

I EINLEITUNG

1 DAS SEROTONERGE SYSTEM

1.1 Vorkommen und Wirkungen von Serotonin (5-HT) in Säugetieren

Schon seit Mitte des 19. Jahrhunderts wusste man, dass Blutserum eine Substanz enthält, die die glatte Gefäßmuskulatur kontrahiert und somit den Gefäßtonus reguliert. Erst 1948 gelang die Isolierung und Identifizierung dieser Substanz aus dem Serum, daher der Trivialname Serotonin, als das substituierte Indolderivat 5-Hydroxytryptamin (5-HT) (Rapport *et al.*, 1947, 1948).

Dieses biogene Monoamin gehört phylogenetisch zu den ältesten Botenstoffen und ist im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitet. So findet es sich reichlich in Ananas, Bananen, im Gift von Brennnesseln und Hohltieren und im Hautdrüsensekret von Amphibien (Römpp). Im Säugetierorganismus kommt ein Großteil des 5-HTs in den enterochromaffinen Zellen der Magen- und Darmschleimhaut vor, wo es in Vesikeln gespeichert ist. Im Darmlumen freigesetzt bewirkt es die Kontraktion der glatten Muskulatur und reguliert somit die Darmmotilität (Ormsbee und Fondacaro, 1985). Die enterochromaffinen Zellen können 5-HT auch ins Blut abgeben und sind damit als Quelle des Blutserotonins identifiziert worden (Ormsbee und Fondacaro, 1985). Gespeichert wird es dort in großen Mengen in Thrombozyten, welche es bei der Blutgerinnung freisetzen und hier eine entscheidende Rolle bei der primären Hämostase spielt (Holland, 1976; Walther *et al.*, 2003b). Außerdem ist in Mastzellen vorkommendes 5-HT an der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt (Finocchiaro *et al.*, 1988; Geba *et al.*, 1996). Gefunden wurde es bis heute in vielen weiteren peripheren Geweben und Zellen, wo es als Gewebshormon vielfältige Funktionen erfüllt (Tabelle I.1). Aber auch in ontologisch frühen Stadien scheint 5-HT eine Rolle zu spielen, so ist es bereits in befruchteten Eizellen und embryonalen Stammzellen gefunden worden (Walther und Bader, 1999).

Im Nervensystem kommt 5-HT eine bedeutende Rolle als Neurotransmitter zu, wo es erstmals 1953 lokalisiert werden konnte (Twarog und Page, 1953). Als hydrophile Substanz kann es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, es muss also dort synthetisiert werden. Im Gehirn befinden sich die Zellkörper der relativ wenigen serotonergen Nervenzellen in den Raphekernen im Bereich des Mittelhirns, des *Pons* und der *Medulla oblonga*. Von dort projizieren die Axone dieser Neuronen in nahezu alle Teile des Gehirns und ins Rückenmark

(Dahlström und Fuxe, 1964; Abbildung I.1). Es ist daher das umfangreichste monoaminerge System im Gehirn von Vertebraten, wodurch es auch das am schwierigsten zu studierende System ist (Joh, 1997; Abschnitt I.2.1). Serotonerge Nervenzellen sind bereits bei niedrigeren Spezies wie der Meeresschnecke *Aplysia*, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu finden.

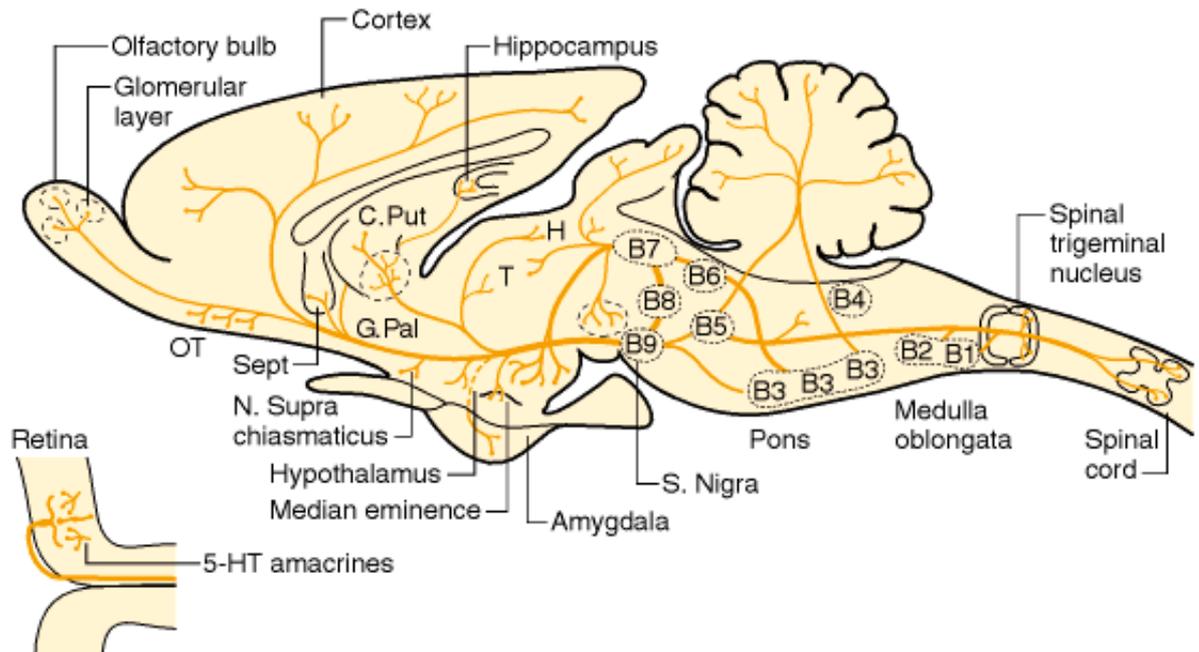


Abbildung I.1: Schematische Darstellung vom ZNS der Ratte im Sagittalschnitt mit der Lokalisation der serotonergen Zellkörpergruppen in den Raphekernen (B1 bis B9) und deren Projektionen. *OT*, Olfactory tuberculum; *Sept*, Septum; *C. Put*, Nucleus caudate-putamen; *G. Pal*, Globus pallidus; *T*, Thalamus; *H*, Habenula; *S. Nigra*, Substantia nigra (modifiziert nach Siegel *et al.*, 1982).

Die höchste Konzentration an 5-HT besitzt die Zirbeldrüse (Epiphyse), die sich zwar im Gehirn befindet, aber durch die Blut-Hirn-Schranke von ihm getrennt ist. Das 5-HT ist hier die Vorläuferlängersubstanz des Botenstoffes Melatonin. Projektionen von der Zirbeldrüse führen hauptsächlich in den *Nucleus supra chiasmaticus* (NSC), dem eine Rolle bei der Kontrolle von Biorhythmen wie Schlafen und Wachen zugeschrieben wird (Tabelle I.1).

Tabelle I.1: Organe und Gewebe in denen 5-HT und/oder Tryptophanhydroxylase (TPH)-Protein oder -mRNA aufzufinden sind.

Organ oder Gewebe	Zell-Typen	Biomolekül	Quelle
Gehirn	Raphe-Neuronen	5-HT und TPH	Weber <i>et al.</i> , 1965
	Epiphyse	5-HT und TPH	
Auge	retinale Zellen	5-HT und TPH	Green und Beharse, 1994
gastrointestinaler Trakt	enterochromaffine Zellen	5-HT und TPH	Weber <i>et al.</i> , 1965
Nebennierenmark	adrenochromaffine Zellen	5-HT und TPH	Delarue <i>et al.</i> , 1992
Niere	renale proximale Tubuli	5-HT und TPH	Sole <i>et al.</i> , 1986
hämatopoetische Zellen	Thrombozyten	5-HT und <i>Tph</i> -mRNA	Champier <i>et al.</i> , 1997
	Lymphozyten und Makrophagen	5-HT und TPH	
	Mastzellen	5-HT und TPH	Finocchiaro, 1988
Milz	T-Lymphozyten?	5-HT und TPH	Young <i>et al.</i> , 1993
Pankreas	β -Zellen der Langerhansschen Inselzellen	5-HT und TPH	Barbosa <i>et al.</i> , 1998
Lunge	Neuroendokrine Zellen	5-HT und TPH	Newman <i>et al.</i> , 1993
Hoden	Leydigzellen	5-HT	Frungieri <i>et al.</i> , 1999
Zunge	Geschmacksknospen	5-HT und TPH	Fujimoto <i>et al.</i> , 1997
Brustdrüse	Epithelzellen	5-HT und TPH	Matsuda <i>et al.</i> , 2004
Zygoten		5-HT und TPH	Walther und Bader, 1998
Blastozysten		5-HT und TPH	Walther und Bader, 1998

1.2 Der 5-HT-Stoffwechsel

1.2.1 Die 5-HT-Biosynthese

Die Biosynthese von 5-HT ist hochgradig reguliert und erfolgt in zwei Schritten. Die essentielle Aminosäure Tryptophan (Trp), die vom großen neutralen Aminosäuretransporter in die Zellen aufgenommen wird, wird im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zum 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert. Diese Reaktion wird vom Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH; EC 1.14.16.4) katalysiert. Die TPH benötigt dabei molekularen Sauerstoff und als Kofaktor das reduzierte Pterin Tetrahydrobiopterin (BH₄), das zusammen mit Eisen(II)-ionen als Elektronendonator dient.

Den zweiten und schnellen Schritt, die Decarboxylierung der hydroxylierten Aminosäure zum Amin katalysiert die Pyridoxal-5'-phosphat (Vitamin B6) abhängige Aromatische-

Aminosäure-Decarboxylase (AAAD; EC 4.1.1.28). Dieses lösliche Enzym kommt ubiquitär im Organismus vor und ist nicht spezifisch für die Decarboxylierung von 5-HTP (Abbildung I.2), sondern auch an der Katecholaminbiosynthese beteiligt.

Konzentrationsänderungen von Trp, Sauerstoff und BH_4 beeinflussen die Syntheserate von 5-HT, weil sie in der Zelle in untergesättigten Konzentrationen für TPH vorkommen.

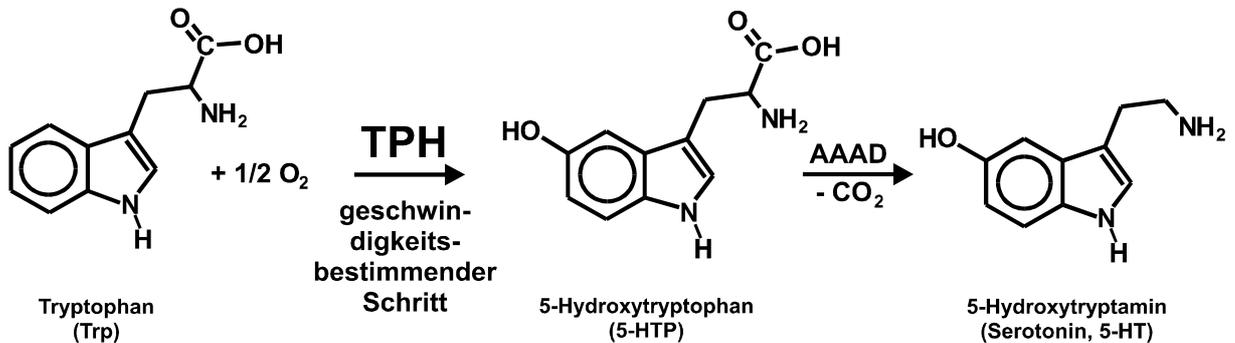


Abbildung I.2: Biosynthese von 5-HT. TPH katalysiert die Pterin abhängige Hydroxylierung von Trp zu 5-HTP. Diese ist die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion der 5-HT-Biosynthese. TPH = Tryptophanhydroxylase; AAAD = Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase; Trp = Tryptophan; 5-HTP = 5-Hydroxytryptophan; 5-HT = 5-Hydroxytryptamin (Serotonin).

1.2.2 Biochemische Zusammenhänge

Die 5-HT-Biosynthese ist nur ein Teil des Trp-Stoffwechsels und deshalb beeinflussen 5-HT-Metaboliten auch andere Synthesewege und umgekehrt. Im besonderen ist das der Fall für die Melatoninbiosynthese in der Epiphyse, aber auch in der Retina und der Hypophyse, die vom 5-HT ausgeht (Coon *et al.*, 1996). Diese erfolgt in zwei Schritten: im ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird die Aminogruppe des 5-HTs durch die Serotonin-N-Acetyl-Transferase (SNAT; EC 2.3.1.87) acetyliert, im zweiten folgt die Methylierung der 5-ständigen Hydroxylgruppe durch die N-Acetylserotonin-O-Methyltransferase (Hydroxyindol-O-Methyltransferase, HIOMT; EC 2.1.1.4) zum Melatonin. Melatonin reguliert zusammen mit 5-HT den Schlaf-Wach-Rhythmus und dessen Biosynthese unterliegt damit der zirkadianen Rhythmik, wobei die höchsten Konzentrationen also die höchste Aktivität um Mitternacht erreicht wird. Melatonin und 5-HT aus der Retina synchronisieren die innere Uhr.

Ein wichtiger zur 5-HT-Synthese konkurrierender Stoffwechselweg ist der Kynureninabbauweg des Trps, der mit der Bildung der wichtigen Redoxmetaboliten NAD^+ und NADP^+ endet und über 95 % des Trps verbraucht (Gholson *et al.*, 1960). Der erste Schritt

ist dabei der geschwindigkeitsbestimmende, in dem die Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.42) und in der Leber die Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11) die Oxidation des Trps zum N-Formylkynurenin katalysiert. Damit ist auch gewährleistet, dass sich alle nachfolgenden Metaboliten, die toxisch sind, nicht akkumulieren können (Gal und Sherman, 1980). Aber auch andere Indolamine wie 5-HT und Melatonin können von der IDO und der TDO abgebaut werden und so indirekt die Nicotinamidsynthese beeinflussen. Denn Melatonin inhibiert IDO und TDO kompetitiv, während 5-HT diese Enzyme allosterisch hemmt, was besonders nachts zum tragen kommt, weil dann die Melatonin- und 5-HT-Spiegel im Gehirn erhöht sind (Walsh und Daya, 1997). Weiterhin kann Trp auch durch die AAAD zum Tryptamin decarboxyliert werden, das weiter zum Skatol oder Indol abgebaut wird (Ummadi und Weimer, 2001) und deshalb nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt. Tryptamin wirkt selbst als Botenstoff durch Bindung an die 5-HT-Rezeptoren, jedoch mit geringerer Affinität als 5-HT. Beschrieben ist bisher dessen kontrahierende Wirkung auf die glatte Muskulatur (Bosin *et al.*, 1976; Hixson *et al.*, 1977). Außerdem lässt die Expression von spezifischen Rezeptoren für Tryptamin im Gehirn, insbesondere des TA₄-Rezeptors auf die Rolle als Neurotransmitter oder Neuromodulator schließen (Baker *et al.*, 1977; Jones, 1982).

