HTP Generation in vitro durch murine Leber-Lysate und signifikante Hemmung durch den PAH-Inhibitor alpha-MPA. **c:** 5-HTP Generation in vitro durch murine Leber-Lysate aus Tieren mit den Genotypen WT, $Tph1^{-/-}$ und $Tph1^{-/-} Tph2^{-/-}$, aber nicht $Pah^{-/-}$. Effekt ist unabhängig von verwendetem Futtermittel. **d:** Spezifische 5-HTP Generation in vitro in primären Hepatozyten aus Mäusen mit dem Genotyp WT, $Tph1^{-/-}$, aber nicht $Tph1^{-/-} Pah^{-/-}$.

Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt:

ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Diese Grafik stellt ein Zitat der „Figure 2“ aus Mordhorst et al. (2021) mit der Erlaubnis des Verlages John Wiley and Sons (Lizenz-Nummer: 5301871127076) dar.

sich, dass die Homologie zwischen TPHs und PAHs höher ist als zwischen THs und TPHs oder PAHs. Zusammen mit der Tatsache, dass die TH in hoher Menge im Gehirn exprimiert wird, das Gehirn von $Tph2^{-/-}$ -Mäusen aber Serotonin-frei ist und den Berichten über 5-HTP Generation durch die PAH aber nicht die TH in vitro (Abschnitt 5.2.3), priorisierten wir zunächst die PAH als Kandidaten

8.1.3 PAH hydroxyliert Tryptophan zu 5-HTP in vitro:

Um die Fähigkeit der murinen Pah Trp in vitro zu hydroxylieren zu überprüfen, exprimierten wir diese zunächst in HEK-Zellen. Hierbei zeigte sich, dass Kulturen welche mit dem mPah-Gen transfiziert wurden die Fähigkeit erlangten 5-HTP aus Tryptophan zu generieren. Dies fehlte in untransfizierten oder mit einem leeren Vektor transfizierten Kontrollen (Abbildung 9a).

Signifikante Expression der PAH findet in Nagern ausschließlich in Leber und Nieren statt (Rao & Kaufman, 1986). Renson et al.

konnten bereits in den 1960er Jahren zeigen, dass Leber-Homogenate in vitro in der Lage waren neben Phenylalanin auch Tryptophan zu hydroxylieren, wobei Konkurrenz zwischen den beiden Edukten besteht (Renson et al., 1961; Renson et al., 1962). Ein verantwortliches Enzym oder Gen wurde bisher allerdings nicht ermittelt.

Daher wiederholten wir zunächst enzymatische 5-HTP Assays mit murinen Lebern und beobachteten spezifische 5-HTP Generation in vitro. In einem weiteren Schritt fügten wir dem Assay den hochspezifischen PAH-Inhibitor alpha-methylphenylalanine (α -MPA) hinzu (Greengard et al., 1976).

Wir beobachteten eine Verminderung der Tryptophan-Hydroxylierung um etwa 80%, womit wir die Identität des Tryptophan-hydroxylierenden Systems der Leber als PAH als pharmakologisch gesichert annahmen (Abbildung 9b).

Um diese auch genetisch zu sichern wiederholten wir den Versuch mit Homogenaten aus Lebern von Mäusen mit den Genotypen $Tph1^{-/-}$, $Tph1^{-/-}Tph2^{-/-}$ und $Pah^{-/-}$. Es zeigte sich eine starke Verminderung der 5-HTP Generation auf wenige Prozent in Lebern aus $Pah^{-/-}$ Mäusen und ein unbeeinträchtigter Umsatz in $Tph1^{-/-}$ - und $Tph1^{-/-}Tph2^{-/-}$ -Lebern. PAH-Defizienz führt in Menschen und Mäusen zur Phenylketonurie mit hohen Plasma-Spiegeln von Phenylalanin und seinen Abbauprodukten den Phenylketonen. Von diesen ist bekannt, dass sie TPHs inhibieren (Winn et al., 2018). Um auszuschließen, dass der beobachtete Effekt auf der Inhibition einer bisher unbekanntem TPH durch hohe Phenylalanin- bzw. Phenylketon-Konzentrationen im Homogenat zurückgeht, wiederholten wir den Versuch mit Lebern aus Phenylalanin-frei ernährten $Pah^{-/-}$ Tieren. Hier zeigte sich kein Unterschied zu den regulär ernährten Tieren (Abbildung 9c).

In einem abschließenden Versuch kultivierten wir primäre murine Hepatozyten aus Wildtyp (WT), $Tph1^{-/-}$ und $Tph1^{-/-}Pah^{-/-}$ Tieren und überprüften ihre Fähigkeit Tryptophan-abhängig 5-HTP zu generieren durch Immunzytochemie. PAH-defiziente, aber nicht TPH1-defiziente Zellen zeigten kein Substrat-spezifisches anti-5-HTP-Signal in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 9d). Damit nahmen wir die Identität des Tryptophan-hydroxylierenden Systems der Maus-Leber als mPah als genetisch gesichert an.

8.1.4 mPah generiert einen Anteil der murinen Serotonin Plasma-Spiegel in vivo:

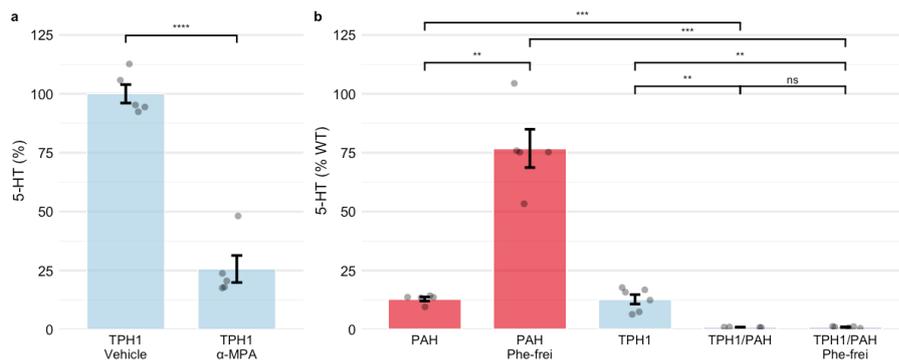


Abbildung 10: Pharmakologische Inhibition oder genetische Ablation der mPah reduziert 5-HT im Blut in vivo.

a: Administration des PAH-Inhibitors alpha-MPA in Mäuse vom Genotyp $Tph1^{-/-}$ reduziert 5-HT im Blut signifikant. **b:** Tiere vom Genotyp $Tph1^{-/-}$ $Pah^{-/-}$ weisen nahezu kein nachweisbares 5-HT im Blut auf und gegenüber Tieren vom Genotyp $Pah^{-/-}$ und $Tph1^{-/-}$ signifikant verminderte Werte. Der Effekt besteht unabhängig des verwendeten Futtermittels. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Diese Grafik stellt ein Zitat der „Figure 3“ aus Mordhorst et al. (2021) mit der Erlaubnis des Verlages John Wiley and Sons (Lizenz-Nummer: 5301871127076) dar.

In einem ersten Versuch injizierten wir $Tph1^{-/-}$ Mäuse mit α -MPA. Ähnlich dem Effekt in vitro kam es auch hier zu einer weiteren Reduktion der 5-HT Plasma-Spiegel um etwa 75% (Abbildung 10a).

Anschließend verglichen wir die Serotonin-Spiegel im Blut von $Pah^{-/-}$, $Tph1^{-/-}$ und $Tph1^{-/-}$ $Pah^{-/-}$ Mäusen. Dies geschah wieder jeweils im Vergleich zwischen Phe-haltiger und Phe-freier Ernährung für Tiere in denen die PAH genetisch unterbrochen wurde.

Es zeigte sich eine starke Reduktion der 5-HT Spiegel in $Pah^{-/-}$ Mäusen, etwa auf das Niveau von $Tph1^{-/-}$ Mäusen. Diese Tiere erreichten allerdings durch Haltung unter Phe-freier Nahrung etwa 75% des Wildtyp-Niveaus. Im Blut von $Tph1^{-/-}$

$Pah^{-/-}$ -Tieren war nicht genug Serotonin vorhanden, um es sicher zu quantifizieren. Dieser drastische Effekt blieb auch unter Phe-freier Diät unverändert (Abbildung 10b).

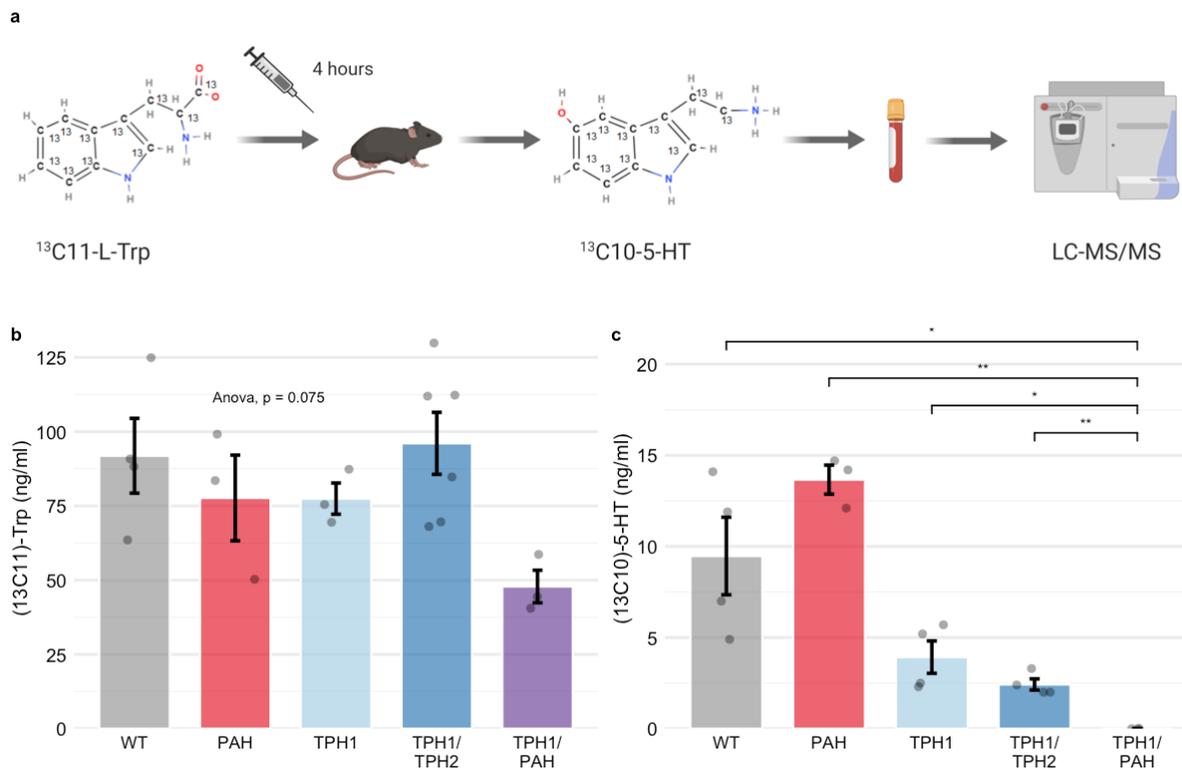


Abbildung 11: Mäuse vom Genotyp *Tph1*^{-/-}-*Pah*^{-/-} weisen keine massenspektrometrisch erfassbare Serotonin-neo-Synthese auf.

a: Experimentelles Schema und Strukturformel stabil-Isotopen-markierter Metabolite. **b:** Die Spiegel ¹³C-markierten Tryptophans im Blut weisen anhand einer one-way ANOVA keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den eingesetzten Genotypen auf. **c:** Die Spiegel ¹³C-markierten Serotonins im Blut von Mäusen mit dem Genotyp WT, *Pah*^{-/-}, *Tph1*^{-/-}, *Tph1*^{-/-}-*Tph2*^{-/-} und *Tph1*^{-/-}-*Pah*^{-/-}. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$. Diese Grafik stellt ein Zitat der „Figure 4“ aus Mordhorst et al. (2021) mit der Erlaubnis des Verlages John Wiley and Sons (Lizenz-Nummer: 5301871127076) dar.

Um die 5-HT-neo-Synthese abschließend in Anwesenheit und Abwesenheit der *Tph1* beurteilen zu können griffen wir auf die Applikation von, mit stabilen Isotopen markierten, metabolischen Precursoren und Massenspektrometrie zurück (stabile-isotope resolved mass spectrometry, SIRM). Mit diesem Verfahren wurde schon die Serotonin-Synthese in Ratten, Hunden und Menschen durch die Applikation von ¹⁵N- oder ¹³C-markiertem Tryptophan erfasst (Gehin et al., 2018; Sano et al., 2014; Welford et al., 2016).

Wir injizierten vollständig ¹³C-markiertes Tryptophan in WT-Mäuse, sowie Mäuse mit dem Genotyp *Tph1*^{-/-}, *Tph1*^{-/-}-*Tph2*^{-/-}, *Pah*^{-/-} und *Tph1*^{-/-}-*Pah*^{-/-}. Tiere ohne PAH-Aktivität wurden Phe-frei ernährt. Wir konnten beobachten, dass die Plasma-Verfügbarkeit von markiertem Tryptophan über die Tiermodelle nicht signifikant unterschiedlich war (Abbildung 11b) und, dass deutlich mess- & quantifizierbare Mengen zu Serotonin umgesetzt wurden (Abbildung 11c).

Erwartungsgemäß waren die ^{13}C -Serotonin-Spiegel in $\text{Tph1}^{-/-}$ und $\text{Tph1}^{-/-}\text{-Tph2}^{-/-}$ Tieren auf etwa 10% des Wildtyp-Niveaus reduziert. ^{13}C -Serotonin im Blut von $\text{Tph1}^{-/-}\text{-Pah}^{-/-}$ Tieren war auf $< 1\%$ des Wildtyp-Niveaus reduziert, womit wir uns darin bestätigt sehen, dass TPH1-unabhängig produziertes Serotonin im Blut und den peripheren Organen von Mäusen, mit Ausnahme von Rest-Mengen, PAH-abhängig produziert wird (Abbildung 11c).

8.1.5 Physiologische Bedeutung PAH-generierten Serotonins:

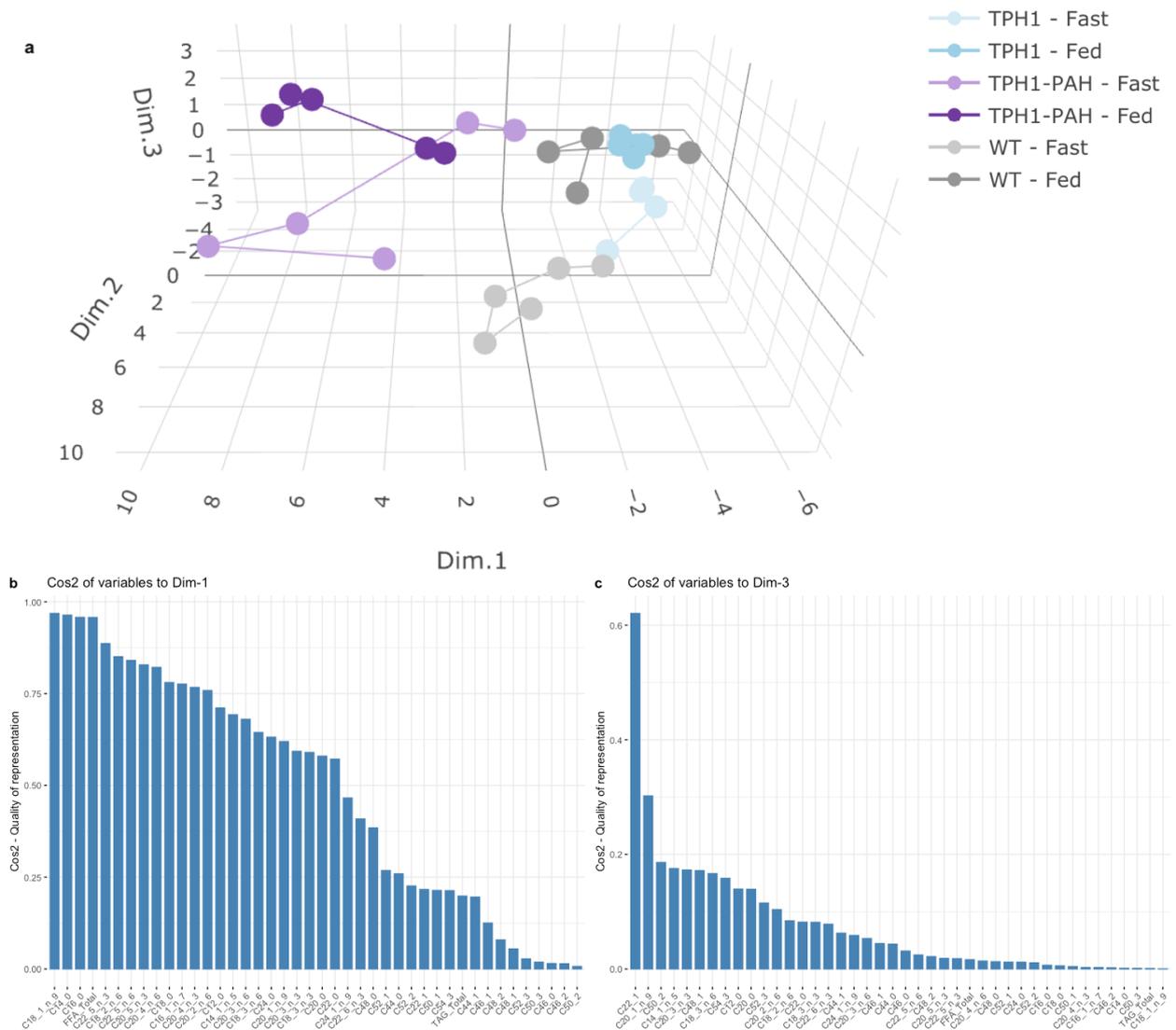


Abbildung 12: Dimensionsreduktion der Spiegel lipidomischer Metabolite im Plasma von Tieren unterschiedlicher Genotypen unter Fasten und normaler Diät.

a: Visualisierung der ersten drei Hauptkomponenten. Die Kombination aus Genotyp und Diät stellt jeweils ein Gruppenmerkmal dar. Gruppenmerkmale sind durch eine Farbe, sowie Verbindung der Punkte markiert. **b:** Repräsentation der Hauptkomponente 1 durch einzelne Metabolite anhand des „Cos2“-Wertes. **c:** Repräsentation der Hauptkomponente 2 durch einzelne Metabolite anhand des „Cos2“-Wertes.

Lokaler serotonerger Stimulus ohne Beeinflussung der zirkulierenden 5-HT Spiegel ist aus Organen mit geringgradiger TPH-Expression wie dem Pankreas, Fettgewebe und dem Drüsengewebe der Brust bekannt (Kim et al., 2010; Matsuda et al., 2004; Oh et al., 2015; Paulmann et al., 2009). Da der Anteil PAH-generierten Serotonins an den frei zirkulierenden Mengen recht gering ist orientierten wir uns bei der Suche nach Zielorganen für einen physiologischen Effekt in den Organen von denen eine hohe PAH-Expression bekannt ist: Leber und Nieren (Rao & Kaufman, 1986).

8.1.5.1 Untersuchung einer möglichen Beeinflussung der metabolischen Adaptation durch PAH-generiertes Serotonin in der Leber:

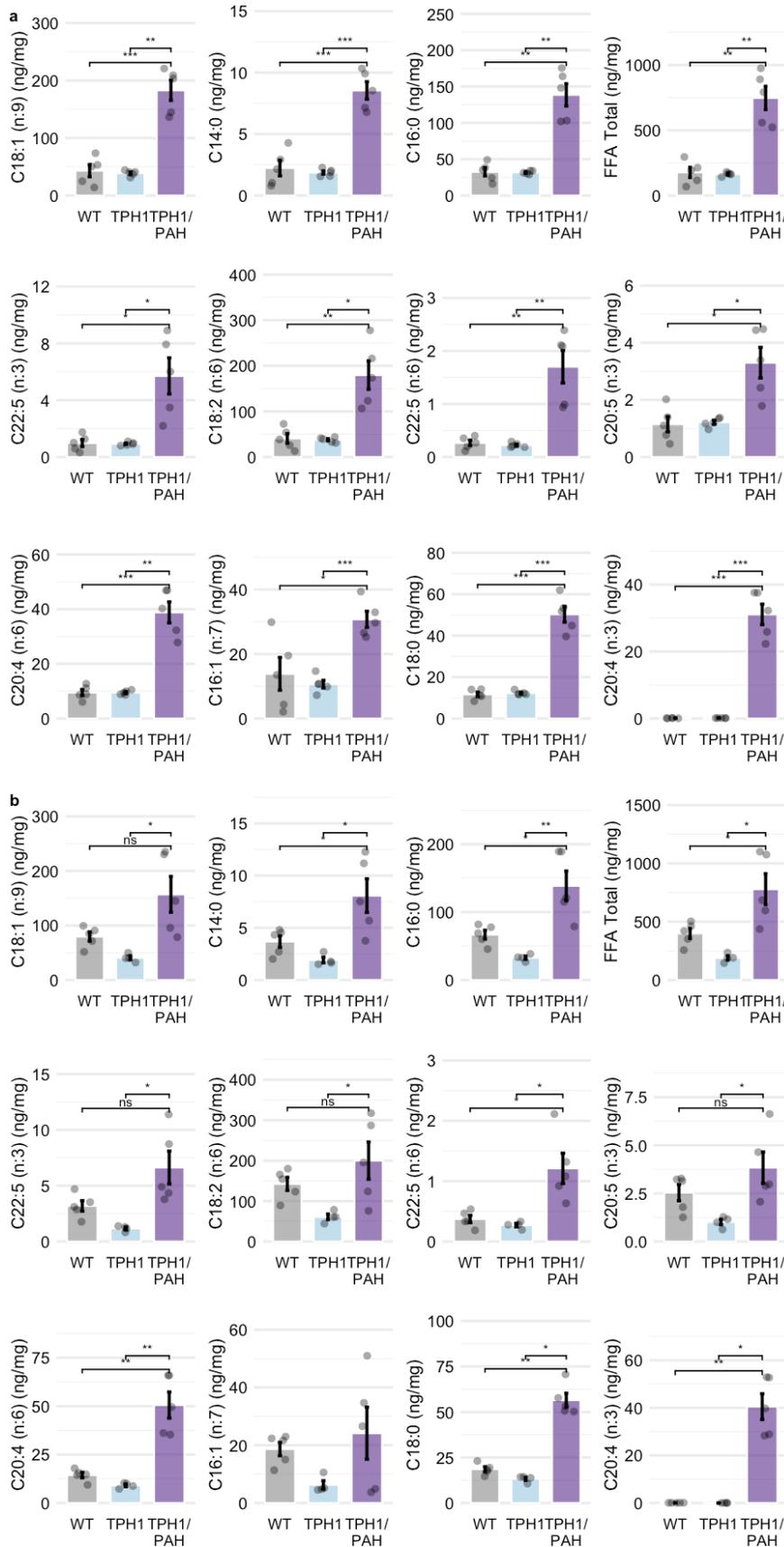
Die Leber spielt eine wichtige Rolle in der Adaptation an veränderte alimentäre Zustände des Organismus und wird dabei unter anderem durch Serotonin in ihrer Aktivität reguliert.

Sumara et al. konnten 2012 erstmalig zeigen, dass in Mäusen eine 48-stündige Fastenperiode zur Erhöhung der Genexpression der Tph1 im Darm und zur Erhöhung der zirkulierenden Serotonin-Spiegel im Blut führt. Eine Darm-spezifische Tph1^{-/-}-Linie zeigte während des Fastens verminderte hepatische Gluconeogenese, verminderte zirkulierende freie Fettsäuren (free fatty acids, FFAs) und vermindertes zirkulierendes Glycerol. Dies weist auf eine verminderten Lipolyse hin. Die Effekte auf die Lipolyse scheinen dabei allerdings vor Allem die adipozytäre Lipolyse zu betreffen, da ein Adipozyten-spezifischer Knockout des 5HT_{2B}Rs denselben Effekt hervorbrachte (Sumara et al., 2012).

Nur so stehen diese Daten auch in Übereinstimmung mit Veröffentlichungen von Crane et al. und Choi et al. Diese zeigen in globalen und Darm-spezifischen Tph1^{-/-}-Modellen eine protektive Wirkung gegenüber einer hepatischen Lipid-Akkumulation unter fettreicher Diät (high-fat diet, HFD). Choi et al. zeigen zusätzlich, durch einen Leber-spezifischen 5HT_{2B}R-Knockout, den zuständigen Rezeptor auf (Choi et al., 2018; Crane et al., 2015).

Um den möglichen Einfluss von in der Leber PAH-abhängig generierten Serotonins gegenüber Darm-generiertem Serotonin auf die hepatische Lipid-Balance zu erfassen, fasteten wir WT, Tph1^{-/-} und Tph1^{-/-}-Pah^{-/-} Mäuse für 24 Stunden und maßen massenspektrometrisch lipidomische Signaturen in der Leber.

