

IV DISKUSSION

1 PHARMAKOLOGISCHE MANIPULATION DES SEROTONERGEN SYSTEMS

1.1 Erhöhung des 5-HT-Spiegels mit 1-Methyltryptophan (1-MeTrp)

1-MeTrp wurde bisher nur für immunologische Studien verwendet, indem die immunsuppressive Wirkung des Trp katabolisierenden Enzyms IDO durch lokale Senkung der Trp-Konzentration und damit die T-Zell-Proliferation unterdrückt, durch die IDO-Hemmung mit 1-MeTrp aufgehoben wird (Kudo *et al.*, 2001; Munn *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2005). Diese durch 1-MeTrp verursachte Erhöhung der Trp-Konzentration wurde in dieser Arbeit am Mausmodell genauer untersucht und auch welche Auswirkungen sie auf das serotonerge System hat. Aufschluss darüber gaben die Konzentrationsbestimmungen der Trp-Metaboliten in serotonergen Organen, wie dem Doudenum und dem Gehirn, aber auch im Blutplasma und in der Leber. Aufgrund einer Trp-Erhöhung und des ungesättigten Zustandes der TPH ist auch eine Erhöhung der 5-HT-Konzentration zu erwarten. Die Messungen ergaben nach einmaliger Verabreichung von 1-MeTrp im Blutplasma ungefähr neunfach erhöhte Werte von 5-HT, ein unerwartetes Absinken im Duodenum um 40 % und einen Anstieg um 20 % in der Leber bei überall gleichzeitiger Erhöhung der Trp-Konzentrationen. Die Diskrepanz zwischen Duodenum und Blutplasma könnte durch eine vermehrte 5-HT-Ausschüttung des im Duodenums gespeicherten 5-HTs erklärt werden.

Von besonderem Interesse in Bezug auf die Bedeutung des 5-HTs im ZNS bei psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen ist die Wirkung von 1-MeTrp auf den 5-HT-Spiegel im Gehirn. Dort wurde für mehrere Stunden eine fast 30 %ige Erhöhung des 5-HTs erreicht. Diese Erhöhung entspricht auch in etwa derjenigen einer einmaligen Trp-Applikation in der Größenordnung, wie sie bereits beschrieben wurde (Meeusen *et al.*, 1996; Reader *et al.*, 1999). Nur die Kombination beider Substanzen ergab eine weitere Erhöhung um 5 %. Im Unterschied zur Trp-Gabe, die nur kurzfristig wirkt, konnte mit 1-MeTrp aber auch noch nach 12 Stunden diese erhöhten 5-HT-Gehalte beobachtet werden. Mit den entsprechenden Erhöhungen der 5-HIAA-Konzentrationen zeigen die Daten eine erhöhte Neurotransmission an (Sarna *et al.*, 1983; Parsons *et al.*, 1992; Cabrera-Vera *et al.*, 1997).

Die behandelten Mäuse zeigten außerdem auch noch nach 24 Stunden eine offensichtliche erhöhte Lokomotoraktivität, die auf ein Serotoninsyndrom hindeutet, was beim Menschen mit zu hohen Dosen serotonerger Drogen wie SSRIs oder MAO-Hemmer oder deren Kombination infolge serotonerger Überstimulation auftreten kann. Es ist gekennzeichnet

durch die bekannten Erscheinungen wie Agitiertheit, Tremor, Ataxie, Konfusion und Hyperthermie (Bodner *et al.*, 1995; Ener *et al.*, 2003).

In früheren Studien wurden MAO-Hemmer und auch Trp (Meeusen *et al.*, 1996; Reader *et al.*, 1999) verwendet, um die Konzentrationen dieses Neurotransmitters im Gehirn zu erhöhen, insbesondere die MAO-Hemmer haben aber ein breiteres Wirkungsspektrum und interferieren zum Beispiel mit Rezeptoren und Transporter des serotonergen aber auch anderer Neurotransmittersysteme, so bewirken MAO-Hemmer eine generelle Zunahme von Monoaminen. Im Vergleich dazu beeinflusst 1-MeTrp das serotonerge System spezifisch, aber im Gegensatz zur Trp-Applikation für einen wesentlich längeren Zeitraum.

Diese Befunde machen 1-MeTrp als Pharmakon zur Erforschung und eventuell Therapie von Erkrankungen interessant, bei denen ein zu niedriger 5-HT-Spiegel im Gehirn eine entscheidende Rolle spielt (vgl. Abschnitt 1.2.2.3), wie bei Depressionen (Akiskal und McKinney, 1973; Lesch und Beckmann 1990; Rosa-Neto *et al.*, 2004), Zwangs- und Angsterkrankungen (Jann und Kurtz, 1987) und der Borderlinestörung (Winchel und Stanley, 1991; Goodman und New, 2000). Allerdings sollte dabei berücksichtigt werden, dass zum einen keine Differenzierung zwischen Peripherie und ZNS gegeben ist, also auch periphere serotonerge Funktionen beeinflusst werden, wie zum Beispiel die primäre Hämostase, die zelluläre Immunantwort, Thromboembolismus oder die Darmmotilität. Beachtet werden sollte außerdem, dass durch die Hemmung des Trp-Katabolismus über den Kynureninweg ein Mangel an Nicotinamid entstehen könnte, der aber über eine entsprechende Nahrungszufuhr kompensiert werden könnte.

1.2 Wirkungen von 7-HTP auf serotonerge Zellen

Bisher wurden die 5-HT-Analoga 5,6- und 5,7-DHT verwendet, um serotonerge Neuronen abzutöten. Jedoch zerstören sie vorwiegend die Terminale serotonerger Neuronen, denn sie werden wie 5-HT durch den SERT aufgenommen, der sich vorwiegend dort befindet, und wirken lokal toxisch durch freie Sauerstoffradikale, die über Redoxzyklen der Chinon- und Chinonimin-Intermediate der DHTs entstehen (Rotman, 1977; Tabatabaie *et al.*, 1993). Trotz ihrer Spezifität sind auch unspezifische zytotoxische Effekte an nichtmonaminergen Zellen beschrieben worden (Tutton und Barkla, 1978; Jonsson, 1980).

Ein anderer Weg 5-HT produzierende Zellen spezifisch abzutöten, ist die Verwendung einer Substanz, die direkt an der TPH, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der 5-HT-

Synthese ansetzt. Das dafür gewählte Trp-Derivat 7-HTP sollte durch die TPH und weiter mit der AAAD zum toxischen 5,7-DHT metabolisiert werden und diese Zellen abtöten.

7-HTP wurde synthetisiert und im Zellkultursystem, das aus 5-HT produzierenden Zellen und Zellen, die es nicht produzieren bestand, getestet. Dabei zeigte sich, dass TPH-exprimierende Zelllinien, wie die neuronale Zelllinie NG108-15, die Mastrozytomazelllinie P815, die SCLC-Zelllinie SHP-77 und die pankreatische Karzinoidzelllinie BON 7-HTP zum 5,7-DHT metabolisieren und dadurch absterben oder zumindest in ihre Proliferation gehemmt sind. Bestätigt wurden die Versuche mit dem TPH-Inhibitor PCPA, der die 7-HTP-Metabolisierung unterbindet und so die Zellen schützt. Andererseits zeigt die nicht-TPH-exprimierende Zelllinie COS7 keine Beeinträchtigungen in ihrem Wachstum nach der Behandlung mit 7-HTP, was die Spezifität dieser Substanz ausweist.

