

Phänotypische Charakterisierung von Tryptophanhydroxylase 1-Knockout-Mäusen

Zur Rolle des Serotonins
in Darm- und Herz-Kreislauffunktionen
sowie in der Immunologie

Zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften am
Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin vorgelegte

Inaugural-Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Claudia S. Wilhelm

Berlin, 2005

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Molekularbiologie von
Hormonen im Herz-Kreislaufsystem des Max-Delbrück-Centrums für
Molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Bader

2. Gutachter: Prof. Ferdinand Hucho

Datum der Disputation: 22. April 2005

Berlin, 2005

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
SYMBOLE UND EINHEITEN	XIV
I EINLEITUNG	1
1 5-HT und 5-HT-Metabolismus	1
1.1 5-HT – ein vielseitiges biogenes Amin	1
1.2 Die 5-HT-Biosynthese	1
1.3 TPH1 und TPH2 - gewebespezifische 5-HT-Synthese	2
1.4 Der 5-HT-Katabolismus	3
2 Signalvermittlung durch 5-HT	4
2.1 5-HT-Rezeptoren	4
2.2 5-HT-Transport und Speicherung	6
2.3 Intrazelluläre Wirkungsweise	8
3 5-HT-vermittelte Effekte	10
3.1 5-HT als Neurotransmitter	10
3.2 5-HT in der Ontogenese	11
3.3 5-HT in der Hämostase	11
3.4 5-HT im Gastrointestinaltrakt	12
3.4.1 Der Darm	12
3.4.2 Ausschüttung des 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen	13
3.4.3 5-HT in der Peristaltik	13
3.4.4 5-HT in der Sekretion	15
3.4.5 Choleratoxin-induzierte Sekretion	15
3.4.6 5-HT in der Emesis	16
3.4.7 Pica	16
3.5 5-HT im Herz-Kreislauf-System	17
3.5.1 Vasokonstriktorische und vasodilatorische Eigenschaften des 5-HT	17

VERZEICHNISSE

3.5.2	Beeinflusst 5-HT den basalen Blutdruck?	18
3.5.3	5-HT in der Herzentwicklung	19
3.5.4	5-HT bei Organschäden durch Bluthochdruck	19
3.6	5-HT im Immunsystem	20
3.6.1	Vorkommen von 5-HT und 5-HT-Rezeptoren im Immunsystem	20
3.6.2	Thrombozyten als immunologische Zellen	21
3.6.3	5-HT in der T-Zellaktivierung	22
3.6.4	Kontakthypersensibilität (Das Ohrschwellmodell)	23
3.7	Indolamin-2,3-Dioxygenase-induzierte immunologische Toleranz	24
3.7.1	Schwangerschaft – ein immunologisches Paradoxon	24
3.7.2	Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO)	26
3.7.3	Aushungern als Abwehrmechanismus	27
3.7.4	IDO-Expression zur Regulierung von T-Zell-Reaktionen (Toleranzinduktion)	27
4	Zielsetzung	29
II	MATERIAL UND METHODEN	30
1	Bezugsquellen von Feinchemikalien und Reagenzien	30
2	Bezugsquellen von Enzymen und Kits	31
3	Bezugsquellen von Geräten	31
4	Arbeiten mit Nukleinsäuren	33
4.1	Isolierung von Nukleinsäuren	33
4.1.1	Genomische DNA aus Schwanzbiopsien und Zellen	33
4.1.2	Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	33
4.1.3	DNA aus Agarosegelen	34
4.1.4	RNA-Isolierung	34
4.2	Konzentrationsbestimmungen	34
4.3	Lagerung von Nukleinsäuren	35
4.4	Polymerasekettenreaction (PCR)	35
4.4.1	PCR zur Genotypbestimmung	35
4.4.2	PCR zur Klonierung kleiner Fragmente	36
4.4.3	PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR)	36
4.4.4	PCR zum Nachweis der Genexpression	37
4.4.5	Sequenzierung	37
4.5	Enzymatische Manipulationen der DNA	38
4.5.1	Ligation	38
4.5.2	DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen	38
4.5.3	Reverse Transkription	38
4.6	Gelelektrophorese	39
4.6.1	Agarosegele	39
4.6.2	Polyacrylamidgele	39
5	Bakterien und Zellen	40
5.1	Bakterien und Transformation	40
5.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen	41