Wir nahmen eine Hauptkomponentenanalyse vor mit der Zielsetzung der Dimensionsreduktion. Anhand des Scree-Grafen (siehe Methodik) stellten wir fest, dass die ersten fünf Hauptkomponenten einen Eigenwert von mindestens 1 besitzen und so die sogenannte „Kaiser-Regel“ erfüllen. Die Hauptkomponente 4 und 5 waren dabei allerdings innerhalb unserer Hypothese nicht zu deuten (siehe Abschnitt 7.5.1).



Die grafische Darstellung der ersten drei Hauptkomponenten ist in Abbildung 12a zu sehen. Es fanden sich mit Hauptkomponente 1 und 3 zwei Dimensionen, welche die Varianz zwischen den Genotypen und Konditionen erklärten. Dimension 1 erklärt die Varianz zwischen $Tph1^{-/-}$ - $Pah^{-/-}$ und allen anderen Genotypen. Dimension 3 erklärt primär die Varianz zwischen gefasteten und nicht gefasteten Tieren. In Abbildung 12 b und c lässt sich anhand des „Cos2“-Wertes ablesen, wie gut einzelne, erfasste Metabolite die Hauptkomponente 1 bzw. 3 erklären. Wir legten einen „Cos2“-Wert von 0.5 als Grenzwert fest (siehe Abschnitt 7.5.1). Diesen Wert erfüllten 23 Metabolite der Hauptkomponente 1, von denen wir anhand der Literatur 12 zur weiteren Exploration auswählten. Die Hauptkomponente 3 wurde generell weniger gut von einzelnen Metaboliten erklärt und nur ein einzelner Metabolit erfüllte unseren Grenzwert.

Abbildung 13: Organkonzentrationen (ng/mg) der Einzelmetabolite der Hauptkomponente 1 innerhalb der Fütterungen im Vergleich zwischen den Genotypen.

a: Werte aus gefütterten Tieren. **b:** Werte aus gefasteten Tieren. Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Eine Literatursuche ergab für die Metaboliten der Dimension 1 eine Assoziation mit hepatischer Steatose bzw. nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD). So weist die Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1), das herstellende Enzym der Ölsäure (C18:1 n-9), eine starke Assoziation mit NAFLD und seiner Progression zum hepatozellulären Karzinom (hepatocellular carcinoma, HCC) auf und ist im HCC selbst hochreguliert (Piccinin et al., 2019). Myristinsäure (C14:0) löst in primären und stabil-transfizierten, murinen Leberkulturen proteomische Effekte aus, die mit Steatose assoziiert sind (Speziali et al., 2018). Injektionen des Ceramids C16:0 in HFD-gefütterten Mäusen aggraviert hepatische Steatose (Jiang et al., 2015). Auffällig war, dass alle einzelnen Metabolite im $Tph1^{-/-}$ - $Pah^{-/-}$ gegenüber beiden anderen Metaboliten und über beide Konditionen hinweg erhöht waren. Dies spricht für eine hepatische Akkumulation evtl. im Sinne einer Steatose oder NAFLD.

Weiterhin zeigten $Tph1^{-/-}$ Mäuse gegenüber der WT-Kontrolle entlang der Metabolite der Dimension 1 verminderte Konzentrationen in der Leber im Fastenzustand. Dies spricht für eine bessere Mobilisierung dieser prosteatogenen Metabolite und ist in Übereinstimmung mit Crane et al. und Choi et al.

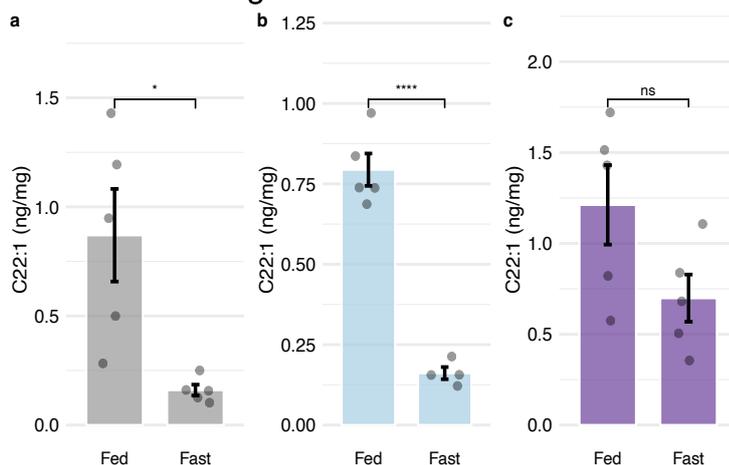


Abbildung 14: Organkonzentrationen (ng/mg) des Hauptmetaboliten der Hauptkomponente 3 innerhalb der Genotypen im Vergleich zwischen den Fütterungen.

a: Werte aus Wildtypen. **b:** Werte aus Tieren mit dem Genotyp $Tph1^{-/-}$. **c:** Werte aus Tieren mit dem Genotyp $Tph1^{-/-}$ - $Pah^{-/-}$. Angewandte statistische Verfahren, Transformationen sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Die Dimension 3, welche über alle Genotypen hinweg am stärksten mit dem Unterschied zwischen gefasteten und nicht gefasteten Tieren korreliert, wird am besten durch das Ceramid C22:1 erklärt. Dieses wird in Tieren mit dem Genotyp $Tph1^{-/-}$ - $Pah^{-/-}$, im Gegensatz zu den anderen Genotypen, im Fastenzustand nicht signifikant abgebaut.

In der Literatur ist hepatische C22:1 Akkumulation mit der Schädigung hepatischen Gewebes assoziiert (Yamaguchi et al., 2004).

Die hier gezeigten Ergebnisse legen eher eine gegenläufige Tendenz des Tph1^{-/-}-Pah^{-/-} Genotyps gegenüber dem Tph1^{-/-} Genotyp in Bezug auf die verstärkte hepatische Lipidmobilisierung nahe.

Da auch in der Phenylketonurie eine hepatische Steatose auftritt, lässt sich dieser Effekt als Überwiegen des Tph1-Effekts durch die Phenylketonurie unter Phe-freier Ernährung deuten (Crome & Pare, 1960; Forssman et al., 1967).

8.1.5.2 Untersuchung des Einflusses von PAH-generiertem Serotonin auf die Nierenphysiologie:

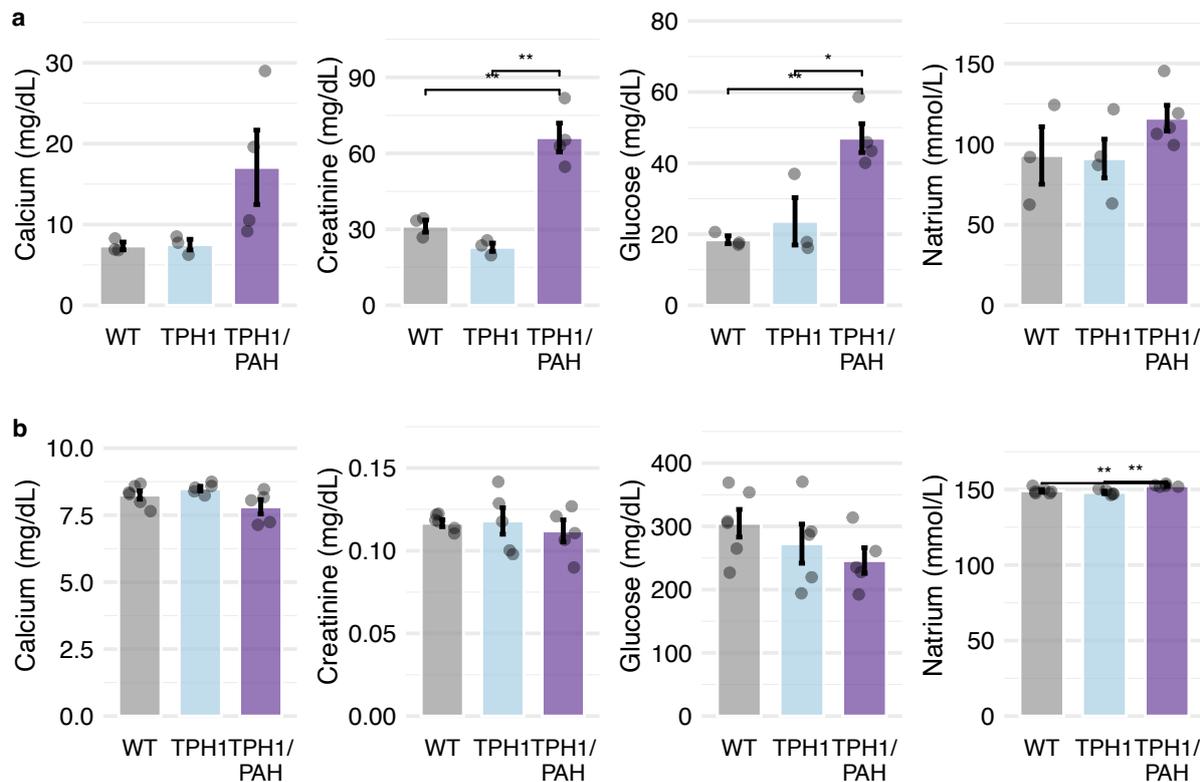


Abbildung 15: Parameter der klinischen Chemie in Tieren verschiedener Genotypen in Urin und Blut.

a: Urin. **b:** Blut. Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.

Die Expression der PAH in nicht-hepatischen Geweben war lange Zeit umstritten. Lichter-Konecki et al. konnten 1999 allerdings durch Nachweis auf Protein- und RNA-

Ebene mit jeweils verschiedenen Techniken zweifelsfrei etablieren, dass die PAH in Menschen und Mäusen auch in Tubuluszellen der Nieren exprimiert wird (Lichter-Konecki et al., 1999). Weiterhin ist in Nieren ein aktiver Pathway der Serotonin-Synthese durch eine biochemisch beschriebene aber genetisch nicht erfasste Hydroxylase in Verbindung mit der ubiquitär exprimierten AADC bekannt. Dies geschieht in Abwesenheit der Expression einer klassischen TPH (Sole et al., 1986). Möglich Effekte, die durch 5-HT in der Nierenphysiologie auftreten sind unzureichend erfasst. Allerdings konnte in Zellkultur eine serotonerge Erhöhung der Aktivität von Natrium-Protonen-Austauschern (Na^+/H^+ exchangers, NHEs) und der Natrium-Kalium-ATPase nachgewiesen werden (Soares-da-Silva et al., 2016). Kongruent zur Erhöhung d. Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase konnte gezeigt werden, dass in Ratten 5HT_{1A} -Agonismus Natriurese auslöst, was durch einen spezifischen Antagonisten am selben Rezeptor verhindert werden konnte (Soares-da-Silva et al., 1995). Auf physiologischer Ebene konnte gezeigt werden, dass in anästhesierten Hunden Serotonin-Infusion in die Nieren-Arterie denervierter Nieren die vaskuläre Resistenz erhöht (Emanuel et al., 1959).

Um Effekte lokal durch die PAH generierten Serotonins auf die Nierenphysiologie zu erfassen, führten wir eine klinische Chemie mit Urin- & Blutproben von WT, $\text{Tph1}^{-/-}$ und $\text{Tph1}^{-/-}\text{-Pah}^{-/-}$ Mäusen durch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 gezeigt.

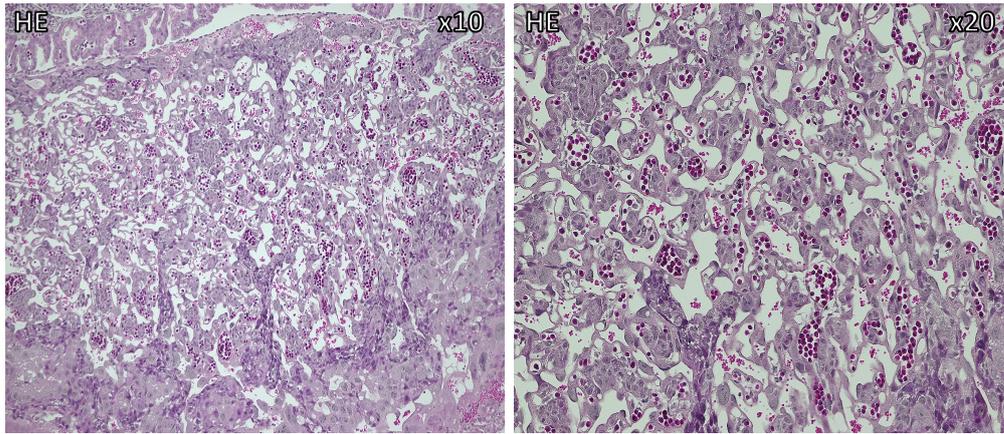
Unsere Messungen zeigten signifikante Erhöhungen von Kreatinin und Glucose im Urin, ohne signifikante Effekte auf die Plasma-Werte derselben Parameter in $\text{Tph1}^{-/-}\text{-Pah}^{-/-}$ Tieren gegenüber den anderen beiden Genotypen. Weiter kam es zu einer signifikanten Erhöhung des Plasma-Natriums in den $\text{Tph1}^{-/-}\text{-Pah}^{-/-}$ Tieren gegenüber beiden Vergleichsgruppen, ohne Korrelat im Urin. Signifikante Effekte zwischen WT und $\text{Tph1}^{-/-}$ Tieren waren nicht zu beobachten.

8.2 Serotonin-Homöostase im embryonalen Organismus:

8.2.1 Evaluation einer möglichen Sert-Expression durch die Plazenta:

Wie aus Abschnitt 5.5.5 hervorgeht besteht innerhalb der Literatur keine Einigkeit über die Expression des Sert-Transporters in der murinen Plazenta. Daher wiederholten wir den Versuch SERT in der murinen Plazenta immunohistochemische nachzuweisen. Wir wählten als Entwicklungszeitpunkt in Übereinstimmung mit Bonnin et al., Verhaag et al., Wu et al. und zeitnah zum in Kliman et al. verwendeten Tag E13.5, sowie in Übereinstimmung mit den im Folgeabschnitt für die Bestimmung der TPH-Aktivität verwendeten Tag, den Gestationstag E14.5 aus (Bonnin et al., 2011; Kliman et al., 2018; Verhaagh et al., 2001; Wu et al., 2016). Wu et al. fanden an E17.5 Sert-Expression, allerdings explizit nicht an E14.5 (Wu et al., 2016). Da uns ein Sert^{-/-} Mausmodell zur Verfügung steht sind wir im Gegensatz zu allen bisherigen Veröffentlichungen in der Lage zwischen spezifischer und unspezifischer Antikörperbindung zu unterscheiden. Wir benutzten den von Wu et al. verwendeten Erstantikörper des Herstellers Frontiers Institute, mit dem in dieser Veröffentlichung keine Expression nachgewiesen werden konnte (Wu et al., 2016). Da dieser allerdings gegen den N-Terminus gerichtet ist, ein Epitop des Proteins, welches wahrscheinlich post-translationaler Modifikation unterliegt, nutzten wir einen weiteren Antikörper, welcher gegen den vierten extrazellulären Loop des homologen rSert gerichtet ist (Dmitriev et al., 2005).

a



b

Genotyp	Antikörper	Sub-Antigen	DAPI	SERT	Merge
Wildtyp	ATSBio Anti-rSERT	4. extrazell. Loop			
Sert ^{-/-}	ATSBio Anti-rSERT	4. extrazell. Loop			
Wildtyp	Frontiers Institute Anti-5HTT	N-terminus (intrazell.)			
Sert ^{-/-}	Frontiers Institute Anti-5HTT	N-terminus (intrazell.)			

c

Genotyp	Antikörper	Sub-Antigen	DAPI	SERT	Merge
Wildtyp	ATSBio Anti-rSERT	4. extrazell. Loop			
Sert ^{-/-}	ATSBio Anti-rSERT	4. extrazell. Loop			
Wildtyp	Frontiers Institute Anti-5HTT	N-terminus (intrazell.)			
Sert ^{-/-}	Frontiers Institute Anti-5HTT	N-terminus (intrazell.)			

Abbildung 16: SERT-Expression in der murinen Plazenta an E14.5 anhand von Immunreaktivität.

a: HE-Färbung einer E14.5 WT-Plazenta in 10- & 20-facher Vergrößerung zur anatomischen Orientierung.
b: Immunhistochemie mit je einem Antikörper gegen die 4. extrazell. Domäne des rSert und den N-Terminus des mSert in einer murinen E14.5 Plazenta im Vergleich zwischen WT und Sert^{-/-}. Signale von links nach rechts: DAPI (blaue Falschfarbe), Cy3 (anti-SERT; rote Falschfarbe), Merge (Autofluoreszenz zur Strukturbeurteilung in grüner Falschfarbe, Exzitation: 490nm, Emission 525 nm). Vergrößerung x10.
c: Immunhistochemie mit je einem Antikörper gegen die 4. extrazell. Domäne des rSert und den N-Terminus des mSert in einer murinen E14.5 Plazenta im Vergleich zwischen WT und Sert^{-/-}. Signale von links nach rechts: DAPI (blaue Falschfarbe), Cy3 (anti-SERT; rote Falschfarbe), Merge (Autofluoreszenz zur Strukturbeurteilung in grüner Falschfarbe, Exzitation: 490nm, Emission 525 nm). Vergrößerung x20.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 gezeigt. Es ist jeweils ein Ausschnitt aus dem plazentalen Labyrinth in zehnfach- und zwanzigfacher Vergrößerung zu sehen. Pro Vergrößerung ist zusätzlich eine Hellfeldmikroskopie einer Wildtyp-Plazenta in HE-Färbung und derselben Vergrößerung zur anatomischen Orientierung abgebildet. Überraschenderweise ist bereits in zehnfacher Vergrößerung in beiden Antikörpern ein Signal in den Schnitten aus Wildtyp-Plazenten zu erkennen, welches in der Knockout-Kontrolle fehlt. In der zwanzigfachen Vergrößerung lässt sich dieses Signal gut auf zellulärem Niveau lokalisieren. Der gegen die extrazelluläre Domäne gerichtete Antikörper zeigt ein Signal sowohl vereinzelt perinukleär, als auch umlaufend um die Anteile des Labyrinths, welche das maternale Blut enthalten. Diese sind leicht von der kindlichen Seite abgrenzbar, da sie durch die, bei der Entnahme des Gewebes vorgenommene, Perfusion mit Kochsalzlösung, entleert sind. Die embryonale Seite der Plazenta enthält unreife Erythrozyten. Diese stellen sich im Vergleich zu adulten Erythrozyten vergrößert und kernhaltig dar. In dieser Vergrößerung zeigt sich auch in der Knockout-Kontrolle ein Signal, dieses ist allerdings ausschließlich perinukleär lokalisiert und in Intensität und Häufigkeit deutlich geringer, vereinbar mit unspezifischer Bindung.

Der gegen den N-Terminus gerichtete Antikörper liefert in dieser Vergrößerung ein weit-verteiltes intrazelluläres Signal, welches in der Knockout-Kontrolle vollständig fehlt.

8.2.2 Evaluation einer möglichen Serotonin-Produktion durch Plazenta und Dottersack:

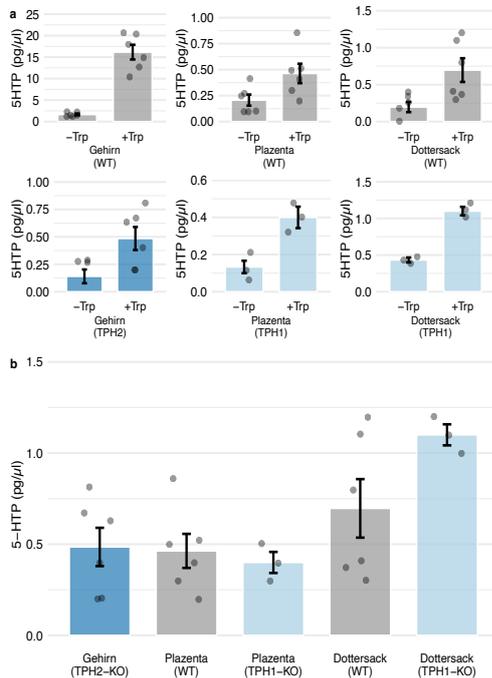


Abbildung 17: In vitro 5-HTP-Synthese durch trophoblastäre Organe im Vergleich zwischen Wildtypen und Knockout-Kontrolle, sowie im Vergleich zu einem Knockout-Gehirn.

a: Validität des Assays anhand Mittelwertunterschied Trp-inkubierter und nicht inkubierter Proben und anhand von Wildtyp-Gehirn-Homogenaten als Positiv-Kontrolle. **b:** Kein Unterschied in der Syntheseleistung Substrat-inkubierter Proben zwischen trophoblastären Strukturen mit und ohne TPH-Expression und Gehirn ohne TPH-Expression anhand ANOVA-P-Wert von 0.86. Verwendete statistische Verfahren und Transformationen sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen.

Da innerhalb der Literatur auch kein Konsens über die Expression einer TPH in der Plazenta oder dem Dottersack besteht wiederholten wir die funktionelle Erfassung der Synthesekapazität durch TPH-Assays (Bonnin

et al., 2011; Kliman et al., 2018; Wu et al., 2016). Wir nutzten Organe mit dem Entwicklungsalter E14.5, da in Bonnin und Wu et al. übereinstimmend die höchste TPH1-Expression an diesem Tag gezeigt wurde.

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Daten nutzten wir zusätzlich Organe aus Tph1^{-/-} bzw. Tph2^{-/-} Tieren als Vergleich, um eine spezifische TPH-abhängige Tryptophan-Hydroxylierung von einer unspezifischen zu unterscheiden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 gezeigt. In allen Organen und allen Genotypen findet Umsatz von Tryptophan zu 5-HTP statt (Abbildung 17a).

Da die Gewebe-Konzentration im Lösungsmittel experimentell gleich gehalten wurde lassen sich Organe und Genotypen in ihrer Fähigkeit 5-HTP zu generieren untereinander vergleichen. Es fällt auf, dass Plazenten und Dottersäcke ungefähr dieselbe Syntheseleistung haben wie ein TPH2-negatives Gehirn, aber nur ca. 1/30 der Leistung eines Gehirns mit TPH-Aktivität (Abbildung 17a). Weiterhin unterscheidet sich die Aktivität in Plazenta und Dottersäcken nicht zwischen WT und Tph1-Knockout (Abbildung 17b).

Damit liegt lediglich eine geringe und unspezifische bzw. TPH-unabhängige Hydroxylierungs-Aktivität der Plazenta und des Dottersacks an E14.5 nah.