Um das therapeutische Potential zu untersuchen, sollte 7-HTP auch im Tiermodell getestet werden. So zeigten Fruchtfliegen eine hohe Toleranz gegenüber hohen Dosen 7-HTP in der Nahrung. Auch im Mausmodell ist diese geringe Toxizität demonstriert worden. Dabei erwies sich die Substanz dennoch als wirksam, indem eine orale Verabreichung von 7-HTP zu einer temporären, aber signifikanten 5-HT-Reduktion im Vollblut durch eine vermutete spezifische Abtötung von 5-HT produzierenden enterochromaffinen Zellen führte. Auf diese Weise müsste es auch gelingen, ein chemisches TPH1-KO-Modell zu generieren, wenn eine vollständige Abtötung dieser Zellen erreicht wird.

Eine besondere Bedeutung könnte dieser Ansatz bei der Tumorbehandlung bestimmter 5-HT produzierender Krebsarten bekommen. Das betrifft vor allem Karzinoide, also neuroendokrine Tumore, die aus chromaffinen Zellen entstehen und überwiegend im Gastrointestinaltrakt, aber auch im bronchiopulmonaren System und im Pankreas vorkommen (Modlin und Sandor, 1997) und außerdem den kleinzelligen Lungenkrebs (SCLC). Denn das dort generierte 5-HT stimuliert autokrin das Wachstum sowohl von Karzinoiden (Ishizuka *et al.*, 1992; Cattaneo *et al.*, 1993; Vicaut *et al.*, 2000) als auch von SCLCs (Schuller und Hegedus, 1989).

Die herkömmlichen Behandlungen mit Chemotherapeutika, wie Fluorouracil, Cyclophosphamid, und Doxorubicin zeigten bisher nur enttäuschende Resultate bei Patienten mit dieser Krankheit im fortgeschrittenem Stadium. Neuere hormonell basierte Therapien mit Somatostatinanaloga oder mit Immunmodulatoren ergaben gute Ergebnisse in der Verringerung der Tumorgröße (Pelley und Bukowski, 1997; Oberg, 1994), jedoch erliegen zwischen 3 und 18 % der Patienten dem mit Metastasen begleiteten Karzinoidsyndrom (Modlin und Sandor, 1997; Neary *et al.*, 1997), das sich durch eine stark eingeschränkte Verfügbarkeit der seltenen essentiellen Aminosäure Trp auszeichnet (Pelley und Bukowski,

1997; Oberg, 1994). Es wird angenommen, dass für diese verringerten Trp-Spiegel bei Patienten mit Karzinoidsyndrom die starke TPH-Expression im Karzinoidtumor verantwortlich ist, denn sie synthetisieren große Mengen 5-HT (Harris und Smith, 1983). Dabei werden bis zu 60 % des vorhandenen Trp für die 5-HT- und Nikotinamidsynthese des ZNS und Gastrointestinaltraktes metabolisiert, während der normale 5-HT-Metabolismus nur etwas über ein Prozent des diätetischen Trp verwendet (Harris und Smith, 1983). Das erklärt auch die Beeinträchtigung in der Stimmung, die Patienten mit fortgeschrittenem Karzinoidtumor aufweisen, durch den so entstehenden 5-HT-Mangel im Gehirn. Eine andere chemotherapeutische Strategie, die in Zellkulturexperimenten erfolgreich erprobt wurde, beruht auf der Hemmung der AAAD mit Carbidopa, um die 5-HT-Synthese zu unterbrechen und damit die Proliferation induzierende Wirkung des 5-HTs zu unterbinden (Gilbert *et al.*, 2000).

7-HTP vereinigt beide Vorteile bei der Bekämpfung 5-HT produzierender Tumore: es verringert durch kompetitive Hemmung der TPH die 5-HT-Biosynthese in den Tumorzellen, und es wirkt dort nach der Umwandlung zum 5,7-DHT intrazellulär zytotoxisch und tötet die Tumorzellen ab, wie die Zellkulturexperimente an den Karzinoid- und SCLC-Zelllinien demonstrierten. Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass 7-HTP ein in hohem Grade spezifisches chemotherapeutisches Mittel gegen 5-HT produzierende Tumore sein kann, das auch die wachstumsstimulierenden autokrinen Effekte der 5-HT-Synthese hemmt.

2 MANIPULATION DES SEROTONERGEN SYSTEMS MIT RIBOZYMEN

2.1 Ribozym vermittelte Herabregulation der TPH1-Expression

Ribozyme, die spezifisch die TPH1-Expression herabregulieren, können in einer antithrombotischen Therapie nützlich sein. Denn es ist kürzlich gezeigt worden, dass TPH1-KO-Mäuse, die peripher kein 5-HT synthetisieren, voll entwicklungsfähig, unauffällig im Verhalten und anscheinend gesund sind, aber viel weniger dazu neigen, thrombotische Krankheiten zu entwickeln. Das dokumentierten Experimente, in denen eine verminderte Hämostase und verringerter Thromboembolismus in diesen Mäusen festgestellt wurde (Walther *et al.*, 2003b). Diese Entdeckungen demonstrierten, dass es möglich ist, gezielt die periphere 5-HT-Biosynthese zu manipulieren, ohne das ZNS zu beeinflussen. Isoformspezifische Inhibitoren könnten ein Fortschritt in der Behandlung thrombotischer Krankheiten darstellen, aber die große Ähnlichkeit der beiden TPH-Isoformen und die

identischen biochemischen Funktionen, machen es nahezu unmöglich, auf die Proteinstruktur basierte Pharmaka zu entwickeln. Deshalb sollte eine bessere Methode sein, eine Isoform auf mRNA-Ebene auf Grund der unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen gezielt zu manipulieren (Walther *et al.*, 2003a).

Für Hammerheadribozyme ist gezeigt worden, dass sie in hohem Maße RNA spezifisch schneiden, wenn die Bindungssequenzen entsprechend gewählt werden (Herschlag, 1991; Kijima *et al.*, 1995). Obwohl, mindestens theoretisch, ein Hammerheadribozym entworfen werden könnte, um praktisch jede mögliche Ziel-RNA nach dem Konsensstriplett zu schneiden, ist gezeigt worden, dass die Sekundärstruktur in der Region um das GUH-Motiv stark die Ribozymaktivität beeinflusst (Bertrand *et al.*, 1994). Deshalb wurden drei Schnittstellen ausgewählt, die nach der ermittelten Struktur der *Tph1*-mRNA zu den besten Spaltungsorten gehören sollten. Das waren nur GUH-Stellen in Loop-Regionen, die für die Ribozyme *in vivo* zugänglich sein müssten (Abbildung. III.1.17). Bevorzugt wurden außerdem nur GUC-Triplets, da eine Rangfolge der Spaltungseffizienz GUC > GUA > GUU beschrieben worden ist (Kobayashi *et al.*, 1994; Yokoyama *et al.*, 1997; Kore *et al.*, 1998). Die Nukleotide A und G in der katalytischen Kernregion des Hammerheadribozyms sind funktionell notwendig, denn sie bilden die Hammerheadkonformation (Kobayashi *et al.*, 1994). Jedoch können die Helix bildenden Nukleotide ausgetauscht werden und interessanterweise ist eine niedrigere erforderliche Mg^{2+} -Konzentration bei Hammerheadribozymen mit einer verkürzten Helix II ermittelt worden (Conaty *et al.*, 1999). Wegen des Aktivitätsoptimums bei Mg^{2+} -Konzentration von ungefähr 10 mM, was ungefähr der zehnfachen physiologischen Konzentrationen entspricht (Flatman, 1991), sollten solche Miniribozyme verwendet werden, die eine höhere Effizienz *in vivo* erwarten ließen. Zuerst wurden die Aktivitäten der AntiTPH1-Miniribozyme *in vitro* bestimmt, indem kurze *in vitro* transkribierte *Tph1*-RNA-Substrate verwendet wurden, denn die Wahrscheinlichkeit eines kurzen RNA-Substrates eine stabile Struktur anzunehmen, ist niedriger und sie behindert weniger wahrscheinlich die katalytische Aktivität der Ribozyme *in vitro* (Bertrand *et al.*, 1994).