Der Abbau des 5-HTs (Abbildung I.3) erfolgt hauptsächlich durch Oxidation zum 5-Hydroxyindolacetaldehyd, katalysiert durch die Flavinadenindinukleotid (FAD) abhängigen Monoaminoxidasen A und B (MAO; EC 1.4.3.4), die sich in der äußeren Mitochondrienmembran befinden, mit nachfolgender schnellen weiteren Oxidation zur 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) durch die Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) abhängige Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH; EC 1.2.1.3). Die in die zerebrospinale Flüssigkeit (CSF) abgegebene 5-HIAA wird in den Blutkreislauf transportiert und über die Nieren ausgeschieden.

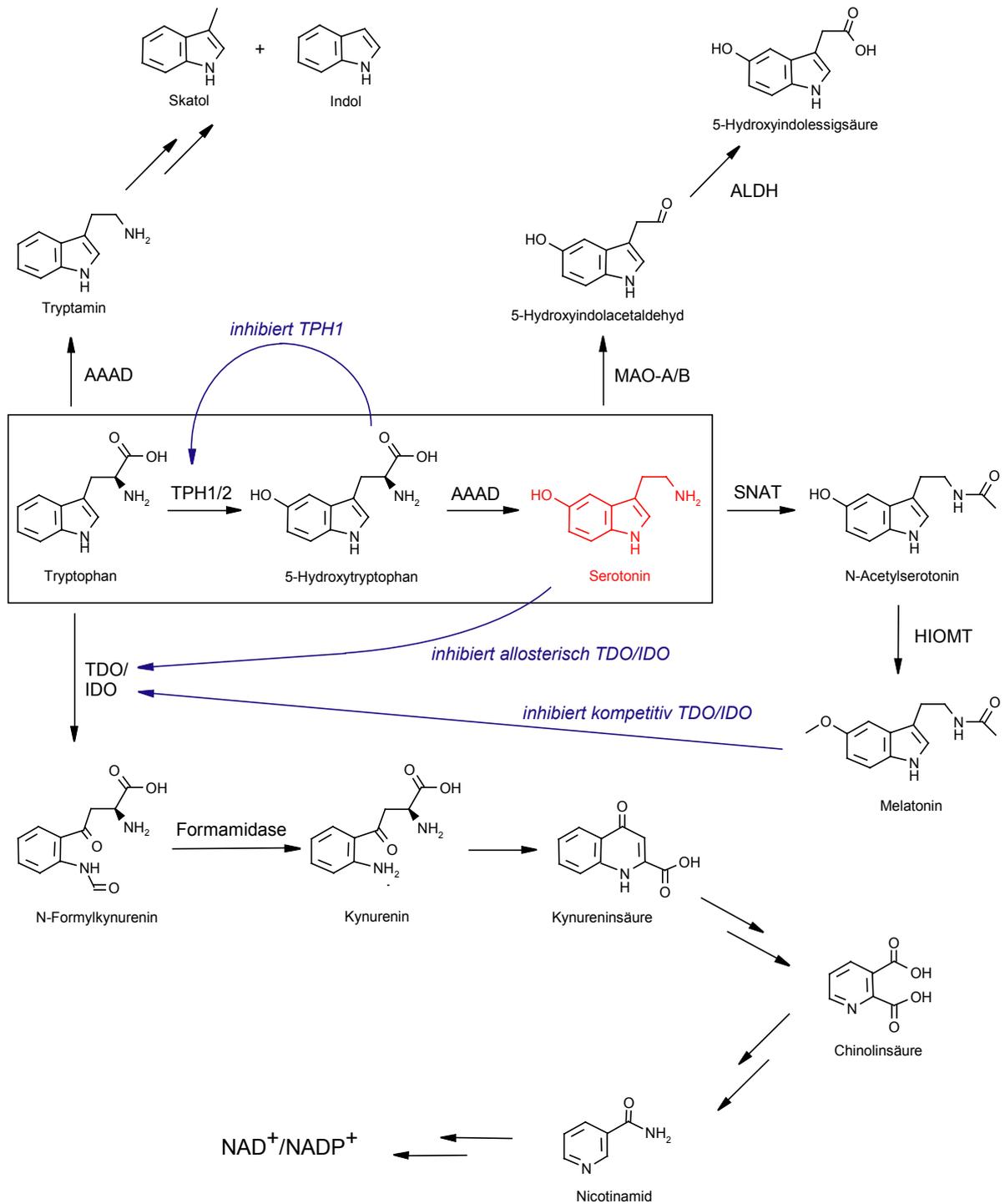


Abbildung I.3: Die 5-HT-Biosynthese und zusammenhängende biochemische Stoffwechselwege. Die 5-HT-Syntheseschritte sind eingerahmt. In der Peripherie inhibiert das Zwischenprodukt 5-Hydroxytryptophan rückkoppelnd die TPH1-Aktivität. 5-HT wird entweder zur 5-Hydroxyindolessigsäure abgebaut oder zu Melatonin umgesetzt. Die Melatoninsynthese läuft überwiegend in der Epiphyse ab. Die Ausgangssubstanz Tryptophan, wird außerdem direkt in Tryptamin umgesetzt, dem ebenfalls eine wichtige biologische Rolle zukommt. Tryptamin wird weiter zu Skatol und Indol abgebaut. Außerdem entstehen über den Kynureninabbauweg NAD^+ und NADP^+ , beides wichtige Redoxmetaboliten zahlreicher Stoffwechselwege. Interessanterweise wird der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Kynureninabbauweges sowohl durch 5-HT, als auch durch Melatonin inhibitorisch reguliert. Die Zwischenprodukte des Kynureninabbauweges, N-Formylkynurenin, Kynurenin, Kynurensäure und Chinolinsäure sind stark neurotoxische Substanzen. AAAD, Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase; ALDH, Aldehyd-Dehydrogenase; HIOMT, Hydroxyindol-O-Methyltransferase; MAO-A/B, Monoaminoxidase A/B; SNAT, Serotonin-N-Acetyl-Transferase; TDO/IDO, Tryptophan-/Indolamin-2,3-Dioxygenase, TPH1/2, Tryptophanhydroxylase 1 und 2.

1.3 Komponenten des serotonergen Systems

1.3.1 Transporter

Der Na⁺-abhängige Transporter für große neutrale Aminosäuren (LNAA, large neutral amino acid) befindet sich in Membranen der Endothelzellen von Kapillargefäßen, die im Gehirn die Blut-Hirn-Schranke bilden und gewährleistet den aktiven Transport der großen neutralen Aminosäuren Leucin, Isoleucin, Valin, Tryptophan, Tyrosin, Phenylalanin, Methionin, Alanin, Histamin und Threonin aus dem Blut in die extrazelluläre Flüssigkeit und in die Zelle (Leathwood, 1987; Salter *et al.*, 1989; O'Kane *et al.*, 2004). Unter normalen physiologischen Bedingungen ist der LNAA-Transporter gesättigt, und damit hängt die Verfügbarkeit jeder einzelnen Aminosäure, wie z.B. Trp von ihrem Konzentrationsverhältnis zu den anderen großen neutralen Aminosäuren im Blutplasma ab (Voog and Eriksson, 1982; Shulkin *et al.*, 1995). Auf diese Weise kann der LNAA-Transporter indirekt den 5-HT-Gehalt im Gehirn beeinflussen und spielt deshalb keine unbedeutende Rolle im 5-HT-Stoffwechsel (Abbildung I.4).

5-HT, wie auch die anderen Monoamine werden in Vesikel aufgenommen und gespeichert. Diese werden dann gezielt durch einen spannungsabhängigen Kalziuminflux infolge eines ankommenden Aktionspotentials in den synaptischen Spalt entleert, wo 5-HT spezifische Rezeptoren aktiviert. Auf diese Weise ist eine schnelle und präzise Signalweiterleitung gewährleistet. Die Aufnahme der Neurotransmitter in die Vesikel erfolgt als Protonen getriebener Antiport durch vesikuläre Monoamintransporter (VMAT). Der Protonengradient wird wiederum durch eine ATP abhängige Protonenpumpe aufrechterhalten und liefert so die notwendige Energie für den Transport (Abbildung I.5A). Der VMAT kommt in zwei Subtypen vor, VMAT1 vorwiegend in nichtneuronalen peripheren und VMAT2 in neuronalen Geweben (Weihe *et al.*, 1994; Peter *et al.*, 1995). Sie unterscheiden sich aber auch in ihrer Substrataffinität (Peter *et al.*, 1994) und ihrer Phosphorylierung durch endogene Kinasen (Krantz *et al.*, 1997).

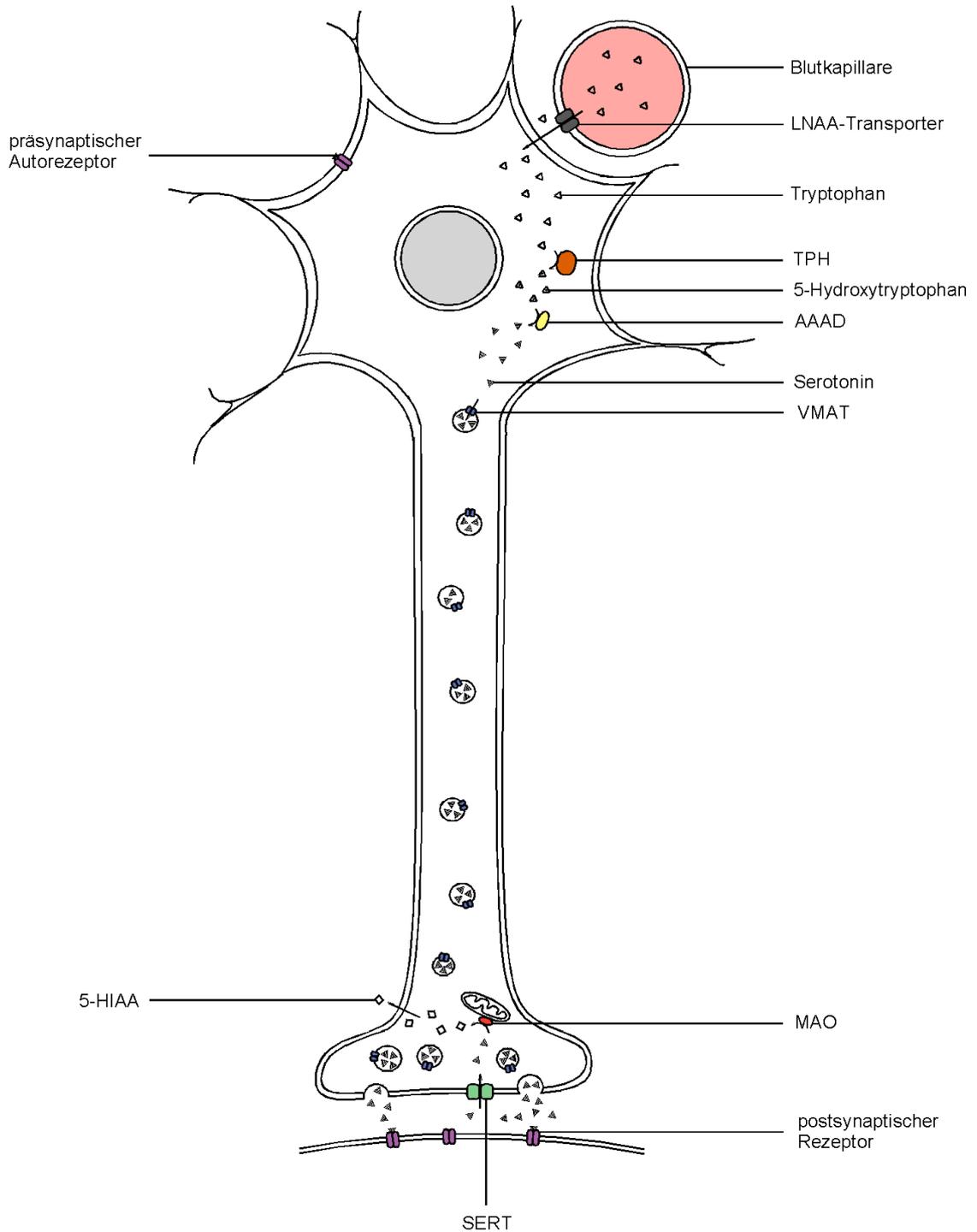


Abbildung I.4: Schematische Darstellung einer Nervenzelle mit Synapse als Beispiel einer serotonergen Zelle. Trp wird vom LNAA-Transporter durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert und von TPH im Zellkörper oder in den Axonendigungen zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) und dieses von der AAAD zu 5-HT umgesetzt, das in Vesikeln durch den VMAT aufgenommen und gespeichert wird. Beim Eintreffen eines Aktionspotentials werden die Speichervesikel in den synaptischen Spalt entleert. Dort wirkt 5-HT über spezifische Rezeptoren auf die Signaltransduktion postsynaptischer Neuronen ein, aber auch auf präsynaptische Autorezeptoren, wie dem 5-HT_{1A} -Rezeptor, und wird außerdem über den SERT wieder aufgenommen. Nur ein geringer Teil des 5-HTs diffundiert aus dem synaptischen Spalt ab. Ein großer Teil des präsynaptisch aufgenommenen 5-HTs wird zur Wiederverwendung in den Speichervesikeln aufgenommen, während ein weiterer Teil über mitochondriale MAO zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) verstoffwechselt und ausgeschieden wird. Durch die Wirkung von 5-HT auf präsynaptische 5-HT_{1A} -Autorezeptoren wird außerdem die TPH-Aktivität rückkoppelnd reguliert.