VERZEICHNISSE

5.3	Fibroblastenisolierung und –kultivierung	41
5.4	Kultur embryonaler Stammzellen und deren Manipulation	42
5.5	Kultur Dendritischer Zellen	42
5.6	Milzzellenisolierung und ³ Thymidin-Inkorporationsassay	43
6	Tierversuche	43
6.1	Allgemeine Handhabung der Tiere	43
6.1.1	Tierstämme und Tierhaltung	43
6.1.2	Narkosen und Tötungen	44
6.1.3	Blutabnahme	44
6.1.4	Anpaarung	45
6.2	Untersuchungen der Darmfunktionen	45
6.2.1	<i>in vivo</i> -Messungen der Peristaltik im gesamten Darm	45
6.2.2	<i>in vivo</i> -Messungen der Peristaltik des Dünndarms	46
6.2.3	<i>in vitro</i> -Messung der Peristaltik	46
6.2.4	Messung der Cholera-toxin-induzierten Sekretion	46
6.2.6	Messung des Cisplatin-induzierten Pica-Verhalten	47
6.3	Untersuchungen des Herz-Kreislauf-Systems	48
6.3.1	Blutdruckmessungen	48
6.3.2	DOCA/NaCl/Nx-Behandlung	49
6.4	Immunologische Untersuchungen	49
6.4.1	Test auf Kontakthypersensibilität	49
6.4.2	Crotonöl-induzierte Ohrenschwellung	49
6.4.3	Adoptiver Transfer	50
6.4.4	Ermittlung der Migrationsfähigkeit Dendritischer Zellen	50
7	Histochemische Untersuchungen	51
7.1	whole mount-Immunhistochemie von Duodenum	51
7.2	whole mount-Immunhistochemie von Epidermis	52
7.3	Immunhistochemie von duodenalen Kryoschnitten	52
7.4	PAS-gefärbte Paraffinschnitte von Nieren	53
8	High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	53
8.1	Probenaufarbeitung für die HPLC	53
8.2	5-HT-Detektion mittels HPLC	54
9	Statistik	54
III	ERGEBNISSE	55
1	5-HT als Vermittler verschiedener Darmfunktionen	55
1.1	Untersuchung des Gastrointestinaltraktes der TPH-/- Tiere auf 5-HT	55
1.2	Untersuchung des Darmtransportes <i>in vivo</i>	57
1.3	Untersuchung der Peristaltik <i>in vitro</i>	59
1.4	Messung der Cholera-toxin-induzierten Sekretion	61
1.5	Messung des Pica-Verhaltens nach Verabreichung des Chemotherapeutikums Cisplatin	62
2	5-HT im kardiovaskulären System	63
2.1	5-HT im Blutkreislauf	63