Die hier beschriebenen *in vitro* Spaltungsstudien zeigten, dass alle drei AntiTPH1-Miniribozyme zum Schneiden von *Tph1* an den vorausgesagten Schnittstellen fähig waren (Abbildung III.1.21 und III.1.22.). Interessanterweise ergaben sich aber bedeutende Unterschiede bezüglich der Spaltungseffizienz der *Tph1*-RNA-Substrate mit den drei AntiTPH1-Miniribozymen, die abhängig war von der Reaktionsdauer sowie vom Verhältnis Miniribozym zu Substrat. Die höchste Spaltungseffizienz wurde mit dem Ribozym Rz1218 erzielt, das an der Position 1218 die *Tph1*-RNA schneidet. Wie die Berechnungen zeigten,

können die gemessenen Unterschiede bezüglich der relativen Aktivitäten der drei Miniribozyme zumindest teilweise mit den freien Energien ihrer Dissoziationen und Substratassoziationen (denn nur diese beiden Parameter sind von der Nukleotidsequenz abhängig) erklärt werden (Tabelle III.1.2). So ergab sich eine enge Korrelation zwischen den errechneten freien Energiewerten und den experimentell gemessenen Aktivitäten jedes Miniribozyms.

Schlussfolgernd kann man feststellen, dass Sekundärstrukturvorhersagen der Ziel-RNAs und Berechnungen der freien Energien die Vorauswahl der passenden Schnittstellen von Ribozymen für *in vitro* Studien unterstützen können. Die *in vitro* Spaltungsexperimente, die in dieser Arbeit beschrieben sind, wurden durchgeführt, um eine Vorauswahl für das effektivste AntiTPH1-Miniribozym zu treffen, das dann für *in vivo* Anwendungen im Tiermodell verwendet werden sollte. Jedoch war nicht klar, ob die Ergebnisse aus diesen *in vitro* Versuchen mit kurzen synthetisch erzeugten RNA-Substraten auf *in vivo* Bedingungen übertragen werden können, obgleich das bereits früher vorgeschlagen worden ist (Mistry *et al.*, 2001). Die Unterschiede zwischen den Vorhersagen und der *in vivo* Situation können damit erklärt werden, dass die meisten RNAs als komplexe Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen, zum Teil in Verbindung mit Proteinen, in der Zelle vorliegen (Pyle und Green, 1995), so dass nicht alle möglichen Schnittstellen für die Ribozym vermittelte Spaltung gleichermaßen *in vivo* zugänglich sein können. Außerdem sind die Art der Applikation der Ribozyme, deren Stabilität und subzelluläre Lokalisation wichtige limitierende Parameter für *in vivo* Anwendungen (Thompson *et al.*, 1995; Bertrand *et al.*, 1997). Folglich sind nicht nur die Wahl der geeignetsten Schnittstellen sondern auch die Wahl der verwendbaren Applikation und des Expressionssystems die Herausforderungen im Design einer effektiven Ribozymstrategie.

Um die Spaltungseffizienz der drei Miniribozyme *in vivo* zu studieren, wurden sie in eine tRNA-Expressions-kassette geklont, von der man weiß, dass sich diese tRNA-Konstrukte im Zytosol lebender Zellen anreichern (Abbildung III.1.23; Thompson *et al.*, 1995), dem Teil der Zelle, um die bestmögliche Wechselwirkung mit der endogen exprimierten *Tph1*-mRNA zu gewährleisten. Eine computergestützte Vorhersage der Spaltungseffizienzen der drei tRNA-Ribozymkonstrukte ist jedoch leider nicht möglich. Deshalb musste das effizienteste Miniribozym ausgetestet werden. In für diesen Zweck ersten Versuchen, wurden die Aktivitäten der Anti-Tph1-tRNA-Miniribozyme *in vitro* gemessen, wie bereits für die Miniribozyme allein beschrieben. Überraschenderweise zeigten weder das Ribozym tRz793 noch das Ribozym tRz1218 eine Spaltungsaktivität in diesen Experimenten, aber die

Spaltreaktionen der kurzen *Tph1*-RNAs mit Ribozym tRz186 ergab unerwartet eine Dosis abhängige Spaltung (Abbildung III.1.25).

Diese Daten zeigen, dass Computer gestützte Vorhersagealgorithmen noch nicht ausreichen, um die Spaltungseffizienz von Ribozymen zuverlässig vorherzusagen. Deshalb können nur mit empirischen Tests entsprechende Aussagen gemacht werden. Jedoch ist dieser empirische Ansatz, der hier verwendet wurde, ein leistungsfähiges Verfahren, um wirkungsvolle tRNA-Miniribozymkonstrukte zu identifizieren, die für *in vivo* Anwendungen bestimmt sind.

Schließlich wurden auch die Spaltungseffizienzen der tRNA-Miniribozymkonstrukte in Zellkulturexperimenten bestimmt. Dafür wurden die tRNA-Expressions-kassetten benutzt, um stabil transfizierte P815-Zellen zu erzeugen. In guter Übereinstimmung mit den dargestellten *in vitro* Daten für die Spaltungseffizienz des tRz186-Konstruktes waren die Ergebnisse aus den Zellkulturstudien mit den tRz186 transfizierten P815-Zellen, in denen sich der *Tph1*-mRNA-Gehalt und die TPH1-Aktivität deutlich bis 21 % bzw. 36 % verringert hatten, während keine Herabregulation in den Zellen ermittelt wurde, die mit tRz793 und tRz1218 transfiziert wurden (Abbildung III.1.27). Diese Daten bestätigen, dass es möglich ist, die *in vitro* Effizienz eines Ribozyms in gewissem Ausmaß auf die *in vivo* Situation zu übertragen, aber nur wenn die komplette Expressionskassette für die Generierung der *in vitro* Daten verwendet wird.

2.2 Ribozyme im transgenen Tiermodell

Die Anwendung von Ribozymen zur gezielten Inhibition der Genexpression im Tiermodell wurde bereits demonstriert. Die ersten transgenen Mäuse, die ein Hammerheadribozym exprimierten, waren gegen β 2-Mikroglobulin gerichtet und reduzierten die mRNA um bis zu 90 % (Larsson *et al.*, 1994). Weitere Beispiele sind die spezifische Reduktion von bovinem α -Lactalbumin mit einem Hammerheadribozym in einer doppelt transgenen Maus um bis zu 78 % (L'Huillier *et al.*, 1996) und die Hammerheadribozym vermittelte leichte Reduktion des Chloridionenkanals CIC5 auf Proteinlevel. Jedoch gab es in diesem Fall widersprüchliche Ergebnisse, weil eine transgene Maus ohne Reduktion der mRNA zu beobachten war, während im *in vitro* Assay eine über 80 %ige Reduktion der mRNA nachgewiesen werden konnte (Luyckx *et al.*, 1999). Diese Beispiele zeigen das Potential der Ribozymtechnologie, um spezifisch die Genexpression im transgenen Tiermodell zu unterdrücken, andererseits ist aber die Effizienz im einzelnen transgenen Tiermodell schwer vorherzusagen

beziehungsweise in Zellkultur oder die *in vitro* bestimmten Effizienzen auf das Tiermodell zu übertragen. Bestimmende Faktoren für die Expression eines Transgens sind neben denen im Design des Konstruktes liegenden, wie die Stärke des Promotors und die Stabilität und intrazellulären Lokalisation des Transkripts, vor allem Integrationsort und -frequenz des Transgens im Genom. So kann das Transgen durch den Positionseffekt in der Nähe von transkriptionell inaktiven Regionen (Heterochromatin) integrieren und teilweise oder komplett inaktiviert werden oder es können häufig auftretende multiple Integrationen beziehungsweise lange Tandemintegrationen zu Interferenzen führen (Robertson *et al.*, 1995; Wall, 1996). Dieses Phänomen tritt besonders häufig mit kleineren Konstrukten auf, wie sie auch die hier verwendeten Ribozymkonstrukte darstellen.

