

I EINLEITUNG

1 5-HT und 5-HT-Metabolismus

1.1 5-HT – ein vielseitiges biogenes Amin

1947 wurde im Rinderserum eine auf Blutgefäße vasokonstriktorisch wirkende Substanz in hoher Konzentration entdeckt und isoliert (Rapport *et al.*, 1947; Rapport *et al.*, 1948). Zuerst war nur diese tonusbeeinflussende Aktivität bekannt, weshalb sich schnell der Name Serotonin einbürgerte (Rapport *et al.*, 1948). Recht bald wurde jedoch klar, dass Serotonin identisch mit der schon früher in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes gefundenen, ebenfalls Kontraktionen auslösenden Substanz Enteramin ist (Erspamer, 1946; Erspamer & Asero, 1952). Die in den folgenden Jahren betriebene Strukturaufklärung zeigte, dass es sich bei dieser Substanz um einen decarboxylierten und hydroxylierten Tryptophanabkömmling, das 5-Hydroxytryptamin (5-HT) handelt (Rapport, 1949). 1951 konnte schließlich auch der Syntheseweg bestimmt werden (Hamlin & Fischer, 1951).

1964 wurde Serotonin/Enteramin auch in den Neuronen des Hirnstamms nachgewiesen, wo es als Neurotransmitter wirkt (Dahlström & Fuxe, 1964; Fuxe, 1965; Weber & Horita, 1965). Dies ist wohl die bekannteste Funktion diesesamins. Inzwischen ist klar, dass 5-HT auch ein wichtiger Botenstoff in der Hämostase, der Ontogenese oder der Immunantwort ist. Da 5-HT nun aber nicht nur als tonusregulierende Substanz im Blut beziehungsweise enteral vorkommt, sondern auch in anderen Organen und Geweben an sehr vielfältigen physiologischen und biochemischen Prozessen beteiligt ist, sind die Bezeichnungen Serotonin und Enteramin inzwischen eher als Trivialnamen gebräuchlich. Trotz der intensiven Arbeiten in den letzten sechzig Jahren ist das Forschungsgebiet „5-HT“ noch bei weitem nicht erschöpft. Das liegt vor allem an der großen Komplexität des 5-HT-Rezeptorsystems (Abschnitt I.2.1), und am 5-HT-Katabolismus, der vielfältige Regulationsmöglichkeiten bereit hält (Abschnitt I.1.4 und I.3.7.2). Aber selbst die recht einfach aufgebaute 5-HT-Synthese offenbarte erst vor Kurzem, dass nicht ein, sondern zwei Enzyme organabhängig den geschwindigkeitsbestimmenden Syntheseschritt katalysieren (Abschnitt I.1.2 und I.1.3).

1.2 Die 5-HT-Biosynthese

5-HT wird in einer relativ kurzen Reaktionsfolge aus der natürlich vorkommenden und proteinbildenden, für Säuger essentiellen aromatischen Aminosäure Tryptophan (Trp) gebildet (Abbildung I.1).

Im ersten Schritt wird der Indolring des Trp an Position 5 hydroxyliert, es entsteht 5-Hydroxytryptophan (5-HTP). Diese Reaktion wird, je nachdem wo die Synthese stattfindet, durch die Enzyme Tryptophan-Hydroxylase (TPH) 1 oder 2 (EC 1.14.16.4) katalysiert (siehe auch Abschnitt 1.3). TPH1 und TPH2 sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der 5-HT-Biosynthese und gelten daher auch als deren Marker. Beide

Enzyme enthalten Eisen (Fe^{2+}) und benötigen Tetrahydrobiopterin als Kofaktor, um die Reaktion mit molekularem Sauerstoff einzuleiten.

5-HTP wird anschließend zum Amin decarboxyliert. Katalysiert wird dieser Schritt durch die Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD, EC 4.1.1.28) mit Pyridoxalphosphat und Pyrrolochinolinchinon als Koenzyme. AAAD bewirkt nicht nur die Decarboxylierung von 5-HTP zu 5-HT, sondern ist auch an der Biosynthese anderer Amine, z.B. Tryptamin und Dopamin, beteiligt (Jung, 1986; Uchida *et al.*, 1992).

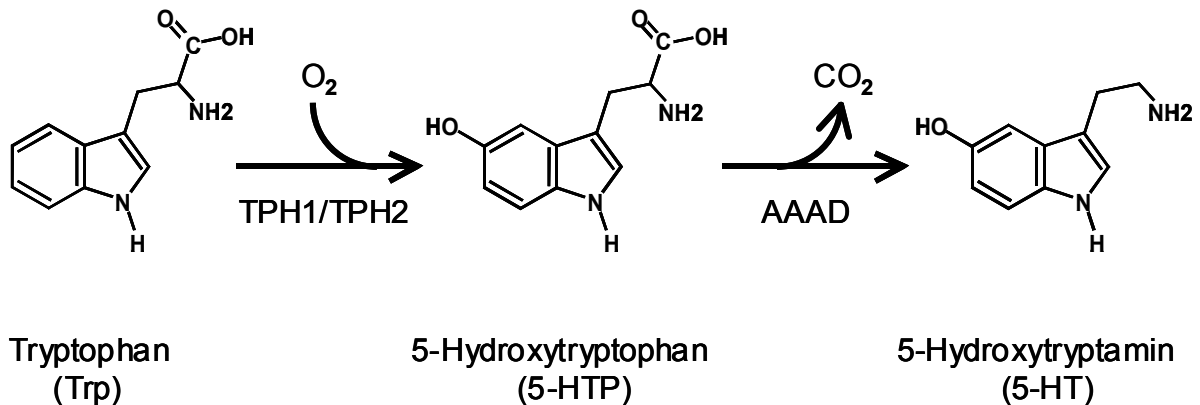


Abbildung I.1: Die 5-HT-Biosynthese.

TPH katalysiert im ersten Schritt die Hydroxylierung von Trp zu 5-HTP. Im zweiten Schritt katalysiert AAAD die Decarboxylierung von 5-HTP zu 5-HT.

1.3 TPH1 und TPH2 - gewebespezifische 5-HT-Synthese

Schon seit langem gibt es in der Literatur Hinweise auf das Vorkommen von mehr als einer TPH-Form. So unterschieden sich zum Beispiel die physikalisch-chemischen Eigenschaften von aus Hirnstamm und Epiphyse isolierter TPH (Kim *et al.*, 1991; Cash *et al.*, 1985). Andere Studien wiederum zeigten ein 150fach größeres mRNA-Protein-Verhältnis in der Epiphyse als in den Raphe-Kernen (Dumas *et al.*, 1989; Hart *et al.*, 1991; Austin *et al.*, 1999). Gewebespezifische Unterschiede wurden außerdem bei TPH-Antikörpern offenkundig, welche das Enzym entweder nicht in allen 5-HT-synthetisierenden Geweben detektieren konnten (Hasegawa *et al.*, 1987), oder, je nach verwendetem Gewebe, Proteine unterschiedlicher Größe erfassten (Chung *et al.*, 2001; Haycock *et al.*, 2002). Als Ursache dieser Phänomene wurde neben alternativem Splicing, daraus resultierender unterschiedlicher Translationseffizienz und/oder mRNA-Stabilität, beziehungsweise posttranslationalen Modifikationen, zum Beispiel Phosphorylierungen, auch eine zweite TPH-Isoform diskutiert. Jedoch konnte die Existenz eines zweiten *tph*-Genes lange Zeit nicht bewiesen werden.

Erst die Erstellung TPH-defizienter Mäuse zeigte deutlich, dass es eine zweite Tryptophan-Hydroxylase gibt. Da 5-HT eine Rolle in der Ontogenese (siehe auch Abschnitt I.3.1) spielt, war erwartet worden, dass ein Knockout des *tph*-Gens lethal ist,

zumindest aber schwere neuronale Schäden hervorruft. Grundlage dieser Erwartung waren auch die Effekte, die bei einer Dysfunktion der beiden anderen Mitglieder der Familie der Aromatischen Aminosäure Hydroxylasen auftreten. Die Tyrosin-Hydroxylase (TH, EC 1.14.16.2) katalysiert die Umwandlung von Tyrosin zu L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), welches dann unter anderem zu dem Neurotransmitter Dopamin und den Hormonen Adrenalin und Noradrenalin verstoffwechselt wird. Dopaminmangel gilt als Ursache des Parkinson-Syndrom. Der TH-knockdown im Mittelhirn mittels RNAi bewirkt Verhaltensstörungen (Hommel *et al.*, 2003), der Knockout des *th*-Gens wirkt schon im Embryonalstadium lethal (Zhou *et al.*, 1995). Das Fehlen der Phenylalanin-Hydroxylase (PAH, EC 1.14.16.1), welche Phenylalanin in Tyrosin überführt, ist eine relativ häufige Enzymopathie, die sogenannte Phenylketonurie. Sie ist zwar nicht tödlich, bei unbehandelten Kindern treten jedoch durch eine Aufstauung des Phenylalanins und dessen Umwandlungsprodukt Phenylpyruvat, welche den Ketonkörpertransport ins Hirn und damit dessen Energieversorgung blockieren, schwere irreversible Hirnschädigungen auf.

Trotz dieser markanten Phänotypen bei TH- oder PAH-Defizienz zeigten *tph*-Knockout-Mäuse keine offensichtliche Störungen oder gar Letalität. Eine genaue Analyse der verschiedenen Organe auf 5-HT zeigte, dass die TPH-KO-Tiere normale 5-HT-Konzentrationen im Gehirn aufwiesen. Als Ursache dieses 5-HT konnte kurze Zeit später ein zweites *tph*-Gen identifiziert werden (Walther *et al.*, 2003a).

Die altbekannte TPH-Form wird nun als TPH1, die neu entdeckte TPH2 genannt. Die beiden Isoenzyme zeigen eine hohe Sequenzhomologie zueinander (beim Menschen 71%), benötigen die gleichen Ko-Faktoren, unterscheiden sich aber in ihrer Lage im Genom und den physikalisch-chemischen Eigenschaften (Walther *et al.*, 2003b). TPH1 gilt als die periphere TPH-Variante und bildet 5-HTP in den extraneuronalen Geweben, zum Beispiel in den enterochromaffinen Zellen im Duodenum, aber auch in der Epiphyse, währenddessen TPH2 in neuronalen Zellen im Hirn und auch im enterischen Nervensystem exprimiert wird.

1.4 Der 5-HT-Katabolismus

5-HT kann über mehrere Wege abgebaut werden. Die drei wichtigsten werden in Abbildung 1.2 dargestellt.

Die oxidative Deaminierung des 5-HT durch die Monoamin-Oxygenasen führt zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd. Man kennt zwei Monoaminoxxygenasen: Typ A (MAO A) und Typ B (MAO B, EC 1.4.3.4). MAO A vermittelt den 5-HT-Abbau im Hirn, während MAO B hauptsächlich im Blut vorkommt, und dort 5-HT degradiert. 5-Hydroxyindolacetaldehyd wird anschließend zu 5-Hydroxyindolacetat (5-HIAA) umgewandelt und mit dem Urin ausgeschieden.

Durch N-Acetylierung (Arylalkylamin-N-Acetyltransferase, AANAT, EC 2.3.1.87) und anschließende O-Methylierung (Acetylserotonin-O-Methyltransferase, EC 2.1.1.4) des 5-HT wird in der Epiphyse, aber auch in einigen Gehirnregionen und der Retina, Melatonin hergestellt. Dieses Amin wird über eine 6-Hydroxylierung katabolisiert, und das

Produkt über die Nieren ausgeschieden.

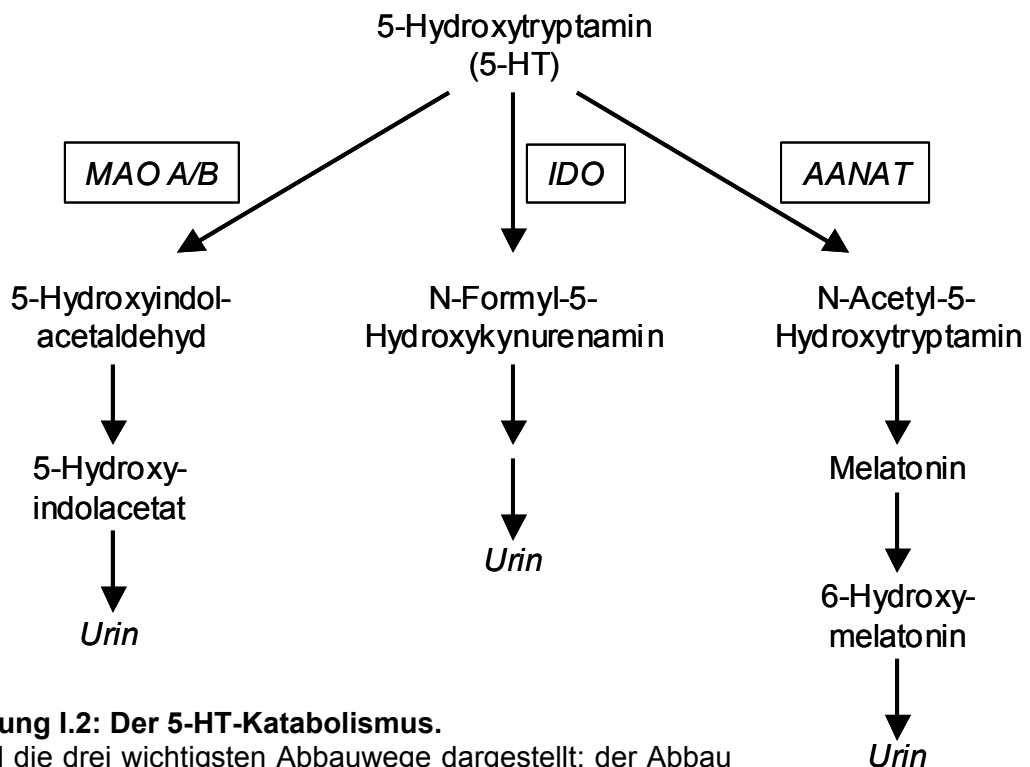


Abbildung I.2: Der 5-HT-Katabolismus.

Es sind die drei wichtigsten Abbauwege dargestellt: der Abbau über MAO, der Abbau über den Kynureninweg und die Melatoninsynthese. Nähere Erläuterungen in Abschnitt I.1.4.