Eine wesentliche Rolle bei der Signaltransduktion durch 5-HT spielt der hoch affine plasmamembranständige Serotonintransporter (SERT, 5-HTT), der das in den synaptischen Spalt abgegebene 5-HT zusammen mit Natrium- und Chloridionen wieder ins Zytosol der Zelle transportiert und damit die Transmission beendet. Er kann aber auch überschüssiges 5-HT zusammen mit Kaliumionen aus der Zelle heraus transportieren (Abbildung I.6B). Auf diese Weise bestimmen die Plasmamembrantransporter die Dauer und Stärke der Signaltransduktion. Auch Zellen von 5-HT produzierenden peripheren Geweben exprimieren den SERT, insbesondere aber auch die Blutplättchen, die 5-HT aus dem Blut aufnehmen müssen, da sie es selbst nicht produzieren.

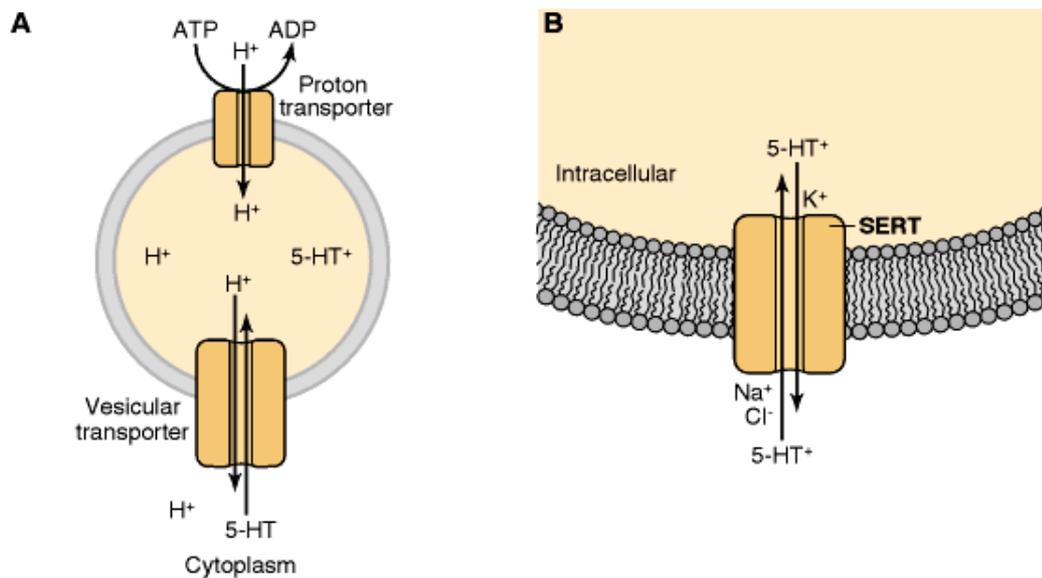


Abbildung I.5: (A) Schematische Darstellung des vesikulären Monoamintransporters (VMAT), der gleichzeitig 5-HT aus dem Zytosol in die Vesikel und Protonen aus den Vesikeln transportiert. Der Protonengradient wird durch den ATP-abhängigen Protonentransporter aufrechterhalten. (B) Schematische Darstellung des Serotonintransporters (SERT). Er transportiert 5-HT zusammen mit Natrium- und Chloridionen aus dem synaptischen Spalt in die Zelle, wobei Kaliumionen nach außen transportiert werden (modifiziert nach Siegel *et al.*, 1982).

Die Struktur der Monoamintransporter ist gut erforscht, weil sie ein maßgebliches Element der Neurotransmission und so die bevorzugten Angriffspunkte zahlreicher Psychopharmaka sind, wie selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) und trizyklische Antidepressiva, aber auch psychotroper Drogen wie Kokain und MDMA. Mit seinen zwölf Transmembrandomänen ähnelt der SERT denen der beiden verwandten Monoamintransporter des Dopamintransporters (DAT) und des Noradrenalintransporters (NAT) (Abbildung I.6).

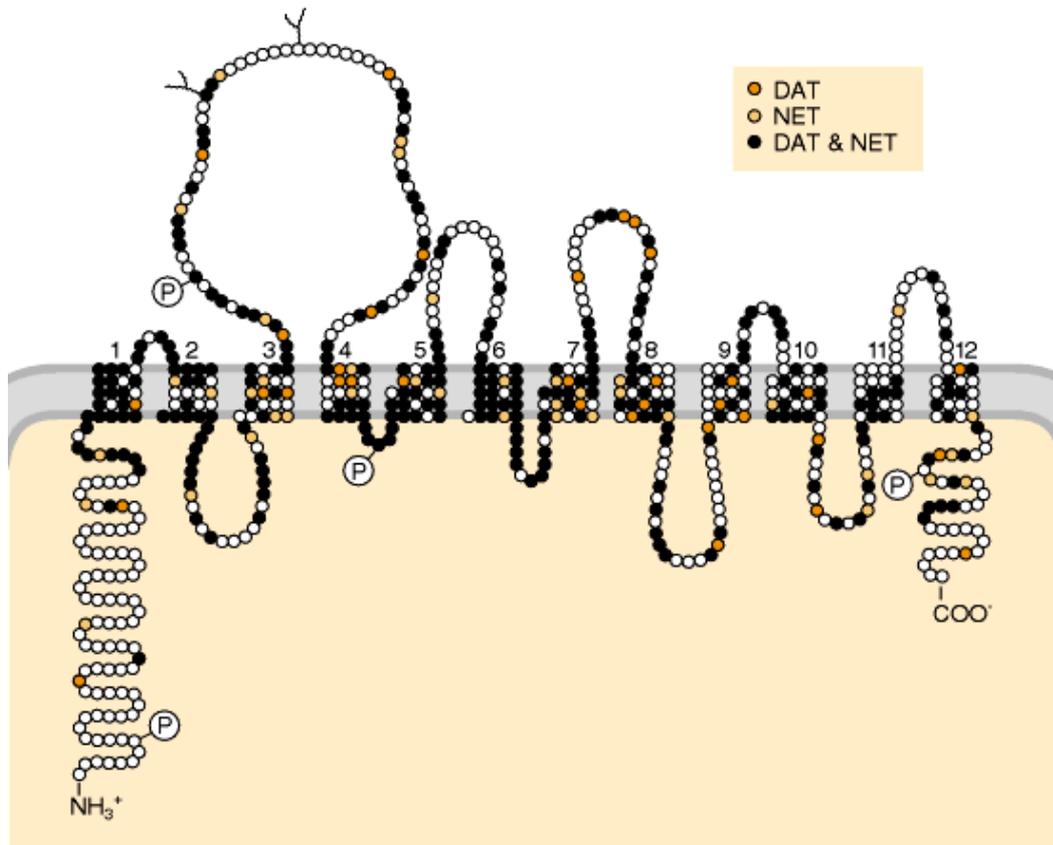


Abbildung I.6. Putative Struktur des Serotonintransporters (SERT) mit den 12 Transmembrandomänen. Dargestellt sind die homologen Aminosäuren mit dem Ratten-Dopamintransporter (DAT), dem humanen Noradrenalintransporter (NAT) oder beidem. Mögliche Phosphorylierungs- und Glukosylierungsstellen sind mit P bzw. Y gekennzeichnet (Siegel *et al.*, 1995).

1.3.2 5-HT-Rezeptoren (5-HTRs)

Einen wesentlichen Teil des serotonergen Systems bildet die große Familie der membrangebundenen 5-HT-Rezeptoren (5-HTRs), die die vielfältigen Wirkungen des 5-HTs vermitteln. Eingeteilt werden sie nach Strukturhomologien und Effektormechanismen in sieben Unterfamilien, wobei sechs zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit der typischen 7-Transmembrandomänenstruktur gehören und eine zur Unterfamilie der Liganden gesteuerten Ionenkanäle gezählt werden kann (Humphrey *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994; Hoyer und Martin, 1997). Posttranslationale Modifizierung (Phosphorylierung, Glykosylierung), entwicklungs- oder gewebsspezifisches RNA-Editing und Splicing erhöht noch die Anzahl der Rezeptoren auf über 30 und damit die Komplexität des serotonergen Systems (Abb. I.7).

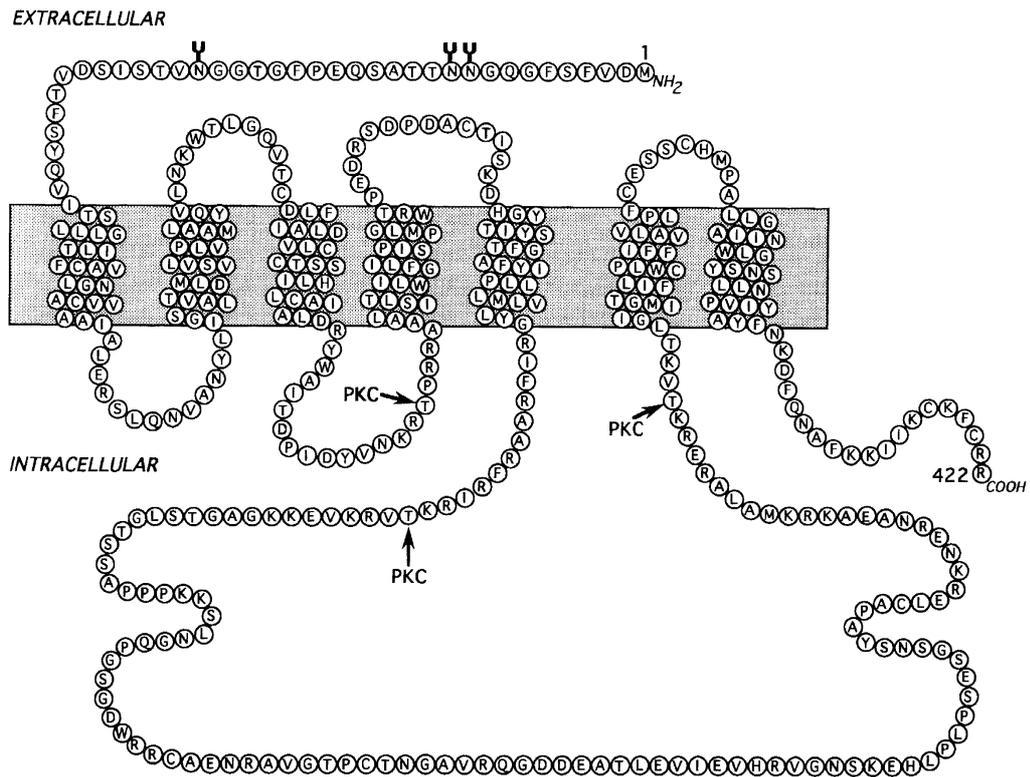


Abbildung I.7: Modell der Transmembran-Topologie von 5-HT-Rezeptoren am Beispiel des 5-HT_{1A}-Rezeptors (aus Albert *et al.*, 1990). Konsensus-Stellen für die Phosphorylierung durch Proteinkinase C (PKC) und für N-Glykosylierung (Y) sind angegeben.

Die G-Protein gekoppelten 5-HTRs sind entweder an stimulierenden (5-HT₄, 5-HT₆, 5-HT₇) oder inhibierenden G-Proteinen (G_s/G_i) gekoppelt (5-HT₁, 5-HT₅) und bewirken damit eine Aktivierung bzw. Hemmung der Adenylat-Cyclase, was wiederum zur Aktivierung/Hemmung der Proteinkinase A führt. Oder sie sind wie die drei 5-HT₂-Rezeptoren an G_q-Proteine gekoppelt und damit am Phospholipase C-Signalweg beteiligt, der letztlich zur Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und zur Aktivierung der Proteinkinase C führt (Raymond *et al.*, 2001; Abbildung I.8).

Durch unterschiedliche Affinitäten zum 5-HT und den in den 1970er Jahren entwickelten Radioliganden konnte die Verteilung der einzelnen Rezeptoren in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. So empfangen z.B. im Gehirn alle Typen von Nervenzellen serotonerge Signale, aber auch Gliazellen, Endothelzellen und endokrine Zellen (Tabelle I.2).

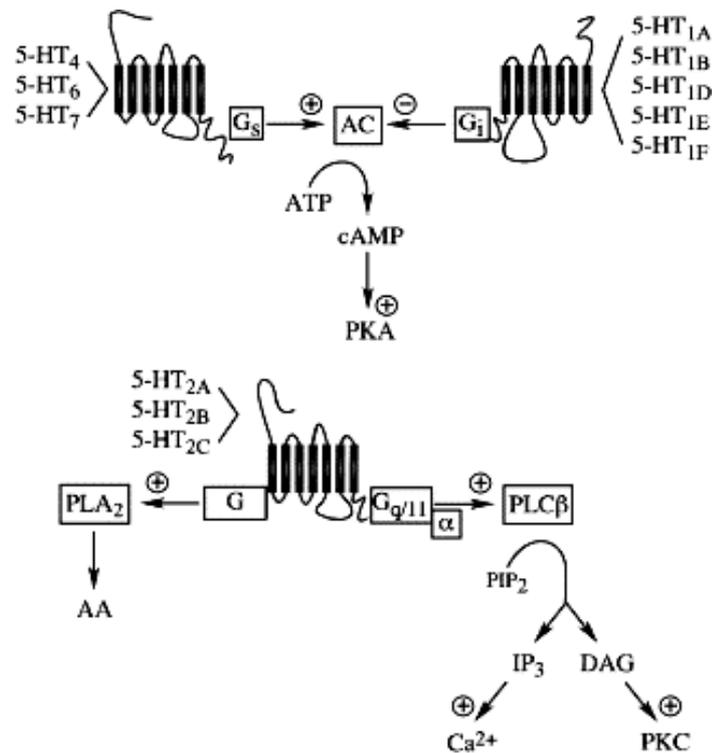


Abbildung I.8: Einteilung der G-Protein gekoppelten 5-HT-Rezeptoren nach ihrem Downstream-Effektor-System. 5-HT₁-Rezeptoren inhibieren Adenylylcyclase (AC) durch G-Proteine der G_i-Familie, während 5-HT₄-, 5-HT₆- und 5-HT₇-Rezeptoren AC durch G-Proteine der G_s-Familie stimulieren. Die Aktivierung von AC resultiert in einer erhöhten Produktion von cAMP, was zur Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) führt. 5-HT₂-Rezeptoren aktivieren Phospholipase Cβ (PLCβ) durch G-Proteine der G_{q/11}-Familie resultierend in Akkumulation von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). Die Generierung von IP₃ führt zu einer Erhöhung von intrazellulären Ca²⁺-Level, während DAG die Ca²⁺- und Phospholipid-abhängige Proteinkinase C (PKC) aktiviert. 5-HT₂-Rezeptoren aktivieren auch Phospholipase A₂ (PLA₂) durch G-Proteine, was zu einer Akkumulation von Arachidonsäure (AA) führt (aus Raymond *et al.*, 2001).