8.2.3 Einfluss verschiedener Genotypen auf embryonale zentralnervöse 5HT-Spiegel:

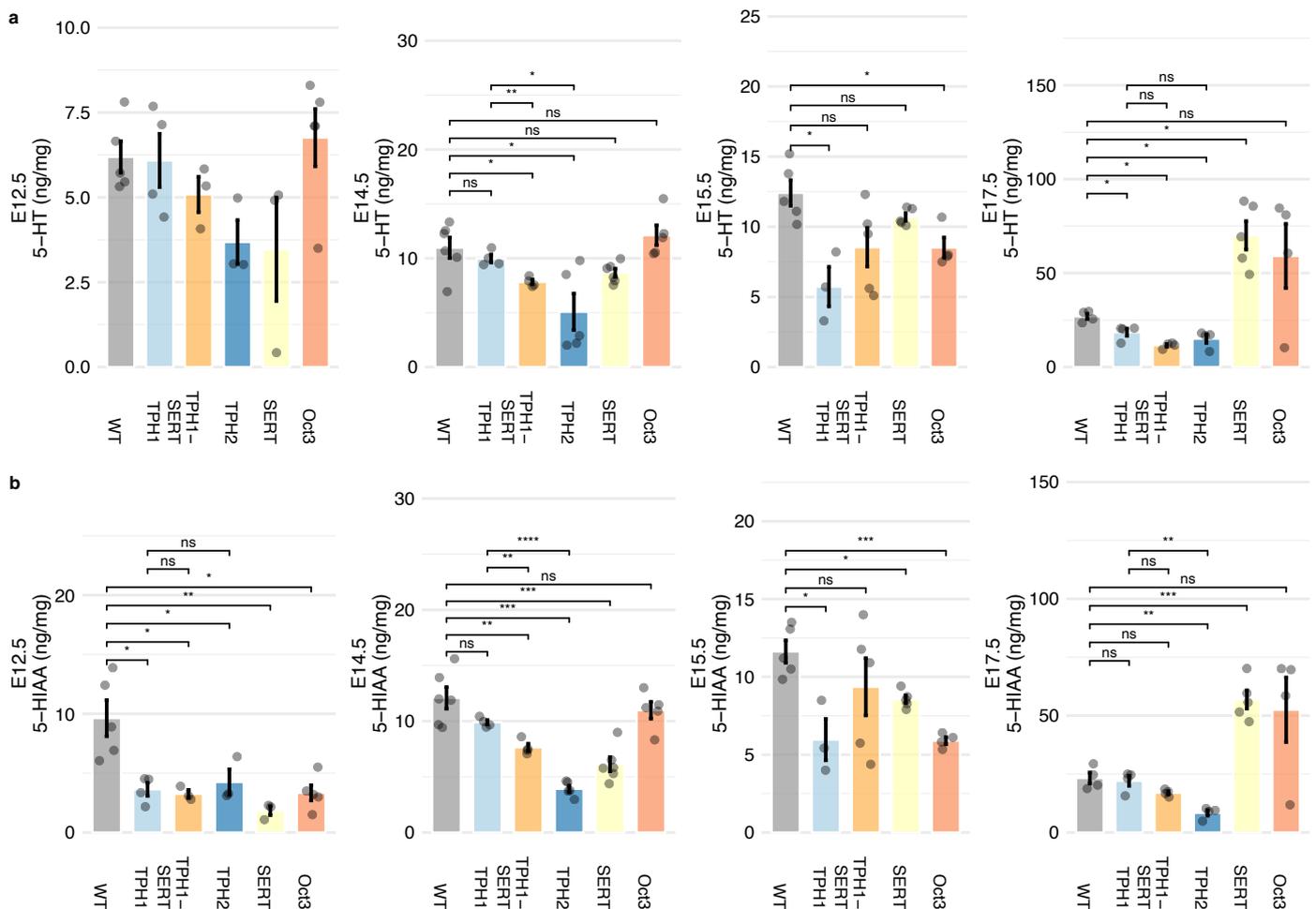


Abbildung 18: Organkonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA in embryonalen Köpfen an verschiedenen Entwicklungsstagen und in Embryonen verschiedener Genotypen.

a: Organkonzentrationen von 5-HT. **b:** Organkonzentrationen von 5-HIAA. Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Um den Einfluss verschiedener intra- und extraembryonaler Quellen auf die Serotonin-Spiegel im sich entwickelnden Gehirn über verschiedene Entwicklungsstadien zu erfassen, nutzten wir den embryonalen Kopf oberhalb der Kiemenbögen als innerhalb der Embryonalentwicklung konstante anatomische Leitstruktur. Der 5-HT Stoffwechsel kann sich auf Ebene von Synthese und Abbau an Veränderungen im jeweils anderen Stellglied anpassen um Spiegel gleichzuhalten (Mosienko et al., 2015). 5-HIAA reagiert als Parameter häufig sensitiver auf, auf Ebene der 5-HT Spiegel kompensierte, Effekte. So lassen sich Gendosis-Effekte im ZNS von adulten Mäusen vom Genotyp $Tph2^{+/-}$ oder $Sert^{+/-}$ auf Ebene der 5-HIAA Spiegel, aber nicht

der 5-HT Spiegel feststellen. Dabei treten in diesen Tieren schon Effekte in Verhalten und Physiologie auf (Kim et al., 2005; Mosienko et al., 2012).

Die Ergebnisse der Messungen von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Genotypen und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten sind in Abbildung 18 gezeigt. Die Genotypen von Muttertier und Embryo bzw. Fetus sind in diesem Experiment jeweils homozygot-negativ für das jeweilige Gen.

8.2.3.1 E12.5:

An E12.5 ergaben sich über alle fünf erfassten Genotypen keine signifikanten Unterschiede der 5-HT Spiegel. Auffällig dabei ist allerdings, dass die im arithmetischen Mittel geringsten Spiegel in $Sert^{-/-}$ Schwangerschaften auftraten. Diese waren niedriger als in $Tph2^{-/-}$ -Schwangerschaften, obwohl die $Tph2$ zu diesem Zeitpunkt schon mindestens einen Entwicklungstag in den Raphe-Neuronen exprimiert wird (Cote et al., 2007).

In den 5-HIAA Spiegeln zeigen sich signifikante Verminderungen in allen erfassten Genotypen.

Von besonderem Interesse ist hierbei die signifikanten Senkungen in Embryonen aus $Tph1^{-/-}$ -Schwangerschaften, mit im Mittel stärkeren Senkungen als in Embryonen aus $Tph2^{-/-}$ -Schwangerschaften. Die $Tph1$ wird an E12.5 weder in den neuroendokrinen Zellen des Darms, noch in der Zirbeldrüse exprimiert (Cote et al., 2007). Die der Senkung zu Grunde liegende, $Tph1$ -abhängige Quelle kann somit nicht embryonalen Ursprungs sein.

8.2.3.2 E14.5:

Der 14. Entwicklungstag stellt in Bezug auf intraembryonale Serotonin-Quellen einen Zeitpunkt dar zu dem die zentralnervöse $Tph2$ deutliche Aktivität aufweist, während die $Tph1$ des Darms noch nicht exprimiert wird (Cote et al., 2007).

Entsprechend zeigen embryonale Köpfe aus $Tph2^{-/-}$ -Schwangerschaften hier eine signifikante Verminderung der 5-HT und 5-HIAA Spiegel, welche in $Tph1^{-/-}$ -Schwangerschaften nicht ausgeprägt ist. Signifikante Verminderungen des Transmitters finden sich in $Tph1^{-/-}$ - $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften und Verminderungen des Metaboliten finden sich in $Sert^{-/-}$ - und $Tph1^{-/-}$ - $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften.

8.2.3.3 E15.5:

An E15.5 nimmt die $Tph1$ des embryonalen Darms ihre Aktivität auf (Cote et al., 2007). In unseren Messungen zeigt sich zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Verminderung

der zentralnervösen Spiegel von Transmitter und Metabolit in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften. Dies untermauert weiter die Hypothese, dass der zentralnervöse und der periphere Serotonin-Pool während der Embryonalentwicklung korrespondieren.

Auffällig ist, dass in Oct3^{-/-}-Schwangerschaften an diesem Entwicklungstag erstmalig eine signifikante Senkung der 5-HT Spiegel zu beobachten ist, welche von einer Senkung der 5-HIAA Spiegel begleitet wird. Messungen in Tph2^{-/-}-Schwangerschaften fehlen an diesem Entwicklungstag.

8.2.3.4 E17.5:

An E17.5 zeigt sich eine ausgeprägte signifikante Verminderung der Serotonin-Spiegel in Tph1^{-/-}- und Tph2^{-/-}-Schwangerschaften gegenüber dem Wildtyp-Niveau. Dabei bestehen zwischen Tph1^{-/-}- und Tph2^{-/-}-Schwangerschaften keine signifikanten Unterschiede. Dies weist auf eine zweite Phase hin, in der die Tph1 für den embryonalen Kopf und möglicherweise das ZNS dieselbe Wichtigkeit besitzt, wie die Tph2.

Weiterhin sticht die deutliche Erhöhung der Serotonin- und 5-HIAA-Spiegel in Sert^{-/-}- und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften hervor. Eine Deutung der erhöhten Serotonin-Spiegel wäre der unterbundene Abbau nach Wiederaufnahme über Sert in der Leber oder dem Herzen oder Oct3 in der Plazenta (Karahoda et al., 2020; Narboux-Nême et al., 2008). Interessanterweise sind die Serotonin-Spiegel in Tph1^{-/-}-Sert^{-/-}-Schwangerschaften nicht wie in Sert^{-/-}-Schwangerschaften erhöht, sie sind im Mittel am niedrigsten von allen Genotypen und signifikant niedriger als in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften.

8.2.4 Einfluss verschiedener Genotypen auf embryonale periphere 5HT-Spiegel:

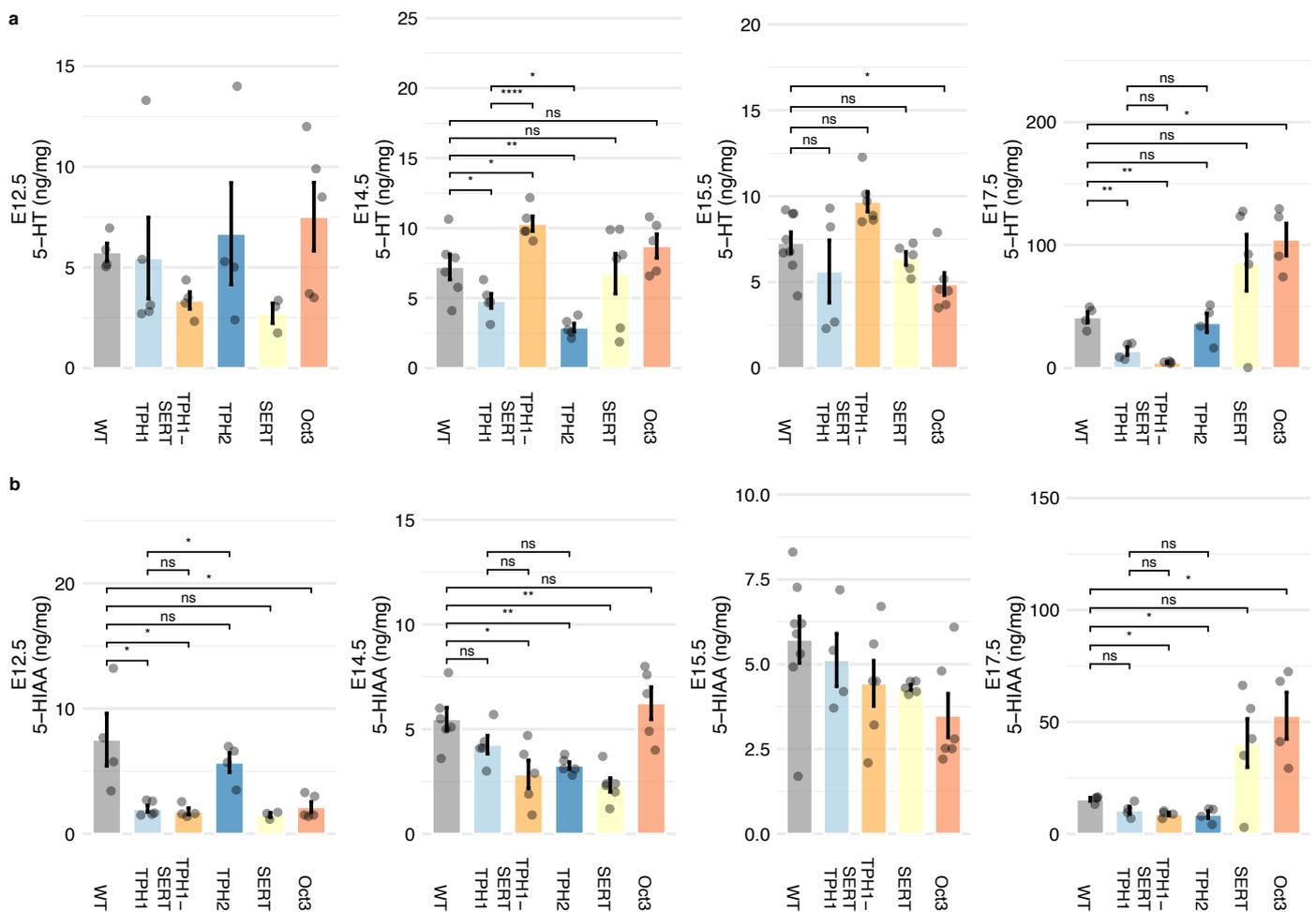


Abbildung 19: Organkonzentrationen von 5-HT und 5-HIAA in embryonalen Körpern an verschiedenen Entwicklungsstadien und in Embryonen verschiedener Genotypen.

a: Organkonzentrationen von 5-HT. **b:** Organkonzentrationen von 5-HIAA. Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Um den Einfluss verschiedener intra- und extraembryonaler auf die peripheren Serotonin-Spiegel über verschiedene Entwicklungsstadien zu erfassen, nutzten wir den embryonalen Körper als innerhalb der Embryonalentwicklung konstante anatomische Leitstruktur. Auch hier maßen wir wieder 5-HIAA Spiegel als sensitiven Parameter für ansonsten kompensierte Effekte. Die Ergebnisse der Messungen von 5-HT und 5-HIAA in verschiedenen Genotypen und zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten sind in Abbildung 19 gezeigt. Die Genotypen von Muttertier und Embryo sind in diesem Experiment jeweils homozygot-negativ für das jeweilige Gen.

8.2.4.1 E12.5:

An E12.5 sind keine signifikanten Effekte auf die Serotonin-Spiegel im embryonalen Körper ausgeprägt.

Signifikante Effekte auf die 5-HIAA Spiegel sind in Tieren mit dem Genotyp $Tph1^{-/-}$, $Tph1^{-/-}$ $Sert^{-/-}$ und $Oct3^{-/-}$ erkennbar. Auch in $Sert^{-/-}$ -Tieren finden sich im Mittel verminderte Spiegel allerdings ohne dass dieser Effekt signifikant ausfällt.

Somit zeigt sich ein vergleichbares Muster zum embryonalen Kopf.

8.2.4.2 E14.5:

Die Serotonin-Spiegel in $Sert^{-/-}$ - und $Tph1^{-/-}$ - $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften sind hier im Vergleich zum Vortag deutlich erhöht und im ersten Fall ohne signifikante Abweichung zum WT-Niveau und im zweiten Fall sogar signifikant erhöht. Dies ließe sich über eine prominentere Rolle SERT-abhängigen Abbaus erklären, da die 5-HIAA Spiegel in beiden Fällen signifikant vermindert sind. Damit liegt ein gegenteiliger Effekt zum Vortag vor.

In $Tph1^{-/-}$ - wie in $Tph2^{-/-}$ -Schwangerschaften finden sich signifikant verminderte Spiegel. Da die embryonale $Tph1$ zu diesem Zeitpunkt noch nicht aktiv ist, könnte dies hinweisend auf den Einfluss einer extra-embryonalen $Tph1$ -abhängigen Quelle sein.

8.2.4.3 E15.5:

Das Muster in $Sert^{-/-}$ - und $Tph1^{-/-}$ - $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften entspricht dem an E14.5, wobei die Spiegel in $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften im Mittel noch erhöht sind, der Effekt allerdings nicht signifikant ausfällt.

Wie im embryonalen Kopf sind auch im Körper die Serotonin- und 5-HIAA-Spiegel $Oct3$ -abhängig signifikant vermindert, obwohl der Effekt an den vorangegangenen und dem darauffolgenden Tag umgekehrt ist.

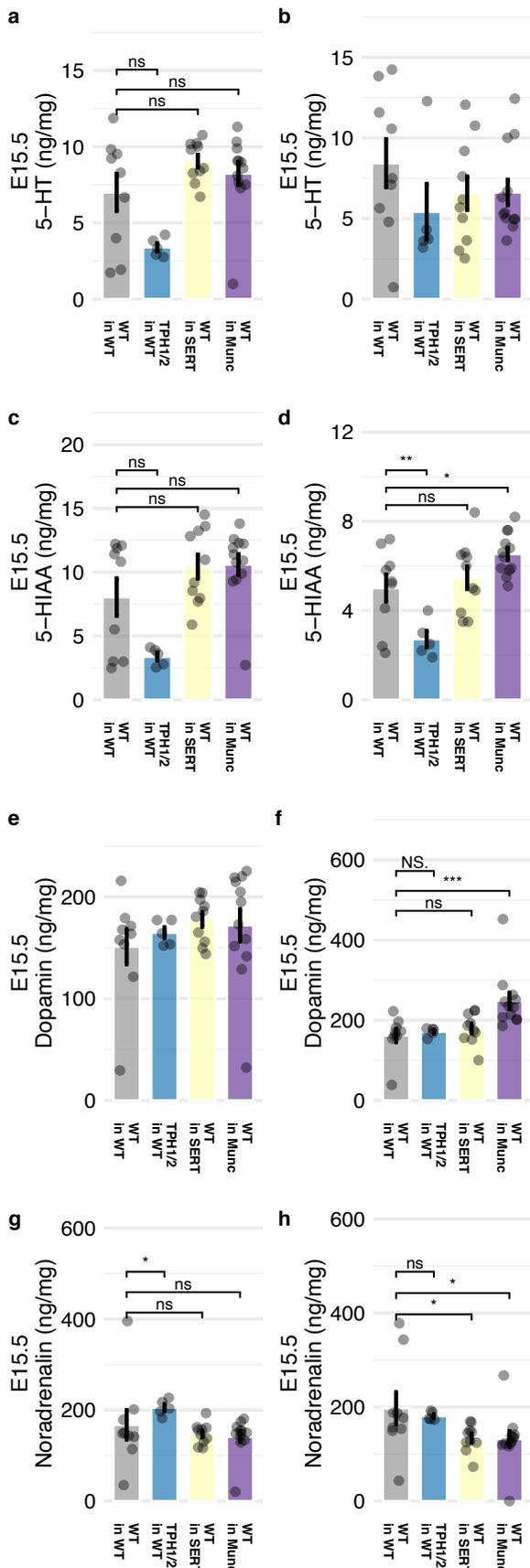
8.2.4.4 E17.5:

Ähnlich wie im embryonalen Kopf zeigt sich in $Tph1^{-/-}$ - und $Tph1^{-/-}$ - $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften eine signifikante Verminderung an Serotonin.

Allerdings scheint hier der $TPH2$ -Genotyp keinen Einfluss auf die Serotonin-Spiegel zu haben.

Embryonale Körper aus $Sert^{-/-}$ - und $Oct3^{-/-}$ -Schwangerschaften zeigen wie im embryonalen Kopf eine deutliche Erhöhung der Serotonin- und 5-HIAA-Spiegel.

8.2.5 Einfluss des maternalen Genotyps auf embryonale 5-HT Spiegel:



Die in den Abschnitten 8.2.2 und 8.2.3 gezeigten Daten wurden in Embryonen aus Schwangerschaften, in denen Muttertier und Kind denselben Genotyp aufwies, erhoben. Dies führt insbesondere beim Knockout des SERT-Transporters dazu, dass unklar ist ob beobachtete Effekte auf das Fehlen des Transporters im maternalen Blut, in der Plazenta oder im Embryo selbst zurückzuführen sind. Um besser zwischen maternal und embryonal bedingten Effekten unterscheiden zu können führten wir Embryotransfers durch. Hierbei bestand die Möglichkeit Schwangerschaften zu erzeugen in denen sich der Genotyp zwischen Muttertier und Embryo unterscheidet.

Wir führten Transfers von Wildtyp-Embryonen in *Sert*^{-/-}-Ammen und *Tph1*^{-/-}-*Tph2*^{-/-}-Embryonen in WT-Ammen durch, um erfassen zu können, ob die Abwesenheit von Serotonin in der Mutter die Spiegel in WT-Embryonen senkt und ob TPH-negative Embryonen messbare Serotonin-Spiegel durch maternales Serotonin aufbauen können.

Da in der Literatur kein Konsens über die Spiegel freien (nicht Thrombozytengebundenen) Serotonins in adulten *Sert*^{-/-}

Abbildung 20: Organkonzentrationen verschiedener Neurotransmittern in verschiedenen Embryotransfer-Modellen in Embryonen an Entwicklungstag E15.5.

a, c, e, g: Organkonzentrationen in embryonalen Köpfen. **b, d, f, h:** Organkonzentrationen in embryonalen Körpern.
a, b: Organkonzentrationen an 5-HT. **c, d:** Organkonzentrationen an 5-HIAA. **e, f:** Organkonzentrationen an Dopamin.
g, h: Organkonzentrationen an Noradrenalin.

Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt:
ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Mäusen besteht (siehe Abschnitt 5.3.4), nutzten wir zusätzlich Munc13-4^{-/-}-Ammen. Munc13-4 ist das Genprodukt des *Unc13d* Gens und ein terminaler Faktor der Sekretion von delta-Granula aus Thrombozyten. Diese ist im von uns verwendeten Mausmodell völlig aufgehoben (Stegner et al., 2013).

Als Gestationstag wählten wir E15.5, da der Effekt hier entgegen der TPH1- und TPH2-Expression durch den Embryo bestehen muss.

Wir maßen keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Embryonen, welche in WT-, Sert^{-/-}- oder Munc13-4^{-/-}-Ammen transferiert wurden (Abbildung 20).

Dies könnte für eine ausreichende Kompensation durch die embryonalen TPHs zu diesem Entwicklungstag sprechen.

Interessanterweise zeigten Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Embryonen aus WT-Ammen im Mittel nur eine nicht-signifikante Reduktion der Serotonin-Spiegel von etwa 50% im Kopf und 30% im Körper.

In adulten Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-} Tieren lässt sich eine Reduktion von etwa 90% im Blut und 100% im Gehirn nachweisen (Abbildung 8). Da der Genotyp dieser Embryonen auch die Produktion durch etwaige trophoblastäre TPHs unterbindet, liegt die Aufnahme aus dem maternalen Blut zur Kompensation nah.

8.2.6 Einfluss serotonerger Genotypen auf die Gewichtsentwicklung:

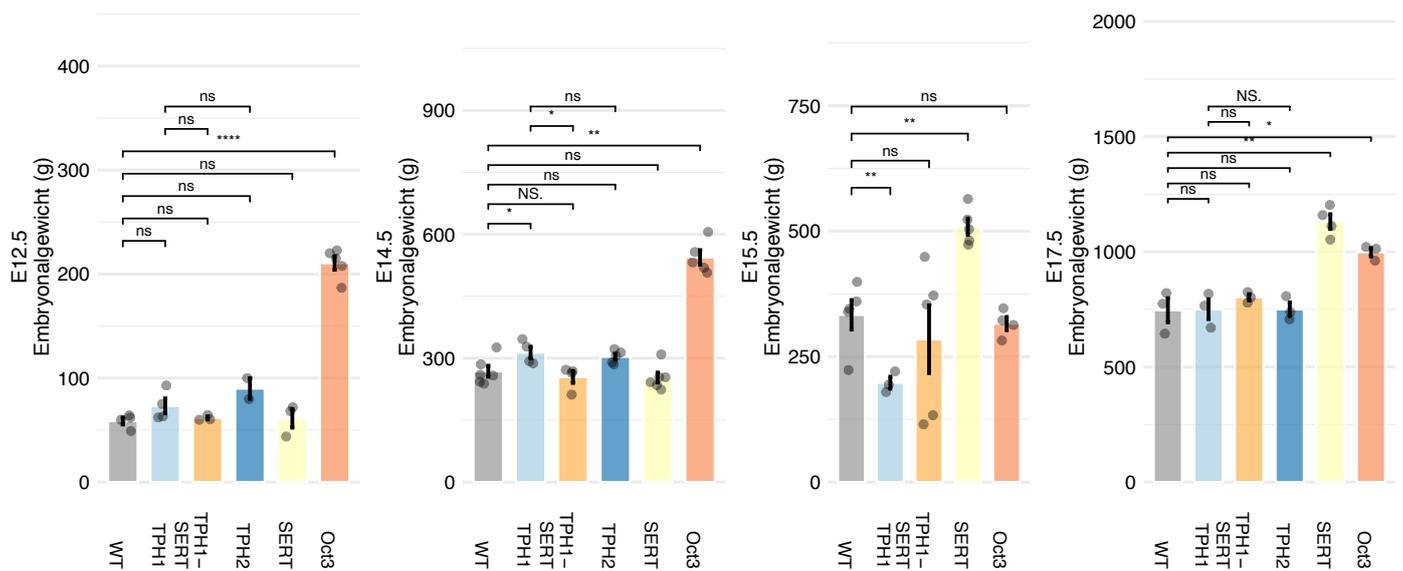


Abbildung 21: Körpergewicht (g) von Embryonen verschiedener Genotypen an verschiedenen Entwicklungstagen.

Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und Omnibustest-P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt: ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Da Cote et al. in $Tph1^{-/-}$ -Schwangerschaften an E12.5 Unterschiede im embryonalen Größenwachstum in Abhängigkeit des Genotyps der Mutter feststellten, verglichen wir als leicht erhebbaren und soliden Parameter das Gewicht von Embryonen verschiedener Genotypen zu verschiedenen Gestationstagen (Cote et al., 2007). Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 gezeigt. Eine Verminderung des embryonalen Gewichts in $Tph1^{-/-}$ -Schwangerschaften konnten wir an E12.5 nicht feststellen, jedoch trat eine signifikante Verringerung an E15.5, also nach Einsetzen der Expression der gastrointestinalen $Tph1$ ein. Diese normalisierte sich bis E17.5.

Auffällig war eine konstante Erhöhung des Gewichts von Embryonen aus $Oct3^{-/-}$ -Schwangerschaften um den Faktor 2-3 an allen Entwicklungstagen bis auf E15.5.

Ein ähnlicher Effekt trat an E15.5 und E17.5 in $Sert^{-/-}$ -Schwangerschaften auf. Diese Gewichtserhöhung steht in engem zeitlichem Zusammenhang mit der in den Abschnitten 8.2.2 und 8.2.3 diskutierten starken Erhöhung der zentralen und peripheren Serotonin-Spiegel in denselben Genotypen.

8.2.7 Einfluss serotonerger Genotypen auf embryonale Katecholamin-Spiegel:

Um den Einfluss serotonerger Genotypen auf embryonale Katecholamin-Spiegel zu erfassen, maßen wir Dopamin und Noradrenalin in embryonalen Köpfen und Körpern an verschiedenen Gestationstagen. Die Ergebnisse sind in den Abbildung 22 und 23 gezeigt.