Ein weiteres Problem, das auch bei retroviral erzeugten transgenen Tieren auftreten kann, stellt der Mosaizismus dar. Das heißt, dass nicht alle Zellen einer transgenen Maus das Transgen im Genom integriert haben und deshalb zum Beispiel im Zielgewebe keine Expression des Transgens stattfindet (Soriano und Jaenisch, 1986). Der retrovirale Gentransfer birgt auch den Nachteil einer möglichen reduzierten Transkription durch Hypermethylierung in Abhängigkeit von den LTRs des Virusgenoms in sich (Pannell *et al.*, 2000). Durch gezielte Mutationen in den LTRs von retroviralen Vektoren konnte aber der Inaktivierung durch Methylierung entgegengewirkt werden (Swindle *et al.*, 2004).

2.3 Bedeutung für eine antithrombotische Gentherapie

Schon seit längerem ist bekannt, dass 5-HT für die Blutgerinnung wegen seiner vasokonstriktorischen Wirkung und proaggregatorischen Eigenschaft auf Thrombozyten eine wichtige Rolle spielt, doch blieben die Wirkmechanismen von 5-HT weiter unklar (Holland, 1976; Houston und Vanhouette, 1986). In Studien mit TPH1-KO-Mäusen, die kein peripheres 5-HT aufweisen, wurde eine deutlich verminderte primäre Hämostase festgestellt, die durch 5-HT-Applikation vollständig wiederhergestellt werden kann (Walther *et al.*, 2003b). Genauere Untersuchungen zeigten, dass für die Blutgerinnung die Anwesenheit von 5-HT notwendig ist. So stimuliert 5-HT über den 5-HT_{2A}-Rezeptor die Ausschüttung von vWf aus den α -Granula der Thrombozyten und aus Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen, während ADP die 5-HT induzierte Ausschüttung verstärkt. Weiterhin ist 5-HT auch verantwortlich für die Bindung der aus den α -Granula freigesetzten proaggregatorischen Proteinen an die Oberfläche der Thrombozyten (Walther *et al.*, 2003b). So wurde bereits gezeigt, dass 5-HT durch Transglutaminase katalysiert, kovalent an vWf, Fibrinogen,

Faktor V und andere α -Granula-Proteine nach deren Ausschüttung gebunden wird und dann an Thrombospondin und Fibrinogen von aktivierten Thrombozyten bindet (Dale *et al.*, 2002; Szasz und Dale 2002). Die aggregierenden Thrombozyten können dann mit subendothelialen Matrix-Proteinen in Wechselwirkung treten, wodurch der Thrombozytenpfropf gebildet wird, der die Läsion verschließt. Zusätzlich führt 5-HT zur Kontraktion vaskulärer glatter Muskeln und trägt auf diese Weise zum Verschluss bei (Cohen *et al.*, 1983).

Weil, wie beschrieben, die Thrombozytenaggregation in den 5-HT defizienten TPH1-KO-Mäusen wesentlich verringert ist, sind sie vor Thrombose und Thromboembolismus geschützt (Walther *et al.*, 2003b). Diese Befunde eröffnen ein therapeutisches Potential in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen durch spezifische Hemmung der TPH1, die zu einer Reduktion des peripheren 5-HT führt. Denn Thrombosen und arteriosklerotische Plaques (sekundäre Thrombosen) in Herzkranz- oder Hirnarterien, die zu Herzinfarkt beziehungsweise Schlaganfall führen, sind die Hauptursachen für Invalidität und Mortalität in den entwickelten Industrienationen. Eine bisher angewendete dauerhafte medikamentöse antithrombotische Therapie bei Hochrisikopatienten konnte, wie in einer kürzlichen Metaanalyse gezeigt wurde, die nichttödlichen Herzinfarktraten um ein Drittel und Schlaganfälle um ein Viertel reduzieren (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; Wald und Law, 2003). Mit den antithrombotischen Ribozymen umginge man bei dieser Therapie die Risiken und Nebenwirkungen von anderen Thrombozytenaggregationshemmern wie zum Beispiel die von Acetylsalicylsäure verursachten Gastrointestinalblutungen (Elwood *et al.*, 2005; Baigent, 2005). Auch Durchblutungsstörungen, die zum Beispiel durch *Diabetes mellitus* bedingt sind, könnten mit diesen Ribozymen behandelt werden.

Wie in Abschnitt IV.2.1 dargestellt, eignen sich Ribozyme gut dafür, spezifisch die *Tph1*-Expression zu hemmen ohne die wichtige neuronale *Tph2*-Expression zu beeinträchtigen. Jedoch gibt es in der Humanmedizin noch keine etablierten und zugelassenen Verfahren für die Anwendung von gentherapeutisch wirkenden Substanzen wie sie Ribozyme oder andere Oligonukleotide darstellen. Zur Behandlung maligner Tumore befinden sich aber viele Ansätze einer somatischen Gentherapie in der Erprobung. So wurden zum Beispiel in Studien mit einem retroviralen Vektor Antisense-Oligonukleotide gegen die mRNA des *bcr-abl*-Gens bei chronischer myeloischer Leukämie eingesetzt (Zhao *et al.*, 1997) oder durch direkte Verabreichung modifizierter Antisense-Oligonukleotide gegen das *bcl-2*-Gen follikuläre Lymphome behandelt (Webb *et al.*, 1997). Ferner gibt es Ansätze zur Gentherapie von HIV-Infektionen (Statham und Morgan, 1999). Die fortgeschrittensten Entwicklungen einer Gentherapie gibt es bei Indikationen, wie Brustkrebs, Dick- und Enddarmkrebs, HIV und

zystischer Fibrose, die sich in der klinischer Phase II befinden, bei Kopf- und Halskrebs schon in Phase III (Edelman *et al.*, 2003; Bender, 2004).

Als Vektoren für die Gentherapie werden meist rekombinante Retroviren und Adenoviren, seltener Herpes- und Lentiviren verwendet, aber auch nichtvirale Liposom vermittelte Vektoren werden eingesetzt. Problematisch sind bisher die sichere Anwendung der Viren (Spink und Geddes, 2004) und die oft zu geringe Effizienz verursacht durch Immunabwehr und geringe Transduktionsraten (Nathwani *et al.*, 2004; Bender, 2004).

Für eine Gentherapie zur Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen sind vor allem Strategien in der Erprobung, die durch Transmission und damit Überexpression proangiogener Faktoren, wie zum Beispiel VEGF und FGF, eine bessere Durchblutung erreicht werden soll, aber auch Strategien in denen mit Hilfe von Oligonukleotiden Zielgene, wie zum Beispiel die Entzündung vermittelnde Zytokine TNF- α und NF- κ B, inhibiert werden (Melo *et al.*, 2004).