Es können auch verschiedene Rezeptoren, die gegensätzliche Effekte vermitteln auf einer Nervenzelle vorkommen, wie z.B. der 5-HT_{1A}-Rezeptor, der sehr geringe 5-HT-Konzentrationen detektiert und das Feuern der Nervenzelle unterdrückt und der 5-HT_{2A}-Rezeptor, der erst bei einer etwa 1000mal höheren 5-HT-Konzentrationen anspricht und erregend auf die Nervenzelle wirkt. Auch Pharmaka und Drogen vermitteln so durch ihre spezifischen Bindungsaffinitäten zu den 5-HT-Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen. So werden z.B. 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wie Bupiron als Anxiolytika eingesetzt während 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten wie LSD halluzinogen wirken (Azmita, 2000). Dabei ist zu bemerken, dass durch die Vielzahl der Rezeptorsubtypen und die Verteilung eines Subtyps im ganzen Körper, Pharmaka nie einen isolierten Effekt zeigen.

Tabelle I.2: Die Verteilung und physiologische Rolle von 5-HT-Rezeptoren

Rezeptor	Verteilung	Physiologische Rolle
5-HT _{1A}	ZNS (Raphe nuclei, Hippokampus, Amygdala, Septum, Entorhinalkortex, Hypothalamus), Darm (myenterischer Plexus), Milz	Autorezeptor (inhibiert Neurotransmission), <u>Agonist</u> : wirkt hypotensiv, antidepressiv, anxiolytisch, senkt Herzfrequenz
5-HT _{1B}	ZNS, Vaskulatur	terminaler Autorezeptor (präsynaptische Autoinhibierung), vermittelt Proliferation, <u>Agonist</u> : inhibiert Plasmavasation, gegen Migräne
5-HT _{1D}	ZNS (Substantia nigra, Basalganglien, superior Colliculus), Herz	Autorezeptor, <u>Agonist</u> : wirkt gegen Migräne
5-HT _{1E}	ZNS (Frontalkortex)	unbekannt
5-HT _{1F}	ZNS (Kortex, Hippokampus, Striatum, Gyrus dentatus, Nucleus taktus solitarius, Riechkolben, Rückenmark), Uterus	Autorezeptor, <u>Agonist</u> : wirkt gegen Migräne
5-HT _{2A}	ZNS (Kortex, Claustrum, Striatum, Nucleus accumbens), glatte Muskulatur, Thrombozyten	kontrahiert Blutgefäße, Harnwege, Darm, Uterus, erhöht Kapillarpermeabilität, vermittelt Thrombozytenaggregation
5-HT _{2B}	ZNS(Cerebellum, Kortex, Amygdala, Caudate, Substantia nigra, Hypothalamus, Thalamus, Retina), Darm, Herz, Niere, Lunge, Vaskulatur, Endothelzellen von Lungenarterien	kontrahiert glatte Muskulatur, Vasorelaxation über NO-Freisetzung
5-HT _{2C}	ZNS (Plexus choroidei, Globus pallidus, Kortex, Hypothalamus, Septum, Substantia nigra, Rückenmark)	<u>Agonist</u> : wirkt anxiolytisch
5-HT _{3A} 5-HT _{3B} 5-HT _{3C}	ZNS (Hippokampus, Entorhinalkortex, Nucleus accumbens, Nucleus motorius dorsalis, Amygdala, Area postrema, Nucleus taktus solitarius, Rückenmark), periphere autonome und sensorische Neurone	Ionenkanaluntereinheiten, bewirkt schnelle Depolarisation durch Na ⁺ - und K ⁺ -influx, Darmmotilität, intestinale Sekretion
5-HT ₄	ZNS (Hippokampus, Striatum, Substantia nigra, Pre-Bötzinger-Komplex), Darm, Blase, Nebenniere, Herz	verstärkt Neurotransmission und Gedächtnisbildung durch erhöhte Transmitterfreisetzung, kontrahiert Darm und Oesophagus durch ACh-Freisetzung, vermittelt Sekretion im Darmlumen, kontrolliert Atmung; <u>Agonist</u> : gastroprokinetisch, verstärkt Herzkontraktion (Vorhof)
5-HT _{5A} 5-HT _{5B}	ZNS (Kortex, Cerebellum, Septum, Corpus callosum, Hypothalamus, Hippokampus, Fimbria, cerebrale Ventrikel, Riechkolben, Nuclus raphe dorsalis, Gliazellen)	Einfluss auf adaptives Verhalten bei Stress
5-HT ₆	ZNS (Striatum, Amygdala, Nucleus accumbens, Hippocampus, Cortex)	Einfluss auf Verhalten und Lernen <u>Antagonist</u> : erhöht ACh-Neurotransmission
5-HT ₇	ZNS (Kortex, Septum, Hypothalamus, Thalamus, Amygdala, superior Colliculus), glatte Muskulatur	Vasodilatation

2 5-HT IM NERVENSYSTEM

2.1 Anatomie des neuronalen serotonergen Systems

Die entwicklungsgeschichtlich ältesten Nervenzellen des Gehirns sind retikuläre Neuronen im Hirnstamm, die groß und stark verzweigt sind und Informationen von Sinnesorganen empfangen. Einige von ihnen, weniger als eine Million, sind 5-HT produzierend und ordnen sich als neun Gruppen (bezeichnet mit B1 bis B9 nach Dahlström und Fuxe, 1964) in oder nahe der sagittalen Mittellinie oder Raphe-Region an, wie in Abschnitt I.1.1 für das Rattenhirn beschrieben wurde. Sie können in zwei großen Gruppen von Kernen eingeteilt werden, den superior gelegenen, die ins Vorderhirn projizieren und den inferior gelegenen, die ins Rückenmark projizieren (Azmita, 2000). Die superior im Mittelhirn gelegene Gruppe besteht aus vier Kernen (Törk, 1990):

1. der *caudale lineare Nucleus* (CLN; B8),
2. der *mediane raphe Nucleus* (MnR, *nucleus centralis superior*; B8, B5),
3. der *dorsale raphe Nucleus* (DRN; B7, B6) und
4. Neuronen der *supralemniscalen* Region (B9).

Während die inferior in *Pons* und *Medulla* gelegene Gruppe fünf Kerne umfasst:

1. der *Nucleus raphe obscurus* (NRO; B2),
2. der *Nucleus raphe pallidus* (NRPa; B1, B4),
3. der *Nucleus raphe magnus* (NRMa; B3),
4. Zellkörper in der *ventrolateralen Medulla*, das sind der *laterale paragigantocelluläre Nucleus* (LPGN; B3) und die intermediären *retikulären Nuclei* (IRN; B1, B3) und
5. Neuronen der *Area postrema*.

Von den Kernen des Mittelhirns steigen hauptsächlich zwei unterschiedlich ausgeprägte massive Projektionen auf. Das sind zum einen die dem *dorsalen raphe Nucleus* entstammenden Fasern vom D-Typ mit sehr feinen und sich stark verzweigenden Axonen und zahlreichen Varikositäten. Diese führen hauptsächlich ins *Striatum*, in den *Motorcortex* und in den *Neocortex*. Zum anderen sind das Fasern vom M-Typ mit dicken Axonen und wenigen großen runden Varikositäten und gut ausgebildeten Synapsen. Sie besitzen aber im Gegensatz zu den Typ-D-Fasern keinen SERT, was sie resistenter gegen neurotoxische Substanzen, wie z.B. MDMA („Ecstasy“) und MDA macht, die dort angreifen. Ihren Ursprung haben diese Fasern im *medianen raphe Nucleus* und projizieren in den *Hippocampus*, ins *Septum*, den *Hypothalamus* und ebenfalls in den *Neocortex*. Weitere Projektionen der Rapheneuronen

führen in die *Amygdala* und die *Substantia nigra*. Die anderen Raphe-Kerne (B1 bis B4) besitzen weniger Neuronen und projizieren in den Hirnstamm selbst, ins Kleinhirn und in drei absteigenden Bahnen ins Rückenmark. Außerdem sind die Raphe-Kerne auch untereinander mit Axonen verbunden (Molliver, 1987). Die massiven axonalen Projektionen dieser wenigen Zellen bilden damit das umfangreichste Neurotransmittersystem im ZNS (Abbildung I.9). Erklärt werden kann das mit der sehr frühen Bildung dieser Neuronen während der Gehirnentwicklung und dem hohen Grad der Verzweigungen. So beginnen sie schon ab der neunten embryonalen Woche mit dem Kolonisieren des menschlichen Gehirns. Dabei sprechen sie auf eine Vielzahl von trophischen Faktoren an, die ihr Wachstum stimulieren und modulieren können.

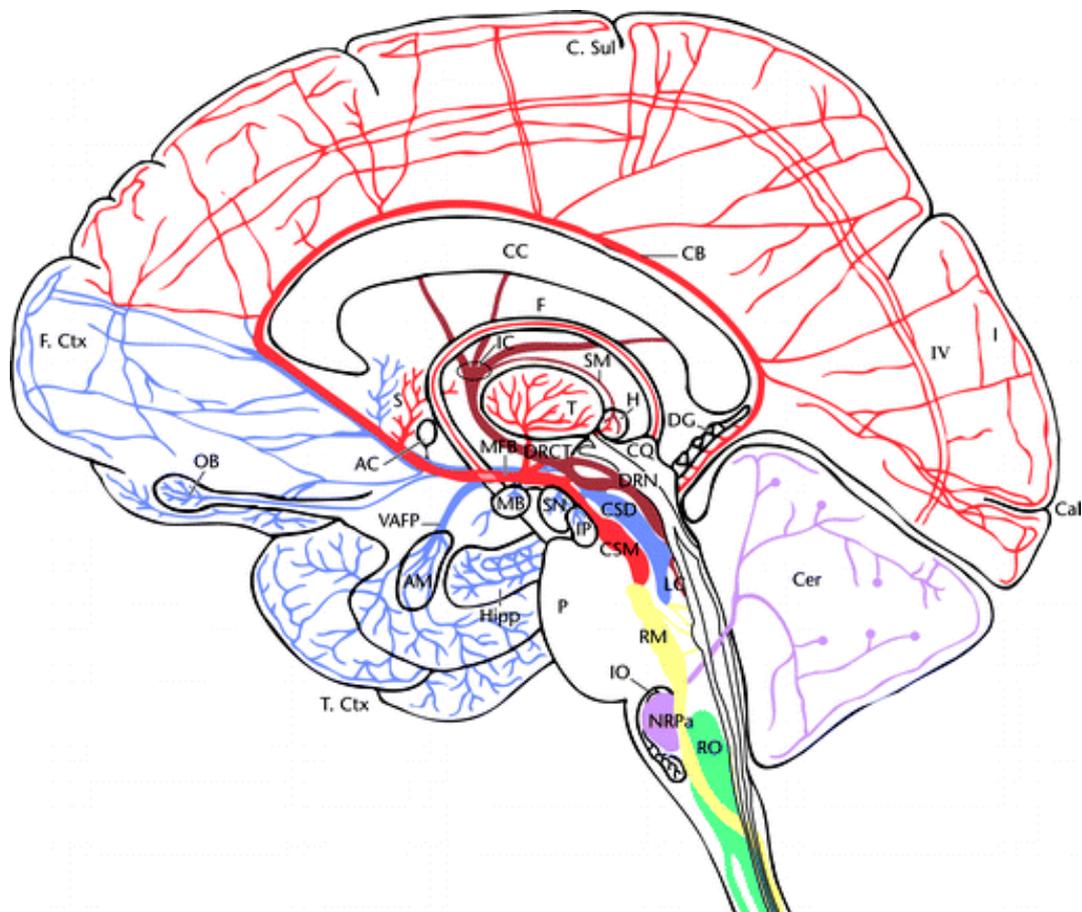


Abbildung I.9: Die Projektionen der serotonergen Zellkerne ins menschliche Gehirn und Rückenmark. AC: anterior colliculus; AM: anterior amygdala; C. Sul: central sulcus; Cal: calcarine cortex; CB: cingulum bundle; CC: corpus callosum; Cer: cerebellum; CQ: corpus quadrigemini; CSD: nucleus central superior, pars dorsalis; CSM: nucleus central superior, pars medialis; DG: dentate gyrus; DRCT: dorsal raphe cortical tract; DRN: dorsal raphe nucleus; F: fornix; F. Ctx: frontal cortex; H: habenula; Hipp: hippocampus; I: layer I of cortex; IC: inferior colliculus; IO: inferior olive; IP: interpeduncular nucleus; IV: fourth ventricle; LC: locus coeruleus; MB: mammillary body; MFb: medial forebrain bundle; NRPa: nucleus raphe pallidus; OB: olfactory bulb; P: pons; RM: raphe magnus; RO: nucleus raphe obscurus; S: septum; SM: stria medularis; SN: substantia nigra; T: thalamus; T. Ctx: temporal cortex; VAFP: ventroanterior forebrain pathway. (aus Azmitia, 2001)

2.2 Funktionen und Dysfunktionen des neuronalen serotonergen Systems

2.2.1 Neuronale Ontogenese

Die ersten Neurotransmitter synthetisierenden Zellen, die sich differenzieren, sind serotonerge Neuronen, die dann die Raphe Kerne bilden. Sie entstehen in der Maus an Embryonaltag 10 bis 12, bei Primaten im ersten Entwicklungsmonat (Levitt und Rakic, 1982). Eine entscheidende Rolle kommt dabei dem Transkriptionsfaktor Pet-1 zu, der selektiv nur dort exprimiert wird und die Transkription von TPH und des SERT kontrolliert (Hendricks *et al.*, 2003). Voll ausgereift ist das axonale Netzwerk aber erst kurz nach der Geburt und wird dann sequenziell abgebaut (Lidov und Molliver, 1982a, 1982b; D'Amato *et al.*, 1987; Rhoades *et al.*, 1990). Mit diesem Zeitverlauf korrelieren auch die Konzentrationen von 5-HT im Gehirn, die beim Menschen in den ersten beiden Lebensjahren maximal sind und dann bis zum 5. Lebensjahr auf das Niveau von Erwachsenen absinken (Hedner *et al.*, 1986; Toth und Fekete, 1986).