Ein weiterer Abbauweg beginnt mit der Überführung des 5-HT zu Formyl-5-hydroxykynurenamin durch Spaltung des Indol-Fünfrings. Diese Reaktion wird durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO, 1.1.11.42) katalysiert, welches auch andere Indolamine wie zum Beispiel Tryptophan, Melatonin und 5-Hydroxytryptophan umsetzen kann. Formyl-5-hydroxykynurenamin wird weiter entlang des Kynureninweges, dem Katabolismus des Tryptophans, abgebaut und ausgeschieden. Jedoch kann 5-HT nicht wie Tryptophan zu $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ umgesetzt werden.

2 Signalvermittlung durch 5-HT

2.1 5-HT-Rezeptoren

Hinweise darauf, dass mehr als ein Rezeptor die physiologischen Effekte des 5-HT vermittelt, und eine erste Klassifizierung dieser 5-HT-Rezeptoren gab es schon Ende der 1950er Jahre. Die Einteilung in M- und D-Rezeptoren (antagonisiert durch Morphin bzw. Dibenzylin) durch Gaddum und Picarelli (1957) wurde aber aufgrund der nichtspezifischen Effekte der diskriminatorischen Liganden auf andere Neurotransmittersysteme recht bald wieder verworfen (Lewis, 1960; Day und Vane, 1963). Mit der Einführung der Radioliganden-Bindungstechnik in den 1970er Jahre (Bennet und Snyder, 1976; Peroutka

und Snyder, 1979) konnten die pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren deutlich präziser bestimmt werden. Die molekularbiologischen Methoden ab den 1980er Jahren führten dann zur Entdeckung vieler weiterer 5-HT-Rezeptoren, und auf Basis der gewonnenen Aminosäuresequenz- und Genstrukturdaten zu einer Neuordnung der 5-HT-Rezeptorklassifikation.

Inzwischen sind insgesamt 14, durch unterschiedliche Gene kodierte 5-HT-Rezeptoren bekannt (bislang nicht klonierte, also putative Rezeptoren wie den 5-HT_{1P} nicht mitgerechnet), welche aufgrund übereinstimmender Aminosäuresequenzen, Genorganisation, pharmakologischer Eigenschaften und der Kopplung mit second-messenger-Reaktionswegen einer von sieben Familien zugeordnet werden (Barnes and Sharp, 1999). Modifikationen, wie zum Beispiel alternatives Splicing (5-HT₄- und 5-HT₇-Rezeptor), mRNA-Editing (5-HT_{2C}-Rezeptor) und Homo- und Heterodimerisierung (5-HT_{1B/1D}-Rezeptor) erhöhen diese Vielfalt noch zusätzlich (Hoyer *et al.*, 2002).

Bis auf den 5-HT₃-Rezeptor, welcher ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal ist, gehören alle 5-HT-Rezeptoren zur Superfamilie der metabotropen, also G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, und zeigen die für diese Superfamilie typische, aus sieben Transmembrandomänen aufgebaute Tertiärstruktur. In Abbildung I.3 sind Signalwege dargestellt, welche durch die verschiedenen 5-HT-Rezeptoren aktivieren werden können. Für die Rezeptoren 5-HT_{5A} und 5-HT_{5B} liegen bislang noch keine gesicherten Daten zur Signaltransduktion in nativen Systemen vor. Die Signaltransduktionsdaten zu diesen Rezeptoren stammen aus rekombinanten Systemen und werden deshalb in Abbildung I.3 nicht mit aufgezeigt.

Es sollte jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass eine Reihe der Rezeptoren nicht nur mit den in der Abbildung I.3 angedeuteten Signalwegen koppelt, sondern mit weiteren Systemen verbunden ist und dabei auch gegensätzliche Reaktionen auslösen kann. So aktiviert zum Beispiel der 5-HT_{1A}-Rezeptor die Adenylat-Cyclase nicht nur, er kann sie in einigen Zellen auch inhibieren, ebenso wie die Phospholipase C durch diesen Rezeptor sowohl aktiviert als auch inhibiert werden kann. 5-HT-Rezeptoren lassen sich aber auch auf verschiedene Weisen selbst regulieren. Phosphorylierungen an intrazellulären Domänen durch Serin- und Threonin-Kinasen beeinflussen die Interaktionen mit G- und anderen Proteinen (eine Übersicht bietet Raymond *et al.*, 2001).

Diese Vielfalt und Komplexität der 5-HT-Rezeptoren und der an sie anschließenden Signaltransduktionswege sind Basis für das große Spektrum an physiologischen Reaktionen, welches 5-HT vermittelt. Einige der 5-HT-Rezeptoren wurden bereits experimentell in Mäusen deletiert: 5-HT_{1A} (Parks *et al.*, 1998), 5-HT_{1B} (Ramboz *et al.*, 1996), 5-HT_{2A} (Fiorica-Howells *et al.*, 2002), 5-HT_{2B} (Nebigil *et al.*, 2000), 5-HT_{2C} (Tecott *et al.*, 1995), 5-HT₃ (Zeitl *et al.*, 2002), 5-HT₄ (Compan *et al.*, 2004), 5-HT_{5A} (Grailhe *et al.*, 1999) und 5-HT₇ (Hedlund *et al.*, 2003). Dass die meisten der Knockout-Mäuse keine schweren oder letalen Phänotypen oder Abnormalitäten zeigen, liegt wahrscheinlich daran, dass die Rezeptoren jeweils nur einen kleinen Ausschnitt der 5-HT-Effekte vermitteln. Eine andere Herangehensweise zur Untersuchung der 5-HT-vermittelten Effekte ist die Deletion eines 5-HT-synthetisierenden Enzyms und damit die Erstellung (partiell) 5-HT-defizienter Mäuse, deren Phänotyp in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte.

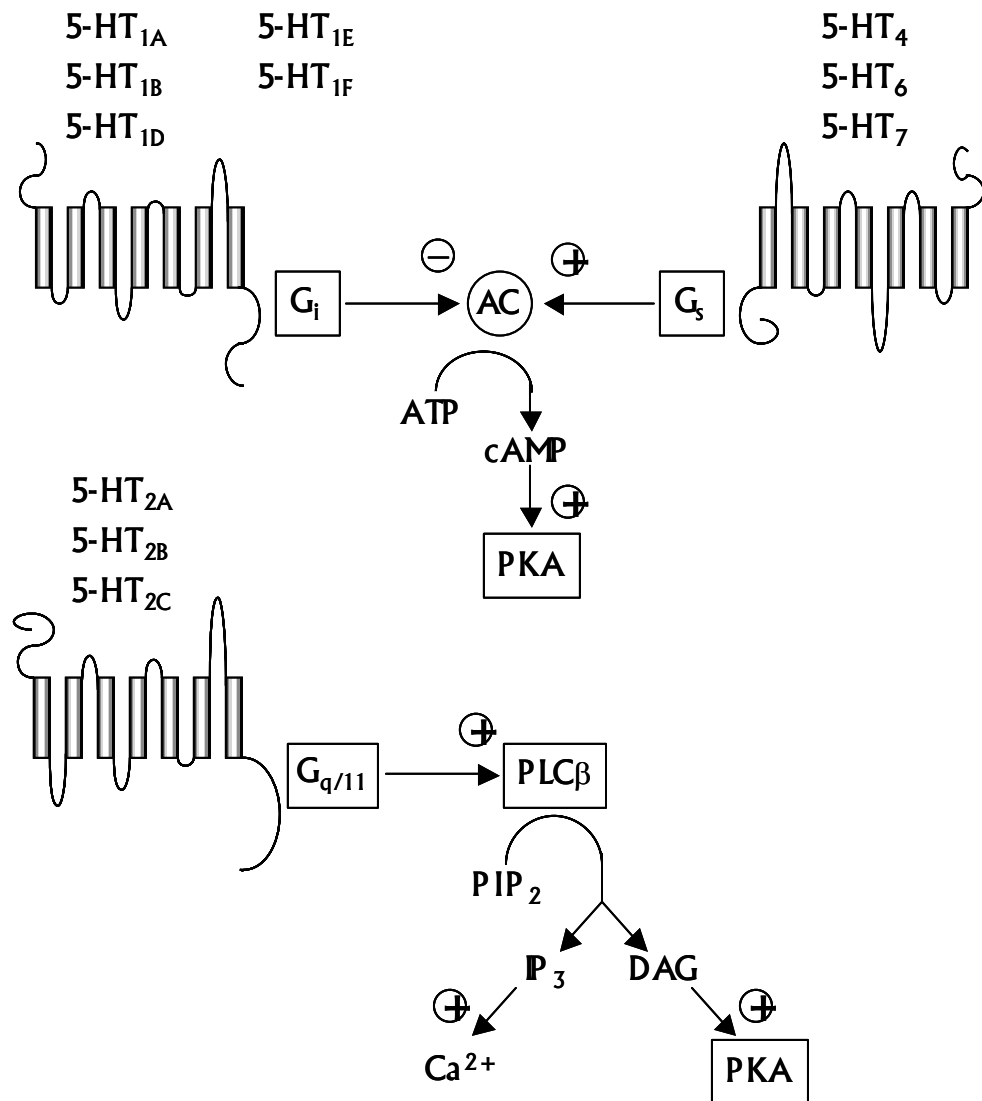


Abbildung I.3: Die typischen Signalwege der verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubtypen.

Die Rezeptoren 5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇ aktivieren typischerweise die Adenylat-Cyclase (AC) über die Cholera-toxin-sensitiven G_s-Proteine, was zu einem Anstieg der Konzentration des 3'-5'-cyclischen AMP (cAMP) und der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt. 5-HT₁-Rezeptoren hemmen dagegen die AC über Pertussis-toxin-sensitiven G_i-Proteine. 5-HT₂-Rezeptoren aktivieren durch G_q-Proteine die Phospholipase C (PLC), welche wiederum Phosphatidyl-Inosit-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inosit-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) aufspaltet. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), während IP₃ die Konzentration des intrazellulären Ca²⁺ erhöht. (modifiziert nach Hoyer *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2001)

2.2 5-HT-Transport und Speicherung

Um eine schnelle und gezielte Signalvermittlung zu erreichen, wird 5-HT nach der Synthese in speziellen Zellkompartimenten gespeichert, um es dann auf einmal und in hoher Konzentration in den interzellulären Raum zu entlassen.

Am besten ist dieser Mechanismus wohl an den Synapsen der 5-HT-synthetisierenden Neuronen untersucht worden (Kelly, 1993): neu synthetisiertes 5-HT wird durch den Vesikulären Monoamintransporter Typ 2 (VMAT 2) in sekretorische Vesikel an den Nervenendigungen gepackt. Das Eintreffen eines Aktionspotential an die Nervenendigung führt zum Öffnen spannungsempfindlicher Ca^{2+} -Kanäle. Der intrazelluläre Ca^{2+} -Anstieg löst wiederum die (recht komplex ablaufende) Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran aus. Bei dieser Fusion gelangt das 5-HT in den synaptischen Spalt und kann dort 5-HT-Rezeptoren auf der Plasmamembran der postsynaptischen Zelle stimulieren, wodurch das Signal auf diese Zelle übertragen wird. Der größte Teil des ausgeschütteten 5-HT wird über den Serotonin Reuptake Transporter (SERT) von der präsynaptischen Zelle wieder aufgenommen, zur Wiederverwendung in der Signalübermittlung erneut in Vesikel verpackt, oder von der MAO A abgebaut (Abbildung I.4). Auf ähnliche Weise wird 5-HT auch in den Neuronen des enterischen Nervensystems gespeichert, freigesetzt und wiederverwendet.

Über 90 % des 5-HT des Körpers befinden sich in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakt. Die 5-HT-Synthese wird hier jedoch durch TPH1 vermittelt, und die Vesikelfusion kann in den enterochromaffinen Zellen auch durch mechanische Stimulation ausgelöst werden (Abschnitt I.3.4.2). Das ausgeschüttete 5-HT wird von den enterochromaffinen Zellen durch den SERT und den Vesikulären Monoamintransporter Typ 1 (VMAT 1, Weihe *et al.*, 1994) wieder aufgenommen.

Ein weiterer Ort, an dem 5-HT in hoher Konzentration gespeichert wird, sind die „Dichte Granula“ genannten Vesikel in den Thrombozyten im Blut. Obwohl in Thrombozyten TPH-mRNA nachgewiesen werden konnte (Champier *et al.*, 1997), scheinen sie das 5-HT, das sie speichern, nicht selbst herzustellen. Die ermittelte Syntheserate reicht bei weitem nicht aus, um die in den Thrombozyten gefundenen 5-HT-Mengen herzustellen. Vielmehr nehmen sie das 5-HT, das durch die enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes in den Blutkreislauf abgegeben wurde, durch SERT und VMAT2 auf (Ormsbee & Fondacaro, 1985; Launay *et al.*, 1994). Aber auch eine Vorbeladung durch die Megakaryozyten, von denen sich die Thrombozyten im Knochenmark abschnüren, ist denkbar.

Die 5-HT-Freisetzung aus den Thrombozyten ist unter anderem Teil der Hämostase, und wird in den Abschnitten 2.3 und 3.1 näher besprochen. Ausgeschüttetes 5-HT wird über den SERT und den VMAT2 von den Thrombozyten wieder aufgenommen, oder von der im Plasma enthaltenen MAO B abgebaut.

Bis auf den VMAT1 sind von allen genannten 5-HT-Transportern und von Mao B inzwischen knock-out-Mäuse erstellt worden (SERT: Bengel *et al.*, 1998; Vmat2: Takahashi *et al.*, 1997; Fon *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; Mao B: Grimsby *et al.*, 1997). Mao A defiziente Mäuse wurden zufällig durch Integration eines Transgens gewonnen (Cases *et al.*, 1995). Alle diese Tiermodelle zeichnen sich durch Verhaltensstörungen aus.