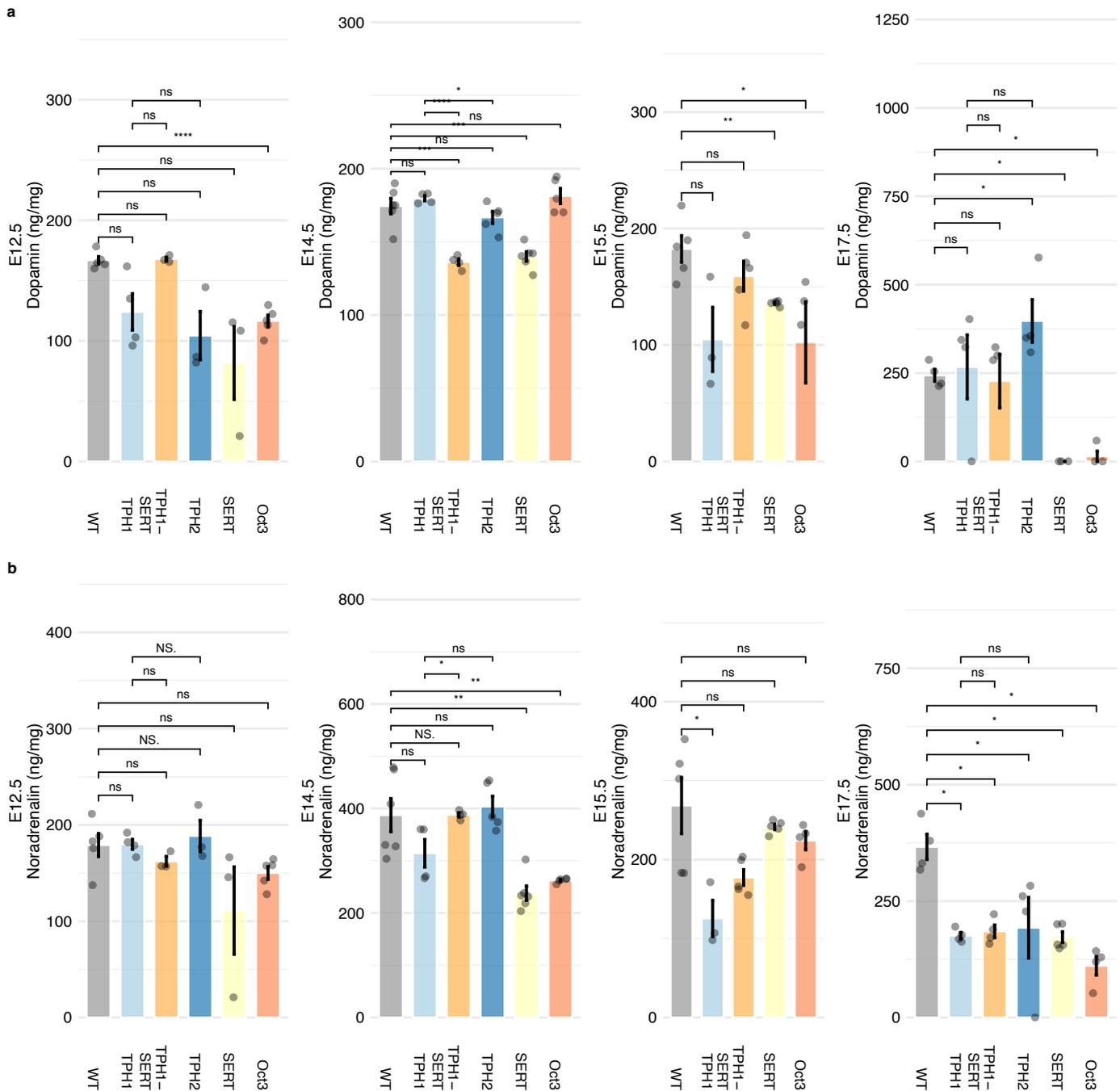


Abbildung 22: Organkonzentrationen von Katecholamin-Transmittern in embryonalen Köpfen an verschiedenen Entwicklungstagen und in verschiedenen Genotypen.

a: Dopamin. **b:** Noradrenalin.

Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt:

ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

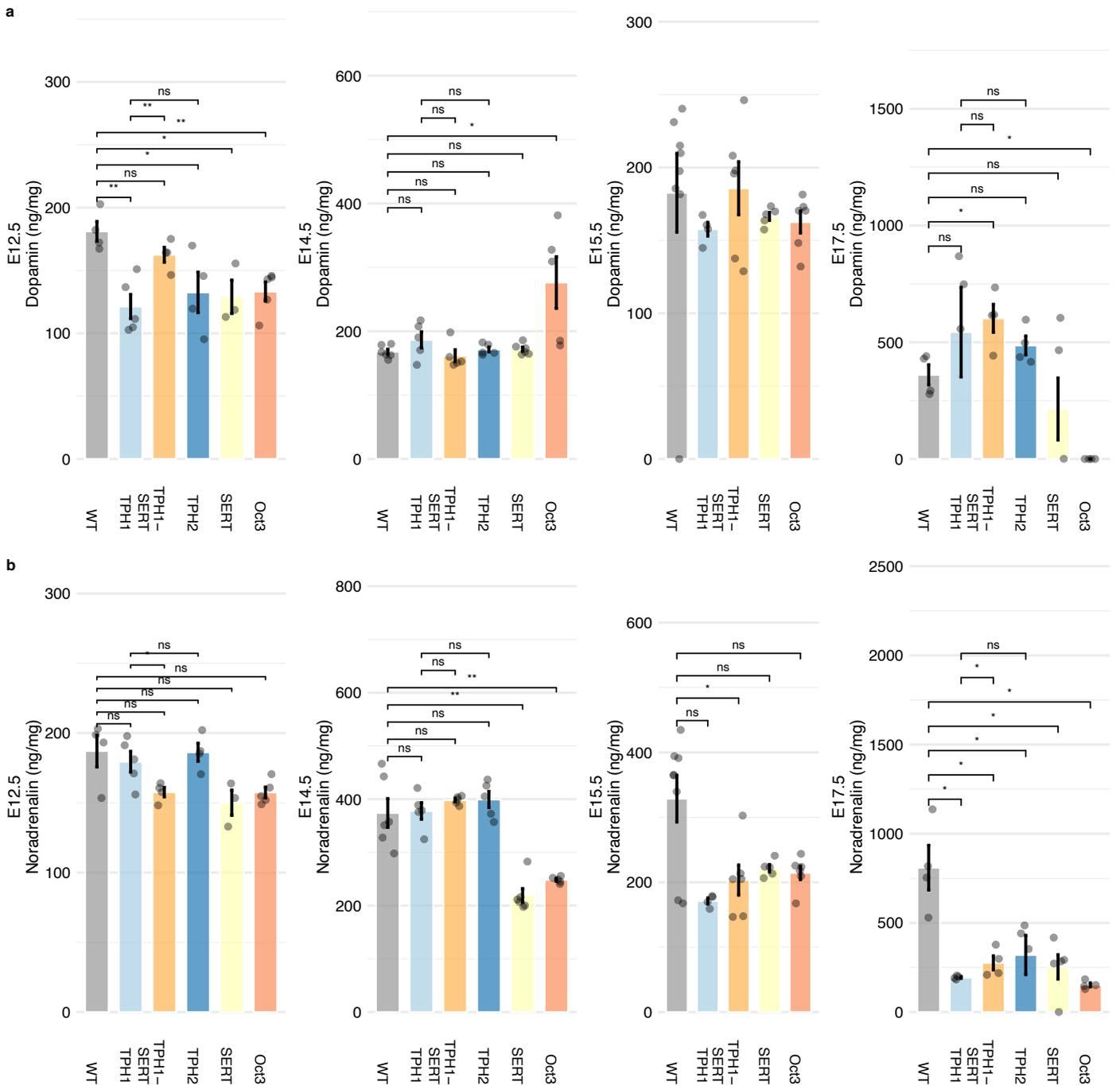


Abbildung 23: Organkonzentrationen von Katecholamin-Transmittern in embryonalen Körpern an verschiedenen Entwicklungsstadien und in verschiedenen Genotypen.

a: Dopamin. **b:** Noradrenalin.

Angewandte statistische Verfahren, Transformationen und exakte P-Werte sind der Tabelle in Abschnitt 7.5 zu entnehmen. Die Grafische Darstellung des P-Wertes findet folgendermaßen statt:

ns: $p > 0.05$, *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

8.2.7.1 E12.5:

An E12.5 zeigt sich im embryonalen Kopf eine signifikante Verminderung an Dopamin in Oct3^{-/-} Schwangerschaften. Im embryonalen Körper zeigen sich signifikante Dopamin-Erniedrigungen in Tph1^{-/-}, Tph2^{-/-}, Sert^{-/-} und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften. Noradrenerge Effekte sind nicht erkennbar.

8.2.7.2 E14.5:

Im embryonalen Kopf sind in Sert^{-/-} und Tph1^{-/-} Sert^{-/-}-Schwangerschaften signifikante Verminderungen an Dopamin zu sehen. Noradrenalin ist in Sert^{-/-}-und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften vermindert. Köpfe von Embryonen mit dem Genotyp Tph2^{-/-}, welcher den größten Einfluss auf die 5-HT Spiegel im embryonalen Kopf zu diesem Zeitpunkt darstellt, zeigen keine Verminderung von Katecholaminen.

Im embryonalen Körper ist Noradrenalin in Sert^{-/-}-und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften signifikant vermindert. Dopamin ist hier in Oct3^{-/-}-Schwangerschaften signifikant und sichtbar erhöht.

8.2.7.3 E15.5:

Der embryonale Kopf zeigt an E15.5 verminderte Dopamin-Spiegel in Sert^{-/-}-und in Oct3^{-/-}-Schwangerschaften und verminderte Noradrenalin-Spiegel in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften.

Im embryonalen Körper kommt es im Mittel zur starken Verminderung von Noradrenalin-Spiegeln in allen erfassten Genotypen, wobei keiner der Effekte signifikant ausfällt. Dies könnte an der hohen Varianz innerhalb des Genotyps Wildtyp als Vergleichsgruppe begründet sein.

8.2.7.4 E17.5:

An E17.5 sind Dopamin-Spiegel im embryonalen Kopf in Sert^{-/-} und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften bis an die Nachweisgrenze vermindert. Im embryonalen Körper findet sich derselbe Effekt in Oct3^{-/-}-Schwangerschaften und eine nicht-signifikante Verminderung im Mittel mit hoher Streuung in Sert^{-/-}-Schwangerschaften.

Währenddessen sind sie Kopf in Tph2^{-/-} und im Körper in Tph1^{-/-}-Sert^{-/-}-Schwangerschaften signifikant erhöht.

Die Noradrenalin-Spiegel sind über alle Genotypen hinweg in beiden Strukturen vermindert.

8.2.8 Einfluss des maternalen Genotyps auf embryonale Katecholamin-Spiegel:

Um den Einfluss einer möglichen maternalen 5-HT Quelle auch auf embryonale Katecholamin-Spiegel zu erfassen, maßen wir Dopamin und Noradrenalin in Embryonen aus dem, bereits in Abschnitt 8.3.4 besprochenen, Embryotransfer-Modell an E15.5. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 gezeigt. Als Effekt zeigte sich eine signifikante Dopamin-Erhöhung in den Körpern von Wildtyp-Embryonen, welche in Ammen vom Genotyp *Unc13d^{-/-}* ausgetragen wurden, sowie eine Noradrenalin Senkung in Körpern desselben Transfermodelles, sowie von Wildtyp-Embryonen, welche in Ammen vom Genotyp *Sert^{-/-}* ausgetragen wurden. Eine Erhöhung der Noradrenalin-Spiegel war in Köpfen von *Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}*-Embryonen aus Wildtyp-Ammen zu beobachten.

9 Diskussion

Zusammenfassend untersuchen wir in dieser Arbeit verschiedene Stellglieder in der Homöostase globaler und Organ-spezifischer Serotonin-Spiegel in adulten, embryonalen und fetalen Mäusen, sowie deren Effekte auf einige physiologische Parameter wie Fastenadaptation, Nierenfunktion und Gewichtsentwicklung.

9.1 Serotonin-Synthese in Abwesenheit einer TPH im adulten Organismus:

In diesem Anteil der Arbeit untersuchten wir die Quelle der verbliebenen ca. 10% Serotonin im Blut von $Tph1^{-/-}$ -Mäusen. In einem ersten Schritt schlossen wir die $Tph2$ als Quelle aus. Dies geschah durch die Untersuchung von Serotonin-Spiegeln in Blut und Organen von $Tph1^{-/-}$ - $Tph2^{-/-}$ -Mäusen. Wir schlossen Cyp-medierte Serotonin-Synthese, ausgehend vom Tryptamin, anhand der evolutionären Konservierung aus und priorisierten innerhalb der Familie der AAHs die Pah gegenüber der Th durch eine gezielte Analyse der jeweiligen Homologie zu TPHs.

Die Fähigkeit der Pah zur Generation relevanter Mengen Serotonins aus Tryptophan zeigten wir durch 5-HTP Assays in Zellkulturen und Leber-Homogenaten und wiesen den Precursor durch HPLC und Immunhistochemie und in Abhängigkeit von Genotyp und Enzym-Inhibition nach. Wir zeigten, dass sich Serotonin-Spiegel im Blut von $Tph1^{-/-}$ -Mäusen durch pharmakologische Inhibition der Pah weiter senken ließen und generierten ein $Tph1^{-/-}$ - $Pah^{-/-}$ -Mausmodell, welches unabhängig der zirkulierenden Phenylalanin-Spiegel im Blut eine Reduktion des im Blut zirkulierenden 5-HTs auf unter 1% der WT-Spiegel zeigte.

Abschließend erfassten wir durch den Einsatz eines mit stabilen Isotopen markierten, chemischen Vorläufers die gesamte 5-HT neo-Synthese in Abhängigkeit der Genotypen. Auch hier bestätigte sich das bisher beobachtete Muster. Damit sehen wir die Abhängigkeit von ca.10% der Gesamtplasma-Spiegel an Serotonin von der PAH als bestätigt an.

Abschließend versuchten wir eine Rolle Pah-abhängig generierten Serotonins für die Physiologie von Mäusen zu finden. Hierzu untersuchten wir Organe in denen Pah-Expression auf eine lokale Generation von Serotonin hinweist.

In der Leber erfassten wir hierzu lipidomische Signaturen in gefasteten und normal ernährten Mäusen entsprechender Genotypen. Der Effekt, den wir erfassten, war

allerdings in größerer Übereinstimmung mit einer, durch die Phenylketonurie hervorgerufenen, hepatischen Steatose.

Dieser scheint auch nicht durch Phenylalanin-freie Ernährung unterbunden werden zu können.

In der Niere erfassten wir klassische Parameter der klinischen Chemie. Es zeigte sich eine Glucosurie und Erhöhung des Urin-Kreatinins, ohne entsprechende Korrelate im Plasma. Dies wird von uns als unspezifische Schädigung der Niere im Rahmen der Phenylketonurie gewertet.

Limitiert wird dieser Anteil der Arbeit unserer Ansicht nach durch zwei Faktoren:

Auch Tph1^{-/-}-Pah^{-/-}-Mäuse weisen noch eine Restmenge Serotonin im Blut auf, diese ist im Rahmen unserer Messmethoden nicht sicher zu quantifizieren (unterhalb des LLOQ), beläuft sich aber ungefähr auf 1% der WT-Spiegel.

Eine mögliche Quelle, stellt der Übertritt von Kleinstmengen Serotonins über die BBB dar (Nakatani et al., 2008). Auch ein „Spillover“ aus enterischen Neuronen, in Analogie zum Übertritt Noradrenalins aus dem vegetativen Nervensystem ins Blut, ist denkbar (Esler et al., 1984).

Wir konnten zwar feststellen, dass in Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}- Tieren kein Unterschied in den Mengen zirkulierenden Serotonins zu Tieren mit dem Genotyp Tph1^{-/-} besteht (Abbildung 8), abschließend lässt sich diese Möglichkeit aber erst durch die Generation von Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Pah^{-/-}-Tieren. Die Generation dieser Linie war uns bisher allerdings durch eine extrem hohe embryonale Mortalität nicht möglich.

Eine weitere mögliche Quelle stellt die Aufnahme aus dem Darm dar. Wie in Abschnitt 5.2 diskutiert, kommt Serotonin in einer Vielzahl pflanzlicher Quellen vor und kann in kleineren Mengen durch einige Spezies kommensaler Bakterien synthetisiert werden. Die Kontrolle dieser möglichen Quelle als Störgröße könnte durch gezielte Fütterung mit Serotonin-freiem Futter und den Einsatz gnotobiotischer Tiere erreicht werden.

Die abschließende Erfassung möglicher physiologischer Rollen für Pah-abhängig produziertes Serotonin wurde in unseren Untersuchungen stark durch die veränderte Physiologie in Pah^{-/-}- Tieren beeinträchtigt. Dies war auch durch Phenylalanin-freie Fütterung nicht zu kontrollieren.

Eine Möglichkeit solche hypothetischen Effekte dennoch festzustellen, wäre die Generation Organ-spezifischer Pah^{-/-}-Modelle für Leber und Nieren, etwa durch den

Einsatz eines Cre-lox-Systems unter der Kontrolle geeigneter, Organ-spezifischer Promotoren.

Allerdings verfügt das von uns verwendete B6.Pah^{enu2}-Modell über eine unbeeinträchtigte Protein-Expression und -stabilität bei mutierter katalytischer Domäne. In einem kürzlich veröffentlichten neuartigen Mausmodell der PKU, welches ähnliche Charakteristika aufweist, finden sich Hinweise auf eine Leberschädigung durch Amyloid-artige Proteinaggregationen im Zuge eines gain-of-function Effekts und unabhängig des Verlusts der katalytischen Aktivität. Auch hier finden sich Veränderungen der hepatischen Lipid-Balance (Aubi et al., 2021). Dies könnte auch die hier beobachteten Effekte erklären und wäre durch eine Verwendung konditioneller Knockout-Modelle am ehesten nicht zu kontrollieren.

9.2 Serotonin-Homöostase im embryonalen Organismus:

Als weiteres Teilprojekt dieser Arbeit untersuchten wir die Einflüsse von intra- und extra-embryonalen Serotonin-Quellen auf die zentralnervösen und peripheren, embryonalen Serotonin-Spiegel, bzw. als Surrogate die Spiegel im embryonalen Kopf und Körper, über mehrere Entwicklungstage.

In einem ersten Schritt wiederholten wir Experimente aus der Literatur, welche Tph1-Expression und Aktivität durch die Plazenta und den Dottersack von Mäusen an E14.5 zeigten. Wir erweiterten diese Experimente durch Kontroll-Organen aus TPH-negativen Knockout-Tieren.

Wir konnten an E14.5 keine Tph-Aktivität in Plazenta und Dottersack anhand von Enzym-Assays zeigen.

Damit scheinen uns die extra-embryonalen trophoblastären Strukturen als embryonale Serotonin-Quelle unwahrscheinlich.

Wir konnten allerdings am selben Embryonaltag mit zwei verschiedenen Antikörpern die Expression von SERT, am ehesten auf der maternalen Seite der Plazenta lokalisiert, nachweisen. Damit wirkt die Aufnahme maternalen Serotonins über die Plazenta in den Embryo für uns möglich.

Um diese und andere mögliche Serotonin-Quellen in vivo zu untersuchen generierten wir Schwangerschaften verschiedener serotonerger Knockout-Modelle und maßen Serotonin in embryonalem Kopf und Körper an verschiedenen Entwicklungstagen. Es ergab sich das Bild eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Genprodukte innerhalb dessen verschiedene Serotonin-Quellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten eine Rolle spielen und füreinander teilweise kompensieren können.

Zunächst soll hier die die transiente Querbarkeit der BBB Serotonin gegenüber diskutiert werden um die Diskussion trophoblastärer Aufnahme bzw. Synthese im Lichte dessen führen zu können. Ein erster interessanter Datenpunkt hierzu ist der 5-HIAA Spiegel in Köpfen aus Tph1^{-/-}-Schwangerschaften an E12.5. Es finden sich verminderte Spiegel und das, obwohl die Tph1 zu diesem Zeitpunkt weder in Zirbeldrüse noch im Darm exprimiert wird (Cote et al., 2007). Dies liefert einen starken Hinweis für die Abhängigkeit zentralnervöser 5-HT Spiegel von extra-embryonal, Tph1-abhängig generiertem 5-HT in der frühen zweiten Schwangerschaftshälfte. Weiterhin geht aus Abbildung 8 hervor, dass zumindest in adulten Tieren kein Effekt des Tph1-Knockouts auf die ZNS-Spiegel besteht.

Dieser Effekt ist an E14.5 weder im 5-HT noch im 5-HIAA zu finden. Dabei zeigt sich nun ein Effekt in Tph2^{-/-}-Schwangerschaften, beweisend für die Abhängigkeit der Spiegel im embryonalen Kopf vom ZNS 5-HT und damit beweisend für unser experimentelles Modell, welches den Kopf als Surrogat für das embryonale ZNS nutzt. Auch an E15.5 treten signifikante Effekte auf 5-HT und 5-HIAA Spiegel in Köpfen aus Tph1^{-/-}-Schwangerschaften auf, hinweisend auf eine zweite Phase der Abhängigkeit zentraler von peripheren Spiegeln.

Eine umgekehrte Abhängigkeit lässt sich anhand von 5-HT und 5-HIAA Spiegeln an E14.5, also in Abwesenheit peripherer, embryonaler 5-HT Synthese, im embryonalen Körper zeigen. Stammen diese aus Tph2^{-/-}-Schwangerschaften sind die Spiegel beider Moleküle signifikant vermindert. An E17.5 ist ein ähnlicher Effekt noch auf Niveau der 5-HIAA Spiegel ausgeprägt. Die Tph2 wird allerdings auch im myenterischen Plexus ab E12.5 exprimiert. Dass dies allerdings den Effekt an E14.5 oder E17.5 bedingt ist äußerst unwahrscheinlich, da wie aus Abbildung 8 hervorgeht, selbst in adulten Mäusen kein Einfluss des Tph2-Knockouts auf globale periphere Spiegel besteht.

Die Passierbarkeit der BBB gegenüber Serotonin in vivo bis in die Fetalzeit hinein lässt sich somit als erwiesen annehmen.

Einen unerwarteten Befund stellen die Messungen in *Sert^{-/-}* und *Oct3^{-/-}*-Schwangerschaften an E17.5 dar. Sie zeigen eine deutliche Erhöhung der 5-HT Spiegel in Kopf und Körper. Dies ließe sich im Kontext fehlenden Abbaus, durch ein Ausbleiben der Aufnahme nach intrazellulär deuten.

Interessanterweise zeigen Köpfe und Körper aus *Oct3^{-/-}*-Schwangerschaften an E15.5 eine signifikante Verminderung der 5-HT Spiegel. Dies lässt sich als Hinweis in vivo für die bereits in vitro in der Literatur beschriebene Umkehr der Oct3-Polarität in der Plazenta im Laufe der Schwangerschaft deuten.

Um die Abhängigkeit der embryonalen 5-HT Spiegel von extraembryonalen, und anhand der Literatur am ehesten Tph1-abhängigen, Quellen festzustellen, lassen sich Effekte in *Tph1^{-/-}*-Schwangerschaften zu Entwicklungszeitpunkten, während derer keine relevante Tph1-Expression im Embryo stattfindet, heranziehen. So findet sich in Kopf und Körper ein Tph1-abhängiger Effekt auf die 5-HIAA Spiegel an E12.5 und im Körper auf die 5-HT Spiegel an E14.5.

Dies lässt die Abhängigkeit der embryonalen 5-HT Spiegel in der frühen zweiten Schwangerschaftshälfte von zumindest einer extraembryonalen, Tph1-abhängigen Quelle wahrscheinlich erscheinen.

Da unsere Auswertung von trophoblastärer Tph-Aktivität bzw. *Sert*-Expression anhand von Enzym-Assays respektive Immunohistochemie (s.o.) nahelegen, dass es sich bei dieser Quelle eher um die maternale Tph1 als um eine trophoblastäre Tph1 untersuchten wir diese Hypothese näher.

Um einen Einfluss dieser hypothetischen Quelle auf die embryonalen 5-HT Spiegel robust zu erfassen, nahmen wir Embryotransfers vor. Hierzu wählten wir als Entwicklungstag E15.5, da an diesem Tag über alle Quellen hinweg in der Literatur die stabile embryonale Expression beider TPHs nachgewiesen werden konnte.

Einen Einfluss fehlenden maternalen Serotonins in Anwesenheit embryonaler TPHs, anhand von *Sert*- oder *Munc*-negativen Ammen und Wildtyp-Embryonen, konnten wir zu diesem Zeitpunkt nicht feststellen.