5-HT spielt bei diesen Prozessen selbst eine regulative Rolle in der neuronalen Proliferation, Migration und Differenzierung, und es verhindert außerdem den apoptotischen Zelltod (Vitalis *et al.*, 2003). So zeigen Mäuse, deren 5-HT-Spiegel pränatal durch PCPA erniedrigt wurde eine verzögerte Differenzierung von Zellen in serotonergen Projektionsgebieten (Lauder und Krebs, 1978; Lauder *et al.*, 1985). 5-HT dient also als Differenzierungssignal, das die neuronale Genese von Zellenpopulationen reguliert, in die serotonerge Fasern innervieren und so 5-HT seine eigenen Schaltkreise aufbaut (Lauder *et al.*, 1981; Lauder *et al.*, 1982). Dagegen zeigen transgene MAOA- oder SERT-defiziente Mäuse mit sieben- bis neunfach erhöhtem 5-HT-Spiegel eine unvollständige Clusterbildung und Segregation der thalamocorticalen Fasern und die Axone sind weniger verzweigt (Cases *et al.*, 1996; Rebsam *et al.*, 2002; Persico *et al.*, 2003). Vermittelt werden diese Signale vor allem durch den 5-HT_{1A}-Rezeptor, der früh und stark exprimiert, die Reifung und Differenzierung der Neuronen fördert und den 5-HT_{2A}-Rezeptor, der Proliferation, Synaptogenese und Apoptose induziert (Azmita, 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass 5-HT die morphologische Gestaltung des Gehirns entscheidend beeinflusst (Lauder, 1990), aber auch in der Organogenese, beispielsweise der Augen, eine wichtige Rolle spielt (Khozhai *et al.*, 1995).

2.2.2 Einfluss auf das Verhalten

Auf Grund der umfangreichen Verteilung der serotonergen Projektionen über das gesamte Gehirn ist davon auszugehen, dass auch die meisten Gehirnfunktionen serotonergen Steuerungen unterliegen. So sind zahlreiche Untersuchungen beschrieben, in denen das serotonerge System beeinflusst wird, um aus physiologischen oder Verhaltensänderungen auf die Funktion zu schließen. Hinweise liefern vor allem pharmakologische Untersuchungen, in denen der 5-HT-Spiegel im Gehirn verändert wurde, aber auch Liganden von 5-HT-Rezeptoren.

Um eine Deletion von 5-HT zu erreichen, wurde in verschiedenen Studien das neurotoxische 5,7-DHT i.c.v. appliziert, was die 5-HT-Innervierung des Kortex zerstört. Die Verwendung des TPH-Inhibitors PCPA i.p. führt zur Reduktion von 5-HT und 5-HIAA im *Frontalkortex*, *Hippokampus* und *Striatum* um bis zu 95 %. Dabei zeigte sich bei Ratten eine Angstreduktion im Elevated-Plus-Maze-Test durch ein erhöhtes Verhältnis der Aufenthalte im offenen Arm zur Summe der Aufenthalte im geschlossenen und offenem Arm (Briley *et al.*, 1990), aber keine Veränderung im Open-Field-Test, der die lokomotorische Aktivität und das Explorationsverhalten anzeigt (Nazar *et al.*, 1999). Die Behandlung von Ratten mit PCPA erhöht außerdem die Schmerzempfindlichkeit (Steinman *et al.*, 1987). Andererseits können diese Symptome durch Gabe der 5-HT-Vorläufersubstanz 5-HTP, was den 5-HT-Spiegel erhöht, wieder rückgängig gemacht werden und bei nicht vorbehandelten Tieren anxiogen wirken (Artaiz *et al.*, 1998).

Eine andere Methode den 5-HT-Spiegel zu manipulieren besteht darin, den Trp-Anteil in der Nahrung zu eliminieren bzw. zu erhöhen. So führt dies beim Menschen zu erhöhter Erregbarkeit, Hyperreflexie und Aggression. Außerdem werden Lerndefizite und Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus' beobachtet (Young und Leyton, 2002).

Studien an Primaten und Mäusen zeigten auch Änderungen im Sozialverhalten. So führte eine Verringerung des 5-HT-Spiegels ebenfalls zu gesteigerter Aggression und unsozialem Verhalten, während eine erhöhte serotonerge Funktion nicht nur Aggressionen vermindert, sondern auch das Zugehörigkeitsverhalten wie gegenseitiges Putzen fördert (Chamberlain *et al.*, 1987; Raleigh *et al.*, 1980, 1991; Kantak *et al.*, 1980; Raleigh und McGuire, 1991).

Weiterhin ist 5-HT verknüpft mit Dominanz- und Unterwürfigkeitsverhalten. In Gruppen von Grünen Meerkatzen zeigt das Alpha-Männchen hohe 5-HT-Konzentrationen in Blutplättchen und im Gehirn, und diese Spiegel fallen, wenn die Dominanz verlorenght. Umgekehrt führt eine steigende Hirn-5-HT-Funktion zur Erlangung der Dominanz der Männchen (Raleigh und

McGuire, 1991). In gesunden Menschen verursacht zusätzlich verabreichtes Tryptophan relativ zu Placebo eine Reduzierung von streitsüchtigem Verhalten und ein verstärktes Dominanzverhalten (Moskowitz *et al.*, 2001).

Bei männlichen Ratten, denen elektrolytische Läsionen der medianen Raphe-Kerne zugeführt wurden, konnte ein dämpfender Einfluss auf das Sexualverhalten festgestellt werden. So zeigten diese Tiere eine kürzere Kopulationszeit und damit eine erleichterte, schnellere Ejakulation und ein kürzeres Postejakulationsintervall (Albinsson *et al.*, 1996).

Bei diesen pharmakologischen Studien müssen jedoch unspezifische Wirkungen mit in Betracht gezogen werden, die die Ergebnisse der jeweiligen Studie verfälschen können. Dennoch zeigt die Vielzahl der Versuche, dass das serotonerge System mehr modulierend und ausgleichend auf das Verhalten wirkt, als dass es das Verhalten selbst bestimmt.

2.2.3 Neurologische und psychiatrische Erkrankungen

Wegen der bedeutenden Rolle des serotonergen Systems im ZNS werden auch viele neurologische und psychiatrische Erkrankungen mit einer serotonergen Dysfunktion in Verbindung gebracht. So wurde schon vor rund 40 Jahren festgestellt, dass Depressionen und Suizidverhalten mit einem niedrigen 5-HT-Spiegel assoziiert sind. Diese 5-HT- oder Monoaminhypothese wird durch die Wirkungsweise von Antidepressiva unterstützt, denn sie führen zu einer Erhöhung der serotonergen bzw. monoaminergen Neurotransmission, indem sie den 5-HT-Abbau hemmen (reversible und irreversible MAO-Hemmer) oder die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt durch Hemmung des SERT blockieren (SSRIs und trizyklische Antidepressiva) und so die Monoaminkonzentration dort erhöhen (Dewhurst und Pare, 1961; Akiskal und McKinney, 1973; Lesch und Beckmann 1990; Rosa-Neto *et al.*, 2004).

Auch bei Zwangserkrankungen (Murphy *et al.*, 1989), Angst- und Panikstörungen (Jann und Kurtz, 1987; Bell und Nutt, 1998) sowie bei der Borderline-Persönlichkeitsstörung, das durch erhöhte Impulsivität und Selbstverletzungstendenz gekennzeichnet ist (Winchel und Stanley, 1991; Higley und Linnoila, 1997; Goodman und New, 2000), wird eine Störung des serotonergen Systems angenommen, denn auch sie können erfolgreich mit SSRIs behandelt werden, wobei bei Angsterkrankungen der 5-HT_{1A}-Autorezeptor involviert ist und deshalb auch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wie Buspiron als Anxiolytika eingesetzt werden.

Eine verminderte serotonerge Transmission wurde auch mit Essstörungen wie Adipositas und Bulimie in Verbindung gebracht, weil Appetitzügler wie Dexfenfluramin und Sibutramin die synaptische 5-HT-Konzentration erhöhen und die Nahrungsaufnahme durch Beeinflussung des Sättigungsgefühls unterdrücken. In diesem Prozess der Energiehomöostase scheint insbesondere der 5-HT_{2C}-Rezeptor eine entscheidende Rolle zu spielen, wie Gewichtszunahme und verstärkte Nahrungsaufnahme von 5-HT_{2C}-KO-Mäusen aufzeigen (Leibowitz und Alexander, 1998; Nonogaki *et al.*, 1998; Abschnitt I.5).

Alkoholismus geht ebenfalls mit einem reduzierten 5-HT-Spiegel einher, wie er zum einen in Gehirnen von gezüchteten Mäusen oder Ratten, die zu erhöhter Alkoholpräferenz neigen und zum anderen in genetisch veranlagten Alkoholikern zu finden sind. Dazu passen auch Verhaltensmerkmale wie erhöhte Aggressivität, verminderte Impulskontrolle und Depressivität (Badawy, 1999; Abschnitt I.2.2.2).

Ähnlich wie für die Alkoholabhängigkeit kann auch eine verstärkte Tendenz zur Selbstverabreichung und Missbrauch von Drogen mit einer reduzierten serotonergen Neurotransmission assoziiert werden, wobei zwischen den einzelnen Drogen unterschieden werden muss. Stimulierende Drogen wie z.B. MDMA („Ecstasy“), Methamphetamin und Kokain bewirken eine nichtvesikuläre Freisetzung von 5-HT und/oder Noradrenalin, was zu einem euphorischen Gefühl führt, langfristig aber die serotonergen Fasern schädigen kann. Halluzinogene wie LSD und Psilocybin dagegen wirken spezifisch als 5-HT_{2A}-Rezeptor-Agonisten.

Diese durch den 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelten Halluzinationen führten auch zur Hypothese, dass auch psychotische Erkrankungen wie Schizophrenie mit Störungen des serotonergen Systems zusammenhängen. Konsistent damit sind die gefundenen verringerten Dichten des 5-HT_{2A}-Rezeptors im Kortex oder auch ein Polymorphismus im 5-HT_{2A}-Rezeptor-Gen von Schizophrenen und die antipsychotische Wirkung von 5-HT_{2A}-Rezeptor-Antagonisten wie zum Beispiel Clozapin (Dean und Hayes, 1996; Williams *et al.*, 1996).

Es gibt weiterhin Hinweise einer verringerten serotonergen Funktion bei Demenzerkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit, bei Chorea Huntington (Yohrling *et al.*, 2002), bei Autismus (Chugani, 2002) und beim Downsyndrom, die aber vermutlich auf Störungen in der pränatalen Entwicklung des serotonergen Systems zurückzuführen sind (Whitaker-Azmitia, 2001).

Neben Depressionen ist die Migräne mit einer Prävalenz von 10 % in der westlichen Welt, eine der häufigsten Krankheiten, die mit einer verminderten serotonergen Funktionen in Verbindung stehen (Lipton *et al.*, 2002; Jones und Blackburn, 2002). Dabei scheint es

während einer Migräneattacke zu einem Sinken des 5-HT-Spiegels mit begleitender Vasodilatation der arteriellen Hirngefäße zu kommen. Die Rolle von 5-HT bei Migräne wird auch deutlich durch die hohe Effizienz der Triptane oder auch durch i.v. Applikation von 5-HT selbst bei Behandlung der akuten Migräne. Triptane bewirken selektiv als Rezeptor-Agonisten über den 5-HT_{1B}-Rezeptor eine Vasokonstriktion im externen Karotiskreislauf und über die 5-HT_{1D}- und 5-HT_{1F}-Rezeptoren eine Hemmung der trigeminovaskulären Entzündung und beenden so die Migräneattacke (Villalon *et al.*, 2003).

3 5-HT IN DER PERIPHERIE

3.1 Funktionen und Dysfunktionen des peripheren serotonergen Systems

3.1.1 Präneuronale Ontogenese

Bereits in den 1950er und 1960er Jahren wurden Neurotransmitter wie Acetylcholin und Monoamine in frühen Stadien der Embryonalentwicklung von Wirbellosen (Seeigel, Seesterne) und Wirbeltieren (Fische, Amphibien) gefunden (Numanoi *et al.*, 1953; Koshtoyants, 1963). Insbesondere 5-HT scheint schon in der befruchteten Eizelle die erste Zellteilung zu kontrollieren (Renaud *et al.*, 1983), es hat weiterhin Anteil an Zellbewegungen während der Gastrulation (Colas *et al.*, 1999a, 1999b) und bei der meiotischen Oozytenreifung (Cerdea *et al.*, 1998) und spielt auch eine Rolle bei der Interaktion der Gameten während der Befruchtung (Leclerc *et al.*, 2000). Aber auch in späteren Stadien der Embryogenese von Säugern führt die Hemmung der 5-HT-Synthese zu abnormaler Organogenese, speziell in der Entwicklung des Gehirns, der Augen, der Kiefer und des vaskulären Systems (Khozhai *et al.*, 1995).

3.1.2 Hämostase und Blutgerinnung

Bei Verletzungen der Vaskulatur kommt es dort zum Ausschütten von 5-HT und ADP durch aktivierte Thrombozyten. Dies bewirkt teilweise synergistisch über 5-HT_{1A}-, 5-HT₂- und Purinorezeptoren eine Vasokonstriktion, weshalb 5-HT offensichtlich eine signifikante Rolle in der Hämostase zukommt (Soslau *et al.*, 1997).