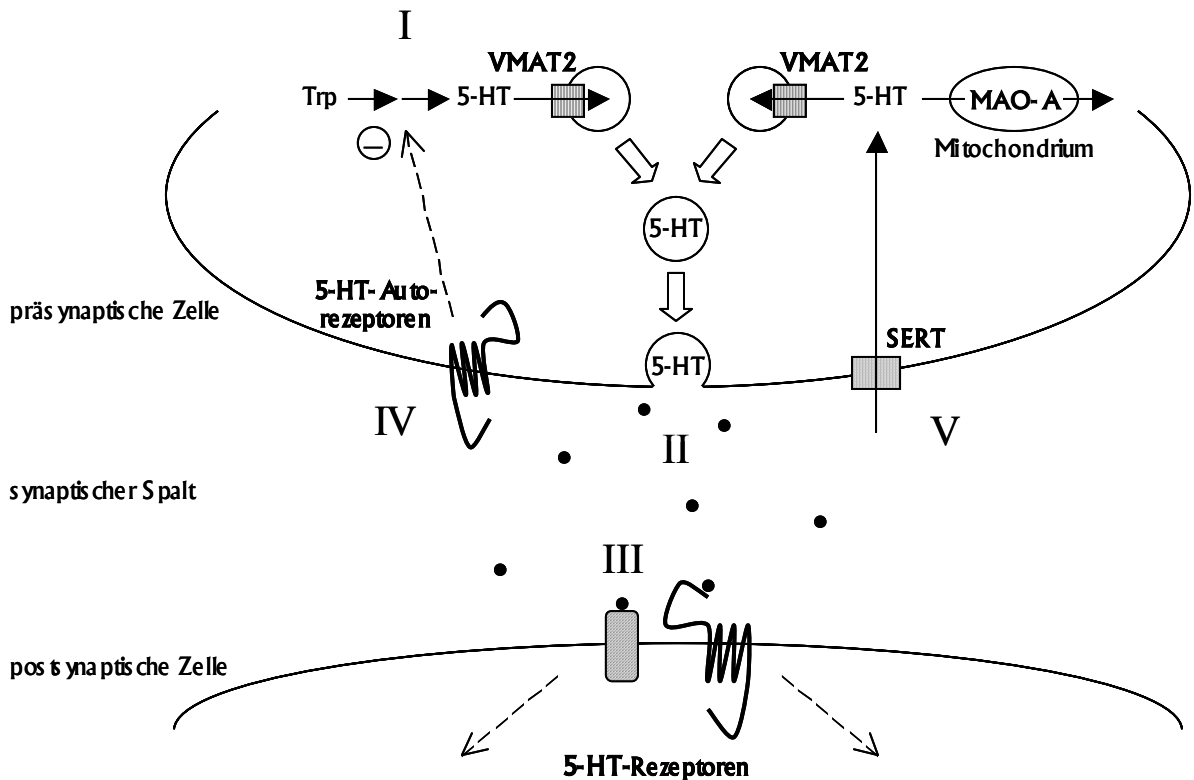


Abbildung I.4: Die elementaren Vorgänge an Synapsen 5-HT-synthetisierender Neuronen.

(A) Trp wird in die Nervenendigungen geleitet, von TPH2 und AAAD in 5-HT umgewandelt, und von VMAT2 in Vesikel transportiert. (B) Ein ankommendes Aktionspotential bewirkt den Einstrom von Ca^{2+} in die präsynaptische Zelle, was zum Verschmelzen der Vesikel mit der Plasmamembran führt. Dabei wird 5-HT in den synaptischen Spalt entlassen. (C) 5-HT bindet an 5-HT-Rezeptoren auf der Oberfläche der postsynaptischen Zelle und überträgt so das Signal auf diese Zelle. Der Bindung an den ionotropen 5-HT₃-Rezeptor folgt eine neuronale Depolarisation durch Kationendurchtritt, alle anderen 5-HT-Rezeptoren führen die Signalweiterleitung über G-Proteine aus. (D) Durch Bindung an 5-HT_{1A}- oder 5-HT_{1B}-Rezeptoren auf präsynaptischer Seite erfolgt außerdem eine Regulation der 5-HT-Freisetzung. (E) Ein Teil des 5-HT diffundiert aus dem synaptischen Spalt. Der weitaus größere Teil wird jedoch über den SERT von der präsynaptischen Zelle wieder aufgenommen. Es folgt eine Recycling durch erneutes Verpacken durch den VMAT2 in Vesikel oder der Abbau durch MAO A in den Mitochondrien.

2.3 Intrazelluläre Wirkungsweise

Neben der Wirkungsweise über die verschiedenen 5-HT-Rezeptorsubtypen kann 5-HT auch intrazellulär und rezeptorunabhängig an der Signalvermittlung teilnehmen. Dieser „Serotonierung“ genannte Effekt wurde erst vor kurzem in unserer Arbeitsgruppe entdeckt (Walther *et al.*, 2003c).

Grundlage dieser Signaltransduktion ist eine Transglutaminasereaktion. Transglutaminasen verknüpfen normalerweise Proteine miteinander, indem sie eine kovalente Verbindung zwischen der γ -Carboximidgruppe von Glutaminresten und der ϵ -Amino-

Gruppe von Lysinresten in Ca^{2+} -abhängiger Weise schaffen (Greenberg *et al.*, 1991). Statt des Lysins können Transglutaminasen aber auch andere einfache Amine, zum Beispiel 5-HT verwenden. Die kovalente Anbindung von 5-HT an Proteine kann deren Eigenschaften verändern. Bekannt ist zum Beispiel die Erhöhung der Adhäsionsfähigkeit des von Willebrand-Faktors (vWF) durch kovalent gebundenes 5-HT (Dale *et al.*, 2002; Szasz & Dale, 2002).

Intrazellulär spielen Transglutaminasereaktionen eine Rolle bei der Stabilisierung von Synapsen (Citron *et al.*, 2000) und der Apoptose (Melino *et al.*, 1994). Die Einbindung einer Transglutaminasereaktion in Signalwege war bislang allerdings nur von einigen bakteriellen Toxinen bekannt: Die beiden bakteriellen Toxine *Bordetella* dermonecrotic toxin (DNT) und *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor (CNF) können kleine GTPasen, zum Beispiel Rac1, RhoA und Cdc42 auf diese Weise kovalent modifizieren (Schmidt *et al.*, 1997 und 1999; Aktories *et al.*, 2000; Masuda *et al.*, 2000; Doye *et al.*, 2002). Dadurch verlieren diese GTPasen ihre intrinsische GTPase-Aktivität, können gebundenes GTP also nicht mehr spalten. Sie bleiben konstitutiv aktiv und geben daher ständig Signale an nachgeschaltete Effektormoleküle weiter.

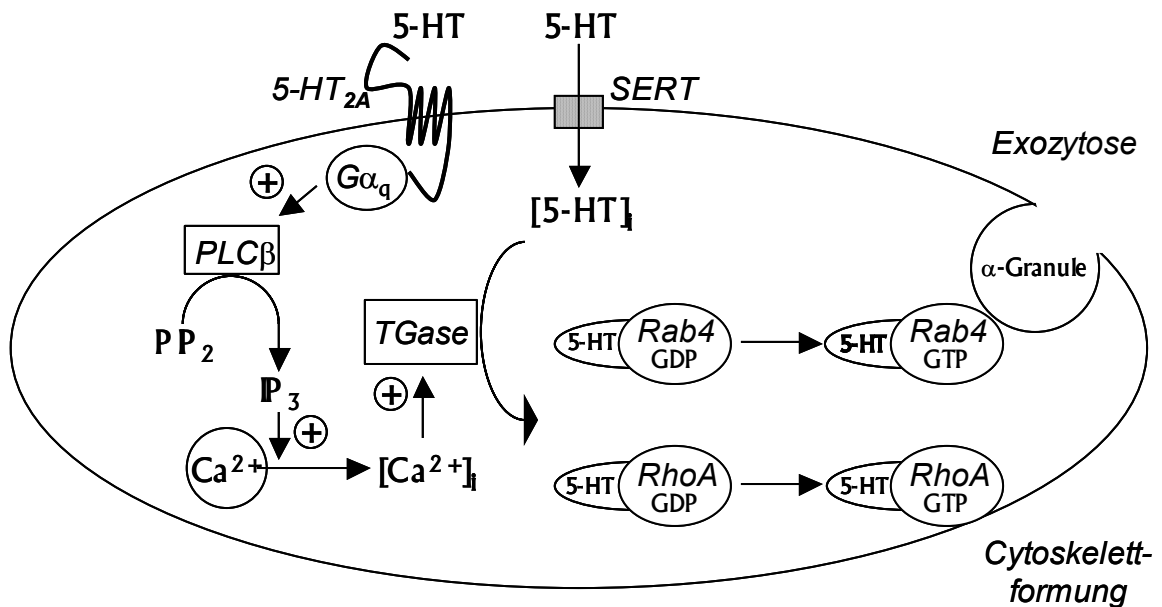


Abbildung I.5: 5-HT-vermittelte Exozytose der α -Granula von Thrombozyten.

Nur die konzertierte Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} - und 5-HT-Konzentration ermöglicht die kovalente Bindung des 5-HT an die kleinen GTPasen Rab4 und RhoA durch die Transglutaminase. Als Folge dessen sind Rab4 und RhoA konstitutiv aktiv und vermitteln die Exozytose der α -Granula, was schließlich zur Aggregation der Thrombozyten führt. Näheres in Abschnitt I.2.3.

Neu ist hingegen die Erkenntnis, dass die Modifikation von kleinen GTPasen durch Transglutaminasen auch in höheren Organismen ein normaler Mechanismus in der Signaltransduktion ist, und nicht nur durch Bakterien genutzt wird. Die Verwendung von 5-HT als Reaktionspartner, der erst einmal im Cytosol zur Verfügung gestellt werden

muss, bietet eine gute Kontrolle über die Aktivierung von Signalwegen.

Abbildung 1.5 zeigt die Serotonylierungsreaktion innerhalb der Signaltransduktion, die zur Ausschüttung der α -Granula der Thrombozyten führt. 5-HT aus den dichten Granula des selben oder anderer Blutplättchen wirkt auf zweierlei Weise auf einen Thrombozyten ein. Über die Interaktion mit dem 5-HT_{2A}-Rezeptor in der Plasmamembran wird der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel erhöht. Der SERT transportiert 5-HT ins Cytosol. Sowohl die hohe Ca²⁺-Konzentrationen als auch das cytosolische 5-HT sind Voraussetzungen für die Transglutaminasereaktion, über die die kleinen GTPasen RhoA und Rab4 aktiviert werden, was schließlich zur Fusion der α -Granula mit der Plasmamembran führt. Die dabei freigesetzten Proteine (zum Beispiel der von Willebrand-Faktor und P-Selektin) sind wichtige Komponenten der Adhesion von Thrombozytenaggregaten an verletzte Gefäßwände.

3 5-HT-vermittelte Effekte

5-HT wirkt im Körper in einer großen Anzahl an physiologischen Prozessen mit. In diesem Abschnitt wird eine kurze Übersicht über die Prozesse gegeben, die nicht in dieser Arbeit behandelt werden sollen. Ab Abschnitt 3.2 wird dann die Rolle des 5-HT im Gastrointestinaltrakt, im Herz-Kreislauf- und im Immunsystem besprochen.

3.1 5-HT als Neurotransmitter

Zwar wirkt nur ein Bruchteil des 5-HT im Körper als Neurotransmitter im Gehirn, jedoch ist es durch die recht komplexe und umfangreiche Morphologie des 5-HT-Systems in sehr unterschiedliche Hirnfunktionen involviert. Ausgangspunkt dieses Systems sind die zu verschiedenen Gruppen gebündelten Raphe-Kerne in Mittelhirn, Pons und Medulla oblongata, welche die 5-HT-synthetisierenden Neuronen enthalten (Dahlström & Fuxe, 1964). Von den Raphe-Kernen aus projizieren die Neuronen ihre Axone in nahezu alle Bereiche des Gehirns, aber auch ins Rückenmark.

Durch diese weitreichende Morphologie kann 5-HT zum Beispiel Appetit und Nahrungsaufnahme, Nocizeption, Sexual- und maternales Verhalten, Stress, Stimmung, sowie die Regulation von Schlaf und Körpertemperatur modulieren (Jacobs *et al.*, 1992). Des Weiteren werden viele Krankheiten und Verhaltensmerkmale wie Alkoholismus, Migräne, impulsive Aggression, Ängstlichkeit und manische Depressionen mit Veränderungen der 5-HT-Regulation in Verbindung gebracht (Bellivier *et al.*, 1998; Lucki, 1998; Mann *et al.*, 2001; Durham & Russo, 2002). Ein Teil dieser Assoziationen basiert auf Polymorphismusstudien, in denen das zuerst entdeckte TPH1-Gen untersucht wurde. Wie jedoch später festgestellt wurde, wird das TPH1-Gen nicht im Gehirn exprimiert, stattdessen ist die Isoform TPH2 für die 5-HT-Biosynthese im Gehirn verantwortlich (siehe Abschnitt 1.1.3). Die Polymorphismusstudien sind demnach falsch. Trotz allem zeigt jedoch der Einsatz 5-HT-modulierender Substanzen im klinischen Bereich, dass 5-HT bei den beschriebenen Verhaltensweisen eine Rolle spielt. Darüber hinaus zeigen aktuelle

Studien einen Zusammenhang zwischen einem single-nucleotide polymorphism (SNP) im TPH2-Gen und dem Auftreten von manischer Depression (Harvey *et al.*, 2004; Zill *et al.*, 2004).

Da 5-HT Vorläufer des Neurohormons Melatonin ist, welches in der Epiphyse synthetisiert wird (siehe Abschnitt 1.4), kann ein veränderter 5-HT-Metabolismus auch verschiedene, Melatonin-gesteuerte physiologische Prozesse beeinflussen (Reiter, 1991). 5-HT scheint aber auch direkt eine Rolle im circadianen Zeitsystem zu spielen: die Raphe-Kerne stehen unter visuellem Einfluss und steuern ihrerseits wiederum den Nucleus suprachiasmaticus (NSC) an, welcher als „innere Uhr“ gilt (Reuss, 1996).

3.2 5-HT in der Ontogenese

Da man 5-HT schon sehr früh in der Entwicklung des Gehirns detektieren kann, scheint es an Vorgängen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt zu sein (Lauder, 1993; Hansson *et al.*, 1999; Gaspar, 2003). Auch in der Morphogenese anderer Organe, zum Beispiel der Augen (Khozhai *et al.*, 1995) und des Herzens (Yavarone *et al.*, 1993; Nebigil *et al.*, 2000) ist 5-HT involviert. Dabei scheint es sich um Effekte auf neuronaler Ebene zu handeln.