Allerdings konnten wir in TPH1-TPH2-Embryonen aus WT-Ammen feststellen, dass die Reduktion der Serotonin-Spiegel im embryonalen Kopf nur im arithmetischen Mittel 30-50% ausmachte und statistisch nicht signifikant ausfiel, während diese im adulten Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}- ZNS nahezu 100% beträgt.

Damit scheint eine maternale Quelle, die selbst in Anwesenheit embryonaler TPHs noch kompensatorisch tätig sein kann, weiterhin möglich.

Weiterhin untersuchten wir den Einfluss der eben beschriebenen Genotypen auf die embryonale Gewichtsentwicklung und Katecholamin-Spiegel.

Die Gewichtsentwicklung war vor allem in drei Genotypen auffällig:

Der deutlichste Effekt zeigte sich in der Vervielfachung des embryonalen Gewichts im Sert^{-/-}- und Oct3^{-/-}-Schwangerschaften.

In Oct3^{-/-}-Schwangerschaften trat dies an allen gemessenen Entwicklungstagen, außer E15.5 auf. Damit gleicht sie der Kinetik der Serotonin-Spiegel in diesem Mausmodell, da diese in an E12.5 und E14.5 nicht-signifikant erhöht, an E15.5 vermindert und an E17.5 signifikant erhöht ist.

In Sert^{-/-}-Schwangerschaften zeigte sie sich an E15.5, während signifikante Erhöhungen der 5-HT Spiegel im embryonalen Körper im selben Genotyp an E14.5 auftreten und auch an E15.5 noch (im Mittel aber nicht signifikant) ausgeprägt sind.

Gegenläufig zu Cote et al. zeigen Tph1^{-/-}-Schwangerschaften in unseren Experimenten an E12.5 keine Minderung im Gewicht als Surrogat des Wachstums. Sie zeigen sich an diesem Entwicklungstag nicht signifikant erhöht. Dieser Trend fällt an E14.5 signifikant aus und kehrt sich an E15.5 in eine signifikante Verminderung um. An E17.5 finden sich keine Effekte auf das Gewicht in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften.

Wir konnten einen deutlichen Effekt auf die Spiegel der gemessenen Katecholamine durch Knockout serotonerger Gene zeigen. Dabei scheinen Knockouts der TPHs auch eher mit niedrigen Konzentrationen an Katecholaminen zu korrelieren. So findet sich eine Senkung der Dopamin-Spiegel im Körper an E12.5 in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften, eine Senkung der Noradrenalin-Spiegel im Körper an E15.5 in Tph1^{-/-}- Sert^{-/-}-Schwangerschaften, eine Senkung der Noradrenalin-Spiegel im Körper an E17.5 in Tph1^{-/-}- und Tph2^{-/-}-Schwangerschaften, eine Senkung der Noradrenalin-Spiegel im Kopf an E17.5 in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften und eine Senkung der

Noradrenalin-Spiegel im Kopf an E17.5 in Tph1^{-/-}-Schwangerschaften und Tph2^{-/-}-Schwangerschaften. Diese Ergebnisse wären mit einem trophischen Effekt 5-HTs auf katecholaminerge Zellpopulationen, wie ihn auch Li et al. beobachteten und wie er durch adulte Tph2^{-/-} Mäuse nahelegt, vereinbar (Gutknecht et al., 2012; Z. Li et al., 2011).

Dies könnte auch die verminderten Noradrenalin-Spiegel im Körper von Wildtyp-Embryonen aus Sert^{-/-}- und Unc13d^{-/-}-Ammen an E15.5 Zeitpunkt bedingen.

Eine Erhöhung von Katecholamin-Spiegel in einem der Tph^{-/-}-Modelle ist zu keinem Zeitpunkt zu beobachten. Diese wäre anhand der Literatur durch die hemmende Wirkung 5-HTs auf das sich entwickelnde Nebennierenmark denkbar (Kameneva et al., 2022).

Embryonen aus Oct3^{-/-}- und des Sert^{-/-}-Schwangerschaften zeigen allerdings an E17.5 stark verminderte Katecholamin-Spiegel. Dies sind Entwicklungszeitpunkte zu denen in beiden Modellen signifikant erhöhte 5-HT Spiegel vorliegen. Dies wäre wiederum mit dem durch Kameneva et al. beschriebenen Effekt vereinbar.

Auch die beobachtete Erhöhung der Dopamin-Spiegel im Körper von Wildtyp-Embryonen aus Unc13d^{-/-}-Ammen an E15.5 ließe sich mit der fehlenden Hemmung durch maternal-thrombozytäres Serotonin erklären.

Diese Teilarbeit bietet Hinweise auf die Rolle maternalen Serotonins für den Embryo, die wechselseitige Bedeutung peripheren embryonalen Serotonins für das embryonale ZNS und zentralnervösen embryonalen Serotonins für die Peripherie, die medierende Funktion Oct3s in der Embryonalzeit und lässt die aus der Literatur hervorgehende Bedeutung trophoblastärer Tph1-Expression für den Embryo eher unwahrscheinlich erscheinen.

Dabei fehlen allerdings wichtige Datenpunkte, etwa Messungen von Embryonen aus Tph2^{-/-}-Schwangerschaften an E15.5, aus Sert^{-/-}-Oct3^{-/-}-Schwangerschaften stammende Embryonen an allen erfassten Gestationstagen, sowie aus Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Schwangerschaften und Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}- Sert^{-/-}-Schwangerschaften stammende Embryonen an allen erfassten Gestationstagen.

Um die Transfer-Experimente zu vervollständigen, fehlt ein Embryotransfer von Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Embryonen in Serotonin-inkompetente Ammen, etwa Genotypen in denen die Funktion des Sert- oder Unc13d-Gens unterbrochen ist oder Ammen die ebenfalls den Genotyp Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-} besitzen an E15.5. Dies würde als Kontrollgruppe für die

Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Embryonen die in von Tph1^{-/-}-Tph2^{-/-}-Ammen transferiert wurden, dienen.

Um einen möglichen Einfluss maternalen 5-HTs auf embryonale Spiegel in der frühen zweiten Gestationshälfte abschließend beurteilen zu können, müssten weiterhin Embryotransfers mit den bereits verwendeten Genotyp-Kombinationen an einem Entwicklungstag vorgenommen werden, an dem keine embryonale Expression von TPHs vorliegt, etwa E11.5.

Auch die für den adulten Organismus in dieser Arbeit erfasste Rolle PAH-abhängig produzierten Serotonins ist für den embryonalen Organismus noch nicht erfasst.

Weiterhin ist diese Arbeit deutlich darin limitiert, dass dieselben Genprodukte in verschiedenen Organen exprimiert werden. Im Fall von Sert mit vielleicht sogar mit gegensätzlichen Aufgaben.

Dies ließe sich abschließend durch den Einsatz von Organ-spezifischen Knockout-Modellen lösen, etwa plazentale und hepatische Sert-Knockouts, plazentale Oct3-Knockouts und trophoblastäre Tph1-Knockouts.

Diese Modelle würden auch die mögliche Rolle veränderter embryonaler Serotonin-Spiegel auf Gewichtsentwicklung und Katecholamin-Spiegel besser erfassen.

Die veränderte Gewichtsentwicklung, insbesondere in Embryonen aus Oct3^{-/-}-Schwangerschaften, ist bisher ohne morphologisches Korrelat. Möglich wären sowohl trophische Effekte, als auch etwa ein Polyhydramnion, etwa im Zuge eines drohenden Abortes. Histologien und die Erfassung postnataler Gewichte wären ein geeignetes Mittel zu Differenzierung.

Zuletzt ist die Beeinflussung der Katecholamin-Spiegel nur auf organismischem Niveau erfasst. Es ist unbekannt, ob dem Veränderungen in katecholaminergen Zellpopulationen, in der Synthese oder dem Abbau zugrunde liegen. Dies müsste durch geeignete Histologien auf zellulärem Niveau untermauert werden.

10 Literaturverzeichnis

- Agrawal, L., Vimal, S. K., & Shiga, T. (2019). Role of serotonin 4 receptor in the growth of hippocampal neurons during the embryonic development in mice. *Neuropharmacology*, *158*, 107712. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107712>
- Agus, A., Planchais, J., & Sokol, H. (2018). Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, *23*(6), 716-724. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- Aitken, A. R., & Tork, I. (1988). Early development of serotonin-containing neurons and pathways as seen in wholemount preparations of the fetal rat brain. *J Comp Neurol*, *274*(1), 32-47. <https://doi.org/10.1002/cne.902740105>
- Akbari, H. M., Whitaker-Azmitia, P. M., & Azmitia, E. C. (1994). Prenatal cocaine decreases the trophic factor S-100 beta and induced microcephaly: reversal by postnatal 5-HT1A receptor agonist. *Neurosci Lett*, *170*(1), 141-144. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90259-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90259-3)
- Alcaino, C., Knutson, K. R., Treichel, A. J., Yildiz, G., Strege, P. R., Linden, D. R., Li, J. H., Leiter, A. B., Szurszewski, J. H., Farrugia, G., & Beyder, A. (2018). A population of gut epithelial enterochromaffin cells is mechanosensitive and requires Piezo2 to convert force into serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(32), E7632-e7641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804938115>
- Alcañiz, S., & Silva, F. J. (1997). Phenylalanine Hydroxylase Participation in the Synthesis of Serotonin and Pteridines in *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, *116*(3), 205-212. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(96\)00148-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0742-8413(96)00148-X)
- Alenina, N., Kikic, D., Todiras, M., Mosienko, V., Qadri, F., Plehm, R., Boye, P., Vilianovitch, L., Sohr, R., Tenner, K., Hortnagl, H., & Bader, M. (2009). Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(25), 10332-10337. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810793106>
- Amin, A. H., Crawford, T. B. B., & Gaddum, J. H. (1954). The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol*, *126*(3), 596-618. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005229>
- Amireault, P., & Dubé, F. (2005). Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. *Mol Pharmacol*, *68*(6), 1678-1687. <https://doi.org/10.1124/mol.104.010124>
- Amireault, P., & Dubé, F. o. (2005). Serotonin and Its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos1. *Biol Reprod*, *73*(2), 358-365. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039313>
- Amireault, P., Sibon, D., & Cote, F. (2013). Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci*, *4*(1), 64-71. <https://doi.org/10.1021/cn300154j>

- Andolina, D., Conversi, D., Cabib, S., Trabalza, A., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., & Pascucci, T. (2011). 5-Hydroxytryptophan during critical postnatal period improves cognitive performances and promotes dendritic spine maturation in genetic mouse model of phenylketonuria. *Int J Neuropsychopharmacol*, *14*(4), 479-489. <https://doi.org/10.1017/s1461145710001288>
- Andre, P., Saubamea, B., Cochois-Guegan, V., Marie-Claire, C., Cattelotte, J., Smirnova, M., Schinkel, A. H., Scherrmann, J. M., & Cisternino, S. (2012). Transport of biogenic amine neurotransmitters at the mouse blood-retina and blood-brain barriers by uptake1 and uptake2. *J Cereb Blood Flow Metab*, *32*(11), 1989-2001. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.109>
- Aubi, O., Prestegård, K. S., Jung-Kc, K., Shi, T. S., Ying, M., Grindheim, A. K., Scherer, T., Ulvik, A., McCann, A., Spriet, E., Thöny, B., & Martinez, A. (2021). The Pah-R261Q mouse reveals oxidative stress associated with amyloid-like hepatic aggregation of mutant phenylalanine hydroxylase. *Nat Commun*, *12*(1), 2073. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22107-1>
- Axelrod, J., & Inscoe, J. K. (1963). THE UPTAKE AND BINDING OF CIRCULATING SEROTONIN AND THE EFFECT OF DRUGS. *J Pharmacol Exp Ther*, *141*, 161-165. <http://jpet.aspetjournals.org/content/jpet/141/2/161.full.pdf>
- Azmitia, E. C. (2020). Chapter 1 - Evolution of serotonin: sunlight to suicide. In C. P. Müller & K. A. Cunningham (Eds.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 31, pp. 3-22). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00001-3>
- Bader, M. (2019). Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics. *Front Mol Neurosci*, *12*, 288. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00288>
- Baković, P., Kesić, M., Perić, M., Bečeheli, I., Horvatiček, M., George, M., Čičin-Šain, L., Desoye, G., Wadsack, C., Panzenboeck, U., & Štefulj, J. (2021). Differential Serotonin Uptake Mechanisms at the Human Maternal-Fetal Interface. *Int J Mol Sci*, *22*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22157807>
- Barnea, E. R., MacLusky, N. J., DeCherney, A. H., & Naftolin, F. (1986). Monoamine oxidase activity in the term human placenta. *Am J Perinatol*, *3*(3), 219-224. <https://doi.org/10.1055/s-2007-999871>
- Barnes, N. M., Ahern, G. P., Becamel, C., Bockaert, J., Camilleri, M., Chaumont-Dubel, S., Claeysen, S., Cunningham, K. A., Fone, K. C., Gershon, M., Di Giovanni, G., Goodfellow, N. M., Halberstadt, A. L., Hartley, R. M., Hassaine, G., Herrick-Davis, K., Hovius, R., Lacivita, E., Lambe, E. K., . . . Hoyer, D. (2021). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol Rev*, *73*(1), 310-520. <https://doi.org/10.1124/pr.118.015552>
- Bellono, N. W., Bayrer, J. R., Leitch, D. B., Castro, J., Zhang, C., O'Donnell, T. A., Brierley, S. M., Ingraham, H. A., & Julius, D. (2017). Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways. *Cell*, *170*(1), 185-198.e116. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.034>

- Bengel, D., Murphy, D. L., Andrews, A. M., Wichems, C. H., Feltner, D., Heils, A., Mössner, R., Westphal, H., & Lesch, K. P. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol*, 53(4), 649-655.
<https://doi.org/10.1124/mol.53.4.649>
- Bhatt, S., Diaz, R., & Trainor, P. A. (2013). Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(2).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008326>
- Bhowal, B., Bhattacharjee, A., Goswami, K., Sanan-Mishra, N., Singla-Pareek, S. L., Kaur, C., & Sopory, S. (2021). Serotonin and Melatonin Biosynthesis in Plants: Genome-Wide Identification of the Genes and Their Expression Reveal a Conserved Role in Stress and Development. *Int J Mol Sci*, 22(20).
<https://doi.org/10.3390/ijms222011034>
- Boado, R. J., Li, J. Y., Nagaya, M., Zhang, C., & Pardridge, W. M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(21), 12079-12084.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.21.12079>
- Bogatyeva, N. S., Finkelstein, A. V., & Galzitskaya, O. V. (2006). Trend of amino acid composition of proteins of different taxa. *J Bioinform Comput Biol*, 4(2), 597-608. <https://doi.org/10.1142/s0219720006002016>
- Bohórquez, D. V., & Liddle, R. A. (2011). Axon-like basal processes in enteroendocrine cells: characteristics and potential targets. *Clin Transl Sci*, 4(5), 387-391.
<https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00299.x>
- Bonnin, A., Goeden, N., Chen, K., Wilson, M. L., King, J., Shih, J. C., Blakely, R. D., Deneris, E. S., & Levitt, P. (2011). A transient placental source of serotonin for the fetal forebrain. *Nature*, 472(7343), 347-350.
<https://doi.org/10.1038/nature09972>
- Bonnin, A., Peng, W., Hewlett, W., & Levitt, P. (2006). Expression mapping of 5-HT1 serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience*, 141(2), 781-794.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.036>
- Bonnin, A., Torii, M., Wang, L., Rakic, P., & Levitt, P. (2007). Serotonin modulates the response of embryonic thalamocortical axons to netrin-1. *Nat Neurosci*, 10(5), 588-597. <https://doi.org/10.1038/nn1896>
- Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2008). Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(13-14), 1527-1533.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002>
- Branchek, T. A., & Gershon, M. D. (1989). Time course of expression of neuropeptide Y, calcitonin gene-related peptide, and NADPH diaphorase activity in neurons of the developing murine bowel and the appearance of 5-hydroxytryptamine in mucosal enterochromaffin cells. *J Comp Neurol*, 285(2), 262-273.
<https://doi.org/10.1002/cne.902850208>

- Brand, T., & Anderson, G. M. (2011). The measurement of platelet-poor plasma serotonin: a systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem*, 57(10), 1376-1386.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.163824>
- Cabrera, R. M., Linda Lin, Y., Law, E., Kim, J., & Wlodarczyk, B. J. (2020). The teratogenic effects of sertraline in mice. *Birth Defects Res*, 112(13), 1014-1024. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1660>
- Candiani, S., Moronti, L., Ramoino, P., Schubert, M., & Pestarino, M. (2012). A neurochemical map of the developing amphioxus nervous system. *BMC Neurosci*, 13, 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-59>
- Carpenter, L. L., Anderson, G. M., Pelton, G. H., Gudín, J. A., Kirwin, P. D., Price, L. H., Heningler, G. R., & McDougle, C. J. (1998). Tryptophan depletion during continuous CSF sampling in healthy human subjects. *Neuropsychopharmacology*, 19(1), 26-35. [https://doi.org/10.1016/s0893-133x\(97\)00198-x](https://doi.org/10.1016/s0893-133x(97)00198-x)
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J. C., & et al. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268(5218), 1763-1766. <https://doi.org/10.1126/science.7792602>
- Cases, O., Vitalis, T., Seif, I., De Maeyer, E., Sotelo, C., & Gaspar, P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron*, 16(2), 297-307.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80048-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80048-3)
- Castro, E. C., Sen, P., Parks, W. T., Langston, C., & Galambos, C. (2017). The Role of Serotonin Transporter in Human Lung Development and in Neonatal Lung Disorders. *Can Respir J*, 2017, 9064046.
<https://doi.org/10.1155/2017/9064046>
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z., & Ruas, J. L. (2017). Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*, 357(6349).
<https://doi.org/10.1126/science.aaf9794>
- Chen, J. J., Li, Z., Pan, H., Murphy, D. L., Tamir, H., Koepsell, H., & Gershon, M. D. (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(16), 6348-6361.
<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/21/16/6348.full.pdf>
- Chen, K., Cases, O., Rebrin, I., Wu, W., Gallaher, T. K., Seif, I., & Shih, J. C. (2007). Forebrain-specific expression of monoamine oxidase A reduces neurotransmitter levels, restores the brain structure, and rescues aggressive behavior in monoamine oxidase A-deficient mice. *J Biol Chem*, 282(1), 115-123. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609830200>
- Chen, X., Petit, E. I., Dobrenis, K., & Sze, J. Y. (2016). Spatiotemporal SERT expression in cortical map development. *Neurochem Int*, 98, 129-137.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.010>

- Chen, X., Ye, R., Gargus, J. J., Blakely, R. D., Dobrenis, K., & Sze, J. Y. (2015). Disruption of Transient Serotonin Accumulation by Non-Serotonin-Producing Neurons Impairs Cortical Map Development. *Cell Rep*, *10*(3), 346-358. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.12.033>
- Chen, Y., Yuan, Y., & Li, W. (2018). Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from alpha-granules. *Biosci Rep*, *38*(5). <https://doi.org/10.1042/bsr20180458>
- Cheng, A., Scott, A. L., Ladenheim, B., Chen, K., Ouyang, X., Lathia, J. D., Mughal, M., Cadet, J. L., Mattson, M. P., & Shih, J. C. (2010). Monoamine oxidases regulate telencephalic neural progenitors in late embryonic and early postnatal development. *J Neurosci*, *30*(32), 10752-10762. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2037-10.2010>
- Cheng, L., Chen, C.-L., Luo, P., Tan, M., Qiu, M., Johnson, R., & Ma, Q. (2003). Lmx1b, Pet-1, and Nkx2.2 Coordinately Specify Serotonergic Neurotransmitter Phenotype. *The Journal of Neuroscience*, *23*(31), 9961-9967. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-31-09961.2003>
- Chittajallu, R., Craig, M. T., McFarland, A., Yuan, X., Gerfen, S., Tricoire, L., Erkkila, B., Barron, S. C., Lopez, C. M., Liang, B. J., Jeffries, B. W., Pelkey, K. A., & McBain, C. J. (2013). Dual origins of functionally distinct O-LM interneurons revealed by differential 5-HT(3A)R expression. *Nat Neurosci*, *16*(11), 1598-1607. <https://doi.org/10.1038/nn.3538>
- Choi, D. S., Ward, S. J., Messaddeq, N., Launay, J. M., & Maroteaux, L. (1997). 5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells. *Development*, *124*(9), 1745-1755. <https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1745>
- Choi, W., Namkung, J., Hwang, I., Kim, H., Lim, A., Park, H. J., Lee, H. W., Han, K. H., Park, S., Jeong, J. S., Bang, G., Kim, Y. H., Yadav, V. K., Karsenty, G., Ju, Y. S., Choi, C., Suh, J. M., Park, J. Y., Park, S., & Kim, H. (2018). Serotonin signals through a gut-liver axis to regulate hepatic steatosis. *Nat Commun*, *9*(1), 4824. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07287-7>
- Cloutier, N., Allaëys, I., Marcoux, G., Machlus, K. R., Mailhot, B., Zufferey, A., Levesque, T., Becker, Y., Tessandier, N., Melki, I., Zhi, H., Poirier, G., Rondina, M. T., Italiano, J. E., Flamand, L., McKenzie, S. E., Cote, F., Nieswandt, B., Khan, W. I., . . . Boilard, E. (2018). Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(7), E1550-e1559. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720553115>
- Coleman, C. M., & Neckameyer, W. S. (2005). Serotonin synthesis by two distinct enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol*, *59*(1), 12-31. <https://doi.org/10.1002/arch.20050>
- Commons, K. G. (2020). Dorsal raphe organization. *J Chem Neuroanat*, *110*, 101868. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101868>
- Cornide-Petronio, M. E., Anadón, R., Rodicio, M. C., & Barreiro-Iglesias, A. (2013). The sea lamprey tryptophan hydroxylase: new insight into the evolution of the

- serotonergic system of vertebrates. *Brain Struct Funct*, 218(2), 587-593.
<https://doi.org/10.1007/s00429-012-0412-7>
- Cote, F., Fligny, C., Bayard, E., Launay, J. M., Gershon, M. D., Mallet, J., & Vodjdani, G. (2007). Maternal serotonin is crucial for murine embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(1), 329-334.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0606722104>
- Cote, F., Thevenot, E., Fligny, C., Fromes, Y., Darmon, M., Ripoche, M. A., Bayard, E., Hanoun, N., Saurini, F., Lechat, P., Dandolo, L., Hamon, M., Mallet, J., & Vodjdani, G. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13525-13530. <https://doi.org/10.1073/pnas.2233056100>
- Crane, J. D., Palanivel, R., Mottillo, E. P., Bujak, A. L., Wang, H., Ford, R. J., Collins, A., Blumer, R. M., Fullerton, M. D., Yabut, J. M., Kim, J. J., Ghia, J. E., Hamza, S. M., Morrison, K. M., Schertzer, J. D., Dyck, J. R., Khan, W. I., & Steinberg, G. R. (2015). Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med*, 21(2), 166-172. <https://doi.org/10.1038/nm.3766>
- Cray, J. J., Jr., Weinberg, S. M., Parsons, T. E., Howie, R. N., Elsalanty, M., & Yu, J. C. (2014). Selective serotonin reuptake inhibitor exposure alters osteoblast gene expression and craniofacial development in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 100(12), 912-923. <https://doi.org/10.1002/bdra.23323>
- Crome, L., & Pare, C. M. B. (1960). Phenylketonuria: A review and a report of the pathological findings in four cases. *Journal of Mental Science*, 106(444), 862-883. <https://doi.org/10.1192/bjp.106.444.862>
- Crumeyrolle-Arias, M., Tournaire, M. C., Rabot, S., Malpoux, B., & Thiéry, J. C. (2008). 5-hydroxyoxindole, an indole metabolite, is present at high concentrations in brain. *J Neurosci Res*, 86(1), 202-207. <https://doi.org/10.1002/jnr.21475>
- Csaba, G. (2015). Biogenic amines at a low level of evolution: Production, functions and regulation in the unicellular Tetrahymena. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62(2), 93-108. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.1>
- Cui, Y., Niziolek, P. J., MacDonald, B. T., Alenina, N., Matthes, S., Jacobsen, C. M., Conlon, R. A., Brommage, R., Powell, D. R., He, X., Bader, M., Williams, B. O., Warman, M. L., & Robling, A. G. (2014). Reply to Lrp5 regulation of bone mass and gut serotonin synthesis. *Nat Med*, 20(11), 1229-1230.
<https://doi.org/10.1038/nm.3697>
- D'Amato, R. J., Blue, M. E., Largent, B. L., Lynch, D. R., Ledbetter, D. J., Molliver, M. E., & Snyder, S. H. (1987). Ontogeny of the serotonergic projection to rat neocortex: transient expression of a dense innervation to primary sensory areas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(12), 4322-4326.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.12.4322>
- Dahlstroem, A., & Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I.

- DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiol Scand Suppl*, Suppl 232:231-255.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, *468*(7323), 562-566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Davies, J. A., & Nicholson, A. N. (1978). Studies in the monkey (*Macaca mulatta*) on the effect of (+/-)-6-fluorotryptophan and (+/-)-p-chlorophenylalanine on plasma tryptophan [proceedings]. *Br J Pharmacol*, *62*(3), 451p-452p.
- De Deurwaerdère, P., Bharatiya, R., Chagraoui, A., & Di Giovanni, G. (2020). Constitutive activity of 5-HT receptors: Factual analysis. *Neuropharmacology*, *168*, 107967. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107967>
- Deeb, S. S. (1972). Inhibition of cleavage and hatching of sea urchin embryos by serotonin. *Journal of Experimental Zoology*, *181*(1), 79-86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.1401810109>
- Delacre, M., Lakens, D., & Leys, C. (2017). Why Psychologists Should by Default Use Welch's t-test Instead of Student's t-test. *International Review of Social Psychology*. <https://doi.org/10.5334/irsp.82>
- Deneris, E., & Gaspar, P. (2018). Serotonin neuron development: shaping molecular and structural identities. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, *7*(1). <https://doi.org/10.1002/wdev.301>
- Dmitriev, A. D., Factor, M. I., Segal, O. L., Pavlova, E. V., Massino, Y. S., Smirnova, M. B., Yakovleva, D. A., Dmitriev, D. A., Kizim, E. A., Kolyaskina, G. I., & Brusov, O. S. (2005). Western blot analysis of human and rat serotonin transporter in platelets and brain using site-specific antibodies: evidence that transporter undergoes endoproteolytic cleavage. *Clin Chim Acta*, *356*(1-2), 76-94. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.12.019>
- Dubé, F., & Amireault, P. (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sci*, *81*(25-26), 1627-1637. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.034>
- Durham, E., Howie, R. N., Larson, N., LaRue, A., & Cray, J. (2019). Pharmacological exposures may precipitate craniosynostosis through targeted stem cell depletion. *Stem Cell Res*, *40*, 101528. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101528>
- Eggers, L. F., & Schwudke, D. (2016). Liquid Extraction: Folch. In M. R. Wenk (Ed.), *Encyclopedia of Lipidomics* (pp. 1-6). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_89-1
- Emanuel, D. A., Scott, J., Collins, R., & Haddy, F. J. (1959). Local effect of serotonin on renal vascular resistance and urine flow rate. *Am J Physiol*, *196*(5), 1122-1126. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1959.196.5.1122>
- Engelstoft, M. S., Egerod, K. L., Lund, M. L., & Schwartz, T. W. (2013). Enteroendocrine cell types revisited. *Curr Opin Pharmacol*, *13*(6), 912-921. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.018>

- Erland, L. A. E., Turi, C. E., & Saxena, P. K. (2016). Serotonin: An ancient molecule and an important regulator of plant processes. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1347-1361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.10.002>
- Erspamer, V. (1937). Experimental research on the biological significance of enterochromaffin cells. *Arch Fisiol*, 37, 156-169.
- Erspamer, V., & Asero, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169(4306), 800-801. <http://www.nature.com/nature/journal/v169/n4306/pdf/169800a0.pdf>
- Erspamer, V., & Boretti, G. (1950). Identification of enteramine and enteramine-related substances in extracts of posterior salivary glands of *Octopus vulgaris* by paper chromatography. *Experientia*, 6(9), 348-349. <https://doi.org/10.1007/bf02152871>
- Esler, M., Jennings, G., Korner, P., Blombery, P., Burke, F., Willett, I., & Leonard, P. (1984). Total, and organ-specific, noradrenaline plasma kinetics in essential hypertension. *Clin Exp Hypertens A*, 6(1-2), 507-521. <https://doi.org/10.3109/10641968409062580>
- Falck, B. (1962). Observations on the Possibilities of the Cellular Localization of Monoamines by a Fluorescence Method. *Acta Physiol Scand, Suppl.* 197, 1-25.
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., & Gershon, M. D. (2000). Serotonin and the 5-HT_{2B} receptor in the development of enteric neurons. *J Neurosci*, 20(1), 294-305. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/20/1/294.full.pdf>
- Fiorica-Howells, E., Maroteaux, L., & Gershon, M. D. (2000). Serotonin and the 5-HT_{2B} Receptor in the Development of Enteric Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 20(1), 294-305. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-01-00294.2000>
- Fitzpatrick, P. F. (1999). Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem*, 68, 355-381. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.355>
- Fon, E. A., Pothos, E. N., Sun, B. C., Killeen, N., Sulzer, D., & Edwards, R. H. (1997). Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, 19(6), 1271-1283. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80418-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80418-3)
- Forssman, H., Kristensson, K., Sourander, P., & Svennerholm, L. (1967). Histological and chemical studies of a case of phenylketonuria with long survival. *J Ment Defic Res*, 11(3), 194-206. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.1967.tb00220.x>
- Fujiwara, T., Maisonneuve, S., Isshiki, M., Mizutani, M., Chen, L., Wong, H. L., Kawasaki, T., & Shimamoto, K. (2010). Sekiguchi lesion gene encodes a cytochrome P450 monooxygenase that catalyzes conversion of tryptamine to serotonin in rice. *J Biol Chem*, 285(15), 11308-11313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.091371>

- Fukumoto, T., Kema, I. P., & Levin, M. (2005). Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos. *Curr Biol*, *15*(9), 794-803. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.03.044>
- Gaddum, J. H., & Hameed, K. A. (1954). Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chemother*, *9*(2), 240-248. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1954.tb00848.x>
- Galfalvy, H., Huang, Y. Y., Oquendo, M. A., Currier, D., & Mann, J. J. (2009). Increased risk of suicide attempt in mood disorders and TPH1 genotype. *J Affect Disord*, *115*(3), 331-338. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2008.09.019>
- Gao, S., Cui, Y. L., Yu, C. Q., Wang, Q. S., & Zhang, Y. (2013). Tetrandrine exerts antidepressant-like effects in animal models: role of brain-derived neurotrophic factor. *Behav Brain Res*, *238*, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.10.015>
- Garcia, L. P., Witteveen, J. S., Middelman, A., van Hulten, J. A., Martens, G. J. M., Homberg, J. R., & Kolk, S. M. (2019). Perturbed Developmental Serotonin Signaling Affects Prefrontal Catecholaminergic Innervation and Cortical Integrity. *Molecular Neurobiology*, *56*(2), 1405-1420. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1105-x>
- Garel, S., & López-Bendito, G. (2014). Inputs from the thalamocortical system on axon pathfinding mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, *27*, 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.03.013>
- Gehin, M., Welford, R. W. D., Garzotti, M., Vercauteren, M., Groenen, P. M. A., Nayler, O., Sidharta, P. N., & Dingemans, J. (2018). Assessment of Peripheral Serotonin Synthesis Using Stable Isotope-Labeled Tryptophan. *Clin Pharmacol Ther*, *104*(6), 1260-1267. <https://doi.org/10.1002/cpt.1087>
- Gershon, M. D. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, *20*(1), 14-21. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32835bc703>
- Gershon, M. D., & Tack, J. (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, *132*(1), 397-414. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.11.002>
- Gonçalves, S., Nunes-Costa, D., Cardoso, S. M., Empadinhas, N., & Marugg, J. D. (2022). Enzyme Promiscuity in Serotonin Biosynthesis, From Bacteria to Plants and Humans [Review]. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.873555>
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., & Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(4), 1607-1611. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1607>
- Greengard, O., Yoss, M. S., & Del Valle, J. A. (1976). Alpha-methylphenylalanine, a new inducer of chronic hyperphenylalaninemia in suckling rats. *Science*, *192*(4243), 1007-1008. <https://doi.org/10.1126/science.944951>

- Grenett, H. E., Ledley, F. D., Reed, L. L., & Woo, S. L. (1987). Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(16), 5530-5534. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5530>
- Gribble, F. M., & Reimann, F. (2016). Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*, *78*, 277-299. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105439>
- Gunawardene, A. R., Corfe, B. M., & Staton, C. A. (2011). Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *Int J Exp Pathol*, *92*(4), 219-231. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2011.00767.x>
- Gustafson, T., & Toneby, M. (1970). On the role of serotonin and acetylcholine in sea urchin morphogenesis. *Exp Cell Res*, *62*(1), 102-117. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90512-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90512-3)
- Gutknecht, L., Araragi, N., Merker, S., Waider, J., Sommerlandt, F. M., Mlinar, B., Baccini, G., Mayer, U., Proft, F., Hamon, M., Schmitt, A. G., Corradetti, R., Lanfumey, L., & Lesch, K. P. (2012). Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification. *PLoS One*, *7*(8), e43157. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043157>
- Gutknecht, L., Waider, J., Kraft, S., Kriegebaum, C., Holtmann, B., Reif, A., Schmitt, A., & Lesch, K. P. (2008). Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice. *J Neural Transm (Vienna)*, *115*(8), 1127-1132. <https://doi.org/10.1007/s00702-008-0096-6>
- Haberzettl, R., Bert, B., Fink, H., & Fox, M. A. (2013). Animal models of the serotonin syndrome: a systematic review. *Behav Brain Res*, *256*, 328-345. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.045>
- Hadden, C., Fahmi, T., Cooper, A., Savenka, A. V., Lupashin, V. V., Roberts, D. J., Maroteaux, L., Hauguel-de Mouzon, S., & Kilic, F. (2017). Serotonin transporter protects the placental cells against apoptosis in caspase 3-independent pathway. *J Cell Physiol*, *232*(12), 3520-3529. <https://doi.org/10.1002/jcp.25812>
- Halmoy, A., Johansson, S., Winge, I., McKinney, J. A., Knappskog, P. M., & Haavik, J. (2010). Attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms in offspring of mothers with impaired serotonin production. *Arch Gen Psychiatry*, *67*(10), 1033-1043. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.124>
- Hanswijk, S. I., van Rooij, D., Oosterlaan, J., Luman, M., Hoekstra, P. J., Hartman, C. A., Franke, B., Sprooten, E., Homberg, J. R., & Buitelaar, J. K. (2021). Maternal serotonin transporter genotype and offsprings' clinical and cognitive measures of ADHD and ASD. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *110*, 110354. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110354>
- Hardebo, J. E., & Owman, C. (1980). Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursors at the blood-brain interface. *Ann Neurol*, *8*(1), 1-31. <https://doi.org/10.1002/ana.410080102>

- Hardeland, R. (2010). Melatonin metabolism in the central nervous system. *Curr Neuropharmacol*, 8(3), 168-181. <https://doi.org/10.2174/157015910792246244>
- Harriott, N. D., Williams, J. P., Smith, E. B., Bozigian, H. P., & Grigoriadis, D. E. (2018). VMAT2 Inhibitors and the Path to Ingrezza (Valbenazine). *Prog Med Chem*, 57(1), 87-111. <https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2017.12.002>
- Helsel, D. R. (2005). More than obvious: better methods for interpreting nondetect data. *Environ Sci Technol*, 39(20), 419a-423a. <https://doi.org/10.1021/es053368a>
- Hendricks, T. J., Fyodorov, D. V., Wegman, L. J., Lelutiu, N. B., Pehek, E. A., Yamamoto, B., Silver, J., Weeber, E. J., Sweatt, J. D., & Deneris, E. S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron*, 37(2), 233-247. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01167-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01167-4)
- Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience*, 3, 31-31. <https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009>
- Hernandez, M. C., & Janušonis, S. (2010). Quantitative mRNA analysis of serotonin 5-HT₄ and adrenergic β_2 receptors in the mouse embryonic telencephalon. *Dev Neurosci*, 32(4), 278-287. <https://doi.org/10.1159/000314723>
- Hill, M. A. (2007). Early human development. *Clin Obstet Gynecol*, 50(1), 2-9. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31802f119d>
- Holtje, M., Winter, S., Walther, D., Pahner, I., Hortnagl, H., Ottersen, O. P., Bader, M., & Ahnert-Hilger, G. (2003). The vesicular monoamine content regulates VMAT2 activity through Galphaq in mouse platelets. Evidence for autoregulation of vesicular transmitter uptake. *J Biol Chem*, 278(18), 15850-15858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212816200>
- Hołubiec, P., Leończyk, M., Staszewski, F., Łazarczyk, A., Jaworek, A. K., & Rojas-Pelc, A. (2021). Pathophysiology and clinical management of pellagra - a review. *Folia Med Cracov*, 61(3), 125-137. <https://doi.org/10.24425/fmc.2021.138956>
- Homberg, J. R., Molteni, R., Calabrese, F., & Riva, M. A. (2014). The serotonin-BDNF duo: developmental implications for the vulnerability to psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev*, 43, 35-47. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.012>
- Homberg, J. R., Olivier, J. D., Smits, B. M., Mul, J. D., Mudde, J., Verheul, M., Nieuwenhuizen, O. F., Cools, A. R., Ronken, E., Cremers, T., Schoffelmeer, A. N., Ellenbroek, B. A., & Cuppen, E. (2007). Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. *Neuroscience*, 146(4), 1662-1676. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.030>
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C., Hyun, M., Birnbaum, J. E., Cicconet, M., & Sabatini, B. L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *eLife*, 8, e46464. <https://doi.org/10.7554/eLife.46464>

- Iversen, L. L. (1965). THE UPTAKE OF CATECHOL AMINES AT HIGH PERFUSION CONCENTRATIONS IN THE RAT ISOLATED HEART: A NOVEL CATECHOL AMINE UPTAKE PROCESS [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb01753.x>]. *Br J Pharmacol Chemother*, 25(1), 18-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1965.tb01753.x>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*, 72(1), 165-229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>
- Janusonis, S., Gluncic, V., & Rakic, P. (2004). Early serotonergic projections to Cajal-Retzius cells: relevance for cortical development. *J Neurosci*, 24(7), 1652-1659. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4651-03.2004>
- Jenny, M., Uhl, C., Roche, C., Duluc, I., Guillermin, V., Guillemot, F., Jensen, J., Keding, M., & Gradwohl, G. (2002). Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo j*, 21(23), 6338-6347. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf649>
- Jian, B., Xu, J., Connolly, J., Savani, R. C., Narula, N., Liang, B., & Levy, R. J. (2002). Serotonin mechanisms in heart valve disease I: serotonin-induced up-regulation of transforming growth factor-beta1 via G-protein signal transduction in aortic valve interstitial cells. *Am J Pathol*, 161(6), 2111-2121. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1850922/pdf/3418.pdf>
- Jiang, C., Xie, C., Li, F., Zhang, L., Nichols, R. G., Krausz, K. W., Cai, J., Qi, Y., Fang, Z. Z., Takahashi, S., Tanaka, N., Desai, D., Amin, S. G., Albert, I., Patterson, A. D., & Gonzalez, F. J. (2015). Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*, 125(1), 386-402. <https://doi.org/10.1172/jci76738>
- Jiao, J., Xia, Y., Zhang, Y., Wu, X., Liu, C., Feng, J., Zheng, X., Song, S., Bai, T., Song, C., Wang, M., & Pang, H. (2021). Phenylalanine 4-Hydroxylase Contributes to Endophytic Bacterium *Pseudomonas fluorescens*' Melatonin Biosynthesis [Original Research]. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.746392>
- Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., & Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 125, 105776. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105776>
- Kaelberer, M. M., Buchanan, K. L., Klein, M. E., Barth, B. B., Montoya, M. M., Shen, X., & Bohórquez, D. V. (2018). A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction. *Science*, 361(6408). <https://doi.org/10.1126/science.aat5236>
- Kameneva, P., Melnikova, V. I., Kastriti, M. E., Kurtova, A., Kryukov, E., Murtazina, A., Faure, L., Poverennaya, I., Artemov, A. V., Kalinina, T. S., Kudryashov, N. V., Bader, M., Skoda, J., Chlapek, P., Curylova, L., Sourada, L., Neradil, J., Tesarova, M., Pasqualetti, M., . . . Adameyko, I. (2022). Serotonin limits generation of chromaffin cells during adrenal organ development. *Nat Commun*, 13(1), 2901. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30438-w>

- Kandasamy, P., Gyimesi, G., Kanai, Y., & Hediger, M. A. (2018). Amino acid transporters revisited: New views in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(10), 752-789. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.05.003>
- Kang, S., Kang, K., Lee, K., & Back, K. (2007). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep*, 26(11), 2009-2015. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0405-9>
- Karahoda, R., Horackova, H., Kastner, P., Matthios, A., Cervený, L., Kucera, R., Kacerovsky, M., Duintjer Tebbens, J., Bonnin, A., Abad, C., & Staud, F. (2020). Serotonin homeostasis in the materno-foetal interface at term: Role of transporters (SERT/SLC6A4 and OCT3/SLC22A3) and monoamine oxidase A (MAO-A) in uptake and degradation of serotonin by human and rat term placenta. *Acta Physiol (Oxf)*, 229(4), e13478. <https://doi.org/10.1111/apha.13478>
- Kim, D. K., Tolliver, T. J., Huang, S. J., Martin, B. J., Andrews, A. M., Wichems, C., Holmes, A., Lesch, K. P., & Murphy, D. L. (2005). Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter. *Neuropharmacology*, 49(6), 798-810. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.08.010>
- Kim, H., Toyofuku, Y., Lynn, F. C., Chak, E., Uchida, T., Mizukami, H., Fujitani, Y., Kawamori, R., Miyatsuka, T., Kosaka, Y., Yang, K., Honig, G., van der Hart, M., Kishimoto, N., Wang, J., Yagihashi, S., Tecott, L. H., Watada, H., & German, M. S. (2010). Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med*, 16(7), 804-808. <https://doi.org/10.1038/nm.2173>
- Kim, Y. R., Woo, J. M., Heo, S. Y., Kim, J. H., Lim, S. J., & Yu, B. H. (2009). An Association Study of the A218C Polymorphism of the Tryptophan Hydroxylase 1 Gene with Eating Disorders in a Korean Population: A Pilot Study. *Psychiatry Investig*, 6(1), 44-49. <https://doi.org/10.4306/pi.2009.6.1.44>
- Kiyasova, V., & Gaspar, P. (2011). Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur J Neurosci*, 34(10), 1553-1562. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07910.x>
- Kliman, H. J., Quaratella, S. B., Setaro, A. C., Siegman, E. C., Subha, Z. T., Tal, R., Milano, K. M., & Steck, T. L. (2018). Pathway of Maternal Serotonin to the Human Embryo and Fetus. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03025>
- Kobe, F., Guseva, D., Jensen, T. P., Wirth, A., Renner, U., Hess, D., Müller, M., Medrihan, L., Zhang, W., Zhang, M., Braun, K., Westerholz, S., Herzog, A., Radyushkin, K., El-Kordi, A., Ehrenreich, H., Richter, D. W., Rusakov, D. A., & Ponimaskin, E. (2012). 5-HT7R/G12 signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *J Neurosci*, 32(9), 2915-2930. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2765-11.2012>
- Koepsell, H. (2021). General Overview of Organic Cation Transporters in Brain. In L. C. Daws (Ed.), *Organic Cation Transporters in the Central Nervous System* (pp. 1-39). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2021_449

- Korasick, D. A., Enders, T. A., & Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, *64*(9), 2541-2555.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Koren, Z., Pfeifer, Y., & Sulman, F. G. (1965). DELETERIOUS EFFECT OF THE MONOAMINE OXIDASE INHIBITOR PARGYLINE ON PREGNANT RATS. *Fertil Steril*, *16*, 393-400.
- Kriegebaum, C., Song, N. N., Gutknecht, L., Huang, Y., Schmitt, A., Reif, A., Ding, Y. Q., & Lesch, K. P. (2010). Brain-specific conditional and time-specific inducible Tph2 knockout mice possess normal serotonergic gene expression in the absence of serotonin during adult life. *Neurochem Int*, *57*(5), 512-517.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.06.015>
- Krishnaswamy, S., Hao, Q., Von Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., & Court, M. H. (2004). Evaluation of 5-hydroxytryptophol and other endogenous serotonin (5-hydroxytryptamine) analogs as substrates for UDP-glucuronosyltransferase 1A6. *Drug Metab Dispos*, *32*(8), 862-869.
<http://dmd.aspetjournals.org/content/dmd/32/8/862.full.pdf>
- Kroeger, C. M., Ejima, K., Hannon, B. A., Halliday, T. M., McComb, B., Teran-Garcia, M., Dawson, J. A., King, D. B., Brown, A. W., & Allison, D. B. (2021). Persistent confusion in nutrition and obesity research about the validity of classic nonparametric tests in the presence of heteroscedasticity: evidence of the problem and valid alternatives. *Am J Clin Nutr*, *113*(3), 517-524.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa357>
- Kulikova, E. A., & Kulikov, A. V. (2019). Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models. *Expert Opin Ther Targets*, *23*(8), 655-667. <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1634691>
- Kumari, A., & Singh, R. K. (2019). Medicinal chemistry of indole derivatives: Current to future therapeutic perspectives. *Bioorg Chem*, *89*, 103021.
<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103021>
- Lang, P. A., Contaldo, C., Georgiev, P., El-Badry, A. M., Recher, M., Kurrer, M., Cervantes-Barragan, L., Ludewig, B., Calzascia, T., Bolinger, B., Merkler, D., Odermatt, B., Bader, M., Graf, R., Clavien, P. A., Hegazy, A. N., Löhning, M., Harris, N. L., Ohashi, P. S., . . . Lang, K. S. (2008). Aggravation of viral hepatitis by platelet-derived serotonin. *Nat Med*, *14*(7), 756-761.
<https://doi.org/10.1038/nm1780>
- Lauder, J. M., & Krebs, H. (1978). Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. *Dev Neurosci*, *1*(1), 15-30. <https://doi.org/10.1159/000112549>
- Lauder, J. M., Tamir, H., & Sadler, T. W. (1988). Serotonin and morphogenesis. I. Sites of serotonin uptake and -binding protein immunoreactivity in the midgestation mouse embryo. *Development*, *102*(4), 709-720.
<http://dev.biologists.org/content/develop/102/4/709.full.pdf>
- Lauder, J. M., Wallace, J. A., Krebs, H., Petrusz, P., & McCarthy, K. (1982). In vivo and in vitro development of serotonergic neurons. *Brain Res Bull*, *9*(1-6), 605-625.