Die Rolle von 5-HT in der Hämostase konnten Untersuchungen an *beige*-Mäusen, einer spontanen Mutante der Linie C57BL/6, weiter aufhellen. Deren Thrombozyten weisen eine verminderte 5-HT-Aufnahme und Speicherkapazität (SPD) auf, begleitet von längeren Blutungszeiten, die durch Behandlung mit 5-HT normalisiert werden können (Holland, 1976). Nicht verändert sind jedoch die Blutgerinnungszeiten und die Anzahl der Thrombozyten. Aggregationsstudien mit Thrombozyten dieser Tiere zeigten auch, dass verschiedene Effektoren wie Collagen, Thrombin, Kalzium-Ionophore und PMA nur stark verminderte Aggregation auslösen konnten (Pratt *et al.*, 1991).

Bei der Anwendung von SSRI-Antidepressiva sind in einigen seltenen Fällen ernsthafte Blutungs-Komplikationen als Nebenwirkung bekannt geworden, die auf die behandlungsbedingt erniedrigten Plasma- und Thrombozyten-5-HT-Spiegel zurückgeführt werden können (Goldberg, 1998; Bottlender *et al.*, 1998). Komplikationen der Hämostase treten auch bei akutem und chronischem renalen Versagen auf. So ist das Nephrotische Syndrom ebenfalls durch stark erniedrigte 5-HT-Blutkonzentrationen mit signifikanter Thrombozyten-SPD und den einhergehenden Blutungsrisiken gekennzeichnet (Malyszko *et al.*, 1996a und 1996b).

Die Wirkungsweise von 5-HT in der Hämostase ist bisher nicht vollständig verstanden. Bekannt ist, dass physiologisch relevante 5-HT-Konzentrationen Endothelzellen *in vitro* zur Ausschüttung des von-Willebrand-Faktors (Faktor-VIII-assoziiertes Antigen) stimulieren (Palmer, 1994), der innerhalb der Blutgerinnungskaskade potenzierend wirkt, aber auch die Thrombozytenadhäsion an der subendothelialen Matrix beschleunigt.

Für die Thrombozytenaggregation scheint eine Aktivierung des G_q-Protein gekoppelten 5-HT_{2A}-Rezeptors erforderlich zu sein, der als einziger serotonerger Rezeptor auf der Thrombozytenmembran zu finden ist (Killam und Cohen, 1991). Das hat eine intrazelluläre Ca²⁺-Mobilisierung und PKC-Aktivierung zur Folge (Offermanns *et al.*, 1997). Diese hohen zytosolischen 5-HT- und Ca²⁺-Konzentrationen gehen einher mit einer Serotonylierung von kleinen GTPasen, die dadurch konstitutiv aktiviert werden und zur α-Granula-Sekretion führen (Walther *et al.*, 2003b).

3.1.3 Zellvermittelte Immunantwort

Im Immunsystem besitzt 5-HT wichtige Funktionen. Es ist z.B. notwendig, um die natürliche Immunität durch Makrophagen zu gewährleisten, indem es die IFN-γ induzierte Phagozytose

der Makrophagen fördert. Es unterstützt außerdem Makrophagen bei der Aktivierung von T-Zellen und über 5-HT_{1A}-Rezeptoren von Monozyten hebt es deren Suppression der natürlichen Killerzellen (NK) auf und aktiviert sie auf diese Weise (Hellstrand und Hermodsson, 1993). Es ist weiterhin für die Initiierung einer zellvermittelten Überempfindlichkeitsreaktion (DTH, delayed-type hypersensitivity) bei Allergien, Kontaktsensibilität (CS) und Transplantatabstoßung essentiell. Während einer Immunantwort früh freigesetzt, induziert 5-HT in spezifischen T-Lymphozyten die Bildung von Chemotaxinen wie Interleukine und führt zur Aktivierung und Proliferation von Makrophagen und Monozyten und deren Wanderung an den Ort der Antigenbelastung (Mössner und Lesch, 1998)

DTH und CS sind CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunreaktionen, die durch biphasische Antigen spezifische Reaktionen charakterisiert sind. Dabei wird in der ein- bis vierstündigen frühen Phase der DTH 5-HT aus lokalen Gewebs-Mastzellen ausgeschüttet (Gershon *et al.*, 1975). Für die spätere lang andauernde Hautschwellung entscheidend ist dann aber die zusätzliche Ausschüttung von 5-HT aus Thrombozyten, wie mit Hilfe von Mastzell defizienten Mäusen und Thrombozyten spezifischen Antikörpern (Ab) gezeigt werden konnte (Geba *et al.*, 1996). Die genaue Rolle von 5-HT in der DHT ist jedoch noch weitgehend unerforscht. Hohe Dichten an 5-HT_{1A}-Rezeptoren auf aktivierten humanen T-Zellen (Aune *et al.*, 1993) und die verstärkte T-Zell-Blastogenese in Mäusen via 5-HT₂-Rezeptor-Stimulierung, deuten darauf hin, dass 5-HT bei Aktivierung der Interleukin 2-Expression in die Signaltransduktion eingreift (Young *et al.*, 1993).

3.1.4 5-HT bedingte Krankheiten in der Peripherie

Eine der häufigsten Krankheiten des serotonergen Systems in peripheren Geweben und Organen ist das Reizdarmsyndrom. Obwohl die genauen Ursachen noch nicht aufgeklärt sind, scheint eine Dysregulation in der Kommunikation zwischen Darm mit seinem enterischen Nervensystem und dem ZNS vorzuliegen (Mach, 2004). Eine entscheidende Rolle kommt dabei den 5-HT₃-Rezeptoren zu, die sich auf intrinsischen Nervenfasern und enterochromaffinen Zellen befinden und durch endogenes 5-HT überstimuliert werden. Das erklärt auch die antiemetische Wirksamkeit von 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten wie Ondansetron als Therapeutikum gegen Übelkeit und Erbrechen. Agonisten der 5-HT₄-Rezeptoren, die auf der glatten Darmmuskulatur und den Mucosazellen lokalisiert sind,

wirken durch die Beeinflussung der Peristaltik, Förderung der Sekretion von Wasser und Elektrolyten in den Darm und verringern die viszerale Schmerzempfindlichkeit (Hansen, 1995; Borman und Burleigh, 1993; Schikowski *et al.*, 2002).

Eine serotonerge Dysfunktion wird auch bei Präeklampsie vermutet, einer Multiorganerkrankung, begleitet von Hypertonie, die im letzten Drittel einer Schwangerschaft auftreten und letal verlaufen kann. Obwohl die genauen Ursachen in der Pathogenese noch unbekannt sind, scheinen Veränderungen im 5-HT-Stoffwechsel, der zu einem erhöhten Plasma-5-HT-Spiegel führt, eine substantielle Rolle zu spielen (Weiner, 1987; Carrasco *et al.*, 2000a). Festgestellt wurde eine Vasokonstriktion in Gefäßen der Plazenta vor allem durch eine reduzierte plazentale MAOA-Aktivität, die einen verminderten 5-HT-Abbau zur Folge hat (Carrasco *et al.*, 2000b). Aber auch eine verminderte IDO-Aktivität in Endothelzellen der Plazenta ist beobachtet worden (Santoso *et al.*, 2002). Diese kann eine lokale Erhöhung des Trp-Spiegels bewirken und somit die 5-HT-Synthese unterstützen.

Eine wichtige Rolle spielt 5-HT auch bei bestimmten Krebserkrankungen. Das sind zum einen das kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC) und zum anderen Karzinoide, neuroendokrine Tumore, die aus enterochromaffinen Zellen hervorgehen und hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt vorkommen. Zu finden sind sie aber auch im Pankreas und in der Lunge. Diese Tumore produzieren große Mengen 5-HT und verursachen das Karzinoidsyndrom, das durch Diarrhöe und Hautrötung gekennzeichnet ist. Der entstehende Mangel an Trp führt wiederum zu Nicotinamidmangel und äußert sich mit Pellagra ähnlichen Symptomen (Harris und Smith, 1983). Gezeigt worden ist sowohl in Zelllinien von humanen kleinzelligen Lungenkrebs (Cattaneo *et al.*, 1993) und Karzinoiden der Lunge (Schuller und Hegedus, 1989) als auch in Zelllinien pankreatischer Karzinoide (Ishizuka *et al.*, 1992), dass 5-HT in diesen Tumoren mitogen wirkt, also das Wachstum autokrin stimuliert.

4 DIE TRYPTOPHAN HYDROXYLASE (TPH)

4.1 Die Superfamilie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen

Die TPH gehört neben der Tyrosin- (TH) und der Phenylalaninhydroxylase (PAH) zur Superfamilie der Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAAHs). TPH und TH katalysieren im ZNS höherer Tiere geschwindigkeitsbestimmende Schritte in der Biosynthese monoaminerger Neurotransmitter, der Indolamine und Katecholamine. Die PAH dagegen

wird hauptsächlich in der Leber von Tieren exprimiert und bildet die für die Synthese der Katecholamine notwendige Aminosäure Tyrosin, die aber auch mit der Nahrung aufgenommen wird. Der Ausfall der PAH durch Mutationen des *PAH*-Gens, wie er bei der Phenylketonurie auftritt, führt zu schwerer mentaler Retardierung. Das wird auf die Anhäufung von Phenylalanin und seiner Metaboliten zurückgeführt, die den Stoffwechsel des Trps in Mitleidenschaft ziehen und dadurch die Synthese der für die Gehirnfunktionen wichtigen Neurotransmitter 5-HT und 4-Aminobuttersäure vermindern (Kaufman, 1959).

Aus dem Vergleich von Sequenzhomologien können aufgeklärte Funktionen von Strukturelemente innerhalb der AAAHs auf die anderen Enzyme dieser Superfamilie übertragen werden. Daher ist die Betrachtung der evolutionären Verwandtschaft der AAAHs aus Sicht des Struktur-Funktions-Zusammenhangs von großem Interesse.

4.2 Struktur der AAAHs

Die AAAHs sind tetramere Enzyme, deren Monomere in drei Domänen eingeteilt werden: der N-terminalen regulatorischen, der katalytischen und einer kurzen C-terminalen Oligomerisierungsdomäne. Die Proteinsequenzen der AAAHs sind hoch konserviert, wobei die höchste Variabilität in den regulatorischen Domänen auftritt und die hoch konservierten Abschnitte überwiegend in den katalytischen Domänen zu finden sind (Abbildung I.10). Eine Ausnahme bilden zwei bakterielle PAHs, von *Pseudomonas aeruginosa* und *Chromobacterium violaceu*, die keine regulatorische Domäne enthalten (Zhao *et al.*, 1994; Onishi *et al.*, 1991). Als Metalloenzym enthält das katalytische Zentrum ein nicht Häm-gebundenes Eisen(II)-ion, mit Ausnahme der PAH aus *Chromobacterium violaceum*, das Kupfer(II)-ionen anstelle des Eisenions enthält (Onishi *et al.*, 1991).

Am besten ist bisher die Struktur der katalytischen Domänen untersucht worden. Die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Ratten-TH wurde in hoher Auflösung aufgeklärt, der zufolge das Fe^{2+} -Kation durch His331, His336, Glu376 und zwei Wassermoleküle quadratisch-pyramidal koordiniert vorliegt (Goodwill *et al.*, 1997), mit His331 als axialen Liganden und dem Fe^{2+} in der Basisfläche dieser körbchenförmigen Struktur. Mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse konnte beispielsweise auch der punktmutationsbedingte Aktivitätsverlust der TH strukturell erklärt werden, der im L-DOPA-responsiven Parkinsonismus charakteristisch ist (Ludecke *et al.*, 1996).

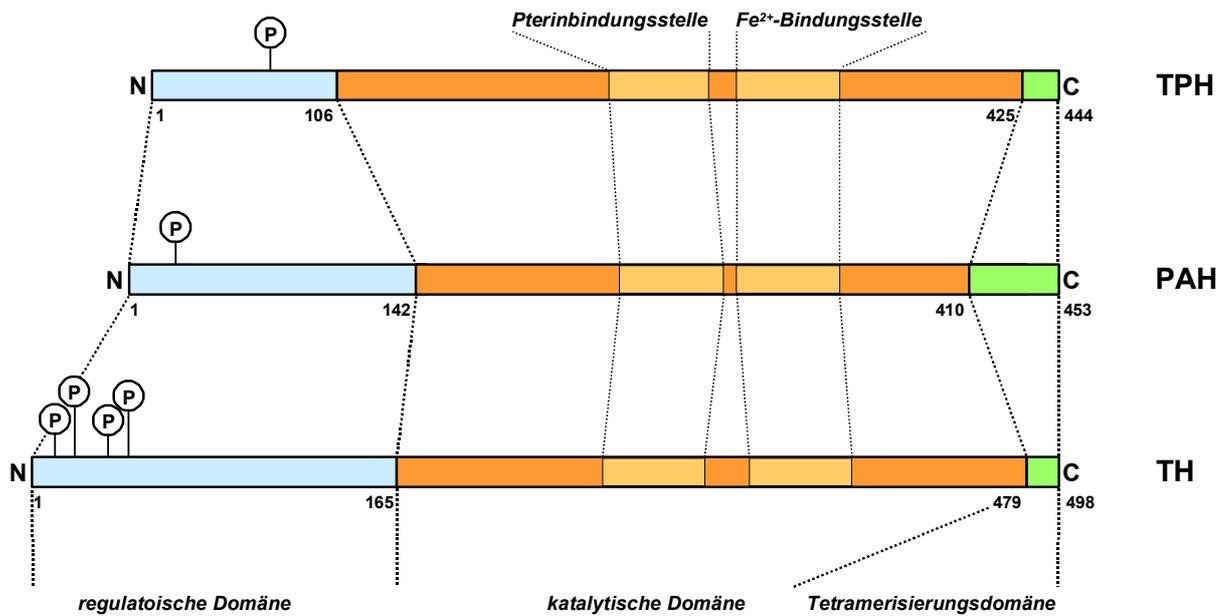


Abbildung I.10: Struktur-Funktions-Korrelation zwischen den drei gut untersuchten AAAHs: humane TPH, Ratten-PAH und -TH. Dargestellt ist die Domänenstruktur der Monomere (regulatorische, katalytische und Tetramerisierungsdomänen). Anfangs- und End-Aminosäurereste der experimentell ermittelten Domänen sind unter den jeweiligen Hydroxylasen angegeben. Wegen der experimentellen Einschränkungen geben die Positionen nur angenähert die Domänengrenzen an. Hervorgehoben sind weiterhin die Fe²⁺- und die Tetrahydrobiopterin-Bindungsstelle, sowie die putativen Phosphorylierungsstellen. Die Maus-TPH enthält einen Einschub von 3 Aminosäuren nahe des Aminoterminus, daher liegt das phosphorylierte Ser58 in der Maus bei Position 61. Außerdem liegt eine weitere putative Phosphorylierungsstelle bei Ser56.