Daneben spielt 5-HT auch in der präneuronalen Ontogenese eine Rolle. Sowohl 5-HT, als auch TPH-mRNA und TPH-Protein können schon in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden (Walther und Bader, 1999). Die Verabreichung von p-Chlorophenylalanin (PCPA, ein spezifischer TPH-Inhibitor) führt zu irreversiblen Schäden während der Embryogenese. An trächtigen Mäusen wurde damit eine Abwesenheit der Cytokinese der Zygoten und eine Hemmung der Zellteilung von noch nicht eingekisteten Embryonen vom 2-Zellstadium bis zum Morula- und Blastulastadium gezeigt (Khozai *et al.*, 1995).

3.3 5-HT in der Hämostase

Bei einer Verletzung der Blutgefäße wird 5-HT aus den dichten Granula der durch Kontakt zur subendothelialen Matrix aktivierten Thrombozyten ausgeschüttet. 5-HT bewirkt eine Gefäßverengung, verlangsamt den Blutfluss und unterstützt dadurch die Thrombusbildung (Soslau *et al.*, 1997). Neben diesem vaskulären Effekt führt das ausgeschüttete 5-HT aber auch über rezeptorabhängige und –unabhängige Signaltransduktion zur Sekretion der α -Granula und damit zur Freisetzung des von Willebrand-Faktor, welcher wiederum die Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Matrixproteine vermittelt (siehe auch Abschnitt 2.3).

Die 5-HT-defizienten TPH1-/- Tiere, aber auch *beige*-Mäuse, eine spontane Mutation innerhalb der Linie C57BL/6, welche eine verminderte 5-HT-Aufnahme- und Speicherkapazität in den Thrombozyten aufweisen, zeigen daher längere Blutungszeiten, da die Blutgerinnsel sich ohne den von Willebrand-Faktor nicht an die beschädigte Gefäßwand anheften können. Die Blutplättchenaggregation selbst ist in diesen Tieren jedoch nicht

beeinträchtigt, da die Blutplättchen im Blutgerinnsel untereinander durch Fibrin vernetzt werden können, welches aus dem Plasmaprotein Fibrinogen gebildet wird (Holland, 1976; Walther *et al.*, 2003).

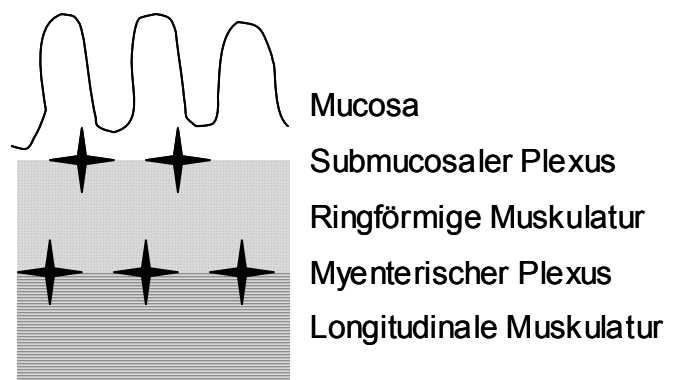
3.4 5-HT im Gastrointestinaltrakt

3.4.1 Der Darm

Die Aufgaben des Darmes sind die Aufarbeitung von Nahrung und die Bereitstellung von Nährstoffen für den gesamten Organismus, sowie die Entsorgung unverdaulicher Materialien. Wichtige Voraussetzungen für die optimale Funktion des Darmes sind unter anderem seine Beweglichkeit, die sowohl der Vermischung der Nahrung mit Verdauungsenzymen, als auch dem Transport der Nahrung durch den Darm dient, sowie seine Fähigkeit zur Sekretion von Flüssigkeit, welche schleimverdünnend wirkt, und, in höheren Raten, den Darminhalt weiterspült.

Sowohl die Beweglichkeit, als auch die Sekretion werden über das enterische Nervensystem (ENS) gesteuert. Zwar ist das ENS mit dem Zentralen Nervensystem (ZNS) verbunden und kann von ihm auch Impulse erhalten, ebenso wie das ENS Signale an das ZNS sendet, die *in vivo*-Versuche Trendelenburgs (Trendelenburg, 1917) und anderer zeigten jedoch, dass das ENS das Darmverhalten völlig unabhängig vom ZNS kontrollieren kann, was unter allen Organen einzigartig ist. Das ENS teilt sich in den myenterischen Plexus (Auerbachs Plexus) zwischen der inneren, ringförmigen und der äußeren, longitudinalen glatten Muskulatur, sowie den submucosalen Plexus (Meissners Plexus) zwischen Muskulatur und Mucosa auf (Abbildung I.6). Die Anwesenheit von intrinsischen primären afferenten Neuronen (intrinsic primary afferent neurons, IPANs) ermöglicht es dem ENS, auf intraluminalen Bedingungen zu reagieren und enterische Reflexe zu kontrollieren (Kirchgessner *et al.*, 1992; Furness *et al.*, 1998).

Abbildung I.6: Aufbau des Darmes. Der Darm besteht aus zwei Muskelschichten und einer Schleimhaut (Mucosa). Zwischen diesen Schichten befinden sich die Nervenzellen des ENS, unterteilt in submucosalen und myenterischen Plexus.



Die Mucosa besteht aus Epithelzellen, zwischen denen endokrine Zellen eingebettet sind. Im Gastrointestinaltrakt finden sich mehr als 16 verschiedene endokrine Zellen (Hakanson *et al.*, 1978; Anlauf *et al.*, 2003). Im Dünndarm stellen die enterochromaffinen Zellen die Mehrheit der endokrinen Zellen. Sie synthetisieren mehr als 95% des in der Peripherie enthaltenen 5-HT und speichern es in ihren apical und basal gelegenen sekretorischen

Granula (Rubin *et al.*, 1971). Geringe Mengen davon werden kontinuierlich in das Darmlumen und in die unter der Mucosa gelegenen Blutgefäße abgegeben (Fujimiya *et al.*, 1997). Die enterochromaffinen Zellen gelten daher auch als Quelle des 5-HT in den Thrombozyten. Darüber hinaus sind aber auch einige Neuronen des ENS als serotonerg bekannt (Gershon *et al.*, 1965; Gershon *et al.*, 1977; Costa *et al.*, 1982; Furness & Costa, 1982, Kurian *et al.*, 1983).

3.4.2 Ausschüttung des 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen

Die Ausschüttung der 5-HT-enhaltenden Granula der enterochromaffinen Zellen wird hauptsächlich durch die lokale Stimulation der Mucosa ausgelöst. Als Stimulanzen wirken zum Beispiel ein saures Milieu im Darmlumen (Resnick und Gray, 1962; Kellum *et al.*, 1983) und die Ausdehnung des Darms mit dem damit einher gehenden vergrößerten luminalen Druck auf die Mucosa (Bülbring und Crema, 1959a; Ferrara *et al.*, 1983).

Die Granula können apical in das Darmlumen und basal in die darunter gelegenen Gewebe und Blutgefäße ausschütten. Enterochromaffine Zellen wirken somit bipolar und scheinen sowohl endokrine als auch exokrine Funktionen auszuüben.

Die Verschmelzung der Vesikel mit der Zellmembran ist Ca^{2+} -abhängig (Racke *et al.*, 1996, Lomax *et al.*, 1999), was die Wirkung des Choleratoxins erklärt (Abschnitt I.3.4.5). Die Vesikelausschüttung wird auf vielfältige Weise moduliert. Die enterochromaffinen Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche die unterschiedlichsten Rezeptoren, mit welchen sie die Ausschüttung fördernde und die Ausschüttung inhibierende Signale empfangen können (stimulierend wirken zum Beispiel der β_1 -adrenerge, der 5-HT₃-, der muscarinische M₃ und der nicotinsche Rezeptor, inhibierend der α_2 -adrenerge, der 5-HT₄-, der GABA A- und der GABA B-Rezeptor; Cooke, 1998).

Dem aus den enterochromaffinen Zellen ausgeschütteten 5-HT wird eine entscheidende Rolle bei der Signalvermittlung durch die Darmmucosa, und damit der Fähigkeit des Darmes auf intraluminalen Reize zu reagieren, zugeschrieben. Da das ENS nicht durch die Darmmucosa in das Darmlumen hinein reicht, bedarf es endokriner Zellen, die luminalen Stimuli in für das ENS verständliche Signale verwandeln und weiterleiten, und damit entsprechende Reflexe auslösen. In den folgenden Abschnitten soll genauer auf die entsprechenden Mechanismen eingegangen werden.

3.4.3 5-HT in der Peristaltik

Neben den segmentalen Kontraktionen, welche die Nahrung an Ort und Stelle durchmischen, gibt es die Muskelbewegungen, welche die Nahrung im Darm gezielt weiterbefördern, die Peristaltik.

In der Literatur wird folgende Hypothese über den Mechanismus des peristaltischen Reflexes beschrieben: Das nach einem Stimulus, zum Beispiel durch luminalen Druck auf die Darmwand, aus den Granula ausgeschüttete 5-HT initialisiert den peristaltischen Reflex, indem es an 5-HT_{1P}-Rezeptoren auf den in die Mucosa reichenden Projektionen

der submucosalen IPANs bindet (Kirchgessner *et al.*, 1992; Pan & Gershon, 2000). Diese leiten das Signal über Interneuronen zu den Motorneuronen weiter, welche die ringförmige Muskulatur in aufsteigender Richtung kontrahieren, in absteigender Richtung relaxieren lassen (Goyal und Hirano, 1996; siehe auch Abbildung I.7).

Der peristaltische Reflex lässt sich nicht nur durch pharmakologische Modifikationen des 5-HT_{1P}-Rezeptors beeinflussen. 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (Nagakura *et al.*, 1996) und 5-HT₄-Rezeptorantagonisten (Jin *et al.*, 1999) können die Peristaltik ebenfalls abschwächen, aber nur gemeinsam blockieren (Nagakura *et al.*, 1997). Es wird daher angenommen, dass diese beiden Rezeptorsubtypen in die Signalweiterleitung innerhalb des ENS involviert sind (Gershon, 2003).

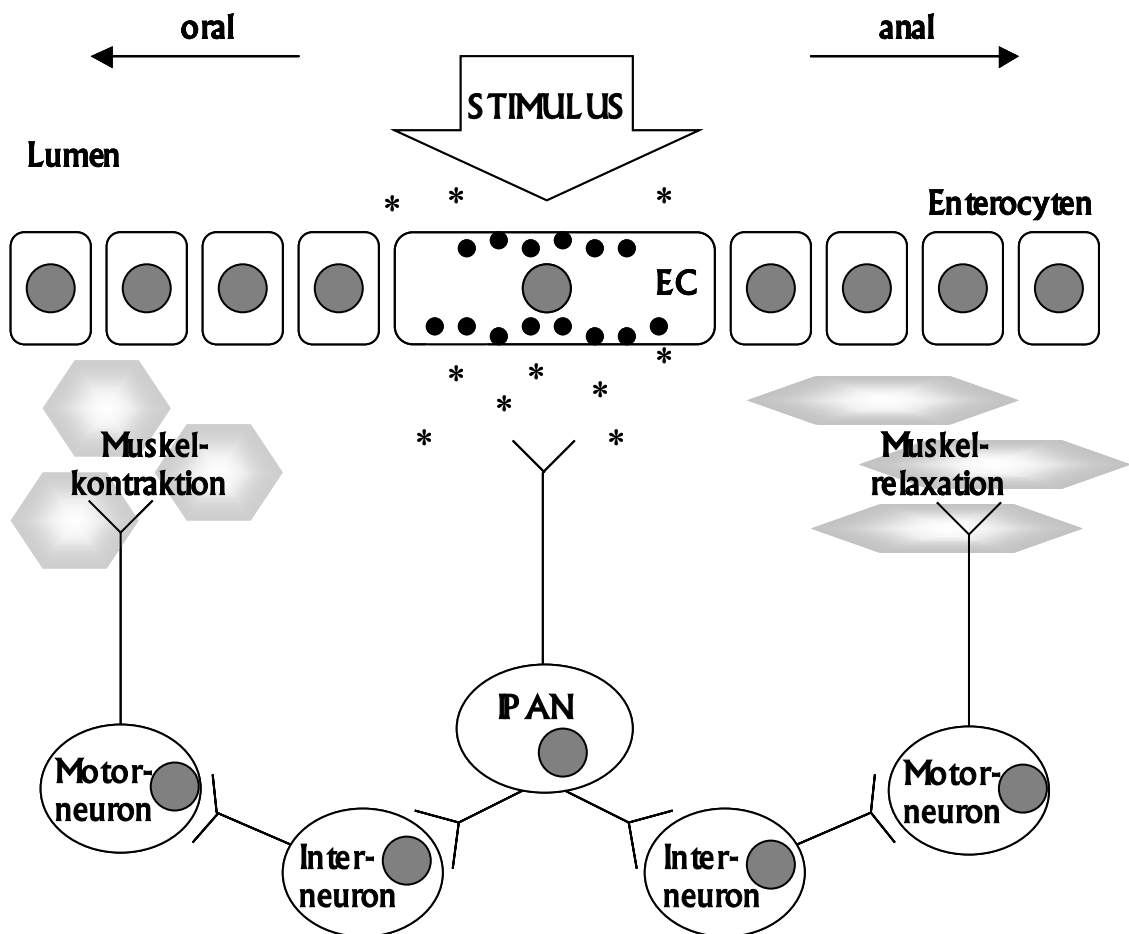


Abbildung I.7: Initiierung des peristaltischen Reflexes.

Der peristaltische Reflex wird durch die Stimulation der Darmmucosa ausgelöst. Das von den enterochromaffinen Zellen ausgeschüttete 5-HT (im Bild als Punkte dargestellt) aktiviert 5-HT-Rezeptoren auf den IPANs, welche wiederum Interneuronen stimulieren. Interneuronen in aufsteigender Richtung aktivieren excitatorische Motorneuronen, die die Muskeln zur Kontraktion bringen. In absteigender Richtung aktivieren die Interneuronen inhibitorisch wirkende Motorneuronen, welche eine Muskelrelaxation auslösen. Muskelkontraktionen in aufsteigender und Relaxationen in absteigender Richtung führen zur Fortbewegung des Darminhaltes.