- Lavrent'eva, A. V., Mel'nikova, V. I., Sapronova, A. Y., Proshlyakova, E. V., Voronova, S. N., & Ugryumov, M. V. (2007). The brain is one of the most important sources of dopamine in the systemic circulation in the perinatal period of ontogenesis in rats. *Neurosci Behav Physiol*, *37*(9), 909-914. <https://doi.org/10.1007/s11055-007-0098-0>
- Lebrand, C., Cases, O., Adelbrecht, C., Doye, A., Alvarez, C., El Mestikawy, S., Seif, I., & Gaspar, P. (1996). Transient uptake and storage of serotonin in developing thalamic neurons. *Neuron*, *17*(5), 823-835.
- Lebrand, C., Cases, O., Wehrlé, R., Blakely, R. D., Edwards, R. H., & Gaspar, P. (1998). Transient developmental expression of monoamine transporters in the rodent forebrain. *J Comp Neurol*, *401*(4), 506-524.
- Lee, J.-H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends Microbiol*, *23*(11), 707-718. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.08.001>
- Lee, L. J. (2009). Neonatal fluoxetine exposure affects the neuronal structure in the somatosensory cortex and somatosensory-related behaviors in adolescent rats. *Neurotox Res*, *15*(3), 212-223. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9022-4>
- Lee, N., Hebert, M. F., Prasad, B., Easterling, T. R., Kelly, E. J., Unadkat, J. D., & Wang, J. (2013). Effect of gestational age on mRNA and protein expression of polyspecific organic cation transporters during pregnancy. *Drug Metab Dispos*, *41*(12), 2225-2232. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.054072>
- Leiros, H. K., Pey, A. L., Innselset, M., Moe, E., Leiros, I., Steen, I. H., & Martinez, A. (2007). Structure of phenylalanine hydroxylase from *Colwellia psychrerythraea* 34H, a monomeric cold active enzyme with local flexibility around the active site and high overall stability. *J Biol Chem*, *282*(30), 21973-21986. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610174200>
- Lesurtel, M., Graf, R., Walther, D. J., Bader, M., & Clavien, P. A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, *312*(5770), 104-107. <https://doi.org/10.1126/science.1123842>
- Li, H. J., Johnston, B., Aiello, D., Caffrey, D. R., Giel-Moloney, M., Rindi, G., & Leiter, A. B. (2014). Distinct cellular origins for serotonin-expressing and enterochromaffin-like cells in the gastric corpus. *Gastroenterology*, *146*(3), 754-764.e753. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.048>
- Li, H. J., Ray, S. K., Singh, N. K., Johnston, B., & Leiter, A. B. (2011). Basic helix-loop-helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation. *Diabetes Obes Metab*, *13 Suppl 1*(0 1), 5-12. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2011.01438.x>
- Li, X., Zhang, B., Hu, Y., & Zhao, Y. (2021). New Insights Into Gut-Bacteria-Derived Indole and Its Derivatives in Intestinal and Liver Diseases [Review]. *Front Pharmacol*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.769501>
- Li, Z., Chalazonitis, A., Huang, Y. Y., Mann, J. J., Margolis, K. G., Yang, Q. M., Kim, D. O., Cote, F., Mallet, J., & Gershon, M. D. (2011). Essential roles of enteric

- neuronal serotonin in gastrointestinal motility and the development/survival of enteric dopaminergic neurons. *J Neurosci*, 31(24), 8998-9009.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.6684-10.2011>
- Lichter-Konecki, U., Hipke, C. M., & Konecki, D. S. (1999). Human phenylalanine hydroxylase gene expression in kidney and other nonhepatic tissues. *Mol Genet Metab*, 67(4), 308-316. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2880>
- Liddle, R. A. (2018). Interactions of Gut Endocrine Cells with Epithelium and Neurons. *Compr Physiol*, 8(3), 1019-1030. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170044>
- Lidov, H. G., & Molliver, M. E. (1982a). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res Bull*, 8(4), 389-430. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(82\)90077-6](https://doi.org/10.1016/0361-9230(82)90077-6)
- Lidov, H. G., & Molliver, M. E. (1982b). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res Bull*, 9(1-6), 559-604.
- Lira, A., Zhou, M., Castanon, N., Ansorge, M. S., Gordon, J. A., Francis, J. H., Bradley-Moore, M., Lira, J., Underwood, M. D., Arango, V., Kung, H. F., Hofer, M. A., Hen, R., & Gingrich, J. A. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry*, 54(10), 960-971.
[https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(03\)00696-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(03)00696-6)
- Liu, N., Sun, S., Wang, P., Sun, Y., Hu, Q., & Wang, X. (2021). The Mechanism of Secretion and Metabolism of Gut-Derived 5-Hydroxytryptamine. *Int J Mol Sci*, 22(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22157931>
- Loer, C. M., Davidson, B., & McKerrow, J. (1999). A phenylalanine hydroxylase gene from the nematode *C. elegans* is expressed in the hypodermis. *J Neurogenet*, 13(3), 157-180. <https://doi.org/10.3109/01677069909083472>
- Loizou, L. A. (1970). Uptake of monoamines into central neurones and the blood-brain barrier in the infant rat. *Br J Pharmacol*, 40(4), 800-813.
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1970.tb10656.x>
- Lotto, B., Upton, L., Price, D. J., & Gaspar, P. (1999). Serotonin receptor activation enhances neurite outgrowth of thalamic neurones in rodents. *Neurosci Lett*, 269(2), 87-90. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00422-x](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00422-x)
- Lovenberg, W., Jequier, E., & Sjoerdsma, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155(3759), 217-219.
<http://science.sciencemag.org/content/sci/155/3759/217.full.pdf>
- Lovenberg, W., Weissbach, H., & Udenfriend, S. (1962). Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem*, 237, 89-93.
- Ludwig, C., Alexander Schmidt. (1868). *Das Verhalten der Gase, welche mit dem Blut durch den reizbaren Säugethiermuskel strömen.* .
- Lv, Y., Li, Y., Li, J., Bian, C., Qin, C., & Shi, Q. (2020). A Comparative Genomics Study on the Molecular Evolution of Serotonin/Melatonin Biosynthesizing Enzymes in

- Vertebrates. *Front Mol Biosci*, 7, 11.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00011>
- Maddaloni, G., Bertero, A., Pratelli, M., Barsotti, N., Boonstra, A., Giorgi, A., Migliarini, S., & Pasqualetti, M. (2017). Development of Serotonergic Fibers in the Post-Natal Mouse Brain. *Front Cell Neurosci*, 11, 202.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00202>
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 63, 73-105.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Maehle, A.-H. (2009). A binding question: the evolution of the receptor concept. *Endeavour*, 33(4), 135-140.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.endeavour.2009.09.001>
- Mammadova-Bach, E., Mauler, M., Braun, A., & Duerschmied, D. (2018). Autocrine and paracrine regulatory functions of platelet serotonin. *Platelets*, 1-8.
<https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1478072>
- Marcinkiewicz, C. A., Mazzone, C. M., D'Agostino, G., Halladay, L. R., Hardaway, J. A., DiBerto, J. F., Navarro, M., Burnham, N., Cristiano, C., Dorrier, C. E., Tipton, G. J., Ramakrishnan, C., Kozicz, T., Deisseroth, K., Thiele, T. E., McElligott, Z. A., Holmes, A., Heisler, L. K., & Kash, T. L. (2016). Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature*, 537(7618), 97-101. <https://doi.org/10.1038/nature19318>
- Martin, A. M., Lumsden, A. L., Young, R. L., Jessup, C. F., Spencer, N. J., & Keating, D. J. (2017). The nutrient-sensing repertoires of mouse enterochromaffin cells differ between duodenum and colon. *Neurogastroenterol Motil*, 29(6).
<https://doi.org/10.1111/nmo.13046>
- Mas, A., Guillamon, J. M., Torija, M. J., Beltran, G., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2014). Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation. *Biomed Res Int*, 2014, 898045. <https://doi.org/10.1155/2014/898045>
- Masson, P. (1914). La glande endocrine de l'intestin chez l'homme. *CR Acad Sci*.
- Masson, P. (1924). Appendicite neurogene et carci- noides. *Ann Anat Path*.
- Masson, P. (1928). Carcinoids (argentaffin-cell tu- mors) and nerve hyperplasia of the appen- dicular mucosa. *Am J Pathol*.
- Matsuda, M., Imaoka, T., Vomachka, A. J., Gudelsky, G. A., Hou, Z., Mistry, M., Bailey, J. P., Nieport, K. M., Walther, D. J., Bader, M., & Horseman, N. D. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev Cell*, 6(2), 193-203. [https://www.cell.com/developmental-cell/pdf/S1534-5807\(04\)00022-X.pdf](https://www.cell.com/developmental-cell/pdf/S1534-5807(04)00022-X.pdf)
- Matthes, S., & Bader, M. (2018). Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends Pharmacol Sci*, 39(6), 560-572.
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.03.004>
- Matthes, S., Mosienko, V., Popova, E., Rivalan, M., Bader, M., & Alenina, N. (2019). Targeted Manipulation of Brain Serotonin: RNAi-Mediated Knockdown of

- Tryptophan Hydroxylase 2 in Rats. *ACS Chem Neurosci*, 10(7), 3207-3217.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00635>
- Mawe, G. M., & Hoffman, J. M. (2013). Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(8), 473-486. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.105>
- Mazak, K., & Noszal, B. (2017). Passive membrane penetration of the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan is controlled by its zwitterion. *Chem Biodivers*.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.201700162>
- Mc, M. R., & Oncley, J. L. (1958). The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J Biol Chem*, 233(6), 1436-1447.
- Mertens, B. J. A. (2017). Transformation, Normalization, and Batch Effect in the Analysis of Mass Spectrometry Data for Omics Studies. In S. Datta & B. J. A. Mertens (Eds.), *Statistical Analysis of Proteomics, Metabolomics, and Lipidomics Data Using Mass Spectrometry* (pp. 1-21). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45809-0_1
- Michonneau, F., Brown, J. W., & Winter, D. J. (2016). rotl: an R package to interact with the Open Tree of Life data. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1476-1481. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/2041-210X.12593>
- Migliarini, S., Pacini, G., Pelosi, B., Lunardi, G., & Pasqualetti, M. (2013). Lack of brain serotonin affects postnatal development and serotonergic neuronal circuitry formation. *Mol Psychiatry*, 18(10), 1106-1118.
<https://doi.org/10.1038/mp.2012.128>
- Mir, R., Jallu, S., & Singh, T. P. (2015). The shikimate pathway: review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Crit Rev Microbiol*, 41(2), 172-189. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.813901>
- Miyaguchi, H., Kato, I., Sano, T., Sobajima, H., Fujimoto, S., & Togari, H. (1999). Dopamine penetrates to the central nervous system in developing rats. *Pediatr Int*, 41(4), 363-368. <https://doi.org/10.1046/j.1442-200x.1999.01084.x>
- Mogha, A., Guariglia, S. R., Debata, P. R., Wen, G. Y., & Banerjee, P. (2012). Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC α is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus. *Transl Psychiatry*, 2(1), e66.
<https://doi.org/10.1038/tp.2011.58>
- Moiseiwitsch, J. R., & Lauder, J. M. (1995). Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), 7182-7186.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7182>
- Montgomery, A. K., Shuffrey, L. C., Guter, S. J., Anderson, G. M., Jacob, S., Mosconi, M. W., Sweeney, J. A., Turner, J. B., Sutcliffe, J. S., Cook, E. H., Jr., & Veenstra-VanderWeele, J. (2018). Maternal Serotonin Levels Are Associated With Cognitive Ability and Core Symptoms in Autism Spectrum Disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 57(11), 867-875.
<https://doi.org/10.1016/j.jaac.2018.06.025>
- Mordhorst, A., Dhandapani, P., Matthes, S., Mosienko, V., Rothe, M., Todiras, M., Self, J., Schunck, W. H., Schütz, A., Bader, M., & Alenina, N. (2021).

- Phenylalanine hydroxylase contributes to serotonin synthesis in mice. *Faseb j*, 35(6), e21648. <https://doi.org/10.1096/fj.202100366R>
- Mosienko, V., Beis, D., Pasqualetti, M., Waider, J., Matthes, S., Qadri, F., Bader, M., & Alenina, N. (2015). Life without brain serotonin: reevaluation of serotonin function with mice deficient in brain serotonin synthesis. *Behav Brain Res*, 277, 78-88. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.005>
- Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., & Alenina, N. (2012). Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry*, 2(5), e122-e122. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.44>
- Murch, S. J., KrishnaRaj, S., & Saxena, P. K. (2000). Tryptophan is a precursor for melatonin and serotonin biosynthesis in in vitro regenerated St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. Anthos) plants. *Plant Cell Rep*, 19(7), 698-704. <https://doi.org/10.1007/s002990000206>
- Muzerelle, A., Soiza-Reilly, M., Hainer, C., Ruet, P. L., Lesch, K. P., Bader, M., Alenina, N., Scotto-Lomassese, S., & Gaspar, P. (2021). Dorsal raphe serotonin neurotransmission is required for the expression of nursing behavior and for pup survival. *Sci Rep*, 11(1), 6004. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84368-6>
- Nakatani, Y., Sato-Suzuki, I., Tsujino, N., Nakasato, A., Seki, Y., Fumoto, M., & Arita, H. (2008). Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci*, 27(9), 2466-2472. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06201.x>
- Namkung, J., Shong, K. E., Kim, H., Oh, C. M., Park, S., & Kim, H. (2018). Inhibition of Serotonin Synthesis Induces Negative Hepatic Lipid Balance. *Diabetes Metab J*.
- Narboux-Neme, N., Angenard, G., Mosienko, V., Klempin, F., Pitychoutis, P. M., Deneris, E., Bader, M., Giros, B., Alenina, N., & Gaspar, P. (2013). Postnatal growth defects in mice with constitutive depletion of central serotonin. *ACS Chem Neurosci*, 4(1), 171-181. <https://doi.org/10.1021/cn300165x>
- Narboux-Nême, N., Pavone, L. M., Avallone, L., Zhuang, X., & Gaspar, P. (2008). Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). *Neuropharmacology*, 55(6), 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.08.020>
- Narboux-Nême, N., Sagné, C., Doly, S., Diaz, S. L., Martin, C. B., Angenard, G., Martres, M. P., Giros, B., Hamon, M., Lanfumey, L., Gaspar, P., & Mongeau, R. (2011). Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology*, 36(12), 2538-2550. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.142>
- Nebigil, C. G., Choi, D. S., Dierich, A., Hickel, P., Le Meur, M., Messaddeq, N., Launay, J. M., & Maroteaux, L. (2000). Serotonin 2B receptor is required for heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9508-9513. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16895/pdf/pq009508.pdf>

- Nebigil, C. G., Etienne, N., Schaerlinger, B., Hickel, P., Launay, J. M., & Maroteaux, L. (2001). Developmentally regulated serotonin 5-HT_{2B} receptors. *Int J Dev Neurosci*, 19(4), 365-372. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(01\)00022-3](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(01)00022-3)
- Nichols, D. E. (2018). Dark Classics in Chemical Neuroscience: Lysergic Acid Diethylamide (LSD). *ACS Chem Neurosci*, 9(10), 2331-2343. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00043>
- Niederkofler, V., Asher, T. E., Okaty, B. W., Rood, B. D., Narayan, A., Hwa, L. S., Beck, S. G., Miczek, K. A., & Dymecki, S. M. (2016). Identification of Serotonergic Neuronal Modules that Affect Aggressive Behavior. *Cell Rep*, 17(8), 1934-1949. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.063>
- Nikishin, D. A., Semenova, M. N., & Shmukler, Y. B. (2012). Expression of transmitter receptor genes in early development of sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Russian Journal of Developmental Biology*, 43(3), 181-184. <https://doi.org/10.1134/S1062360412030058>
- O'Connor, J. M. (1912). Über den Adrenalingehalt des Blutes. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 67(3), 195-232. <https://doi.org/10.1007/BF01910879>
- Oh, C. M., Namkung, J., Go, Y., Shong, K. E., Kim, K., Kim, H., Park, B. Y., Lee, H. W., Jeon, Y. H., Song, J., Shong, M., Yadav, V. K., Karsenty, G., Kajimura, S., Lee, I. K., Park, S., & Kim, H. (2015). Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues. *Nat Commun*, 6, 6794. <https://doi.org/10.1038/ncomms7794>
- Okaty, B. W., Commons, K. G., & Dymecki, S. M. (2019). Embracing diversity in the 5-HT neuronal system. *Nat Rev Neurosci*, 20(7), 397-424. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0151-3>
- Okaty, B. W., Sturrock, N., Escobedo Lozoya, Y., Chang, Y., Senft, R. A., Lyon, K. A., Alekseyenko, O. V., & Dymecki, S. M. (2020). A single-cell transcriptomic and anatomic atlas of mouse dorsal raphe Pet1 neurons. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.55523>
- Oleskin, A. V., El'-registan, G. I., & Shenderov, B. A. (2016). Role of Neuromediators in the Functioning of the Human Microbiota: "Business Talks" among Microorganisms and the Microbiota-Host Dialogue. *Microbiology*, 85(1), 3-25.
- Olusakin, J., Moutkine, I., Dumas, S., Ponimaskin, E., Paizanis, E., Soiza-Reilly, M., & Gaspar, P. (2020). Implication of 5-HT₇ receptor in prefrontal circuit assembly and detrimental emotional effects of SSRIs during development. *Neuropsychopharmacology*, 45(13), 2267-2277. <https://doi.org/10.1038/s41386-020-0775-z>
- Osterheld-Haas, M. C., Van der Loos, H., & Hornung, J. P. (1994). Monoaminergic afferents to cortex modulate structural plasticity in the barrelfield of the mouse. *Brain Res Dev Brain Res*, 77(2), 189-202. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90196-1](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90196-1)
- Otis, E. M., & Brent, R. (1954). Equivalent ages in mouse and human embryos. *Anat Rec*, 120(1), 33-63. <https://doi.org/10.1002/ar.1091200104>

- Ouzzine, M., Gulberti, S., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., & Fournel-Gigleux, S. (2014). The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication. *Front Cell Neurosci*, *8*, 349. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00349>
- Pan, W., Pan, J., Zhao, Y., Zhang, H., & Tang, J. (2021). Serotonin Transporter Defect Disturbs Structure and Function of the Auditory Cortex in Mice. *Front Neurosci*, *15*, 749923. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.749923>
- Pascucci, T., Andolina, D., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., & Cabib, S. (2008). Reduced availability of brain amines during critical phases of postnatal development in a genetic mouse model of cognitive delay. *Brain Res*, *1217*, 232-238. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.04.006>
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J. P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., Skelin, M., Jevsek, M., Fink, H., Rupnik, M., & Walther, D. J. (2009). Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol*, *7*(10), e1000229. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000229>
- Pavone, L. M., Mithbaakar, P., Mastellone, V., Avallone, L., Gaspar, P., Maharajan, V., & Baldini, A. (2007). Fate map of serotonin transporter-expressing cells in developing mouse heart. *Genesis*, *45*(11), 689-695. <https://doi.org/10.1002/dvg.20343>
- Pavone, L. M., Spina, A., Rea, S., Santoro, D., Mastellone, V., Lombardi, P., & Avallone, L. (2009). Serotonin transporter gene deficiency is associated with sudden death of newborn mice through activation of TGF-beta1 signalling. *J Mol Cell Cardiol*, *47*(5), 691-697. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.07.021>
- Pelosi, B., Pratelli, M., Migliarini, S., Pacini, G., & Pasqualetti, M. (2015). Generation of a Tph2 Conditional Knockout Mouse Line for Time- and Tissue-Specific Depletion of Brain Serotonin. *PLoS One*, *10*(8), e0136422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136422>
- Pennati, R., Candiani, S., Biggiogero, M., Zega, G., Gropelli, S., Oliveri, D., Parodi, M., De Bernardi, F., & Pestarino, M. (2007). Developmental expression of tryptophan hydroxylase gene in *Ciona intestinalis*. *Dev Genes Evol*, *217*(4), 307-313. <https://doi.org/10.1007/s00427-007-0138-3>
- Persico, A. M., Di Pino, G., & Levitt, P. (2006). Multiple receptors mediate the trophic effects of serotonin on ventroposterior thalamic neurons in vitro. *Brain Res*, *1095*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.04.006>
- Pfaar, H., von Holst, A., Vogt Weisenhorn, D. M., Brodski, C., Guimera, J., & Wurst, W. (2002). mPet-1, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons. *Development Genes and Evolution*, *212*(1), 43-46. <https://doi.org/10.1007/s00427-001-0208-x>
- Piccinin, E., Cariello, M., De Santis, S., Ducheix, S., Sabbà, C., Ntambi, J. M., & Moschetta, A. (2019). Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1). *Nutrients*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/nu11102283>

- Pratelli, M., Migliarini, S., Pelosi, B., Napolitano, F., Usiello, A., & Pasqualetti, M. (2017). Perturbation of Serotonin Homeostasis during Adulthood Affects Serotonergic Neuronal Circuitry. *eNeuro*, 4(2). <https://doi.org/10.1523/eneuro.0376-16.2017>
- Pratelli, M., & Pasqualetti, M. (2019). Serotonergic neurotransmission manipulation for the understanding of brain development and function: Learning from Tph2 genetic models. *Biochimie*, 161, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.016>
- Psichas, A., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2015). Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest*, 125(3), 908-917. <https://doi.org/10.1172/jci76309>
- Quirke, V. (2006). Putting theory into practice: James Black, receptor theory and the development of the beta-blockers at ICI, 1958-1978. *Medical history*, 50(1), 69-92. <https://doi.org/10.1017/s0025727300009455>
- Rand, M., & Reid, G. (1951). Source of 'serotonin' in serum. *Nature*, 168(4270), 385.
- Rao, D. N., & Kaufman, S. (1986). Purification and state of activation of rat kidney phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem*, 261(19), 8866-8876.
- Rapport, M. M. (1949). Serum vasoconstrictor (serotonin) the presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *J Biol Chem*, 180(3), 961-969.
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948a). Crystalline Serotonin. *Science*, 108(2804), 329-330. <https://doi.org/10.1126/science.108.2804.329>
- Rapport, M. M., Green, A. A., & Page, I. H. (1948b). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem*, 174(2), 735-741.
- Rebsam, A., Seif, I., & Gaspar, P. (2002). Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: a study of normal and monoamine oxidase a knock-out mice. *J Neurosci*, 22(19), 8541-8552. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-19-08541.2002>
- Reid, G. (1943). A PRELIMINARY NOTE ON THE RELATIONSHIP OF THE BLOOD PLATELETS TO THE MECHANISM OF HÆMOSTASIS. *Medical Journal of Australia*, 2(13), 244-246. <https://doi.org/https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1943.tb51142.x>
- Ren, J., Friedmann, D., Xiong, J., Liu, C. D., Ferguson, B. R., Weerakkody, T., DeLoach, K. E., Ran, C., Pun, A., Sun, Y., Weissbourd, B., Neve, R. L., Huguenard, J., Horowitz, M. A., & Luo, L. (2018). Anatomically Defined and Functionally Distinct Dorsal Raphe Serotonin Sub-systems. *Cell*, 175(2), 472-487.e420. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.043>
- Ren, J., Isakova, A., Friedmann, D., Zeng, J., Grutzner, S. M., Pun, A., Zhao, G. Q., Kolluru, S. S., Wang, R., Lin, R., Li, P., Li, A., Raymond, J. L., Luo, Q., Luo, M., Quake, S. R., & Luo, L. (2019). Single-cell transcriptomes and whole-brain projections of serotonin neurons in the mouse dorsal and median raphe nuclei. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49424>

- Renson, J., Goodwin, F., Weissbach, H., & Udenfriend, S. (1961). Conversion of tryptopan to 5-hydroxytryptophan by phenylalanine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 6, 20-23.
- Renson, J., Weissbach, H., & Udenfriend, S. (1962). Hydroxylation of tryptophan by phenylalanine hydroxylase. *J Biol Chem*, 237, 2261-2264. <http://www.jbc.org/content/237/7/2261.full.pdf>
- Riccio, O., Jacobshagen, M., Golding, B., Vutskits, L., Jabaudon, D., Hornung, J. P., & Dayer, A. G. (2011). Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl Psychiatry*, 1(10), e47. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.49>
- Riccio, O., Potter, G., Walzer, C., Vallet, P., Szabó, G., Vutskits, L., Kiss, J. Z., & Dayer, A. G. (2009). Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6. *Mol Psychiatry*, 14(3), 280-290. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.89>
- Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., & Dougherty, D. M. (2009). L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int J Tryptophan Res*, 2, 45-60. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s2129>
- Ritter, K. E., Buehler, D. P., Asher, S. B., Deal, K. K., Zhao, S., Guo, Y., & Southard-Smith, E. M. (2021). 5-HT3 Signaling Alters Development of Sacral Neural Crest Derivatives That Innervate the Lower Urinary Tract. *Int J Mol Sci*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22136838>
- Roager, H. M., & Licht, T. R. (2018). Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat Commun*, 9(1), 3294. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05470-4>
- Salichon, N., Gaspar, P., Upton, A. L., Picaud, S., Hanoun, N., Hamon, M., De Maeyer, E., Murphy, D. L., Mossner, R., Lesch, K. P., Hen, R., & Seif, I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J Neurosci*, 21(3), 884-896. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-03-00884.2001>
- Salmoun, M., Devijver, C., Daloz, D., Braekman, J.-C., & van Soest, R. W. M. (2002). 5-Hydroxytryptamine-Derived Alkaloids from Two Marine Sponges of the Genus Hyrtios. *Journal of Natural Products*, 65(8), 1173-1176. <https://doi.org/10.1021/np020009+>
- Sanford, Y. M., & Orias, E. (1981). Phenylketonuric Tetrahymena: phenylalanine hydroxylase mutants and other tyrosine auxotrophs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7614-7618. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7614>
- Sano, M., Ferchaud-Roucher, V., Nael, C., Aguesse, A., Poupeau, G., Castellano, B., & Darmaun, D. (2014). Simultaneous detection of stable isotope-labeled and unlabeled L-tryptophan and of its main metabolites, L-kynurenine, serotonin and quinolinic acid, by gas chromatography/negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 49(2), 128-135. <https://doi.org/10.1002/jms.3313>

- Sato, T. L., Jequier, E., Lovenberg, W., & Sjoerdsma, A. (1967). Characterization of a tryptophan hydroxylating enzyme from malignant mouse mast cell. *Eur J Pharmacol*, 1(1), 18-25.
- Savelieva, K. V., Zhao, S., Pogorelov, V. M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E., & Lanthorn, T. H. (2008). Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One*, 3(10), e3301. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003301>
- Sbrini, G., Hanswijk, S. I., Brivio, P., Middelman, A., Bader, M., Fumagalli, F., Alenina, N., Homberg, J. R., & Calabrese, F. (2022). Peripheral Serotonin Deficiency Affects Anxiety-like Behavior and the Molecular Response to an Acute Challenge in Rats. *Int J Mol Sci*, 23(9). <https://doi.org/10.3390/ijms23094941>
- Schmidt, J. E. (1905). Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie einiger Zellarten der Schleimhaut des menschlichen Darmkanales. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 66(1), 12-40. <https://doi.org/10.1007/BF02979202>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*, 106-107, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Shmukler, Y. B., & Nikishin, D. A. (2022). Non-Neuronal Transmitter Systems in Bacteria, Non-Nervous Eukaryotes, and Invertebrate Embryos. *Biomolecules*, 12(2), 271. <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/2/271>
https://mdpi-res.com/d_attachment/biomolecules/biomolecules-12-00271/article_deploy/biomolecules-12-00271.pdf?version=1644321543
- Shmukler, Y. B., & Tosti, E. (2002). Serotonergic-induced ion currents in cleaving sea urchin embryos. *Invertebrate Reproduction & Development*, 42(1), 43-49. <https://doi.org/10.1080/07924259.2002.9652508>
- Shuey, D. L., Sadler, T. W., & Lauder, J. M. (1992). Serotonin as a regulator of craniofacial morphogenesis: site specific malformations following exposure to serotonin uptake inhibitors. *Teratology*, 46(4), 367-378. <https://doi.org/10.1002/tera.1420460407>
- Siltberg-Liberles, J., Steen, I. H., Svebak, R. M., & Martinez, A. (2008). The phylogeny of the aromatic amino acid hydroxylases revisited by characterizing phenylalanine hydroxylase from *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, 427(1-2), 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.09.005>
- Soares-da-Silva, P., Cabral, J. M., Magalhães, D., Fraga, S., & Magro, F. (2016). Amine neurotransmitters, inflammation and epithelial sodium transport. *Exp Physiol*, 101(4), 459-464. <https://doi.org/10.1113/ep085284>
- Soares-da-Silva, P., Vieira-Coelho, M. A., Pinto-do, O. P., Pestana, M., & Bertorello, A. M. (1995). Studies on the nature of the antagonistic actions of dopamine and 5-hydroxytryptamine in renal tissues. *Hypertens Res*, 18 Suppl 1, S47-51. https://doi.org/10.1291/hypres.18.supplementi_s47