Eine weitere vielversprechende Anwendung von Ribozymen ist eine jüngst erfolgreich durchgeführte Methode, in der das komplette Ribozym enthaltenen Plasmid direkt ohne die Verwendung eines Vektorsystems i.v. injiziert wurde, wie eine Studie am Mausmodell mit antiTNF- α -Ribozymen zur Behandlung von Kollagen induzierter Arthritis beweist (Kumar *et al.*, 2005).

Eine neue vielversprechende Alternative zur Ribozym vermittelten Verminderung der endogenen Genexpression erwächst in der siRNA-Technologie (Elbashir *et al.*, 2001a, b; Paddison *et al.*, 2002). Diese 21 bis 23 nt langen doppelsträngigen RNAs induzieren sequenzspezifisch die Degradierung von mRNA unter Nutzung eines RNA-Interferenz induzierenden Silencing-Komplex (RISC) und führen so zum Knockdown des Zielgens. Der Vorteil dieses Verfahrens ist die sehr hohe Effizienz bei wesentlich geringeren Konzentrationen an siRNA im Vergleich zu Ribozymen und auch eine längere Wirkdauer, wenn synthetische RNA-Oligonukleotide eingesetzt werden (Wang *et al.*, 2004). Andererseits ist aber eine geringere Spezifität von bestimmten siRNAs beobachtet worden (Jackson und Linsley, 2004). So können elf zusammenhängende Nukleotide eines Gens, die homolog zu einer siRNA sind, einen Knockdown dieses Gens induzieren (Jackson *et al.*, 2003). In einer anderen Studie reichten bereits sieben komplementäre Nukleotide aus, um zu einer verminderten Genexpression zu führen (Lin *et al.*, 2005). Ebenso können partiell komplementäre siRNAs die Translation verringern ohne die mRNA-Konzentration zu beeinflussen (Saxena *et al.*, 2003; Scacheri *et al.*, 2004). Auch epigenetische Effekte wie die Unterdrückung der Genexpression durch Methylierung von DNA und Histon H3 kann durch siRNAs verursacht

werden (Kawasaki und Taira, 2004). Dennoch wird die siRNA-Technologie mit voranschreitender Aufklärung der Wirkungsweise und der die Spezifität bestimmenden Faktoren in immer größerem Umfang genutzt. Neben dem Knockdown von Genen in Zellkultursystemen und im Tiermodell, um deren Funktion zu studieren, gibt es auch gentherapeutische Ansätze mit siRNAs. Klinische Studien in Phase I gibt es bereits zur Behandlung von alterungsbedingter Makuladegeneration und HIV (Leung und Whittaker, 2005). Die generellen Probleme der Gentherapie sind bei der Anwendung von siRNAs im jedoch die gleichen wie für die Ribozyme.

3 DIE NEUE NEURONALE TPH-ISOFORM (TPH2)

3.1 Eigenschaften der TPH2

Seit über 30 Jahren gab es Hinweise auf die Existenz mehrerer TPH-Isoformen (Lovenberg *et al.*, 1967; Lovenberg *et al.*, 1968; Jequier *et al.*, 1969; Kuhn *et al.*, 1980; Boadle-Biber, 1978; Cash, 1998; Mockus und Vrana, 1998). So fand man bei der Isolierung von TPH aus Gesamthirnpräparationen von Ratten zwei TPH-Isoformen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (Cash *et al.*, 1985). Auch ergaben sich Unterschiede in den ermittelten biochemischen Eigenschaften der TPH je nach dem Gewebe aus dem die TPH isoliert wurde (Abschnitt III.2.5.2; Nakata und Fujisawa, 1982a, 1982b; Kuhn *et al.*, 1980; Yang und Kaufman, 1984). Weiterhin wurden unterschiedliche Mengenverhältnisse von Protein zu mRNA im Hirnstamm und der Epiphyse berichtet, was mit unterschiedlichen Translationsraten erklärt wurde (Dumas *et al.*, 1989; Hart *et al.*, 1991; Austin und O'Donnell, 1999). Erst die Generierung von TPH(1)-KO-Mäusen (*Tph1*^{-/-}), die wider Erwarten keinen letalen Phänotyp zeigten, machten die strikte Trennung des serotonergen Systems in ein peripheres und ein neuronales serotonerges System deutlich. Denn während im Gehirn der 5-HT-Gehalt nur marginal und nicht signifikant verringert war, fanden sich in peripheren Geweben, wie dem Duodenum und dem Blut kein oder nur noch Spuren von 5-HT (Walther *et al.*, 2003a). Ein zweites *Tph*-Gen, das nicht mit dem TPH(1)-knockout-Konstrukt interferierte und im Nervengewebe exprimiert wird, musste also existieren und es konnte in der Gendatenbank (Human Genome Database) auch ein zu *Tph1* homologes Gen detektiert werden. Die *Tph2*-cDNAs von Maus, Ratte und Mensch wurden kloniert, die Sequenzen ermittelt und analysiert. Die Expression dieser cDNAs im Zellkultursystem ermöglichte die

Bestätigung als TPH durch die Bildung von 5-HTP und die biochemische Charakterisierung der neuen TPH-Isoform (Abschnitt III.2).

Die Sequenzanalysen ergaben eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von TPH1 und 2, insbesondere in der C-terminalen katalytischen Domäne. Die größten Differenzen finden sich erwartungsgemäß in der N-terminalen regulatorischen Domäne, was die beschriebenen Unterschiede der Enzymaktivität der beiden TPH-Isoformen, die aus Hirngewebe und peripheren Geweben isoliert wurden erklären würde. Die hier bestimmten kinetischen Parameter für die rekombinante TPH2 bestätigen diese etwas geringere Aktivität, die mit den synthetischen Kofaktoren in Erscheinung tritt und entsprechen damit in etwa den in der Literatur beschriebenen Werten, die mit Extrakten aus Hirngeweben bzw. P815-Zellen gewonnen wurden (Abschnitt III.2.5.2; Kuhn *et al.*, 1980; Nakata *et al.*, 1982a, 1982b; Kowlessur und Kaufman, 1999). Danach besitzt die TPH2 nur mit dem natürlichen Kofaktor eine etwas höhere katalytische Aktivität, also niedrigere K_m -Werte und interessanterweise eine höhere Stabilität verglichen mit TPH1. Dieser Befund deutet auf eine stabile, relativ gleichbleibende 5-HT-Biosynthese durch TPH2 im Gehirn hin. Eine neuere Studie, in der die humane TPH1 und TPH2 *in vitro* transkribiert und translatiert und auch in *E. coli* exprimiert und gereinigt wurden, bestätigen die hier ermittelten kinetischen Parameter zum großen Teil. Demzufolge sind die K_m -Werte von TPH2 bezüglich Trp aber durchgehend leicht höher als für TPH1, während die K_m -Werte von TPH2 gegenüber TPH1 bezüglich des natürlichen BH₄ auch hier signifikant geringer bestimmt wurden. Außerdem konnte bei TPH2 eine Phosphorylierungsstelle Ser19 in der längeren regulatorischen Domäne gefunden werden, die in der TPH1 keine Entsprechung hat. Auch eine Interaktionsuntersuchung von TPH2 mit dem aktivierenden 14-3-3-Protein BMH1 ergab nur eine Bindung mit der phosphorylierten TPH2. Untersuchungen der Substratspezifitäten von TPH1 und 2 ergaben eine wesentlich stringenter Substratdiskriminierung der TPH2 zwischen Trp und Phenylalanin auf Kosten der Substrataffinität (McKinney *et al.*, 2005). So sind die K_m -Werte der TPH1 für Phenylalanin dreimal so groß wie die für Trp, die K_m -Werte der TPH2 aber 6,5mal so groß und bestätigen frühere Untersuchungen, in denen keine detektierbare Hydroxylierungsaktivität von Phenylalanin mit Stammhirn-TPH (TPH2), aber eine mit Trp vergleichbare für die Epiphysen-TPH (TPH1) ermittelt wurden (Jequier *et al.*, 1969).