Diese Hypothese wird allgemein akzeptiert, obwohl einzelne Schritte bislang noch nicht experimentell bewiesen werden konnten. Unklar ist unter anderem, ob wirklich das 5-HT der enterochromaffinen Zellen durch Stimulation der IPANs den peristaltischen Reflex initiiert. Dagegen sprechen zum Beispiel die Arbeiten von Bülbring & Crema (1959b) und von Boullin (1964). In ersterer wurde in Meerschweinchen das 5-HT der Mucosa depletiert, indem den Tieren Reserpin, eine Substanz, welche die vesikuläre Aufnahme von 5-HT inhibiert, verabreicht wurde. Trotz einer Depletion von circa 90 %, in manchen Tieren auch von 99 %, zeigte sich keine Beeinträchtigung der Peristaltik. Ähnliche Ergebnisse erzielte Boullin, der eine 5-HT-Depletion in Ratten durch Verabreichung einer Trp-freien Diät erzielte.

3.4.4 5-HT in der Sekretion

Ebenso wie die Peristaltik soll auch die Sekretion im Duodenum von der Ausschüttung des 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen initiiert werden: Nach mechanischer Stimulation der Mucosa schütten die enterochromaffinen Zellen 5-HT aus. Das 5-HT stimuliert die IPANs des submucosalen Plexus, indem es an die 5-HT_{1P}-Rezeptoren der in die Mucosa reichenden Projektionen bindet. Das Signal wird über die Interneuronen zu Sekretomotorneuronen weitergeleitet, die durch Freisetzung von Acetylcholin und VIP die Epithelzellen zur Chloridsekretion ins Darmlumen anregen. Den Chloridionen folgen Natriumionen, und diese Salzsekretion führt schließlich zum Wassereinstrom ins Darmlumen (Cooke *et al.*, 1997; Cooke, 2000).

Daneben gibt es aber auch einen ENS-unabhängigen Mechanismus. 5-HT kann die Epithelzellen auch direkt über 5-HT₄-Rezeptoren zur Sekretion bringen (Ning *et al.*, 2004), indem es den cAMP-Spiegel in den Epithelzellen erhöht (Albuquerque *et al.*, 1998).

3.4.5 Cholera-toxin-induzierte Sekretion

Das Enterotoxin der Cholera-bakterien (*Vibrio cholerae*, das Toxin wird im Folgenden als CT abgekürzt) löst im Gastrointestinaltrakt eine gesteigerte Sekretion und damit schwere Durchfälle aus, was unbehandelt in circa 50% der Fälle zum Tode führt (Sack *et al.*, 2004).

CT besteht aus einer A- und fünf B-Untereinheiten. Die B-Untereinheiten binden an Zellmembranen und ermöglichen der A-Untereinheit den Eintritt in die Zellen. Dort bindet die A-Untereinheit des CT den ADP-Ribose-Rest von NAD⁺ kovalent an die aktivierende G_α-GTP-Untereinheit der G_s-Proteine. Die Modifikation verhindert die Dephosphorylierung zu G_{sα}-GDP, und damit auch die Reassoziierung mit G_{βγ}. G_α-GTP kann damit die Adenylatcyclase dauerhaft aktivieren und der intrazelluläre cAMP-Spiegel steigt an (Spangler, 1992).

In der Literatur werden zwei Mechanismen beschrieben, wie der erhöhte cAMP-Spiegel zur gesteigerten Sekretion führt: Zum einen wird angenommen, dass die Proteinkinase A

in den Epithelzellen, durch cAMP aktiviert, die Ionenporter in der Epithelzellmembran in ihrer Aktivität beeinflusst, und es dadurch zur Inhibition der NaCl-Absorption und zur gesteigerten Chloridsekretion kommt (Sears & Kaper, 1996).

Zum anderen wird angenommen, dass CT über die cAMP-Konzentrationserhöhung den Calciumstrom verstärkt (Carabelli *et al.*, 2003), was zur Ausschüttung der 5-HT-haltigen Granula der enterochromaffinen Zellen führt (siehe Abschnitt I.3.4.2). Das ausgeschüttete 5-HT führt dann gemäß dem in Abschnitt I.3.4.4 erläuterten Sekretionsmechanismen (ENS-ab- und ENS-unabhängig) zur Sekretion. Für diesen Mechanismus sprechen die folgenden Punkte:

- CT bringt die enterochromaffinen Zellen in konzentrationsabhängiger Weise zur 5-HT-Ausschüttung (Osaka *et al.*, 1975; Nilsson *et al.*, 1983)
- die CT-induzierte Sekretion lässt sich durch 5-HT-Antagonisten abschwächen (Beubler & Horina, 1990)
- eine 5-HT-Depletion durch PCPA schwächt die CT-induzierte Sekretion (Turvill *et al.*, 1998).

3.4.6 5-HT in der Emesis

Viele Tumorerkrankungen werden mit Bestrahlung behandelt. Eine weitere Möglichkeit sind Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Cisplatin (cis-Diaminplatin(II)dichlorid; Singh & Sodhi, 1998). Eine Nebenwirkung dieser Behandlungen ist jedoch häufig eine starke Emesis (Martin, 1996; Feyer *et al.*, 1998).

Der emetische Reiz lässt sich gut mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten (Gregory & Ettinger, 1998) und PCPA (Alfieri & Cubeddu, 1995) unterdrücken. Weiterhin konnten gezeigt werden, dass die enterochromaffinen Zellen im Duodenum als Folge einer Cisplatingabe ihre Granula, und damit ihr 5-HT ausschütten (Schworer *et al.*, 1991). Diese 5-HT-Freisetzung und die Möglichkeit einer Abschwächung des emetischen Reizes mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten beziehungsweise durch PCPA lassen auf folgenden Mechanismus der Emesis schließen: Nach Stimulation, zum Beispiel Cisplatingabe, wird 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen entlassen und stimuliert via 5-HT₃-Rezeptoren die extrinsischen primären afferenten Neuronen, welche das Signal ins Gehirn weiterleiten. Dort wird dann die emetische Reaktion ausgelöst (Gershon, 2003).

3.4.7 Pica

Als Pica bezeichnet man die orale Einnahme von unverdaulichen Substanzen und Gegenständen. Der Name leitet sich vom lateinischen Namen der Elster (Pica pica) ab, die auch als nicht sehr wählerisch bekannt ist. In der Psychiatrie wird mit dem Begriff Pica eine schwere Essstörung beschrieben, ähnlich der Bulimie und der Anorexie. Pica-Patienten essen zum Beispiel Haare und Münzen. Es gibt aber auch eine nichtkrankhafte Aufnahme von unverdaulichen Substanzen: einige Naturvölker essen Erde, um ihren Bedarf an seltenen Mineralien zu decken (Meißner, 2002).

Da die für wissenschaftliche Studien am häufigsten verwendeten Versuchstiere, Mäuse und Ratten, nicht emetisch reagieren können, gestaltet sich die Erforschung der Emesis als recht schwierig. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Nager in Situationen, die beim Mensch Emesis auslösen (Cisplatingabe, Bestrahlung oder Störung des Gleichgewichtsinns), mit Pica reagieren. Das Pica-Verhalten konnte wie die Emesis mit 5-HT₃-Rezeptorantagonisten inhibiert werden (Santucci *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2002a; Yamamoto *et al.*, 2002b). Daher wird Pica in der Forschung als Korrelat für Emesis verwendet.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass noch heute in Drogerien gemahlener Lös als altes Hausmittelchen verkauft wird, empfohlen zur Einnahme bei leichten Darmbeschwerden - auch eine Form von Pica.

3.5 5-HT im Herz-Kreislauf-System

3.5.1 Vasokonstriktorische und vasodilatorische Eigenschaften des 5-HT

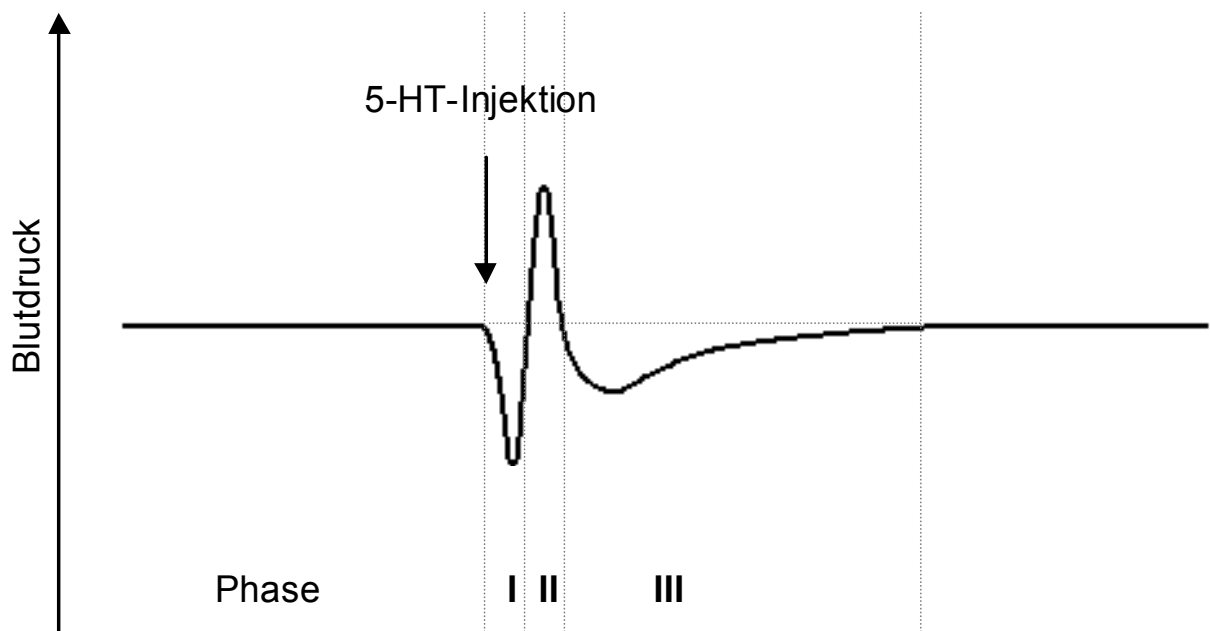


Abbildung I.8: Der dreiphasige Reflex nach 5-HT-Injektion.

Eine 5-HT-Injektion in den Blutkreislauf führt zu Blutdruckveränderungen, die in drei Phasen unterteilt werden. Die Phasen I, II und III werden im Abschnitt I.3.5.1 genauer erläutert.

Eine 5-HT-Injektion in den Blutkreislauf induziert eine dreiphasige Änderung des Blutdruckes (Abbildung I.8). Gleich nach der Injektion sinkt der Blutdruck vorübergehend (Phase I). Ursache dieses Abfalls ist eine Bradycardie und die daraus resultierende Reduktion des kardialen Ausstoßes. Diese Reaktion wird nach ihren Entdeckern auch

Bezold-Jarisch-Reflex genannt. Die sich anschließende Blutdruckerhöhung (Phase II) wird durch einen Anstieg des kardialen Ausstoßes und eine Erhöhung des gesamten peripheren Widerstandes (total peripheral resistance, TPR) verursacht. Der Blutdruckabfall der Phase III dauert länger an. Er resultiert aus einer Abnahme der TPR (Dabire *et al.*, 1990).

Grundlage dieser sehr unterschiedlichen Reaktionen auf 5-HT ist die große Rezeptorvielfalt (siehe Abschnitt I.2.1). Verschiedene Rezeptoren an unterschiedlichen Stellen des Herz-Kreislauf-Systems vermitteln unterschiedliche Reaktionen auf 5-HT. Die Bradycardie der Phase I wird durch 5-HT₃-Rezeptoren auf kardiopulmonären afferenten Nerven vermittelt (Kilpatrick *et al.*, 1990; Whalen *et al.*, 2000; Peotta *et al.*, 2001). Die Blutdruckerhöhung der Phase II wird durch Aktivierung vaskulärer 5-HT_{2A}-Rezeptoren ausgelöst (Saxena & Villalon, 1990), die lang-anhaltende Hypotonie der Phase III dagegen durch vaskuläre 5-HT₇-Rezeptoren (Terron, 1997; Centurion *et al.*, 2004).

3.5.2 Beeinflußt 5-HT den basalen Blutdruck?

Bekannt ist, dass das ZNS mit Hilfe von 5-HT und 5-HT₁-, 5-HT₂- und 5-HT₃-Rezeptoren im Gehirn den Blutdruck beeinflusst und reguliert (Ramage, 2001). Diese zentralen Effekte sollen aber nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. Stattdessen soll hier die Frage behandelt werden, ob das 5-HT im Blutkreislauf, also in den Thrombozyten gespeichertes oder frei im Plasma vorliegendes 5-HT den Blutdruck beeinflussen kann.

Pro	Kontra
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Blutgefäße von Bluthochdruckindividuen reagieren empfindlicher mit Kontraktionen auf 5-HT (Watts et al., 1996, Doggrell & Chen, 2001)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Blutgefäße von Bluthochdruckindividuen reagieren nicht nur empfindlicher gegenüber 5-HT, sondern auch gegenüber anderen Substanzen, zum Beispiel Noradrenalin oder dem α-Adrenorezeptoragonisten Phenylephrin (Lais & Brody, 1975; Eichler et al., 1989)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Der 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonist Ketanserin kann erfolgreich zu hohen Blutdruck senken (Vanhoutte et al., 1988)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Ketanserin antagonisiert auch α-Adrenorezeptoren. 5-HT_{2A}-Rezeptorantagonisten, die keine Affinität zu α-Adrenorezeptoren haben (zum Beispiel Ritanserin) zeigen keine blutdrucksenkende Fähigkeiten (van Zwieten et al., 1990)</i>
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Thrombozyten von Bluthochdruckindividuen reagieren sensibler mit Aggregation auf 5-HT (Fetkovska et al., 1990)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>5-HT aus Thrombozyten führt allenfalls in der Mikrozirkulation zu erhöhten Plasma-5-HT-Spiegeln. Eine Untersuchung der 5-HT-Konzentrationen in Plasma und Thrombozyten ergab keine Unterschiede zwischen hyper- und normotensiven Individuen (Missouris et al., 1998)</i>

Tabelle I.1: Pro & Kontra der 5-HT-Beteiligung an der Bluthochdruckpathogenese.