VERZEICHNISSE

2.2	Untersuchung der Herzgewichte	63
2.3	Funktionale Untersuchung der Herzen	64
2.4	Untersuchung des basalen Blutdruckes	65
2.5	Bluthochdruckinduktion mittels DOCA/NaCl/Nx	67
2.6	Organschäden durch Bluthochdruck	68
3	5-HT in der T-zellvermittelten Immunantwort	72
3.1	5-HT und TPH in lymphatischen Organen	72
3.2	Abgeschwächte Immunantwort in TPH1 ^{-/-} -Mäusen	73
3.3	Nicht-T-Zell-vermittelte Ohrenschwellung	74
3.4	Dendritische Zellen	75
3.5	Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen sensitisierter Tiere	77
3.6	Wiederherstellung der CHS-Reaktion durch 5-HT-Applikation	79
3.7	<i>in-vitro</i> -T-Zell-Proliferation	80
4	5-HT in derIDO-vermittelten Schwangerschaftstoleranz	81
4.1	Effekte einer erhöhten Trp-Verfügbarkeit auf den Schwangerschaftserfolg	81
4.2	Der Effekt des IDO-Inhibitors 1-MT auf allogene Schwangerschaften	84
4.3	IDO-Knockout	86
4.3.1	Klonierung des IDO-Targeting-Vektors für die ES-Zellmanipulation	86
4.3.2	ES-Zellmanipulation	87
IV	DISKUSSION	88
1	5-HT in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	88
2	Darmfunktionen in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	90
2.1	Die Initiation des peristaltischen Reflexes nach gängiger Lehrmeinung	90
2.2	Der peristaltische Reflex in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	90
2.3	Wie wirkt 5-HT in der Peristaltik?	92
2.4	5-HT in der Cholera-toxin-induzierten Sekretion	94
2.5	Pica in Mäusen	95
3	Kardiovaskuläre Untersuchungen in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	97
3.1	5-HT in der Herzentwicklung	97
3.2	Beeinflussung des Blutdruckes durch 5-HT	98
3.3	Verstärkte bluthochdruckinduzierte Organschäden in TPH1 ^{-/-} Mäusen	100
4	Immunologische Untersuchungen in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	102
4.1	Verminderte Kontakthypersensibilität in den TPH1 ^{-/-} Mäusen	102
4.2	Beeinträchtigung der efferenten CHS-Phase in den TPH1 ^{-/-} Tieren	103
4.3	T-Zellaktivierung und -proliferation	105
5	Versuche zur IDO-induzierten Toleranz in der Schwangerschaft	106
5.1	IDO und Schwangerschaft	106
5.2	Trp-Fütterungsversuch	106
5.3	Versuche mit 1-MT	107
5.4	IDO-Knockout	108
5.5	5-HT oder Trp?	108

VERZEICHNISSE

V LITERATURVERZEICHNIS	110
VI ANHANG	127
Lebenslauf	127
Publikationen	127
Danksagung	128

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung I.1	Die 5-HT-Biosynthese	2
Abbildung I.2	Der 5-HT-Katabolismus	4
Abbildung I.3	Die typischen Signalwege der verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubtypen	6
Abbildung I.4	Die elementaren Vorgänge an Synapsen 5-HT-synthetisierender Neuronen	8
Abbildung I.5	5-HT-vermittelte Exozytose der α -Granula von Thrombozyten	9
Abbildung I.6	Aufbau des Darmes	12
Abbildung I.7	Initiierung des peristaltischen Reflexes	14
Abbildung I.8	Der dreiphasige Reflex nach 5-HT-Injektion	17
Abbildung I.9	Das Ohrschwellungsmodell	24
Abbildung I.10	Abstoßung und Akzeptanz zwischen Mutter und Kind	25
Abbildung I.11	Abbau verschiedener Indolamine durch die Indolamin-2,3- Dioxygenase	26
Abbildung I.12	Mechanismus der durchIDO-induzierten Toleranz	28
Abbildung III.1	5-HT-Konzentration im Duodenum	55
Abbildung III.2	5-HT- und TPH-Verteilung im Duodenum der TPH1-/- Tiere	56
Abbildung III.3	Transit durch den gesamten Darm	57
Abbildung III.4	Transit durch den Dünndarm	58
Abbildung III.5	Transit von pastösen Markern durch den gesamten Darm und den Dünndarm	59
Abbildung III.6	Repräsentative Aufzeichnungen phasischer Kontraktionen in Ileum-präparaten <i>in vitro</i>	60
Abbildung III.7	Kontraktionsamplituden in Abhängigkeit vom intraluminalen Druck	60
Abbildung III.8	Kontraktionsfrequenz in Abhängigkeit vom intraluminalen Druck	61
Abbildung III.9	Choleratoxininduzierte Flüssigkeitssekretion	62
Abbildung III.10	5-HT-Konzentrationen in Thrombozyten und Blutplasma	63
Abbildung III.11	Herzgewichte bezogen auf das Körpergewicht	64
Abbildung III.12	Herzrate	64
Abbildung III.13	Katheder- und Telemetriebestimmte Blutdrücke	66
Abbildung III.14	Bluthochdruckinduktion mittels DOCA/NaCl/Nx-Behandlung	67
Abbildung III.15	Herzgewichte nach DOCA/NaCl/Nx-Behandlung bezogen auf das Körpergewicht	68
Abbildung III.16	Albumingehalte im Urin während der DOCA/NaCl/Nx – Behandlung von weiblichen Tieren	69
Abbildung III.17	Albumingehalte im Urin während der DOCA/NaCl/Nx – Behandlung von männlichen Tieren	70
Abbildung III.18	PAS-gefärbte Nierenschnitte DOCA/NaCl/Nx-behandelter TPH1-/- Tiere	71
Abbildung III.19	5-HT-Konzentrationen lymphatischen Organen und der Haut	72