Die mit RPA durchgeführten Untersuchungen zur Expression konnten die angenommene fast exklusive Expression von *Tph2*-mRNA im Gehirn der Maus zeigen (Abschnitt III.2.1.2, Abbildung III.2.2; Walther *et al.*, 2003a), was eine spätere detaillierte Realtime-PCR-Studie mit humanen *post mortem* Proben bestätigte (Zill *et al.*, 2004b). Auch *in situ* Hybridisierungsstudien in denen die *Tph1*- und *Tph2*-mRNA-Expression in den Raphekernen

und der Epiphyse von Ratten untersucht wurde, zeigen eine fast ausschließliche *Tph2*-Expression in den Raphekernen (Patel *et al.*, 2004). Im Widerspruch dazu fand man in neuesten Realtime-PCR-Untersuchungen eine Koexpression von *Tph1* und *Tph2* in den verschiedenen Hirnarealen (Kortex, Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, Amygdala, Cerebellum). Demnach ist die *Tph2*-mRNA gegenüber der *Tph1*-mRNA in den Raphekernen viermal höher und etwa siebenmal höher als in den anderen untersuchten Hirnarealen, wo eher die *Tph1*-mRNA, aber auf sehr niedrigen Niveaus, überwiegt (Zill *et al.*, 2005). Weil in dieser Untersuchung aber eine interne Kontrolle fehlt, ist dieses Ergebnis weniger aussagefähig als die bereits zitierten Studien.

Beschrieben ist weiterhin in *in situ* Hybridisierungsstudien eine ausgeprägte Tagesrhythmik der Expression von *Tph2*-mRNA im Mittelhirn von Ratten. Und zwar erreichen die Werte in den Raphekernen ihr Maximum gegen Ende der Schlafphase mit ca. 30 bis 40 % über den Basalwerten in den Aktivitätsphasen (Malek *et al.*, 2005).

Interessant ist auch, dass die TPH2-Expression durch Glucocorticoide, aber nicht wie die TPH1-Expression durch Estradiol reguliert wird. So konnte mit *in situ* Hybridisierung und Realtime-PCR-Untersuchungen eine signifikante Reduktion der *Tph2*-mRNA um bis zu 44 % in den Raphekernen von Mäusen nach der Behandlung mit Dexamethason festgestellt werden (Clark *et al.*, 2005). In einer weiteren quantitativen RT-PCR- und *in situ* Hybridisierungsstudie von Raphekernregionen von Rhesusaffen wurde jedoch eine signifikante Erhöhung der TPH2-Expression nach einmonatiger Behandlung mit Estrogen gefunden (Sanchez *et al.*, 2005).

Diese Befunde machen die Verknüpfung des zentralen serotonergen Systems mit anderen Hormonsystemen, insbesondere dem Stresssystem deutlich, unterstützt durch die Beobachtung, dass depressive Patienten einen erhöhten Cortisolspiegel durch chronische Überaktivität der Hypothalamo-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) aufweisen (Gibbons, 1964) und anderen klinischen Studien, die eine kausale Verbindung zwischen einer HPA-Dysregulation und Depression beschreiben (Barden *et al.*, 1995; Holsboer und Barden, 1996; Belanoff *et al.*, 2001).

3.2 Bedeutung der TPH2 für das Verhalten im Tiermodell

Dem serotonergen System kommt unter den Neurotransmittersystemen im ZNS eine große Bedeutung bei der komplexen Regulierung von Empfinden und Verhalten höherer Organismen zu, wie aus der Vielzahl bisheriger Studien zur Manipulation des serotonergen

Systems hervorgeht (Abschnitt I.2.2.2). Allerdings gelang es noch nicht, gezielt und spezifisch die Synthese des neuronalen 5-HTs, also die TPH2, auf Nukleinsäureebene zu manipulieren und deren Auswirkungen im Tiermodell zu studieren. Erst mit der Entdeckung des *tph2*-Gens ist dieses, sowie die Untersuchung dieses Gens auf Mutationen und deren Einfluss auf die Entstehung bestimmter Krankheiten des Nervensystems möglich geworden (Walther *et al.*, 2003a).

Für das Studium einer genetisch bedingten verminderten 5-HT-Biosynthese im Gehirn und möglichen Auswirkungen auf die Hirnentwicklung und damit strukturelle und auch funktionelle Ursachen psychiatrischer Erkrankungen zu ergründen, ist der Knockdown von *Tph2* im Tiermodell ein geeigneter Ansatz. Interessant sollten zunächst die Auswirkungen dieser verringerten 5-HT-Synthese auf das Verhalten der Tiere sein. Die erzeugten transgenen Mäuse, die Ribozym vermittelt die TPH2 vermindert exprimieren, zeigten ungewöhnlich aggressives und nervöses Verhalten und in Verhaltenstests konnte ein vermindertes Angstverhalten festgestellt werden. Jedoch konnten im Frontalkortex keine signifikant verringerten 5-HT-Gehalte ermittelt werden. Was sich aber zeigte, waren erniedrigte 5-HIAA-Konzentrationen und erhöhte Trp-Gehalte. Dieser Befund lässt sowohl auf eine verringerte 5-HT-Biosynthese durch ein verringertes Verhältnis von 5-HT zu Trp, als auch auf eine verringerte Neurotransmission, die als 5-HT-Umsatzrate durch das 5-HIAA/5-HT-Verhältnis ausgedrückt wird, schließen (Mena *et al.*, 1976). Insbesondere der Gehalt von 5-HIAA in der CSF wird allgemein als Marker für die serotonerge Aktivität verwendet und mit Verhaltensänderungen in Verbindung gebracht (Sarna *et al.*, 1983; Hutson *et al.*, 1986). So korreliert beispielsweise eine geringe 5-HIAA-Konzentration in der CSF von Primaten mit Verhaltensmerkmalen wie verminderte Impulskontrolle, unbeherrschter Aggression, sozialer Isolation und niedrigem sozialen Rang (Higley und Linnoila, 1997). Keine Aussagen lassen diese Messungen aber über extrazelluläres 5-HT zu, das mit Rezeptoren wechselwirken kann und damit die eigentliche Neurotransmission widerspiegelt. Ungeklärt bleibt bis jetzt auch, ob verringerte 5-HT-Werte die Neurogenese während der Embryonalentwicklung beeinträchtigen und auf diese Weise zu Veränderungen der Architektur des serotonergen Systems im Gehirn führen, beispielsweise durch eine schwächere serotonerge Innervation bestimmter Hirnareale, und allein dadurch Verhaltensänderungen bewirken. Denn wie von MAOA-KO-Mäusen bekannt ist, hat eine erhöhte Neurotransmitterkonzentration einen erheblichen Einfluss auf die Reifung bestimmter Hirnareale (Cases *et al.*, 1996; Lebrand *et al.*, 1996; Vialis *et al.*, 1998; Vitalis und Parnavelas, 2003). Hinweise dafür liefert auch eine kürzlich publizierte Untersuchung mit bildgebenden Verfahren, wonach Träger einer inaktiveren Genvariante des SERT, was eine erhöhte 5-HT-Konzentration im synaptischen Spalt zur Folge haben sollte,

ein verringertes Volumen grauer Hirnsubstanz in der Amygdala und im *perigenualen Anterior Cingulate Cortex* (pACC) und eine geschwächte Verbindung beider Areale aufweisen. Die daraus resultierende schwächere Rückkopplungsschleife führt demnach zu einer erhöhten Aktivität der Amygdala nach Wahrnehmung von Stress auslösenden Stimuli (Pezawas *et al.*, 2005) und wie aus anderen Studien hervorgeht zu einer erhöhten Anfälligkeit für Depression und Suizidalität (Caspi *et al.*, 2003).