Wie in Abschnitt I.3.5.1 erläutert, kann 5-HT im Blutkreislauf den Blutdruck sowohl senken, als auch erhöhen. Auslöser dieser Veränderungen war jedoch injiziertes, also exogenes 5-HT. Ob endogenes 5-HT im Blutkreislauf an der Blutdruckregulation, speziell an der Pathogenese des Bluthochdruckes beteiligt ist, ist umstritten. Die Tabelle I.1 gibt eine kurze Übersicht über die Pros und Kontras in dieser Diskussion:

3.5.3 5-HT in der Herzentwicklung

Anfang der 1990er konnte gezeigt werden, dass 5-HT neben der Beteiligung an der frühesten Embryogenese (Abschnitt I.3.2) auch eine entscheidende Rolle in der Herzentwicklung hat. Embryonale Herzzellen können 5-HT anscheinend nicht selbst produzieren, nehmen es aber aus der Umgebung auf. Die Applikation von Fluoxetin (ein *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) stört die Morphogenese des Herzens empfindlich (Yavarone *et al.*, 1993). Die Erstellung der 5-HT_{2B}-Rezeptor-Knockout-Maus zeigte wenig später, dass 5-HT die Differenzierung und Proliferation von embryonalen Herzzellen über diesen Rezeptor reguliert. Der 5-HT_{2B}-Rezeptor-Knockout führt im embryonalen oder neonatalen Stadium zum Tode, die wenigen überlebenden Tiere zeigen schwere Herzschiäden (Nebigil *et al.*, 2000).

3.5.4 5-HT bei Organschäden durch Bluthochdruck

Durch den durch Bluthochdruck entstehenden mechanischen Stress werden Blutgefäße gereizt und geschädigt. Infolge dessen entstehen die für den Bluthochdruck typischen Organschäden, also die Herzhypertrophie, speziell die Hypertrophie des linken Ventrikels, sowie die Dysfunktion der Niere, gut erkennbar an der Ausscheidung von Serumalbumin. Am Ende dieser Prozesse können Herz- und Nierenversagen stehen.

Die Entstehung der hypertensiven Nierenschäden wird begleitet von der Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine (Fibrose; Tylicki *et al.*, 2002), der Proliferation der glomerulären Mesangialzellen sowie von vaskulären Entzündungsprozessen, bei denen Immunzellen in das Gewebe einwandern (Rodriguez-Iturbe *et al.*, 2001).

Thrombozyten sind bislang die einzigen serotonergen Komponenten, denen ein Einfluss auf die Entwicklung bluthochdruckinduzierter Nierenschäden zugeschrieben wird. Es wird angenommen, dass durch den Druck das Nierenendothel geschädigt, und dabei die subendotheliale Matrix freigelegt wird. Kommen die Thrombozyten mit dem subendothelialen Collagen in Kontakt, werden sie aktiviert und schütten ihre Granula aus (Clark & Naylor, 1989), welche eine Vielzahl an chemotaktischen und stimulierenden Substanzen enthalten (siehe auch Abschnitt I.3.6.2).

Einige dieser ausgeschütteten Substanzen sind dafür bekannt, mitogen zu wirken und die entzündlichen Reaktionen zu fördern. TGF- β (transforming growth factor β) wirkt zum Beispiel entzündungsfördernd, indem es Leukozyten anlockt (Zoja & Remuzzi, 1995). Außerdem fördert es die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine (Border & Noble,

1994). PDGF (platelet-derived growth factor) dagegen wirkt proliferationsfördernd auf die Mesangialzellen ein (Shultz *et al.*, 1988, Kato *et al.*, 1999).

Als eine Strategie zur Verhinderung von Nierenschäden bei Bluthochdruck gilt daher die Anwendung thrombozytenhemmender Substanzen (Patrono & Pierucci, 1990).

3.6 5-HT im Immunsystem

3.6.1 Vorkommen von 5-HT und 5-HT-Rezeptoren im Immunsystem

5-HT wird in einer ganzen Reihe von Zellen des Immunsystems synthetisiert und/oder gespeichert. Darüber hinaus konnten viele der 5-HT-Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellen nachgewiesen werden. Im folgendem soll ein kurzer Überblick gegeben werden:

- **Thrombozyten:** können zwar 5-HT nicht selbst synthetisieren, nehmen aber große Mengen von im Darm durch die enterochromaffinen Zellen hergestelltem 5-HT über den SERT und den VMAT 2 auf, und speichern es in ihren Dichten Granula (Abschnitt I.2.2). Mit dem gespeicherten 5-HT können die Thrombozyten auf auto- und parakrine Weise die Sekretion ihrer α -Granula auslösen (Abschnitt I.2.3 und I.3.3).
- **Mastzellen:** liegen im Bindegewebe, besonders in den oberen Hautschichten und in den Schleimhäuten, in der Nähe kleiner Blutgefäße vor. Sie können 5-HT synthetisieren, aufnehmen und ähnlich den Thrombozyten in Granula speichern (Gripenberg 1976; Mathiau *et al.*, 1993; Hasegawa *et al.*, 1996). Thrombozyten und Mastzellen stellen somit mobile und stationäre 5-HT-Speicher dar. Humane Mastzellen enthalten jedoch, im Gegensatz zu den Mastzellen der Nagetiere, kein 5-HT (Parrat & West, 1957).
- **Monocyten und Makrophagen:** können 5-HT synthetisieren, abbauen (Finocchiaro *et al.*, 1988) und aufnehmen (Jackson *et al.*, 1988). Daneben tragen sie auch den 5-HT_{1A}- (Hellstrand & Hermodsson, 1993) und den 5-HT₂-Rezeptor (Sternberg *et al.*, 1987) auf ihrer Zelloberfläche.
- **Dendritische Zellen:** enthalten eine Vielzahl von 5-HT-Rezeptoren. Unabhängig vom Reifegrad besitzen sie den 5-HT₃- und den 5-HT_{2A}-Rezeptor. Im unreifen Zustand exprimieren sie zusätzlich den 5-HT_{1B}-, den 5-HT_{1E}- und den 5-HT_{2B}-Rezeptor. Nach Reifung durch LPS-Zugabe exprimieren sie dagegen den 5-HT₄- und den 5-HT₇-Rezeptor (Idzko *et al.*, 2004).
- **B-Zellen:** exprimieren den SERT und können somit 5-HT aufnehmen (Lesch *et al.*, 1996). Zusätzlich zu diesem Transporter wurde auch eine Reihe von Rezeptoren in diesen Zellen nachgewiesen: der 5-HT_{1A}- (Iken *et al.*, 1995), der 5-HT₂-, sowie der 5HT₃-Rezeptor (Choquet & Korn, 1988)
- **T-Zellen:** können 5-HT synthetisieren und abbauen (Finocchiaro *et al.*, 1988). Daneben ist die Expression von 5-HT_{1A}-, 5-HT₂-, sowie 5HT₃-Rezeptoren auf T-Zellen bekannt (Aune *et al.*, 1993; Ameisen *et al.*, 1989; Meyniel *et al.*, 1997). Der 5-HT_{1A}-Rezeptor findet sich aber nur auf aktivierten Zellen.
- In Thymus-, Milz-, mitogenaktivierten Milzzellen, sowie in Blutlymphozyten konnte außerdem die Expression des 5-HT_{1B}-, 5-HT_{1F}-, 5-HT_{2A}-, 5-HT_{2B}-, 5-HT₆- und des 5HT₇-

Rezeptors nachgewiesen werden (Stefulj *et al.*, 2000). Eine genaue Lokalisation dieser Rezeptoren wurde in dieser Arbeit jedoch nicht vorgenommen.

3.6.2 Thrombozyten als immunologische Zellen

Während die Rolle der Thrombozyten in der Blutgerinnung jedem geläufig ist, bleiben ihre immunologischen Funktionen häufig unbeachtet. Tatsächlich aber sind Thrombozyten zu Abwehrreaktionen gegen Pathogene fähig. Darüber hinaus stimulieren sie Entzündungs- und Reparaturprozesse nach der Verletzung von Blutgefäßen und interagieren auf vielfältige Weise mit anderen zellulären Komponenten des Blutes.

Kommen Thrombozyten mit Bakterien in Kontakt, können sie sich an diese binden. Durch die Bindung werden die Thrombozyten aktiviert, wodurch sich um die Bakterien ein kleiner „Pfropf“ aus Thrombozyten bildet. Die aktivierten Thrombozyten sondern dann Bakteriozide, zum Beispiel β -Lysin ab, und können so die Bakterien abtöten (Donaldson & Tew, 1977). Aber auch phagozytotische Eigenschaften seitens der Thrombozyten werden diskutiert (Meseguer *et al.*, 2002). Die Bakterien, aber auch andere Pathogene, sollen über das OCS (open canalicular system) genannte Endomembransystem der Thrombozyten aufgenommen werden. Das OCS stellt daneben auch die Membranen bereit, die für die Pseudopodenbildung der Thrombozyten nach deren Aktivierung nötig sind. Mit diesen Pseudopoden können die Thrombozyten Kontakt zu anderen Thrombozyten und Blutzellen herstellen.

Neben dem OCS enthalten Thrombozyten auch noch andere Speicherkompartimente, die dichten und die α -Granula. In den dichten Granula werden Adrenalin, Noradrenalin (Smith, 1996), Dopamin (D'Andrea *et al.*, 1989), Histamin (Fukami *et al.*, 1984), ATP und ADP und natürlich 5-HT (Ozaki *et al.*, 1998) gespeichert. 5-HT kann, wie schon in Abschnitt I.3.5.1 und I.3.5.2 erläutert, den Tonus regulieren. Daneben wirkt es als Mitogen auf Fibroblasten (Boucek & Alvarez, 1970) und glatte Muskelzellen (Nemecek *et al.*, 1986) und ist für die Ausschüttung der α -Granula der Thrombozyten essentiell (Abschnitt I.2.3 und I.3.3).

Die α -Granula enthalten eine Vielzahl von Chemokinen, Interleukinen und adhesiven Proteinen, deren vollständige Aufzählung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde (eine Übersicht bietet zum Beispiel Klinger, 1997). Deshalb sollen im folgenden die Eigenschaften, die die Substanzen der α -Granula vermitteln können, aufgezeigt, und einige Substanzen als Beispiel angeführt werden.

Chemotaxis: Einige der in den α -Granula gespeicherten Substanzen zeigen chemotaktische Eigenschaften: So wirkt das Chemokin PF4 (platelet factor 4) chemotaktisch auf neutrophile Zellen, Monocyten und Fibroblasten (Deuel *et al.*, 1981). Ebenso wirkt RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted) chemotaktisch auf basophile (Bischoff *et al.*, 1993) und eosinophile (Kameyoshi *et al.*, 1992) Zellen, und auf Gedächtnis-T-Zellen und Monocyten (Schall *et al.*, 1990). MIP-1 α (macrophage inflammatory protein) wiederum zieht, neben basophilen und eosinophilen Zellen (Baggiolini & Dahinden 1994; Rot *et al.*, 1992), CD8⁺ T-Zellen an (Taub *et al.*, 1993).

Aktivierung: PF4 (Brindley *et al.*, 1983), RANTES (Kuna *et al.*, 1992) und MIP-1 α (Baggiolini & Dahinden 1994) regen basophile Zellen zur Histaminfreisetzung an, welches wiederum die vaskuläre Permeabilität erhöht (Simons, 2003). RANTES kann die Migration von T-Zellen in peripheres Gewebe induzieren (Murphy *et al.*, 1994), während PDGF (platelet derived growth factor) als Mitogen wirkt (Berk *et al.*, 1986) und Monozyten aktiviert (Tzeng *et al.*, 1985). Somit werden einige der durch die chemotaktischen Eigenschaften der Thrombozyten angelockten immunologischen Zellen durch diese auch aktiviert, beziehungsweise zur Proliferation angeregt.

Zell-Zell-Interaktionen: Zell-Zell-Interaktionen zwischen Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten sind eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung entzündlicher Prozesse. Diese Interaktionen werden von verschiedenen Oberflächenmolekülen vermittelt. Die Bindung zwischen Thrombozyten und Endothel wird hauptsächlich von zwei Molekülen geschaffen: dem von Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin. Beide werden von aktivierten Endothelzellen präsentiert. Mit Hilfe der Glykoproteine GPIb α und GPIb-IX-V binden Thrombozyten an den vWF (André *et al.*, 2000, Lopez *et al.*, 1998), mit dem PSGL-1-Molekül (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) binden sie an das P-Selektin (Frenette *et al.*, 2000). P-Selektin vermittelt neben dem E-Selektin auch das Leukozyten-Rolling, bei dem sich die Leukozyten an das Endothel heften, um dann in das darunterliegende Gewebe zu migrieren (Butcher, 1991). Interessanterweise vermag auch das P-Selektin auf den Thrombozyten diesen Prozess zu fördern. Aktivierte Thrombozyten können zum einen mit Hilfe ihres P-Selektins an Monozyten binden und damit die Bindung der Monozyten an das Endothel verstärken, zum anderen verstärken auch Thrombozyten, die an das Endothel gebunden sind das Rolling, die Adhesion und die Transmigration der Leukozyten (Wagner & Burger, 2003). Ein gutes Beispiel für die Bedeutung der Thrombozyten in Entzündungsprozessen ist die Atherosklerose: In ApoE-defizienten Mäusen war die Atherosklerose verstärkt, wenn aktivierte Thrombozyten verabreicht wurden (Huo *et al.*, 2003), dagegen war sie jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, wenn die Thrombozyten kein P-Selektin enthielten (Burger & Wagner, 2003). Diese Vielzahl an chemotaktischen, aktivierenden und mitogenen Substanzen und die zu Zell-Zell-Interaktionen benötigten Oberflächenmarker befähigen die Thrombozyten dazu, verschiedene immunologische Reaktionen zu fördern und zu verstärken.