VERZEICHNISSE

Abbildung III.20	Genexpression der TPH1 und TPH2 in ausgewählten Organen	73
Abbildung III.21	CHS-Reaktion: Ox-induzierte Ohrenschwellung	74
Abbildung III.22	Crotonölinduzierte Ohrenschwellung	75
Abbildung III.23	Langerhanssche Zellen in der Epidermis der TPH1 ^{-/-} Tiere	76
Abbildung III.24	Migrationsassay für dendritische Zellen	76
Abbildung III.25	Schema des Adoptiven Transfers	77
Abbildung III.26	Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen aus TPH1 ^{-/-} Tieren	78
Abbildung III.27	Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen aus TPH1 ^{+/+} Tieren	78
Abbildung III.28	Phenotyp-Rettung durch 5-HT-Applikation	79
Abbildung III.29	Wurfgrößen syngen und allogenen verpaarter TPH1 ^{+/+} und TPH1 ^{-/-} Tiere unter Trp-Gabe	83
Abbildung III.30	Auswirkung der 1-MT-Applikation auf allogene Föten	84
Abbildung III.31	1-MT im Plasma nach 1-MT-Pellet-Applikation	86
Abbildung III.32	Knockout-Strategie zur Mutierung des <i>ido</i> -Gens	87
Abbildung IV.1	Vollständige Unterdrückung des peristaltischen Reflexes	91
Abbildung IV.2	Mögliche Wirkungsmechanismen des Cholera-toxins	94
Abbildung IV.3	Wirkungsmechanismus des Cholera-toxins	95

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle I.1	Pro & Kontra der 5-HT-Beteiligung an der Bluthochdruckpathogenese	18
Tabelle II.1	Genotypisierungsprimer	36
Tabelle II.2	Primer zur Klonierung des kurzen Armes des IDO-Targeting-Konstrukts	36
Tabelle II.3	Primer zur Klonierung des langen Armes des IDO-Targeting-Konstrukts	37
Tabelle II.4	PCR zum Nachweis der TPH1- und TPH2-Genexpression	37
Tabelle II.5	Primer zum Nachweis der TPH1- und TPH2-Genexpression	37
Tabelle II.6	Aufarbeitung der HPLC-Proben	53
Tabelle III.1	Haemodynamische Parameter	65
Tabelle III.2	Basale Blutdruckwerte	66
Tabelle III.3	Blutdruckveränderungen durch DOCA/NaCl/Nx-Behandlung	67
Tabelle III.4	Wurfgrößen syngen und allogenen verpaarter TPH1 ^{+/+} und TPH1 ^{-/-} Tiere unter Trp-Gabe	82
Tabelle III.5	Anzahl und Entwicklungsstand allogener Föten nach 1-MT-Applikation während der Schwangerschaft	85