Neuere Untersuchungen zeigen auch, dass durch einen homozygoten C1473G-Polymorphismus des *Tph2*-Gens eine Reduktion der 5-HT-Synthese im Gehirn verschiedener Mausstämme bedingt ist, was aber auf Grund des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes andere Ursachen haben könnte (Zhang *et al.*, 2004). Eine weitere Mutation (G1463A) im kodierenden Bereich des humanen *TPH2*-Gens (Exon 11), die nach Zellkulturexperimenten mit rekombinanten Enzymvarianten in catecholaminergen PC12-Zellen zum 80 %igen Funktionsverlust führt, wurde bei neun von 87 Patienten mit unipolarer Depression gegenüber drei von 219 Kontrollpersonen identifiziert (Zhang *et al.*, 2005), während eine andere Studie das Fehlen einer Assoziation von diesem und zwei anderen Polymorphismen in Exon 11 mit unipolarer Depression feststellte (Garriock *et al.*, 2005).

Eine andere Analyse ergab drei SNPs in den Intronen 1, 5 und 8 des humanen *TPH2*-Gens, die keine signifikanten Assoziationen mit bipolaren Depressionen und Suizidalität zeigten (De Luca *et al.*, 2004). Auch die mit Realtime-RT-PCR bestimmte *TPH2*-Expression in *post mortem* Parietalkortexproben von Patienten mit Schizophrenie, unipolaren und bipolaren Depressionen ergaben keine Veränderung bezüglich Kontrollpersonen (Shamir *et al.*, 2005), auch nicht in Suizidopfern, wie eine weitere Untersuchung feststellte (Luca *et al.*, 2005).

SNP- und Haplotypanalysen des *TPH2*-Gens liefern aber Hinweise für Assoziationen eines detektierten SNP im Intron 5 mit unipolarer Depression (Zill *et al.*, 2004a) und Suiziden (Zill *et al.*, 2004c). Eine weitere SNP-Analyse, in der drei intronische SNPs und zwei stille Mutationen in Exon 7 und 9 identifiziert wurden, unterstützen einen Einfluss des *TPH2*-Gens bei der Entstehung affektiver Störungen (Harvey *et al.*, 2004). Die Mehrheit der Studien in Bezug auf Polymorphismen von *TPH2* liefern aber keine Hinweise für eine Assoziation dieses Gens mit bipolaren Depressionen (Preisig *et al.*, 2005).

Interessant sind auch kürzlich entdeckte Polymorphismen des *TPH2*-Gens, die mit dem Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHD) assoziiert sind. So ist ein SNP in Intron 5 in einer Studie mit 179 irischen Familien (Sheehan *et al.*, 2005) und zwei SNPs im regulatorischen Bereich des *TPH2*-Gens in einer Studie mit 103 deutschen Familien und 225 betroffenen Kindern beschrieben (Walitza *et al.*, 2005). Eine *in vivo* Untersuchung mit funktioneller Magnetresonanztomografie (MRT) zeigt außerdem, dass bei Trägern einer

regulatorischen Variante im *TPH2*-Promotor [G(-844)T] die Reaktivität der Amygdala (ein für die Erzeugung und Regulation von emotionalem Verhalten entscheidendes Hirnareal) beeinflusst ist (Brown *et al.*, 2005).

Eine weitere Assoziation zwischen Autismus und zwei SNPs in den Introns 1 und 4 des *TPH2*-Gens ist ebenfalls beschrieben worden (Coon *et al.*, 2005). Demnach könnte *TPH2* auch einen moderaten Beitrag bei der Prädisposition von Autismus liefern.

Diese angeführten Untersuchungen machen deutlich, welche Bedeutung der *TPH2* bei der Entwicklung von bestimmten psychiatrischen Erkrankungen zukommt und dass Tiermodelle mit einer veränderten 5-HT-Biosynthese einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieser Erkrankungen und des serotonergen Systems insgesamt leisten können.

3.3 Phylogenetische Einordnung der *TPH2*

Das gegenwärtige Konzept, das auf Analysen der molekularen Uhr basiert ohne Fossilfunde zu berücksichtigen, geht von einer ersten Verdopplung der ältesten Hydroxylase PAH vor ungefähr 750 Millionen Jahren mit dem Erscheinen der TH aus, gefolgt von einer zweiten Verdopplung vor 450 Millionen Jahren, die zur TPH führte (Grenett *et al.*, 1987).

Die phylogenetischen Analysen von *TPH1* und *TPH2* zeigen, dass die Verdopplung eines ursprünglichen *tph*-Gens vor der Trennung der Knochenfische von den Wirbeltieren aufgetreten sein muss, da eine orthologe *TPH2* im Zebrafisch (*Danio rerio*) und im Kugelfisch (*Takifugu rubripes*) gefunden werden konnte. Folglich muss diese Verdopplung schon vor mindestens 500 bis 550 Millionen Jahren aufgetreten sein. Außerdem ist bekannt, dass schon der einfache Plattwurm *Schistosoma mansoni*, der ein repräsentativer Nachkomme eines Vorfahren ist, der von den *Coelomata* im *Bilateria*-Stadium abzweigt, *TPH* und *TH* besitzt. Das bedeutet, dass die zweite Verdopplung von PAH, die zur TPH führt, vor der Entwicklung von *Bilateria* vor ungefähr 800 Millionen Jahren aufgetreten sein muss.

Weitere Sequenzanalysen ergaben, dass der *Protozoen/Ciliates Tetrahymena* zwei Hydroxylasen besitzt, die beide den ursprünglichen PAHs ähneln, die eine mehr der *Chordaten*-PAH, die andere mehr der TH, und auch Sequenzen von zwei Hydroxylasen im *Protozoen/Flagellate Leishmania major*, die so den Zeitpunkt der ersten Verdopplung von PAH auf ungefähr vor 1 bis 1,1 Milliarden Jahren einengen. Damit stimmt auch überein, dass in der früher abgezweigten pilzartigen Amöbe/*Protozoen Dictyostelium discoideum* nur eine PAH gefunden werden kann, obwohl deren Genom vollständig sequenziert worden ist. Interessanterweise besteht aber diese PAH bereits aus der charakteristischen

Zweidomänenstruktur aller AAAHs, die in allen *Metazoen* vorhanden sind. Es ist weithin bekannt, dass die aminoternale regulatorische Domäne der AAAHs eine große Ähnlichkeit zur bakteriellen Chorismatmutase/Prephenatdehydrogenase (CM/PDH), den Schlüsselenzymen in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren, einschließlich Phenylalanin und Tyrosin, aufweist (Zhang *et al.*, 1998).