Die AAAHs höherer Organismen bilden mit Hilfe ihrer Tetramerisierungsdomäne Homotetramere (Liu und Vrana, 1991). Während TH und TPH als Tetramere vorliegen (Markey *et al.*, 1980; Nakata und Fujisawa, 1982a; Tong und Kaufman, 1975), ist die PAH auch als Monomer und Dimer gefunden worden (Kaufman und Fisher, 1970; Iwaki *et al.*, 1986). Die Tetramere sind gegenüber den monomeren Untereinheiten stabiler, was *in vivo* zu längeren Halbwertszeiten der Enzyme führt. Durch Kooperativität bezüglich der Substratbindung hat die Tetramerisierung auch einen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften der AAAHs (Iwaki *et al.*, 1986, Liu und Vrana, 1991).

Über die regulatorischen Domänen der AAAHs ist wenig bekannt. Zur leichteren Charakterisierung der interessanteren katalytischen Domäne wurden überwiegend rekombinante Techniken angewandt, mit denen nur die katalytische Domäne exprimiert wird (Goodwill *et al.*, 1997; Moran *et al.*, 1998).

Die größeren Sequenzunterschiede der regulatorischen Domänen der drei Familien von AAAHs und auch die größere phylogenetische Divergenz lassen auf verschiedene regulatorische Eigenschaften schließen. Auch die gefundenen unterschiedlichen Splice-Varianten der AAAHs sind auf die regulatorischen Domänen beschränkt. So sind

beispielsweise vier humane TH-Isoformen bekannt, die außerdem gewebsspezifisch in unterschiedlichen Gehirnregionen von ein und demselben Gen exprimiert werden (Kaneda *et al.*, 1987). In Primaten allerdings sind nur zwei, den humanen analoge Isoformen aufgefunden worden (Ichinose *et al.*, 1993), in phylogenetisch weiter entfernten Organismen, wie in Fischen, konnte bisher nur eine einzige TH-Isoform gefunden werden (Boularand *et al.*, 1998), was eine evolutive Spezifizierung der Neurotransmittersysteme demonstriert. Die unterschiedliche Regulation zeigt sich auch in unterschiedlichen Mustern der Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen für weitere Aktivatoren, die alle in der regulatorischen Domänen liegen (Abschnitt I.4.4.2). Man geht von der Vorstellung aus, dass die regulatorische Domäne im inaktiven Grundzustand wie ein Deckel das katalytische Zentrum sterisch abschirmt, und auf diese Weise inhibitorisch auf die Enzymaktivität wirkt (PH: Fisher und Kaufman, 1972; Iwaki *et al.*, 1986; Ledley *et al.*, 1990; Kaufman, 1993; TH: Abate *et al.*, 1988; Daubner *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 1993; Walker *et al.*, 1994; TPH: Kumer *et al.*, 1997; Moran *et al.*, 1998).

4.3 Die TPH1

4.3.1 Genstruktur und Lokalisierung

Das erste klonierte *tph*-Gen ist das der peripheren Isoform (*tph1*) und umspannt ungefähr 21 kb und enthält 11 Exons (Boularand *et al.*, 1990; Stoll und Goldman, 1991). Damit ist die Größe des *tph1*-Gens mit der des *pah*- und *th*-Gens vergleichbar. Das humane Gen enthält ebenfalls 11 Exons und ist mit 29 kb etwas größer (Boularand *et al.*, 1995a). Außerdem wurde eine hohe Splice-Variabilität im untranslatierten 5'-Bereich gefunden, die denen der humanen *pah* und *th* ähnlich sind, sowie cAMP-responsive Elemente im Promotor, die nicht den Konsensus-Sequenzen entsprechen (Boularand *et al.*, 1995a und 1995b). Die Intron-Exon-Grenzen der untersuchten phylogenetisch verschiedenen *tph1*-Gene sind hoch konserviert und auch positionell in den *pah*- und *th*-Genen erhalten, was auch auf die nahe Verwandtschaft der AAAHs verweist (Stoll und Goldman, 1991; Boularand *et al.*, 1995b).

Das humane *tph1*-Gen ist auf Chromosom 11 (11p15.3-p14) lokalisiert (Ledley *et al.*, 1987), das der Maus auf Chromosom 7 (Stoll *et al.*, 1990) und das der Ratte auf Chromosom 1 (Yokoi *et al.*, 1996).

4.3.2 Genexpression

Der humane und auch murine Promotorbereich des *tph1*-Gens enthält neben einer TATA-Box zwei cAMP-responsive Elemente im Bereich von -73 bis +2 und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie z.B. SP1 (Stoll und Goldman, 1991; Cho *et al.*, 1993). Im proximalen Promotorbereich des Mausgens konnte außerdem eine aktivierende Bindung des Transkriptionsfaktor NF-Y gefunden werden (Reed *et al.*, 1995). Promotorstudien in transgenen Mäusen mit *lacZ* als Reportergen unter Kontrolle eines 6,1 kb oder 1,1 kb langen Promotorbereiches des *tph1*-Gens zeigten, dass regulatorische Elemente für die gewebsspezifische Expression im Bereich von -6,1 kb bis -1,1 kb liegen müssen (Huh *et al.*, 1994).

4.4 Regulierung der TPH-Aktivität

4.4.1 Substratkontrolle

Die 5-HT-Synthese kann auf mehreren Ebenen reguliert werden: über die Expression und Stabilität der *Tph*-mRNA und der TPH, über die Substratkontrolle und über aktivierende Faktoren (Abschnitt I.4.4.2; Boadle-Biber, 1993).

Das Enzym steht dabei unter der Kontrolle der Trp-Verfügbarkeit, die wie bereits in Abschnitt I.1.3.1 erwähnt, auch durch das Verhältnis von Trp zu den anderen großen neutralen Aminosäuren (LNAAs) bestimmt wird. Der Trp-Konzentration von 10-30 μM im Gehirn steht ein K_m -Wert von etwa 25 μM gegenüber, d.h. TPH ist *in vivo* nur zu etwa 50 % gesättigt, was dazu führt, dass eine höhere Verfügbarkeit von Trp, beispielsweise nach der Nahrungsaufnahme, eine erhöhte 5-HT-Synthese zur Folge hat (Carlsson und Lindqvist, 1972; Lovenberg und Victor, 1974). Diese Abhängigkeit der 5-HT-Synthese von der Plasmakonzentration an Trp wird auch mit der Regulierung von Appetit und Schlafverhalten in Verbindung gebracht, weil so die Trp-Konzentration den 5-HT-Gehalt im ZNS beeinflusst (Wurtman *et al.*, 1981; Huether *et al.*, 1998).

Über den Beitrag des Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) zur Regulierung der TPH-Aktivität gibt es widersprüchliche Aussagen (Miwa *et al.*, 1985; Boadle-Biber *et al.*, 1986; Wolf *et al.*, 1990, 1991; Sawada *et al.*, 1986). Einem K_m -Wert von TPH für BH_4 von 30 μM stehen unterschiedliche Angaben zur mittleren Konzentration von 1 μM im Gehirn (Friedman

et al., 1972) bis 9 μM in der Leber gegenüber, was einen erheblichen Überschuss bedeuten würde. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass intrazelluläre BH_4 -Konzentrationen Monoamin synthetisierender Neuronen wesentlich höher als die mittleren Gehirngehalte sind (Levine *et al.*, 1979, 1981).

4.4.2 Biochemische Aktivierung

TPH kann wie alle AAAHs durch Phosphorylierung in der regulatorischen Domäne aktiviert werden (Abbildung I.10). So zeigte die Phosphorylierung durch Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II eine Verdopplung der Aktivierung von TPH aus Rattenhirnextrakten (Yamauchi und Fujisawa, 1979a, 1979b, 1983; Kuhn und Lovenberg, 1982). Auch andere *in vitro* Studien mit rekombinanter Kaninchen-TPH, aber auch mit humaner TPH konnten diese Regulierung der TPH-Aktivität durch Phosphorylierung bestätigen (Hamon *et al.*, 1978; Kuhn *et al.*, 1978; Ehret *et al.*, 1989; Vrana *et al.*, 1994; Mockus und Vrana, 1998). Eine Erhöhung der TPH-Aktivität aus Rattenhirnextrakten um das Zweifache wurde auch durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A erreicht (Makita *et al.*, 1990). Außerdem wird durch cAMP *in vivo* auch die Transkription der TPH aktiviert.

In beiden Fällen der Phosphorylierung wurde Ser58 als Phosphorylierungsstelle gefunden (Kumer *et al.*, 1997). Es zeigte sich zudem, dass die maximale Aktivitätssteigerung durch Anwesenheit eines Aktivatorproteins erreicht wurde, das später als das TPH-bindende 14-3-3-Protein identifiziert werden konnte (Ichimura *et al.*, 1987, 1988; Furukawa *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1997; Banik *et al.*, 1997). Zytosolisch vorkommende 14-3-3-Proteine machen etwa 1 % des Gesamtproteins im Gehirn aus und binden mit der C-terminalen Domäne (Ichimura *et al.*, 1995) an die phosphorylierte regulatorische Domäne der TPH (Boston *et al.*, 1982; Isobe *et al.*, 1991). Diese Protein-Protein-Wechselwirkung führt nach der Phosphorylierung zu einer weiteren Aktivierung der TPH und schützt diese außerdem vor der Dephosphorylierung (Banik *et al.*, 1997).

Weiterhin gibt es Berichte über die Aktivierung von TPH durch Heparin (Kuhn *et al.*, 1980) und Phospholipide (Imai *et al.*, 1989), sowie über die TPH-Inaktivierung durch NO (Kuhn und Arthur, 1996).

5 TRANSGENE TIERMODELLE SEROTONERGER DYSFUNKTION

Die gezielten Manipulationen einzelner Gene in transgenen Tiermodellen sind allgemein von hohem Interesse, da sich im Gegensatz zum Einsatz von Pharmaka präzise Aussagen zur Ursache der beobachteten Auswirkung machen lassen (Majzoub und Muglia, 1996). So sind in den vergangenen Jahren zahlreiche transgene Tiermodelle für serotonerge Dysfunktionen etabliert und charakterisiert worden (Tabelle I.3). Auffallend bei diesen Tiermodellen sind das Auftreten von Verhaltensstörungen wie Depressionen, erhöhte Aggressivität und verändertes Angstverhalten, die mit einer verringerten serotonergen Funktion, infolge gestörter oder retardierter Entwicklung des serotonerges Systems einhergehen (SERT-KO, Pet-1-KO; Tabelle I.3; Lesch *et al.*, 2003).

Entgegen den Erwartungen zeigen MAOA-KO-Mäuse trotz erhöhtem 5-HT-Spiegels ebenfalls eine erhöhte Aggressivität, die durch 5-HT-Synthesehemmer und 5-HT-Antagonisten reduziert werden konnte. Erklärt werden kann dies einerseits damit, dass der 5-HT-Spiegel in der nachgeburtlichen Entwicklung sinkt und deshalb relativ niedriger ist. Andererseits ist in diesen Tieren auch der Abbau der katecholaminergen Neurotransmitter (Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin) beeinträchtigt, so dass auch diese Botenstoffe in erhöhten Konzentrationen vorliegen und Einfluss auf das Verhalten ausüben. Außerdem entstehen in diesen Tieren wegen der überschüssigen Neurotransmitter während der neuronalen Ontogenese abnormale Gehirnstrukturen (vgl. Abschnitt I.2.2.1; Cases *et al.*, 1996).

Die bekannten 5-HTR-KO-Mäuse weisen ebenfalls verschiedene Verhaltensänderungen auf, wie gesteigerte Angst, verminderte Neugier (5-HT_{1A}-KO), erhöhte Aggressivität (5-HT_{1B}-KO), erhöhte Neugier (5-HT_{1B}-KO, 5-HT_{5A}-KO) oder auch Stressanfälligkeit (5-HT₄-KO). Gestört ist in einigen dieser Rezeptor-KOs auch der Schlaf (5-HT_{1A}-KO, 5-HT_{1B}-KO) und die Schmerzempfindlichkeit (5-HT_{3A}-KO), sowie Defekte in peripheren Organen, die zu Kardiomyopathie (5-HT_{2B}-KO), Fettleibigkeit (5-HT_{2C}-KO), erhöhte Krampfanfälligkeit (5-HT_{2C}-KO, 5-HT₄-KO) und Thermoregulationsstörungen (5-HT₇-KO) führen.

Auch Doppelknockout-Mäuse sind generiert worden, wie beispielsweise MAOA-5-HT_{1B}-KO-Mäuse, in denen die Fehlbildungen der MAOA-defizienten Mäuse aufgehoben sind, was vermuten lässt, dass die neuronale Ontogenese des serotonergen Systems zum großen Teil durch den 5-HT_{1B}-Rezeptor gesteuert wird (Gingrich und Hen, 2001).

Polygene Ursachen psychiatrischer Erkrankungen werden somit durch die Nutzung transgener Tiermodelle immer verständlicher.

Tabelle I.3: Transgene Tiermodelle (KO) des serotonergen Systems und deren Phänotypen.