3.6.3 5-HT in der T-Zellaktivierung

Die verschiedenen *in vitro*-Experimente über den Einfluss des 5-HT auf die T-Zellaktivierung lassen darauf schließen, dass 5-HT dabei eine entscheidende Rolle spielt. Die vorhandenen Studien ergeben jedoch kein einheitliches Bild, was unter anderem daran liegt, dass in verschiedenen Studien nicht nur unterschiedliche Spezies und unterschiedliche Mitogene in unterschiedlichen Konzentrationen benutzt wurden, sondern auch, weil teilweise Medium mit Serum, welches 5-HT enthält, benutzt wurde.

Stefulj *et al.* (2001) zeigten an mit verschiedenen Mitogenen stimulierten Rattenmilzzellen, dass exogenes 5-HT in physiologischen Konzentrationen (kleiner als 3×10^{-6} M; Mossner & Lesch, 1998) keinen Effekt auf die Lymphozytenproliferation hat. Höhere Konzen-

trationen wirken dagegen inhibitorisch auf die Aktivierung, unter anderem auch durch die Auslösung von Apoptose (Stefulj *et al.*, 2001; Stefulj *et al.*, 2002-2003).

Die Arbeit von Kut *et al.* (1992) lässt darauf schließen, dass solche Effekte auch von endogenem 5-HT vermittelt werden können: die Applikation von hohen Dosen des 5-HT-Freisetzers Fenfluramine führt zu einer Inhibition der Lymphozytenproliferation. Kleine Mengen Fenfluramin stimulieren dagegen die T-Zellaktivierung. Für einen Einfluss von endogenem 5-HT auf die T-Zellaktivierung spricht auch die Tatsache, dass Milzzellen aus mit dem TPH-Inhibitor PCPA behandelten Mäusen deutlich schlechter proliferieren als Zellen aus unbehandelten Tieren, ein Effekt, der durch die Zugabe von exogenem 5-HT wieder aufgehoben werden kann (Young *et al.*, 1993). Das endogene 5-HT scheint von den Makrophagen bereitgestellt zu werden, da bei der Verwendung von Makrophagen aus unbehandelten und Lymphozyten aus PCPA-behandelten Mäusen keine solche Suppression auftritt (Young *et al.*, 1995).

Vermittelt werden diese proliferationsfördernden Effekte des 5-HT anscheinend durch mehrere Rezeptoren: Aune *et al.* (1994) zeigten, dass die T-Zellproliferation durch 5-HT_{1A}-Antagonisten gehemmt werden kann, während Young *et al.* (1993) dies mit 5-HT₂-Rezeptorantagonisten erreichten. Khan & Poisson (1999) konnten zwar keine Suppression der T-Zellproliferation mit einem 5-HT₃-Rezeptorantagonisten erreichen, die Applikation eines 5-HT₃-Rezeptoragonisten konnte aber die Proliferation stimulieren.

3.6.4 Kontakthypersensibilität (Das Ohrschwellungsmodell)

Die Kontakthypersensibilität (contact hypersensitivity, CHS) ist eine Form der verzögerten T-zellvermittelten Hypersensibilität (delayed type hypersensitivity, DTH), und ein einfach durchzuführender und quantifizierbarer *in vivo*-Test für die zellvermittelte Immunfunktion. Dabei wird ein exogenes Hapten auf die Haut aufgetragen, welches dann von den antigenpräsentierenden Zellen der Haut, den Langerhansschen Zellen, aufgenommen wird. Mit dem Antigen wandern die Langerhansschen Zellen, dann zu dendritischen Zellen gereift, zu den nächstgelegenen Lymphknoten. Dort präsentieren sie das Antigen naiven T-Zellen, die daraufhin zu antigenspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Effektorzellen proliferieren, welche dann durch die peripheren Gewebe wandern. Zusammen stellen alle diese Schritte die (afferente) Sensibilisierungsphase dar (Grabbe & Schwarz, 1998).

Kommt ein so sensibilisierter Organismus erneut mit dem Hapten über die Epidermis in Kontakt, löst dies innerhalb von 24 h eine Entzündungsreaktion aus (efferente Reaktion). Sie ist gekennzeichnet durch Vasodilatation, sowie Flüssigkeits- und Zelleinstrom in die Haut. Die dabei ablaufenden Reaktionsschritte sind sehr komplex und noch nicht vollständig verstanden. Sicher ist zum Beispiel, dass die Auslösung der Entzündungsreaktion T-zellabhängig ist, da T-Zell-defiziente Tiere keine CHS-Reaktion ausbilden (Szczepanik *et al.*, 1996). Weiterhin konnten Ptak *et al.* (1991) zeigen, dass zwei verschiedene T-Zelltypen an dieser Reaktion beteiligt sind. Ebenso spielen verschiedene Cytokine eine Rolle: Die Applikation von TNF- α -Antikörper unterdrückt zum Beispiel die CHS-Reaktion (Piguet *et al.*, 1991). Für die Rekrutierung der Leukozyten zum

Entzündungsherd sind dagegen Selektine nötig. Mäuse, die weder E-, noch P-Selektin exprimieren, zeigen ebenfalls eine eingeschränkte CHS-Reaktion (Staite *et al.*, 1996).

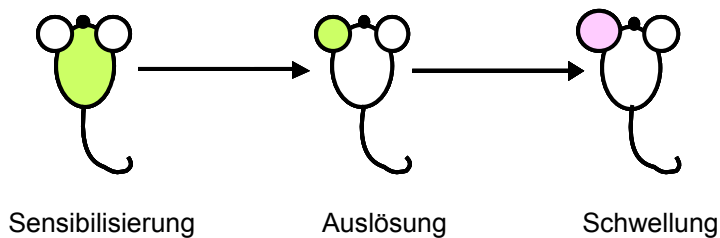


Abbildung I.9: Das Ohrschwellungsmodell

In diesem *in vivo*-Versuch zur Messung der zellvermittelten Immunität wird die Labormaus zuerst sensibilisiert, indem das Antigen großflächig auf die Haut aufgetragen wird (grün). Nach einigen Tagen haben sich in dem Tier antigenspezifische T-Zellen gebildet, die beim erneuten dermalen Kontakt mit dem Antigen, der Auslösung, eine Entzündungsreaktion vermitteln (rosa), die als Schwellung mess- und quantifizierbar ist.

Nach einigen Tagen haben sich in dem Tier antigenspezifische T-Zellen gebildet, die beim erneuten dermalen Kontakt mit dem Antigen, der Auslösung, eine Entzündungsreaktion vermitteln (rosa), die als Schwellung mess- und quantifizierbar ist.

Die CHS-Auslösungsphase lässt sich mit 5-HT_{1A}- (Aune *et al.*, 1994) und 5-HT₂- (Ameisen *et al.*, 1989) Rezeptorantagonisten abschwächen. Die serotonergen Komponenten der efferenten Phase sind die in der Haut vorliegenden Mastzellen und die Thrombozyten im Blut. Zunächst wurde dies angezweifelt, da weder *beige*-Mäuse, die aufgrund eines genetischen Defektes kein 5-HT in ihren Thrombozyten speichern können, noch Mastzelldefiziente Mäuse eine Beeinträchtigung der CHS-Antwort zeigten (Galli & Hammel, 1984). Später zeigen jedoch Geba *et al.* (1996), dass Mastzelldefiziente Mäuse, deren Thrombozyten depletiert worden waren, eine deutlich schwächer ausgeprägte CHS-Reaktion ausbildeten. Mastzellen und Thrombozyten können sich in diesem System gegenseitig ersetzen.

Es wird angenommen, dass Mastzellen und/oder Thrombozyten durch antigenspezifische T-Zellen in der Haut, welche durch Kontakt mit dem Hapten stimuliert worden sind, zur 5-HT-Freisetzung angeregt werden. Dieses 5-HT soll dann zum einen auf das Endothel einwirken und somit die Rekrutierung weiterer antigenspezifischer T-Zellen ermöglichen. Zum anderen soll es wiederum diese Zellen zur Freisetzung chemotaktischer Stoffe stimulieren (Ameisen *et al.*, 1989; Aune *et al.*, 1994; Laberge *et al.*, 1996; Mossner & Lesch, 1998).

3.7 Indolamin-2,3-Dioxygenase-induzierte immunologische Toleranz

3.7.1 Schwangerschaft – ein immunologisches Paradoxon

Während der Schwangerschaft hält ein Fötus über die Plazenta engen Kontakt zum maternalen Organismus, da er von ihm mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird und über ihn Abfallprodukte entsorgt. Er exprimiert aber gleichzeitig paternale, und damit dem maternalen Organismus fremde Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene. Der Fötus verhält sich somit dem maternalen Organismus gegenüber wie ein (semi-)allogenes

Transplantat zum Empfänger, jedoch mit dem Unterschied, dass ein allogenes Transplantat vom Empfänger abgestoßen, der (semi-)allogene Fötus dagegen vom maternalen Organismus gemeinhin toleriert wird. Abbildung I.10 stellt dieses Paradoxon grafisch dar.

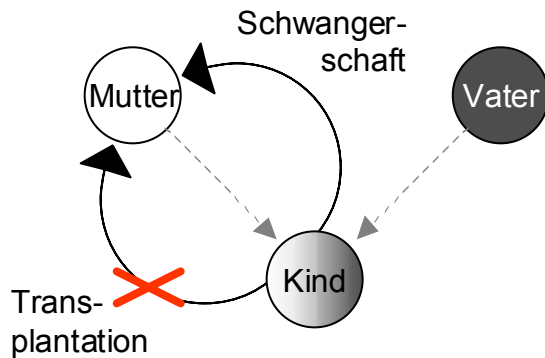


Abbildung I.10: Abstoßung und Akzeptanz zwischen Mutter und Kind.

Ein Kind erbt gleichermaßen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene von Mutter und Vater. Somit ist ein Kind der Mutter gegenüber semiallogen. Eine Transplantation von Kind zu Mutter ist wegen der paternalen Haupt- und Nebenhistokompatibilitätsantigene nicht möglich. Das Transplantat wird abgestoßen. Während der Schwangerschaft ist das Kind jedoch selbst ein „Transplantat“ im maternalen Organismus und wird von diesem normalerweise nicht abgestoßen, sondern toleriert.

Billingham, Brent und Medawar (1953) zogen vier mögliche Mechanismen in Betracht, die das immunologische Paradoxon der Schwangerschaft erklären könnten:

- I eine signifikante Erniedrigung der maternalen Immunabwehr
- II eine antigene Unreife des Fötus und damit ein Nichterkennen durch das maternale Immunsystem
- III der Uterus ist ein immunoprivilegiertes Ort im maternalen Organismus
- IV die Plazenta stellt eine immunologische Barriere dar

Die erste Hypothese, also eine Erniedrigung der maternalen Immunabwehr, ist nicht möglich, da der maternale Organismus sich auch während der Schwangerschaft gegen äußere Einflüsse verteidigen muss. Mit der Tatsache, dass während der Schwangerschaft im maternalen Blut nicht nur fötale Zellen (Reading *et al.*, 1995), sondern auch Antikörper gegen paternale MHC-Proteine vorliegen, und dass alloantigen-spezifische Veränderungen maternaler B- und T-Zellen beobachtet werden (Tafari *et al.*, 1995; Ait-Azzouzene *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998), kann auch die zweite Hypothese ausgeschlossen werden. Schließlich zeigt die Möglichkeit ektopischer Schwangerschaften, dass der Uterus nicht als immunoprivilegiertes Ort für eine Schwangerschaft nötig ist (Peters, 1982).

Bleibt also nur die vierte Hypothese, welche der Plazenta eine Rolle als immunologische Barriere zwischen Fötus und maternalem Organismus zuschreibt. Wie diese immunologische Barriere aussieht und funktioniert ist bislang noch nicht geklärt. Es werden zur Zeit mehrere Theorien verfolgt (eine Übersicht bieten zum Beispiel: Erlebacher, 2001; Thellin *et al.*, 2000). Mit einer dieser Theorien, welche dem Enzym Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO) eine Hauptrolle in der Toleranzvermittlung zugesteht, soll sich diese Arbeit beschäftigen.

3.7.2 Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)

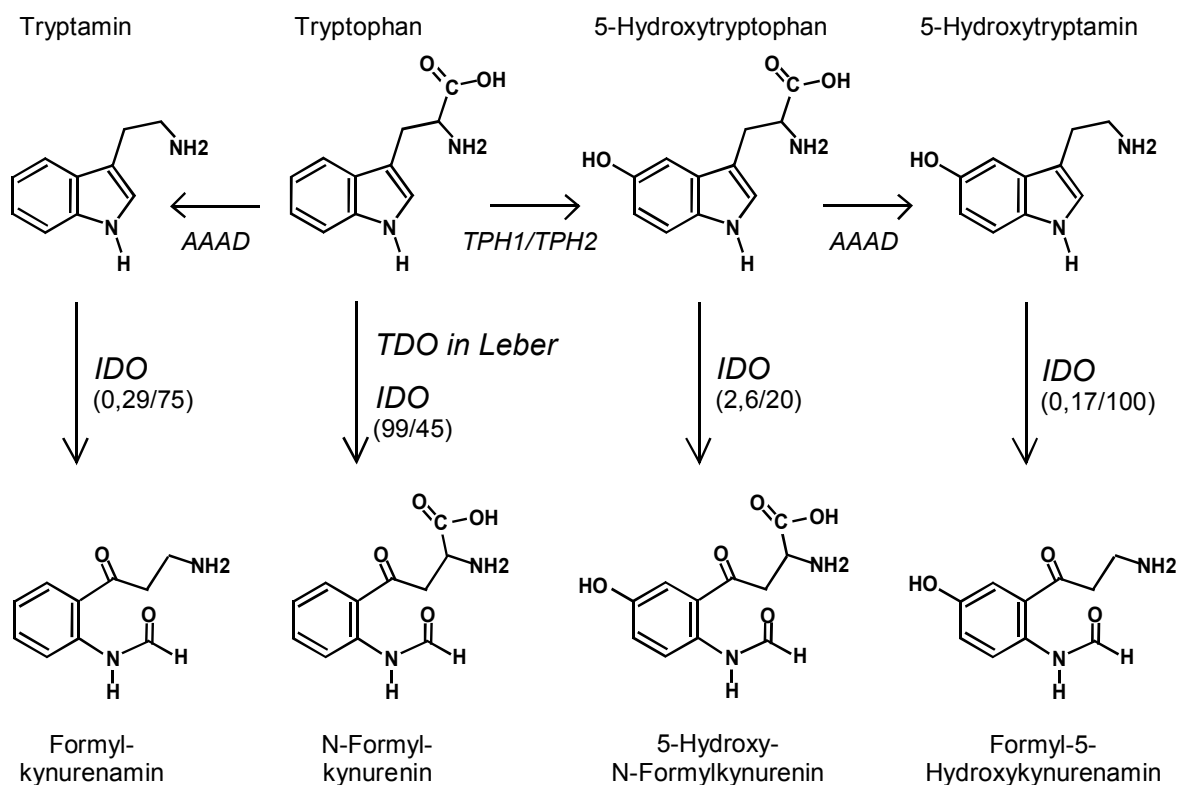


Abbildung I.11: Abbau verschiedener Indolamine durch die Indolamin-2,3-Dioxygenase.