Die Organisation von Genen, die Enzyme eines bestimmten Stoffwechselweges in Operonen kodieren, ist ein Kennzeichen der bakteriellen Anpassung, um auf die Anwesenheit von essentiellen Nährstoffen in ihrer Umwelt zu reagieren und führt häufig zu polycystronischen Transkripten oder sogar zu Fusionsproteinen, die bei mehrstufigen Biosynthesen keine diffusionslimitierenden Schritte enthalten. Ein gutes Beispiel dafür ist das bifunktionale Fusionsprotein von CM und PDH in einigen Bakterienstämmen, sowie monofunktional als unterschiedliche Enzyme in anderen Stämmen. Interessant ist auch, dass alle bakteriellen PAHs Eindomänenenzyme sind ohne eine CM/PDH-Fusion, die in diesen Organismen als einzelne Enzyme vorkommen. Folglich besitzt dieses Bakterium zwei alternative Biosynthesewege des Tyrosins, den energieintensiven CM/PDH-abhängigen und den energetisch vorteilhafteren PAH-abhängigen Weg, in dem molekularer Sauerstoff notwendig ist. Bemerkenswert in diesem Kontext ist, dass das Spektrum aller Bakterien mit einer PAH von zwingend aerob bis fakultativ anaerob reicht, denn so kann der Zeitpunkt des Erscheinens von PAH in diesen Mikroorganismen auf die Zeit der Anreicherung von freiem molekularem Sauerstoff in der Atmosphäre vor etwa 1,5 bis 2 Milliarden Jahren eingegrenzt werden. In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die anaeroben phototropischen *Chloroflexaceae*, die als repräsentative Mikroorganismen mit der rudimentärsten nichtoxygenen photosynthetischen Maschinerie gelten, ebenfalls PAH besitzen. Jedoch ist bemerkenswert, dass *Chloroflexaceae* nicht nur des anaeroben Phototropismus' im Licht fähig sind, sondern auch in der Lage, einen einfachen oxydierenden Metabolismus in der Dunkelheit zu betreiben (Olsen, 1970). Daraus lässt sich abschätzen, dass solche einfachen Organismen begannen, sowohl die energetischen Vorteile der Oxydation mit Sauerstoff für die Tyrosinsynthese, als auch gleichzeitig die oxygene Photosynthese, die vor über 3 Milliarden Jahren auftrat, zu nutzen.

Durch die rudimentäre CM/PDH-PAH-Fusion in den ersten *Protozoen* ist gleichzeitig die Fähigkeit der Phenylalaninsynthese verloren gegangen. Ein Nachteil, der aber durch die Ernährung mit Phenylalanin produzierenden Mikroorganismen kompensiert werden konnte.

4 DIE ETABLIERTEN TIERMODELLE

4.1 Die transgenen TPH1-Knockdown-Mäuse

Zu Beginn dieser Arbeit war nur ein *tph*-Gen bekannt und es konnte angenommen werden, dass ein totaler Knockout letal im Tiermodell sein würde, weil 5-HT bereits eine entscheidende Rolle bei der präneuronalen Ontogenese spielt (Abschnitt I.3.1.1; Walther und Bader, 1998, 1999), es aber auch einer der wichtigsten Neurotransmitter ist und zur Entwicklung des ZNS beiträgt (Abschnitt I.2.2.1). Um die Auswirkungen einer verringerten 5-HT-Biosynthese im Tiermodell zu studieren, wurden transgene Mäuse generiert, die Ribozym vermittelt eine reduzierte TPH1-Expression aufweisen sollten.

Die Methode der Wahl zur Herstellung transgener Mauslinien ist die Mikroinjektion eines Genkonstruktes in den männlichen Vorkern einer Zygote (Gorden *et al.*, 1980). Die Effektivität dieser Methode ist mit ca. 3 % transgenen Mäusen pro Embryo beziehungsweise 17 % transgene Mäuse der Nachkommen beschrieben. Geschmälert wird die Effizienz weiter dadurch, dass nur etwa die Hälfte der Linien, abhängig vom Konstrukt, das Transgen exprimieren (Wall, 1996). Mit 25 % war die hier erreichte Quote der transgenen Nachkommen etwas höher, was durch die relativ geringe Länge des Ribozymkonstruktes von 166 bp bedingt gewesen sein könnte. Die im Vergleich zu den Zellkulturexperimenten relativ geringe Verminderung der TPH1-Expression bei heterozygot transgenen Mäusen der Linie tRz186-10 um 34 % könnte auch durch Tandemintegrationen, begünstigt durch die Kürze des Ribozymkonstruktes und damit einhergehenden Interferenzen, verursacht worden sein. Dennoch war eine erhebliche Reduktion des Plasma-5-HT-Gehaltes um 85 % bei dieser Mauslinie zu beobachten. Auf Grund der zeitaufwändigen Zucht inklusive biologischer Tests wurden bis jetzt keine identifizierbar homozygot transgenen Tiere erhalten von denen zu erwarten ist, dass sie wegen der zweifachen Expression der Ribozyme noch geringere TPH1-Expressionen und somit auch noch geringere 5-HT-Werte in den peripheren Geweben zeigen als die heterozygoten Tiere. In diesem Fall sollte auch untersucht werden, ob diese Tiere Abweichungen in der Immunantwort, zum Beispiel in Bezug auf allergische Reaktionen zeigen (vgl. Abschnitt I.3.1.3).

4.2 Die transgenen TPH2-Knockdown-Mäuse

Erst mit der Entdeckung des *tph2*-Gens wurde es möglich auch das neuronale serotonerge System auf genetischer Ebene zu manipulieren und so die Bedeutung der TPH bei der Entwicklung mentaler Störungen oder psychiatrischer Erkrankungen zu erforschen. Da wie bereits erwähnt, davon ausgegangen werden kann, dass die totale Disruption des *Tph2*-Gens zum Absterben der Embryonen führt (Abschnitt I.3.1.1; Walther und Bader, 1999), eignet sich gerade die Ribozymtechnologie neben der RNA-Interferenz (siRNA) durch spezifische Herabregulation der TPH2-Expression für diese Aufgabe. Mangels einer TPH2 exprimierenden Zelllinie war es nicht möglich, die vier verschiedenen Hammerhead-ribozymkonstrukte zu testen. Für die deshalb mit allen vier Ribozymen direkt generierten transgenen Tiere wurde die effizientere retrovirale Gentransfermethode benutzt, die mit insgesamt über 76 % transgener Nachkommen die hohe Effizienz dieser Methode bestätigt.

Die angewandte Ribozymstrategie führte zwar zu transgenen Tieren mit einem auffälligen Verhaltensphänotyp, jedoch waren die 5-HT-Konzentrationen im Präfrontalkortex der heterozygoten Tiere wider Erwarten nicht verringert. Erst nach einer zusätzlichen Trp-Gabe zeigte sich bei diesen Mäusen ein verringerter Trp-Umsatz durch die TPH2 in einem geringeren 5-HT/Trp-Verhältnis. Diese verringerte TPH2-Aktivität konnte auch mit einem Enzymassay bestätigt werden. Die erniedrigten 5-HIAA-Konzentrationen zeigen außerdem eine verminderte serotonerge Neurotransmission im Präfrontalkortex an. Dieser Befund kann als Folge geringerer 5-HT-Ausschüttung in den synaptischen Spalt oder einer geringeren Dichte serotonerger Nervenfasern in diesem Hirnareal erklärt werden. Weitere detaillierte molekularbiologische Untersuchungen über veränderte serotonerge Projektionen mit immunohistochemischen Methoden und Messungen extrazellulären 5-HTs mit Mikrodialysetechniken könnten Aufschluss darüber geben. Diese sollten dann mit homozygoten Tieren durchgeführt werden, um auch eine bestmögliche Unterscheidung zu durch TPH1 generiertem 5-HT zu erzielen, das zwar eine untergeordnete Rolle im Gehirn spielen sollte, aber trotzdem nicht außer Acht gelassen werden sollte. Interessant wäre auch zu untersuchen, ob durch die verminderte TPH2-Aktivität eine Störung des Gleichgewichts anderer Neurotransmittersysteme, insbesondere des Dopaminsystems verursacht wurde.