Gen	Phänotyp	Referenz
TPH1	verminderte Blutgerinnung	Walther <i>et al.</i> , 2003b
SERT	depressives Verhalten; gesteigertes Angstverhalten; verminderte Lokomotoraktivität; vermehrter REM-Schlaf; verminderter Zelltod durch Apoptose; Auftreten von defekten Axonverbindungen (retinal, Thalamus); 50% weniger serotonerge Zellen; geringere Feuerrate der Raphe-Neuronen	Persico <i>et al.</i> , 2001 Bengel <i>et al.</i> , 1998 Lira <i>et al.</i> , 2003 Holmes <i>et al.</i> , 2002a,b, 2003 Wisor, 2003
VMAT2	neonatal letal; verringertes Wachstum; verminderte Lokomotoraktivität; verstärkte Apoptose im Telencephalon; verändertes Zellmigration	Fon <i>et al.</i> , 1997 Wang <i>et al.</i> , 1997
MAOA	erhöhte Aggressivität; vermindertes Explorationsverhalten; verstärkte Angstkonditionierung; veränderter Gang; Auftreten von defekten Axonverbindungen (retinal, Thalamus); vermehrtes Wachstum von Dendriten (Medulla)	Cases <i>et al.</i> , 1995, 1996 Upton <i>et al.</i> , 1999 Bou-Flores <i>et al.</i> , 2000
MAOB	erhöhte Stressanfälligkeit	Grimsby <i>et al.</i> , 1997
Pet-1	erhöhte Aggressivität; gesteigertes Angstverhalten; 70% weniger serotonerge Zellen	Hendricks <i>et al.</i> , 2003
5-HT _{1A} R	gesteigertes Angstverhalten; vermindertes Explorationsverhalten; verändertes Schlafverhalten; reduzierte Wirksamkeit von Antidepressiva; verzögerte Neurogenese	Gross <i>et al.</i> , 2000, 2002 Santarelli <i>et al.</i> , 2003 Boutrel <i>et al.</i> , 2002
5-HT _{1B} R	erhöhte Aggressivität; erhöhtes Explorationsverhalten; verändertes Schlafverhalten; verbessertes räumliches Gedächtnis; verstärktes Ansprechen auf Kokain und Amphetamin; verstärkte Selbstverabreichung von Kokain; Auftreten von defekten Axonverbindungen (retinotectal)	Saudou <i>et al.</i> , 1994 Brunner <i>et al.</i> , 1999 Upton <i>et al.</i> , 2002
5-HT _{2A} R	vermindertes Ansprechen auf Halluzinogene; verminderte Aktivität des enterischen Nervensystems	Fiorica-Howells <i>et al.</i> , 2002
5-HT _{2B} R	perinatal letal; Kardiomyopathie	Nebigil <i>et al.</i> , 2000
5-HT _{2C} R	spät einsetzende Fettleibigkeit; erhöhte Krampfanfälligkeit (Epilepsie); Diabetes Typ2; veränderte LTP, eingeschränkte synaptischen Plastizität	Tecott <i>et al.</i> , 1995 Heisler <i>et al.</i> , 1998 Nonogaki <i>et al.</i> , 1998
5-HT _{3A} R	reduziertes Schmerzverhalten	Zeitze <i>et al.</i> , 2002
5-HT ₄ R	erhöhte Stress- und Krampfanfälligkeit; Stress induzierte Anorexie	Compan <i>et al.</i> , 2004
5-HT _{5A} R	erhöhtes Explorationsverhalten; verminderte Lokomotoraktivität unter LSD	Grailhe <i>et al.</i> , 1999
5-HT ₇ R	gestörte Thermoregulation	Hedlund <i>et al.</i> , 2003

6 RIBOZYMTECHNOLOGIE

6.1 Ribozyme als natürliche katalytische RNA

Ribozyme sind RNA-Moleküle mit enzymatischer Aktivität, die Anfang der 80er Jahre von Cech und Altman entdeckt wurden (Cech und Altman, Nobelpreis für Chemie 1989; Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Mehrere verschiedene Ribozyme, wie bestimmte Introns der Gruppe I und II, die RNA-Untereinheit der RNase P, die selbstspaltenden RNAs in Satelliten-RNA von Pflanzenviroiden, wie das kurze Hammerhead- und Hairpinribozym oder das Hepatitis- δ -Virus-Ribozym und das Neurospora VS-Ribozym sind beschrieben worden.

Ribozyme katalysieren die Spaltung und Ligation von RNA, meist intramolekular. Alle diese natürlich vorkommenden *cis*-spaltenden Ribozyme können jedoch in *trans* spaltende enzymartige Ribozyme überführt werden, die also in einer multiplen turnover-Reaktion die Spaltung der Ziel-RNA katalysieren. Für diese Spaltreaktion sind zweiwertige Metallionen, in der Regel Magnesiumionen, erforderlich, um den Übergangszustand zu stabilisieren. Die Reaktionseffizienzen liegen mit $k_{cat}/K_m \leq 10^8 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ im Bereich der diffusionskontrollierten Duplexbildung und somit bei etwa einem Tausendstel von proteinogenen Enzymen (Narlikar und Herschlag, 1997). Ihre Fähigkeit RNA sequenzspezifisch zu spalten, machen Ribozyme jedoch interessant, insbesondere um die Expression bestimmter Gene auf RNA-Ebene zu regulieren.

6.2 Einsatz von Ribozymen zur Manipulation der Genexpression

Der Vorteil von Ribozymen gegenüber anderen Antisensetechnologien zum sequenzspezifischen Herunterregulieren (Knockdown) von mRNA, wie Antisenseoligonukleotide, DNAsyme, Aptamere oder RNAi ist, dass sie keine Nebeneffekte und keine Immunantwort verursachen, zwischen einzelnen Basen diskriminieren, relativ einfach herzustellen sind und auch gegen Introns gerichtet werden können (Scherer und Rossi, 2003). Für die Anwendung von Ribozymen zur Herunterregulierung von zellulärer und viraler Genexpression eignen sich besonders wegen ihrer kleinen Größe von nur 30 bzw. 50 Nukleotiden das Hammerhead- und das Hairpinribozym. Beide, aber insbesondere das

Hammerheadribozym, werden bereits vielfältig genutzt und dieses ist auch das am besten erforschte Ribozym (Kiehnopf *et al.*, 1995; Couture und Stinchcomb, 1996).

Im Prinzip können Ribozyme gegen jede gewünschte RNA gerichtet sein, wenn bestimmte sequenzspezifische Voraussetzungen erfüllt sind. So benötigt das Hammerheadribozym an seiner Schnittstelle eine NUH-Sequenz (N: jede Base; H: jede Base, außer G), die zwischen zwei beliebigen Sequenzabschnitten liegt, mit denen das Ribozym durch Watson-Crick-Basenpaarung zwei Helices ausbilden kann, die optimale 6 bis 7 bp lang sind (Abbildung I.11). Entscheidend für die Wirksamkeit eines Ribozyms ist außerdem dessen Zugänglichkeit zur gewählten Schnittstelle innerhalb der komplexen Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Ziel-RNA *in vivo*.

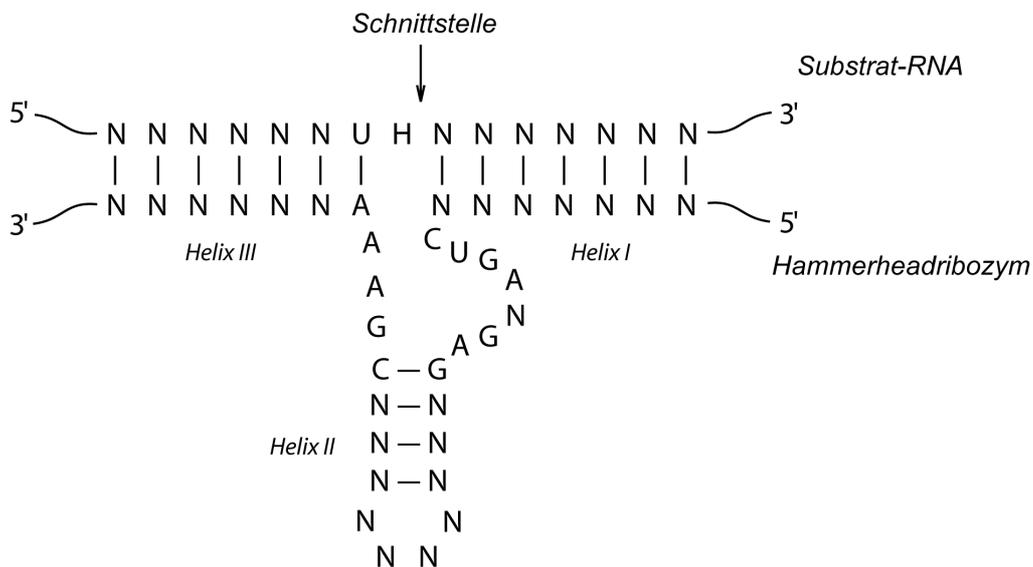


Abbildung I.11: Dargestellt ist die Sekundärstruktur des Hammerheadribozyms als Duplex mit der Substrat-RNA. Die Helices I und III sind komplementär zur Substrat-RNA und können als Antisense- oder bindende Arme des Ribozyms betrachtet werden. Die katalytische Domäne besteht aus der Konsensussequenz und der Helix II. Die konservierten Nukleotide sind essentiell für die Aktivität. N = A, C, G oder U; H = A, C oder U.

Mögliche Anwendungen von Ribozymen sind die Untersuchung von Funktionen eines bestimmten Gens durch Inhibition dessen Expression in Zellkultur und im Tiermodell oder die Verabreichung als Medikament, indem es die Expression von „Krankheitsgenen“ unterdrückt. Im ersten Fall, der endogenen Applikation, werden Zellen mit Ribozym kodierender DNA, die außerdem einen geeigneten Promotor für dessen Transkription enthält, transfiziert oder in eine befruchtete Eizelle injiziert. Die Effizienz dieser Methode hängt dabei

vom Integrationsort, der Stärke des Promotors, der intrazellulären Stabilität und der Lokalisierung in der Zelle ab. Als erfolgreich erwiesen sich Fusionskonstrukte, in denen das Ribozym in tRNA, U1- oder U6-snRNA eingefügt und so gleichzeitig die starken Polymerase III-Promotoren und die Stabilität dieser kleinen RNAs genutzt wird (Thomson *et al.*, 1995).

Die exogene Applikation, in der synthetisch hergestellte Ribozyme als Medikament verabreicht werden, eignet sich eher für klinische Anwendungen. Sie haben aber den Nachteil, als RNA sehr schnell abgebaut zu werden und müssen deshalb chemisch modifiziert werden, wodurch die Halbwertszeit in humanem Serum bereits von etwa einer Minute auf über 10 Tage verlängert werden konnte (Heidenreich *et al.*, 1996). Ein weiteres Problem ist deren schlechte Aufnahme und Verteilung im Gewebe auf Grund ihrer Größe und polyanionischen Struktur. Es gibt aber Ansätze, diese Nachteile mit Hilfe von Trägersubstanzen wie Liposome oder kationische Lipide, wie DOTAP oder Lipofectamine zu überwinden. Häufig sind diese Transfektionen aber wenig effizient und können in höheren Konzentrationen toxisch sein (Chiang *et al.*, 1991; Lange *et al.*, 1993; Sioud *et al.*, 1992).

Die erste beschriebene exogene Anwendung eines chemisch modifizierten Hammerheadribozyms im Tiermodell erfolgte durch Injektion in den Kiefer einer neugeborenen Maus und sollte durch Inhibition von Amelogenin die Biomineralisation des Zahnschmelzes temporär verhindern. Die Expression des Proteins war für ca. 24 Stunden vollständig inhibiert, betrug nach drei Tagen noch 50 % und war erst nach vier Tagen wieder normal (Lyngstadaas *et al.*, 1995).

Es sind auch bereits transgene Mauslinien beschrieben, die endogen Ribozyme exprimieren. So konnte beispielsweise in Mäusen, die unter Kontrolle des Insulinpromotors ein Hammerheadribozym gegen Glukogenase-mRNA exprimieren, die Menge an Glukogenase um die Hälfte reduziert werden (Efrat *et al.*, 1994). Es gelang weiterhin eine transgene Mauslinie zu generieren, die ein Hammerheadribozym gegen β 2-Mikroglobulin-mRNA exprimiert. Diese zeigte eine Reduktion der β 2-Mikroglobulin-mRNA um bis zu 90 %. Jedoch wurde eine starke Varianz der Inhibition zwischen Individuen gleicher transgener Linien beobachtet (Larsson *et al.*, 1994).

7 ZIELSETZUNG

Auf Grund der hohen Komplexität des serotonergen Systems sind viele Aspekte noch unzureichend verstanden. Obwohl bereits viele Funktionen, die durch 5-HT-Rezeptoren vermittelt werden, auch mit Hilfe von transgenen Tiermodellen, aufgeklärt werden konnten, gibt es noch relativ wenig Studien, die die Biosynthese des 5-HTs selbst manipulieren und so die vielfältigen serotonergen Mechanismen ergründen. So konnte erst kürzlich eine zweite Isoform des 5-HT synthetisierenden Enzyms TPH identifiziert werden, durch die sich das serotonerge Systems klar in ein peripheres und ein neuronales serotonerge System einteilen lässt.

In dieser Arbeit sollte daher mit zwei grundlegend unterschiedlichen Ansätzen der 5-HT-Spiegel im Mausmodell manipuliert und die Auswirkungen studiert werden: erstens sollte auf pharmakologischem Wege durch Hemmung des Tryptophanabbaus der 5-HT-Spiegel in peripheren und neuronalem Geweben untersucht werden und zweitens sollte durch transgene Techniken über Herabregulation der TPH-Expression auf Ribozymbasis ein verringerter 5-HT-Spiegel verursacht und dessen Auswirkungen studiert werden.

Das kürzlich entdeckte Gen der neuronalen TPH (*tph2*) sollte mit PCR-Techniken aus RNA und genomischer DNA von Mäusen, Ratten und des Menschen durch Amplifikation und Sequenzierung charakterisiert werden, sowie die kinetischen Eigenschaften des rekombinanten Enzyms ermittelt werden und ebenfalls durch transgene Techniken über Herabregulation der TPH2-Expression auf Ribozymbasis ein verringerter 5-HT-Spiegel verursacht und dessen Auswirkungen studiert werden.

Schließlich sollten die transgenen Tiermodelle physiologisch charakterisiert und auf pathologische Erscheinungen untersucht werden. Dabei sollten die Schwerpunkte auf Hämostase bei den TPH1-KD-Tieren und auf Verhaltensphysiologie bei den TPH2-KD-Tieren gelegt werden.