In Klammern sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (mol/min/mol Enzym bei 24°C) und der Km-Wert der Indolamin-2,3-Dioxygenase für das jeweilige Substrat angegeben (nach Shimizu *et al.*, 1978).

Die Indoleamin-2,3-Dioxygenase (IDO, EC 1.13.11.42; im Menschen bezeichnet die Abkürzung IDO die Indol-2,3-Dioxygenase, die Indolamin-2,3-Dioxygenase wird dort INDO genannt) ist ein cytosolisches Enzym, welches den fünfgliedrigen Ring von Indolaminen mit Hilfe von molekularem Sauerstoff aufbrechen kann. Sie ist eng verwandt mit der Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO, EC 1.13.11.11), welche in Leber und Niere exprimiert wird und dort spezifisch über 90 % des Trp als erstes Enzym des Kynureninweges abbaut (Walsh & Daya, 1997; Bertazzo *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu akzeptiert IDO auch andere Indoleamine, zum Beispiel 5-HTP, 5-HT, Tryptamin und Melatonin, als Substrate (siehe Abbildung I.11).

IDO wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, hauptsächlich in Gehirn, Lunge Milz und Dünndarm (Hayaishi, 1976), aber auch in verschiedenen Zellen des Immunsystems (Abschnitt 3.7.4). Die Expression variiert stark (Shimizu *et al.*, 1978) und kann durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS; Fujigaki *et al.*, 2001) und Interferon- γ (IFN- γ ; Taylor & Feng, 1991) stimuliert werden.

3.7.3 Aushungern als Abwehrmechanismus

Das Cytokin Interferon- γ (IFN- γ) wird von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK) gebildet und hilft bei der Immunabwehr. IFN- γ -Receptor-Knockout-Mäuse sind zum Beispiel anfälliger für Infektionen (Huang *et al.*, 1993). Vermittelt wird diese immunologische Wirkung des IFN- γ unter anderem durch IDO, deren Expression durch IFN- γ induziert wird. In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass IDO das Wachstum verschiedener intrazellulärer Pathogene, zum Beispiel *Toxoplasma gondii* und *Chlamydia psittaci* in Fibroblasten (Gupta *et al.*, 1994), aber auch extrazellulärer Pathogene wie zum Beispiel von Streptokokken (MacKenzie *et al.*, 1999) inhibieren kann. IDO degradiert die essentielle Aminosäure Tryptophan und erzeugt somit eine Tryptophandefizienz, welche wachstumshemmend und damit antiparasitisch wirkt. Zwar kann IFN- γ auch verschiedene andere Effekte induzieren, die ebenfalls wachstumshemmend wirken könnten (zum Beispiel wird die NO-Synthese angekurbelt), die Möglichkeit der Inhibition des antiparasitären Effekts des IFN- γ durch Tryptophangabe *in vitro* zeigt jedoch deutlich, dass die erzeugte Tryptophandefizienz den Effekt vermittelt (Pfefferkorn, 1984).

3.7.4 IDO-Expression zur Regulierung von T-Zell-Reaktionen (Toleranzinduktion)

Die IDO-induzierte Tryptophandefizienz wird nicht nur zur Abwehr von Parasiten benutzt. Es konnte in *in vitro*-Versuchen gezeigt werden, dass Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie Makrophagen (Munn *et al.*, 1999) und dendritische Zellen (DC; Munn *et al.*, 2002) nach Stimulation IDO exprimieren, eine Tryptophandefizienz erstellen, und damit die Proliferation von T-Zellen im G1-Stadium unterdrücken können. Übereinstimmend mit diesen Daten reduziert eine IDO-Überexpression in Zellen, die mit T-Zellen kokultiviert werden die T-Zell-Antworten *in vitro*, aber auch *in vivo* (transgene Mäuse) (Mellor *et al.*, 2002). Diese APCs können also eine „periphere“ (also nicht die durch negative Selektion im Thymus erworbene) Toleranz induzieren. Dieser Toleranzmechanismus spielt bei folgenden Beispielen eine Rolle:

- Eine natürlich auftretende Toleranz zeigt sich bei allogenen Lebertransplantationen. Im Gegensatz zu anderen Organen werden allogene Lebertransplantate in vielen Mäusestämmen nicht abgestoßen (Qian *et al.*, 1994). IDO wird unter normalen Bedingungen nicht in der Leber exprimiert, in allogenen Lebertransplantaten ist eine IDO-Expression jedoch nachweisbar. Die Verabreichung des kompetitiven IDO-Inhibitors 1-Methyltryptophan (1-MT; Cady & Sono, 1991) führt zu einer Abstoßung des allogenen Lebergewebes (Miki *et al.*, 2001). Es ist also anzunehmen, dass bei Lebertransplantaten die IDO-Expression einen Angriff alloreaktiver T-Zellen verhindert.
- Viele Tumore werden nicht durch das Immunsystem erkannt und können daher unbemerkt wachsen. Es scheint, dass Tumore ihre „Tarnung“ selbst erstellen können: Die murine Mastocytoma-Zelllinie P815 bildet in naiven syngeneten Mäusen lethale Tumore. In mit Tumorantigenen präimmunisierten Tieren ist eine Abstoßung der Tumore durch das Immunsystem dagegen möglich. Werden die

P815-Zellen jedoch vorher mitIDO transfiziert, entkommen die Tumore auch in präimmunisierten Tieren einer Abstoßung. Diese „Tarnung“ kann jedoch wieder aufgehoben werden, wenn man den IDO-Inhibitor 1-MT verabreicht. Interessant ist daher, dass viele Tumore IDO exprimieren (Uyttenhove *et al.*, 2003).

- 1998 wurde dieser Mechanismus auch auf die Frage der Schwangerschaftstoleranz übertragen. IDO wird von Syncytiotrophoblastzellen exprimiert (Kamimura *et al.*, 1991), und kann somit nahe des fötal-maternalen Grenz-bereiches eine Tryptophandefizienz erzeugen und die Proliferation alloreaktiver maternaler T-Zellen inhibieren. Tatsächlich verursacht die Gabe von 1-MT eine Abstoßung allogener, nicht jedoch syngener Föten in Mäusen (Munn *et al.*, 1998; Mellor *et al.*, 2001). Allogene Föten scheinen demnach aufgrund der durch IDO an der fötal-maternalen Grenze erstellten Tryptophandefizienz vor einem Angriff durch das maternale Immunsystem geschützt zu werden.

In Abbildung I.12 wird der hypothetische Mechanismus der durch IDO-Expression induzierten Toleranz noch einmal grafisch dargestellt. CTLA-4-Ig (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin) ist ein lösliches Protein welches aus der extrazellulären Domäne des humanen CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen, auch CD152) und einem Fragment der Fc-Region des humanen IgG1 besteht. Es ist bekannt, dass eine Therapie mit CTLA-4-Ig eine langanhaltende Toleranz gegenüber Transplantaten induzieren kann (Lenschow *et al.*, 1996). Grohmann *et al.* (2002) konnten zeigen, dass auch die CTLA-4-Ig-induzierte Toleranz durch IDO vermittelt wird.

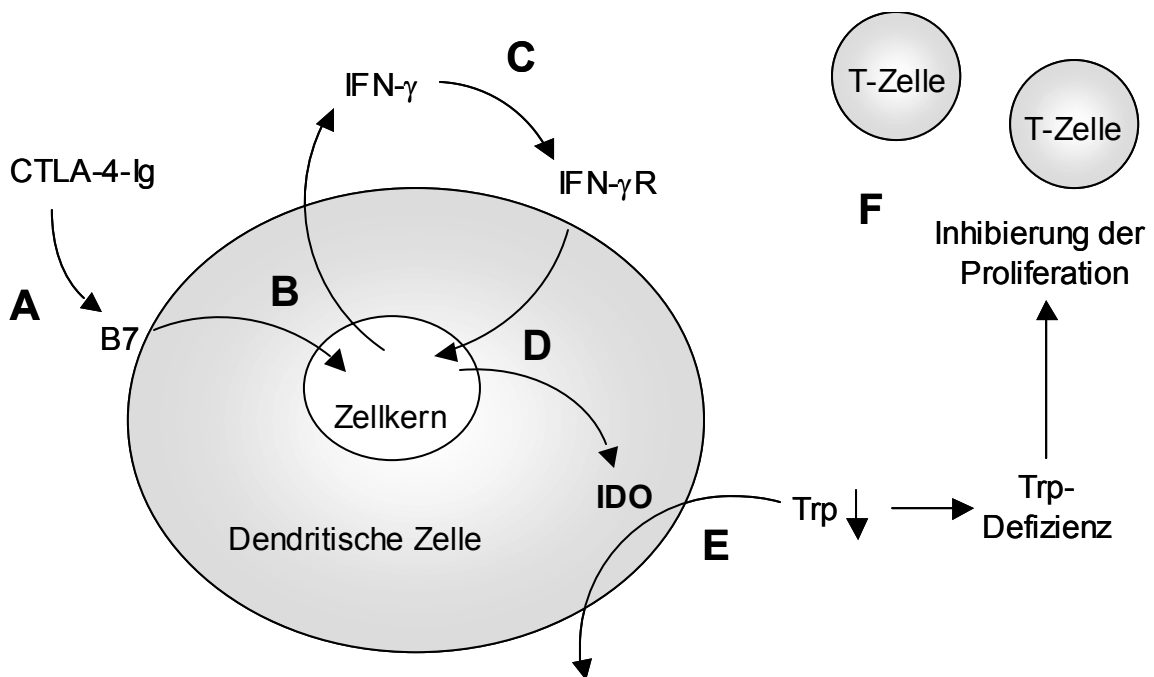


Abbildung I.12: Mechanismus der durch IDO-induzierten Toleranz.

(A) CTLA-4-Ig interagiert mit den Oberflächenmolekül B7 auf den dendritischen Zellen. (B) Mit der dadurch ausgelösten Signaltransduktionskaskade werden die dendritischen Zellen zur IFN- γ -Produktion angeregt. (C) IFN- γ wirkt autokrin und parakrin über den IFN- γ -Rezeptor auf die dendritischen Zellen ein, (D) die als Folge dessen die IDO-Expression hochregulieren. (E) IDO baut das in der Umgebung der dendritischen Zellen vorhandene Tryptophan ab. (F) Die dadurch erzeugte Tryptophandefizienz inhibiert die Proliferation der T-Zellen.

Bislang ungeklärt ist jedoch die Frage, ob wirklich die Tryptophandefizienz oder die Degradation eines der anderen Substrate der Indolamin-2,3-Dioxygenase die Unterdrückung der T-Zellproliferation und damit die Toleranz vermittelt.

4 Zielsetzung

5-HT ist in der wissenschaftlichen Literatur vor allem als Neurotransmitter bekannt. Es wird jedoch auch außerhalb des Gehirns synthetisiert und spielt eine Rolle in der Regulation verschiedener, sehr vielfältiger Prozesse, zum Beispiel der Hämostase, im Immunsystem, der Ontogenese, im Herz-Kreislauf-System und bei der Darmfunktion.

Vor kurzem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es zwei Tryptophan-Hydroxylasen (TPH) gibt, also Enzyme, welche die 5-HT-Biosynthese einleiten. TPH1 wird in extraneuronalen Geweben exprimiert, während TPH2 für die 5-HT-Synthese im Gehirn verantwortlich ist. Mit der TPH1-Knockout-Maus steht nun ein peripher 5-HT-defizientes Tiermodell zur Verfügung, welches hervorragend für die Untersuchung der verschiedenen 5-HT-abhängigen Prozesse außerhalb des zentralen Nervensystems geeignet ist.

In dieser Arbeit soll der Phänotyp der TPH1^{-/-}-Tiere hinsichtlich folgender Aspekte untersucht werden:

1. Die Darmperistaltik, die Cholera-toxin-induzierte Sekretion, aber auch die Emesis sollen durch 5-HT, welches in den enterochromaffinen Zellen synthetisiert und aus ihnen ausgeschüttet wird, initiiert werden. Mit Hilfe der TPH1^{-/-}-Tiere, deren enterochromaffine Zellen kein 5-HT enthalten, soll diese Hypothese überprüft werden.
2. Da 5-HT sowohl vasokonstriktorisch, als auch vasodilatatorisch wirken kann, soll überprüft werden, ob der erniedrigte 5-HT-Blutspiegel in den TPH1^{-/-}-Tieren einen Einfluss auf den basalen Blutdruck hat. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob die TPH1-Deletion einen Einfluss auf die Entwicklung bluthochdruckinduzierter Organschäden hat. Außerdem soll die Untersuchung verschiedener kardialer Parameter Aufschluss darüber geben, ob 5-HT die Herzentwicklung beeinflusst.
3. Verschiedene Komponenten des Immunsystems sind in der Literatur als 5-HT-synthetisierend oder -speichernd beschrieben worden. Mit Hilfe des Kontakthyper-sensibilität-Modells soll eine mögliche Veränderung der Immunantwort in den TPH1^{-/-}-Tieren genauer untersucht werden.
4. Als Erklärung für die immunologische Toleranz der Mutter gegenüber dem allogenen Fötus wird in der Literatur das Modell der Immunsuppression durch lokalen Trp-Abbau diskutiert. Unbeachtet blieb bisher allerdings, dass das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase, welches die Trp-Defizienz hervorruft, auch 5-HT abbaut. Die Frage, ob Trp- oder 5-HT-Defizienz toleranzvermittelnd in der Schwangerschaft wirkt, soll mit Hilfe der TPH1^{-/-}-Mäuse beantwortet werden.