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akronyme	Bedeutung
129SvJ	eine Mauslinie
1-MT	1-Methyltryptophan
5-HIAA	5-Hydroxyindolacetat
5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
AAAD	Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
AANAT	Arylalkylamin-N-Acetyltransferase
AC	Adenylat-Cyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c	eine Mauslinie
BSA	Bovines Serumalbumin
C57BL/6	eine Mauslinie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBA	eine Mauslinie
Cdc42	eine GTPase
CHS	Kontakthypersensibilität (contact hypersensitivity)
CT	Choleratoxin
CTLA-4 (-Ig)	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (-immunglobulin)
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DNT	<i>Bordetella</i> dermonecrotic toxin
dNTPs	Desoxyribonucleotidtriphosphate
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DTH	verzögerte Hypersensibilität (delayed type hypersensitivity)
DTT	1,4-Dithiothreitol
CNF	<i>Escherichia coli</i> cytotoxic necrotizing factor
EC	Enzymkennzahl (Enzyme Commission number)
EDP	Enddiastolischer Druck
EDPVR	Enddiastolische Druck-Volumenrelation
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EDV	Enddiastolisches Volumen
ENS	Enterisches Nervensystem
ESP	Endsystolischer Druck
ESPVR	Endsystolische Druck-Volumenrelation
ESV	Enddiastolisches Volumen
FACS	fluorescence-assisted cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPIb α und GPIb-IX-V	Glykoprotein Iba und Glykoprotein Ib-IX-V
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie mit Fluorometrischer Detektion (high pressure liquid chromatography with fluorometric detection)
ICR	Mauslinie
IMC	interdigestive migrating contractions
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ

VERZEICHNISSE

IP ₃	Inosit-1,4,5-Trisphosphat
IPAN	intrinsic primary afferent neuron
IPTG	Isopropyl-beta-D-Thiogalaktopyranosid
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LKZ	Lymphknotenzellen
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
MAO A/B	Monoaminoxigenase A/B
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
M-MLV	Moloney murine leukaemia virus
mRNA	Boten-RNA
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NK	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
Nx	Uninephrektomie
OCS	Open canalicular system
Ox	Oxazon
PAH	Phenylalanin-Hydroxylase
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCA	Perchlorsäure
PCPA	p-Chlorophenylalanin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PF-4	Platelet factor 4
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
Rab4	eine GTPase
Rac1	eine GTPase
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and presumably secreted
RhoA	eine GTPase
RNA	Ribonucleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNasin	ein Ribonuklease-Inhibitor
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender PCR
SCF	stem cell factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERT	Serotonin Reuptake Transporter
SNP	single-nucleotide polymorphism
SSRI	Selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (selective serotonin reuptake inhibitor)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	Transforming growth factor β
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPH 1/2	Tryptophan-Hydroxylase 1/2
<i>Tph</i> 1/2	Tryptophan-Hydroxylase-Gen 1/2
TPR	Gesamter peripherer Widerstand (total peripheral resistance)
Trp	L-Tryptophan

VERZEICHNISSE

UV	Ultraviolett
VMAT1/2	Vesikulärer Monoamintransporter Typ 1/2
vWF	von Willebrand-Faktors
X-Gal	4-Bromo-5-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

SYMBOLLE UND EINHEITEN

Symbol oder Einheit	Bedeutung
%	Prozent
(v/v)	Volumenverhältnis
(w/v)	Verhältnis Masse zu Volumen
bp	Basenpaare
bpm	Schläge pro Minute
cpm	Impulse pro Minute
d	Tag
g	Gramm oder Einheit der Schwerkraft
h	Stunde
kb	Kilo-Basenpaare
l	Liter
min	Minute
mmHg	Millimeter einer Quecksilbersäule
OD _x	optische Dichte (bei x nm)
s	Sekunde
u	Einheit enzymatischer Aktivität (enzymatic unit)
upm	Umdrehungen pro Minute