- Soiza-Reilly, M., & Gaspar, P. (2020). Chapter 2 - From B1 to B9: a guide through hindbrain serotonin neurons with additional views from multidimensional characterization. In C. P. Müller & K. A. Cunningham (Eds.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 31, pp. 23-40). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00002-5>
- Sole, M. J., Madapallimattam, A., & Baines, A. D. (1986). An active pathway for serotonin synthesis by renal proximal tubules. *Kidney Int*, 29(3), 689-694.
<https://doi.org/10.1038/ki.1986.53>
- Song, N.-N., Jia, Y.-F., Zhang, L., Zhang, Q., Huang, Y., Liu, X.-Z., Hu, L., Lan, W., Chen, L., Lesch, K.-P., Chen, X., Xu, L., & Ding, Y.-Q. (2016). Reducing central serotonin in adulthood promotes hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*, 6(1), 20338. <https://doi.org/10.1038/srep20338>
- Spencer, W. C., & Deneris, E. S. (2017). Regulatory Mechanisms Controlling Maturation of Serotonin Neuron Identity and Function [Original Research]. *Front Cell Neurosci*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00215>
- Speranza, L., Chambery, A., Di Domenico, M., Crispino, M., Severino, V., Volpicelli, F., Leopoldo, M., Bellenchi, G. C., di Porzio, U., & Perrone-Capano, C. (2013). The serotonin receptor 7 promotes neurite outgrowth via ERK and Cdk5 signaling pathways. *Neuropharmacology*, 67, 155-167.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.10.026>
- Speziali, G., Liesinger, L., Gindlhuber, J., Leopold, C., Pucher, B., Brandi, J., Castagna, A., Tomin, T., Krenn, P., Thallinger, G. G., Olivieri, O., Martinelli, N., Kratky, D., Schittmayer, M., Birner-Gruenberger, R., & Cecconi, D. (2018). Myristic acid induces proteomic and secretomic changes associated with steatosis, cytoskeleton remodeling, endoplasmic reticulum stress, protein turnover and exosome release in HepG2 cells. *J Proteomics*, 181, 118-130.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.008>
- Sprenger, J., Hardeland, R., Fuhrberg, B., & Han, S. Z. (1999). Melatonin and Other 5-Methoxylated Indoles in Yeast : Presence in High Concentrations and Dependence on Tryptophan Availability. *CYTOLOGIA*, 64(2), 209-213.
<https://doi.org/10.1508/cytologia.64.209>
- Starke, K. (1998). A history of Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 358(1), 1-109.
<https://doi.org/10.1007/pl00005229>
- Stegner, D., Deppermann, C., Kraft, P., Morowski, M., Kleinschnitz, C., Stoll, G., & Nieswandt, B. (2013). Munc13-4-mediated secretion is essential for infarct progression but not intracranial hemostasis in acute stroke. *J Thromb Haemost*, 11(7), 1430-1433. <https://doi.org/10.1111/jth.12293>
- Stoll, A., & Hofmann, A. (1943). Partialsynthese von Alkaloiden vom Typus des Ergobasins. (6. Mitteilung ,ber Mutterkornalkaloide). *Helvetica Chimica Acta*, 26, 944-965.
- Stoll, J., Kozak, C. A., & Goldman, D. (1990). Characterization and chromosomal mapping of a cDNA encoding tryptophan hydroxylase from a mouse

- mastocytoma cell line. *Genomics*, 7(1), 88-96. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(90\)90522-v](https://doi.org/10.1016/0888-7543(90)90522-v)
- Stoll, W. A. (1947). Lysegsaure-diathylamid, ein Phantastikum aus der Mutterkorngruppe. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie*.
- Strawbridge, R., Javed, R. R., Cave, J., Jauhar, S., & Young, A. H. (2022). The effects of reserpine on depression: A systematic review. *Journal of Psychopharmacology*, 02698811221115762. <https://doi.org/10.1177/02698811221115762>
- Sugisawa, E., Takayama, Y., Takemura, N., Kondo, T., Hatakeyama, S., Kumagai, Y., Sunagawa, M., Tominaga, M., & Maruyama, K. (2020). RNA Sensing by Gut Piezo1 Is Essential for Systemic Serotonin Synthesis. *Cell*, 182(3), 609-624.e621. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.022>
- Suidan, G. L., Duerschmied, D., Dillon, G. M., Vanderhorst, V., Hampton, T. G., Wong, S. L., Voorhees, J. R., & Wagner, D. D. (2013). Lack of tryptophan hydroxylase-1 in mice results in gait abnormalities. *PLoS One*, 8(3), e59032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059032>
- Sumara, G., Sumara, O., Kim, J. K., & Karsenty, G. (2012). Gut-derived serotonin is a multifunctional determinant to fasting adaptation. *Cell Metab*, 16(5), 588-600. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.09.014>
- Sze, J. Y., Victor, M., Loer, C., Shi, Y., & Ruvkun, G. (2000). Food and metabolic signalling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature*, 403(6769), 560-564. <https://doi.org/10.1038/35000609>
- Trendelenburg, P. (1910). Bestimmung des Adrenaliningehaltes im normalen Blut sowie beim Abklingen der Wirkung einer einmaligen intravenösen Adrenalininjektion mittels physiologischer Messmethode. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 63(3), 161-176. <https://doi.org/10.1007/BF01840948>
- Tritsch, N. X., Oh, W. J., Gu, C., & Sabatini, B. L. (2014). Midbrain dopamine neurons sustain inhibitory transmission using plasma membrane uptake of GABA, not synthesis. *eLife*, 3, e01936. <https://doi.org/10.7554/eLife.01936>
- Turner, E. H., Loftis, J. M., & Blackwell, A. D. (2006). Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan. *Pharmacol Ther*, 109(3), 325-338. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.004>
- Twarog, B. M., & Page, I. H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, 175(1), 157-161.
- Udenfriend, S., Titus, E., Weissbach, H., & Peterson, R. E. (1956). Biogenesis and metabolism of 5-hydroxyindole compounds. *J Biol Chem*, 219(1), 335-344.
- Ugrumov, M. V. (2010). Developing brain as an endocrine organ: a paradoxical reality. *Neurochem Res*, 35(6), 837-850. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0127-1>
- Upton, A. L., Salichon, N., Lebrand, C., Ravary, A., Blakely, R., Seif, I., & Gaspar, P. (1999). Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and

- contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J Neurosci*, 19(16), 7007-7024. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-16-07007.1999>
- Verhaagh, S., Barlow, D. P., & Zwart, R. (2001). The extraneuronal monoamine transporter Slc22a3/Orct3 co-localizes with the Maa0 metabolizing enzyme in mouse placenta. *Mech Dev*, 100(1), 127-130.
- Vesela, J., Rehak, P., Mihalik, J., Czikkova, S., Pokorny, J., & Koppel, J. (2003). Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol Res*, 52(2), 223-228.
- Vitaku, E., Smith, D. T., & Njardarson, J. T. (2014). Analysis of the Structural Diversity, Substitution Patterns, and Frequency of Nitrogen Heterocycles among U.S. FDA Approved Pharmaceuticals. *J Med Chem*, 57(24), 10257-10274. <https://doi.org/10.1021/jm501100b>
- Vitalis, T., Ansorge, M. S., & Dayer, A. G. (2013). Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT3A and 5-HT6 receptor subtypes. *Front Cell Neurosci*, 7, 93. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00093>
- Vitalis, T., Cases, O., Passemard, S., Callebert, J., & Parnavelas, J. G. (2007). Embryonic depletion of serotonin affects cortical development. *Eur J Neurosci*, 26(2), 331-344. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05661.x>
- Vitalis, T., Fouquet, C., Alvarez, C., Seif, I., Price, D., Gaspar, P., & Cases, O. (2002). Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J Comp Neurol*, 442(4), 331-347. <https://doi.org/10.1002/cne.10093>
- Vucurovic, K., Gallopin, T., Ferezou, I., Rancillac, A., Chameau, P., van Hooft, J. A., Geoffroy, H., Monyer, H., Rossier, J., & Vitalis, T. (2010). Serotonin 3A receptor subtype as an early and protracted marker of cortical interneuron subpopulations. *Cereb Cortex*, 20(10), 2333-2347. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp310>
- Wade, P. R., & Westfall, J. A. (1985). Ultrastructure of enterochromaffin cells and associated neural and vascular elements in the mouse duodenum. *Cell Tissue Res*, 241(3), 557-563. <https://doi.org/10.1007/BF00214576>
- Waider, J., Proft, F., Langlhofer, G., Asan, E., Lesch, K. P., & Gutknecht, L. (2013). GABA concentration and GABAergic neuron populations in limbic areas are differentially altered by brain serotonin deficiency in Tph2 knockout mice. *Histochem Cell Biol*, 139(2), 267-281. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1029-x>
- Wallace, J. A., & Lauder, J. M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res Bull*, 10(4), 459-479. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(83\)90144-2](https://doi.org/10.1016/0361-9230(83)90144-2)

- Walther, D. J., & Bader, M. (1999). Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 68(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(99\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(99)00046-7)
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603), 76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Walther, D. J., Peter, J. U., Bashammakh, S., Hortnagl, H., & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299(5603), 76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
- Walther, D. J., Peter, J. U., Winter, S., Holtje, M., Paulmann, N., Grohmann, M., Vowinkel, J., Alamo-Bethencourt, V., Wilhelm, C. S., Ahnert-Hilger, G., & Bader, M. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115(7), 851-862. https://ac.els-cdn.com/S0092867403010146/1-s2.0-S0092867403010146-main.pdf?_tid=96a2434a-7c86-47dc-b139-2d34de4e16a0&acdnat=1529572725_ebd6a3e266acb174e377a66827812794
- Wang, H. C., Yeh, T. L., Chang, H. H., Gean, P. W., Chi, M. H., Yang, Y. K., Lu, R. B., & Chen, P. S. (2011). TPH1 is associated with major depressive disorder but not with SSRI/SNRI response in Taiwanese patients. *Psychopharmacology (Berl)*, 213(4), 773-779. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2034-1>
- Wang, Y. M., Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S. R., Bock, C. B., Miller, G. W., Wightman, R. M., & Caron, M. G. (1997). Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron*, 19(6), 1285-1296. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80419-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80419-5)
- Watson, C., Bartholomaeus, C., & Puelles, L. (2019). Time for Radical Changes in Brain Stem Nomenclature—Applying the Lessons From Developmental Gene Patterns. *Front Neuroanat*, 13, 10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2019.00010>
- Watts, S. W., Morrison, S. F., Davis, R. P., & Barman, S. M. (2012). Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacol Rev*, 64(2), 359-388. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004697>
- Welford, R. W., Vercauteren, M., Trebaul, A., Cattaneo, C., Eckert, D., Garzotti, M., Sieber, P., Segrestaa, J., Studer, R., Groenen, P. M., & Nayler, O. (2016). Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation. *Sci Rep*, 6, 30059. <https://doi.org/10.1038/srep30059>
- Wellman, C. L., Izquierdo, A., Garrett, J. E., Martin, K. P., Carroll, J., Millstein, R., Lesch, K. P., Murphy, D. L., & Holmes, A. (2007). Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci*, 27(3), 684-691. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4595-06.2007>

- Welsh, J. H. (1953). Excitation of the heart of *Venus mercenaria*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 219(1-2), 23-29.
<https://doi.org/10.1007/bf00246246>
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1999). The Discovery of Serotonin and its Role in Neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21(1), 2-8.
[https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00031-7)
- Whitney, M. S., Shemery, A. M., Yaw, A. M., Donovan, L. J., Glass, J. D., & Deneris, E. S. (2016). Adult Brain Serotonin Deficiency Causes Hyperactivity, Circadian Disruption, and Elimination of Siestas. *The Journal of Neuroscience*, 36(38), 9828. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1469-16.2016>
- Wiens, M., Koziol, C., Batel, R., & Müller, W. E. (1998). Phenylalanine hydroxylase from the sponge *Geodia cydonium*: implication for allorecognition and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Dev Comp Immunol*, 22(5-6), 469-478. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(98\)00034-2](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(98)00034-2)
- Williams, R. M., Stocking, E. M., & Sanz-Cervera, J. F. (2000). Biosynthesis of Prenylated Alkaloids Derived from Tryptophan. In F. J. Leeper & J. C. Vederas (Eds.), *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids* (pp. 97-173). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-48146-X_3
- Wilson, S. T., Stanley, B., Brent, D. A., Oquendo, M. A., Huang, Y. Y., & Mann, J. J. (2009). The tryptophan hydroxylase-1 A218C polymorphism is associated with diagnosis, but not suicidal behavior, in borderline personality disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150b(2), 202-208.
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30788>
- Winn, S. R., Scherer, T., Thony, B., Ying, M., Martinez, A., Weber, S., Raber, J., & Harding, C. O. (2018). Blood phenylalanine reduction corrects CNS dopamine and serotonin deficiencies and partially improves behavioral performance in adult phenylketonuric mice. *Mol Genet Metab*, 123(1), 6-20.
<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2017.10.009>
- Wirth, A., Holst, K., & Ponimaskin, E. (2017). How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Prog Neurobiol*, 151, 35-56.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.03.007>
- Wong, F. K., Selten, M., Rosés-Novella, C., Sreenivasan, V., Pallas-Bazarra, N., Serafeimidou-Pouliou, E., Hanusz-Godoy, A., Oozeer, F., Edwards, R., & Marín, O. (2022). Serotonergic regulation of bipolar cell survival in the developing cerebral cortex. *Cell Rep*, 40(1), 111037.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111037>
- Wu, H. H., Choi, S., & Levitt, P. (2016). Differential patterning of genes involved in serotonin metabolism and transport in extra-embryonic tissues of the mouse. *Placenta*, 42, 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.03.013>
- Xing, L., Kalebic, N., Namba, T., Vaid, S., Wimberger, P., & Huttner, W. B. (2020). Serotonin Receptor 2A Activation Promotes Evolutionarily Relevant Basal Progenitor Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron*, 108(6), 1113-1129.e1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.09.034>

- Xu, J., Li, Y., Lv, Y., Bian, C., You, X., Endoh, D., Teraoka, H., & Shi, Q. (2019). Molecular Evolution of Tryptophan Hydroxylases in Vertebrates: A Comparative Genomic Survey. *Genes*, *10*(3), 203. <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/3/203>
- Xue, L., Cai, J.-Y., Ma, J., Huang, Z., Guo, M.-X., Fu, L.-Z., Shi, Y.-B., & Li, W.-X. (2013). Global expression profiling reveals genetic programs underlying the developmental divergence between mouse and human embryogenesis. *BMC Genomics*, *14*(1), 568. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-568>
- Yadav, V. K., Ryu, J.-H., Suda, N., Tanaka, K. F., Gingrich, J. A., Schütz, G., Glorieux, F. H., Chiang, C. Y., Zajac, J. D., Insogna, K. L., Mann, J. J., Hen, R., Ducy, P., & Karsenty, G. (2008). Lrp5 Controls Bone Formation by Inhibiting Serotonin Synthesis in the Duodenum. *Cell*, *135*(5), 825-837. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.059>
- Yaguchi, S., & Katow, H. (2003). Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior. *J Comp Neurol*, *466*(2), 219-229. <https://doi.org/10.1002/cne.10865>
- Yamaguchi, M., Miyashita, Y., Kumagai, Y., & Kojo, S. (2004). Change in liver and plasma ceramides during D-galactosamine-induced acute hepatic injury by LC-MS/MS. *Bioorg Med Chem Lett*, *14*(15), 4061-4064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.05.046>
- Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Sadler, T. W., & Lauder, J. M. (1993). Serotonin uptake in the ectoplacental cone and placenta of the mouse. *Placenta*, *14*(2), 149-161.
- Yavarone, M. S., Shuey, D. L., Tamir, H., Sadler, T. W., & Lauder, J. M. (1993). Serotonin and cardiac morphogenesis in the mouse embryo. *Teratology*, *47*(6), 573-584. <https://doi.org/10.1002/tera.1420470609>
- Zhang, J., Wu, C., Sheng, J., & Feng, X. (2016). Molecular basis of 5-hydroxytryptophan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biosyst*, *12*(5), 1432-1435. <https://doi.org/10.1039/c5mb00888c>
- Zhukovsky, P., Alsiö, J., Jupp, B., Xia, J., Giuliano, C., Jenner, L., Griffiths, J., Riley, E., Ali, S., Roberts, A. C., Robbins, T. W., & Dalley, J. W. (2017). Perseveration in a spatial-discrimination serial reversal learning task is differentially affected by MAO-A and MAO-B inhibition and associated with reduced anxiety and peripheral serotonin levels. *Psychopharmacology (Berl)*, *234*(9-10), 1557-1571. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4569-x>

11 Appendix

taxon	DOI		
Hyrtios reticulatus	10.1021/np020009+	Oryza sativa L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002
Hyrtios erectus	10.1021/np020009+	S. aureus	10.1134/S0026261716010082
Branchiostoma lanceolatum	10.1002/cne.10965	Enterococcus faecalis	10.1134/S0026261716010082
Schistocerca gregaria	10.1126/science.1165939	Escherichia coli	10.1134/S0026261716010082
Petromyzon marinus	10.1073/pnas.1119348109	B. subtilis	10.1134/S0026261716010082
Tritonia diomedea	10.1523/jneurosci.4196-12.2013	Rhodospirillum rubrum	10.1134/S0026261716010082
Pleurobranchaea californica	10.1523/jneurosci.4196-12.2013	Saccharomyces cerevisiae	10.1134/S0026261716010082
Apis mellifera mellifera	10.1016/j.jinsphys.2013.12.005	Morganella morganii	10.1134/S0026261716010082
Rhodnius prolixus	10.1016/j.jinsphys.2013.12.005	Klebsiella pneumonia	10.1134/S0026261716010082
Aedes aegypti	10.1016/j.jinsphys.2013.12.005	Hafnia alvei	10.1134/S0026261716010082
Stomoxys calcitrans	10.1016/j.jinsphys.2013.12.005	Lactococcus lactis	10.1134/S0026261716010082
Campanotus mus	10.1016/j.jinsphys.2013.12.005	Lactobacillus plantarum	10.1134/S0026261716010082
Tetrahymena	10.1556/030.62.2015.2.1	Lactobacillus helveticus	10.1134/S0026261716010082
Octopus bimaculoides	10.1016/j.cub.2018.07.061	Eumetazoa	NA
Haliotis discus hannai	10.1016/j.ygcen.2019.03.001	plantae	NA
Danio rerio	10.1039/c9fo02129a	Homo sapiens	NA
Caenorhabditis elegans	10.1016/j.neures.2019.04.006	Mus musculus	NA
Actinidia deliciosa	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Rattus norvegicus	NA
Spinacia oleracea	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Branchiostoma lanceolatum	10.1186/1471-2202-13-59
Allium sativum	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Ciona intestinalis	10.1007/s00427-007-0138-3
Allium cepa	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Hemicentrotus pulcherrimus	10.1002/cne.10865
Daucus carota	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Danio rerio	10.3389/fmolb.2020.00011
Helianthus annuus L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002	Gasterosteidae	10.3389/fmolb.2020.00011
Lactuca sativa L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Brassica oleracea L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Ananas comosus	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Hypericum perforatum L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Juglans nigra L.	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Musa ensete	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Prunus avium	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Prunus persica	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Solanum lycopersicum	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		
Coffea canephora	10.1016/j.biotechadv.2016.10.002		

Tabelle 11: DOIs der Veröffentlichungen anhand derer Abbildung 2 generiert wurde.

12 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Mordhorst, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nicht-kanonische Pathways der Serotonin-Homöostase in embryonalen und adulten Mäusen“ („Non-canonic pathways involved in the homeostasis of serotonin in embryonal and adult mice“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

13 Anteilserklärung

Alexander Mordhorst hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Mordhorst A, Dhandapani P, Matthes S, Mosienko V, Rothe M, Todiras M, Self J, Schunck WH, Schütz A, Bader M, Alenina N.
Phenylalanine hydroxylase contributes to serotonin synthesis in mice. The FASEB Journal. 2021; 35:e21648. <https://doi.org/10.1096/fj.202100366R>

Das veröffentlichte Manuskript wurde von Prof. Bader und Dr. Alenina supervidiert. Die Experimente wurden von Herrn Mordhorst, allerdings in Teilen auch von den anderen KoautorInnen insbesondere seiner Koautorin Frau Dhandapani ausgeführt (Datenpunkte gezeigt in Abbildung 9). Dabei wurden die finalen *in vivo* Experimente (gezeigt in Abschnitt 8.1.4, Abb. 10b & Abb. 11) von Herrn Mordhorst ausgeführt. Die massenspektrometrischen Experimente wurden unter der Supervision von Dr. Rothe und Dr. Schunck ausgeführt. Die statistische Analyse und das Schreiben des Manuskripts wurden von Herrn Mordhorst, Prof. Bader und Dr. Alenina ausgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

14 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

15 Publikationsliste

Mordhorst A, Dhandapani P, Matthes S, Mosienko V, Rothe M, Todiras M, Self J, Schunck WH, Schütz A, Bader M, Alenina N.
Phenylalanine hydroxylase contributes to serotonin synthesis in mice. The FASEB Journal. 2021; 35:e21648. <https://doi.org/10.1096/fj.202100366R>

16 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen meinen Dank ausdrücken, ohne die diese Arbeit nicht hätte zustande kommen können.

Dieser gilt zunächst den Personen, die mich direkt betreut haben. Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Bader, sowie Frau Dr. Natalia Alenina für die wissenschaftliche und persönliche Betreuung dieser Arbeit, dafür immer eine offene Bürotür und immer genug Geduld für selbst die unreifsten meiner Ideen und Hypothesen gehabt zu haben. Ich habe mich zu jedem Zeitpunkt ernst genommen und gefördert gefühlt und eine Augenhöhe erleben dürfen, die ich niemals erwartet hätte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Thomas Wilnow und Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Jentsch für die hilfsbereite wissenschaftliche Betreuung als Zweit- & Drittbetreuer.

Ich danke weiterhin Herrn Dr. Michael Rothe und Herrn Dr. Wolf-Hagen Schunck für die geduldig und gewissenhaft vermittelte Expertise in chromatographischen und massenspektrometrischen Verfahren.

Frau Dr. Fatimunnisa Qadri danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Histologie, Frau Susanne da Costa Goncalves für die Einführung in grundlegende Laborverfahren, sowie hervorragende technische Unterstützung und Frau Polina Peeva für großartige Gesellschaft. Diesen Menschen danke ich weiterhin für ein offenes Ohr in euphorischen, frustrierenden und traurigen Momenten. Dies und ähnliches gilt auch allen weiteren Mitgliedern der AG Bader.

Nicht zuletzt danke ich meinen FreundInnen dafür mich immer ernst genommen, inspiriert, mit neuen Eindrücken konfrontiert, motiviert, aufgefangen, gefördert und im richtigen Moment gezielt abgelenkt zu haben.

Meinen Eltern danke ich für so Vieles. Zu viel, um es hier zu listen.

17 Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietschke

Name, Vorname: Mordhorst, Alexander
Emailadresse: alexander.mordhorst@charite.de
Matrikelnummer: 220149
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. Michael Bader
Promotionsinstitution / Klinik: Max-Delbrück-Centrum

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin
Tel. +49 (0)30 450 562 161
frank.konietschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Mordhorst innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 20.04.2023

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Es handelt sich um eine explorative Studie, auf Formulierungen achten: Um den Einfluss von Variablen herauszufinden, müssen Störfaktoren rausgerechnet werden, da das nicht geht, geben die Ergebnisse nur eine Richtung an, Assoziationen werden untersucht. P-Werte dürfen nicht konfirmatorisch interpretiert werden.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