ZUSAMMENFASSUNG

Das Monoamin Serotonin (5-HT) ist vor allem als Signalmolekül im Zentralen Nervensystem und in der Hämostase bekannt. Darüber hinaus ist 5-HT jedoch auch an immunologischen Prozessen und physiologischen Reaktionen im Darm und im Herz-Kreislaufsystem beteiligt. Der erste Schritt der 5-HT-Biosynthese wird von zwei unterschiedlichen Enzymen katalysiert, von der Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2) in den Neuronen, und von der Tryptophan-Hydroxylase 1 (TPH1) in den extraneuronalen Geweben. In der vorliegenden Arbeit wird der Phänotyp der TPH1-Knockout Tiere hinsichtlich der Beteiligung des 5-HT an verschiedenen Prozessen außerhalb des Zentralen Nervensystems untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen lieferten Ergebnisse, die aufgrund der Komplexität des 5-HT-Rezeptorsystems kaum mit Hilfe pharmakologischer Substanzen hätten erarbeitet werden können.

Der Ort der stärksten 5-HT-Synthese durch die TPH1 ist der Gastrointestinaltrakt. Hier werden über 90 % des im Körper vorkommenden 5-HT in den enterochromaffinen Zellen synthetisiert und gespeichert. Bislang hat man dem 5-HT der enterochromaffinen Zellen die Initiation des peristaltischen Reflexes zugesprochen, obwohl es schon in den 1950er Jahren experimentell begründete Zweifel an dieser Sichtweise gab. Die TPH1-/- Mäuse, deren enterochromaffine Zellen kein 5-HT enthalten, sollten gemäß dieser Hypothese keinen peristaltischen Reflex aufweisen. In dieser Arbeit wird mit Hilfe von *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen gezeigt, dass die 5-HT-Defizienz der enterochromaffinen Zellen keineswegs die Peristaltik der TPH1-/- Tiere beeinträchtigt, und dass demnach das 5-HT der enterochromaffinen Zellen nicht für die Initiierung des peristaltischen Reflexes nötig ist. Ähnlich verhält es sich mit der durch Cholera toxin induzierten gesteigerten Flüssigkeitssekretion. Auch hier wird die in der Literatur beschriebene Beteiligung des 5-HT der enterochromaffinen Zellen widerlegt. Das 5-HT der enterochromaffinen Zellen spielt also bei Weitem nicht die wichtige Rolle in der Darmphysiologie, wie es ihm 50 Jahre lang zugeordnet wurde.

Die Untersuchungen des Herz-Kreislaufsystems der TPH1-/- Mäuse zeigen, dass das in den Thrombozyten gespeicherte periphere 5-HT den basalen Blutdruck beeinflussen kann. Der in der Literatur beschriebene Einfluss des peripheren 5-HT auf die Herzentwicklung wird dagegen widerlegt.

Die immunologischen Untersuchungen mit Hilfe des Kontakthypersensibilitätsmodells bestätigen die entscheidende Rolle des 5-HT in der Entwicklung von Entzündungsreaktionen. Für Untersuchungen des Effekts des 5-HT auf die T-Zellaktivierung erwies sich das Tiermodell aufgrund der verbliebenen 5-HT-Spuren jedoch als nicht zweckhaft.

Die 5-HT-haltigen Thrombozyten werden in der Literatur vor allem in Bezug auf die durch Bluthochdruck induzierten Nierenschäden eher schadensfördernd beschrieben. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf den entzündungsfördernden Eigenschaften der Thrombozyten, die in dieser Arbeit bestätigt werden. Da die Thrombozyten in den TPH1-/- Mäusen auf Grund ihrer 5-HT-Defizienz aber in ihrer Funktion eingeschränkt sind, wurde erwartet, dass die TPH1-/- Mäuse geringere Bluthochdruckschäden davon tragen. Überraschenderweise zeigen jedoch die TPH1-/- Mäuse, verglichen mit entsprechenden Wildtypkontrollen, quantitativ stärkere und qualitativ ungewöhnliche Organschäden nach der Bluthochdruckinduktion. Das Ergebnis dieses Experiment lässt demnach darauf schließen, dass Thrombozyten die Entstehung von hypertensiven Nierenschädigungen nicht fördern, sondern dass sie im Gegenteil eher schützende Eigenschaften aufweisen.

Die Frage, ob 5-HT oder die 5-HT-Vorläufersubstanz Tryptophan an der durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase induzierten immunologischen Toleranz gegenüber allogenen Föten beteiligt ist, konnte dagegen nicht beantwortet werden, da sich herausstellte, dass dieses Enzym generell nicht an der Entstehung der Schwangerschaftstoleranz beteiligt ist.

Es ist also gelungen, verschiedene in der Literatur existierende Hypothesen über die extraneuronale Rolle des 5-HT zu widerlegen, und neue 5-HT vermittelte Effekte aufzuzeigen.

ABSTRACT

The monoamine serotonin (5-HT) is particularly known as signalling molecule in the central nervous system and in the haemostasis. Beyond this, 5-HT is involved in immunological processes and physiological reactions in the gastrointestinal tract and the cardiovascular system, too. The first step of the 5-HT biosynthesis is catalyzed by two different enzymes: tryptophan hydroxylase 2 (TPH 2) acts in the neurons and tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) in all other known serotonergic tissues. In this study the phenotype of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1)-knockout mice was characterized regarding the involvement of 5-HT in various processes outside of the central nervous system. The conducted tests with these mice yield results that were hardly available by the usage of a pharmacological approach since the 5-HT-system is characterized by a very complex receptor family.

Over 90 % of the 5-HT found in the body is synthesized and stored by the enterochromaffin cells in the gastrointestinal system. Since about 1950, the 5-HT of these cells has been described as the key player in initiation of the peristaltic reflex, although there have been experimental doubts about this. According to this hypothesis, TPH1^{-/-} mice, the enterochromaffin cells of which do not contain 5-HT, should not be able to perform any peristaltic reflex. In this study it is shown using *in vivo* and *in vitro* tests that the peristaltic reflex of these mice is not impaired by the absence of 5-HT in the enterochromaffin cells. This result indicates that enterochromaffin cell's 5-HT is not necessary for the initiation of the peristaltic reflex. Another physiological reaction whose formation was described to depend on the 5-HT in the enterochromaffin cells is the increased secretion induced by cholera toxin. Also in this case a participation of the enterochromaffin cell's 5-HT could be disproved. This study shows that the important role of enterochromaffin cell's 5-HT within the gastrointestinal physiology was misattributed.

The analysis of the TPH1^{-/-} cardiovascular system shows that peripheral 5-HT stored within the platelets is able to influence basal blood pressure. But the described effect on cardiac development could be excluded.

The immunological tests performed by means of the contact hypersensitivity model approve the crucial role of 5-HT within the development of inflammatory responses. But for exploring 5-HT effects on T-cell activation the TPH1^{-/-} mice are not the right model since they still contain minute traces of 5-HT that seem to interfere.

The 5-HT containing platelets are described in literature to be conducive to the development on hypertension induced kidney damage. This effect presumably bases upon platelet's properties in promoting inflammatory events that could be proven in this study. Due to the lack of 5-HT TPH1^{-/-} platelets are restricted in their function. Therefore it was expected that TPH1^{-/-} mice develop less hypertensive organ damage. But surprisingly, TPH1^{-/-} mice are more affected by hypertension induced organ damages in a quantitative and qualitative way. The result of this experiment let us conclude that platelets do not promote the development of hypertension induced kidney damages but in contrast that they rather have protective properties.

The question if 5-HT or the 5-HT precursor tryptophan is involved in the maternal tolerance towards allogeneic fetuses mediated by the indoleamine-2,3-dioxygenase could not be answered since it turned out that this enzyme is not at all responsible for the onset of pregnancy induced tolerance.

In conclusion I succeeded to disprove several hypothesis about 5-HT's extra-neuronal role described in literature and to show new effects of serotonin.