

# Die Rolle der Tryptophan-Hydroxylase 2 bei der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen

Alternatives Spleißen und RNA-Editierung humaner  
*TPH2*-Transkripte

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
**Diplom-Biologe Maik Grohmann**  
aus Eisenhüttenstadt

durchgeführt am  
Max-Planck-Institut für molekulare Genetik

eingereicht im  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin



Juni 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Constance Scharff
2. Gutachter: Prof. Dr. Heidrun Fink

Disputation am 13. November 2008

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Das serotonerge System</b> .....	<b>1</b>
1.1	Vorkommen und Bedeutung von 5-HT.....	1
1.2	Der 5-HT-Stoffwechsel.....	3
1.2.1	Biosynthese und Katabolismus.....	3
1.2.2	Biochemische Zusammenhänge.....	4
<b>2</b>	<b>Die Tryptophan-Hydroxylasen TPH1 und TPH2</b> .....	<b>6</b>
2.1	Superfamilie der AAAHs.....	6
2.2	Die Dualität des serotonergen Systems.....	7
2.3	Struktur der Tryptophan-Hydroxylasen.....	8
2.4	Regulation der Tryptophan-Hydroxylasen.....	8
2.4.1	Genexpression.....	8
2.4.2	Regulation auf RNA-Ebene.....	9
2.4.3	Substratkontrolle.....	10
2.4.4	Biochemische Aktivierung.....	10
<b>3</b>	<b>Signalvermittlung durch 5-HT</b> .....	<b>11</b>
3.1	5-HT-Rezeptoren.....	11
3.2	Transporter des 5-HT-Systems.....	12
3.2.1	Der Transport großer neutraler Aminosäuren.....	12
3.2.2	Die vesikuläre Speicherung von Monoaminen.....	13
3.2.3	Die 5-HT-Wiederaufnahme.....	13
<b>4</b>	<b>Pathologie des zentralen 5-HT-Systems</b> .....	<b>14</b>
4.1	Anatomie des serotonergen Systems.....	14
4.2	Psychiatrische Erkrankungen.....	15
4.2.1	Depression.....	15
4.2.2	Schizophrenie.....	16
4.2.3	Drogenmissbrauch.....	16
4.3	Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen.....	17
4.3.1	Monoaminhypothese und weitere Theorien.....	17
4.3.2	<i>TPH2</i> -SNPs und andere Faktoren.....	18
4.4	Die Amygdala.....	19
<b>5</b>	<b>Bedeutung von 5-HT in der Ontogenese</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Posttranskriptionale RNA-Modifikationen</b> .....	<b>22</b>
6.1	Alternatives Spleißen.....	22
6.2	RNA-Editierung.....	23
<b>7</b>	<b>Das NTR/CB1954-System</b> .....	<b>25</b>
<b>8</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>27</b>
<b>II</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
<b>1</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien</b> .....	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Oligonukleotide</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Lösungen, Puffer und Medien</b> .....	<b>29</b>
<b>5</b>	<b>Zellkulturen und Mikroorganismen</b> .....	<b>29</b>
5.1	Säugerzellen.....	29

---

5.2	Bakterien.....	30
5.2.1	Stämme.....	30
5.2.2	Kulturbedingungen.....	30
5.2.3	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	30
5.2.4	Transformation.....	31
<b>6</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>31</b>
6.1	Isolierung von Nukleinsäuren.....	31
6.1.1	Isolierung genomischer DNA.....	31
6.1.2	Analytische Plasmid-DNA-Isolierung.....	32
6.1.3	Präperative Plasmid-DNA-Isolierung.....	32
6.1.4	DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen.....	32
6.1.5	RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben.....	32
6.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
6.3	Manipulation von Nukleinsäuren.....	33
6.3.1	Restriktionsverdau.....	33
6.3.2	Dephosphorylierung.....	33
6.3.3	Generierung stumpfer Enden.....	33
6.3.4	Erzeugung von 3'-A-Überhängen.....	33
6.3.5	Ligation.....	33
6.4	Agarosegelelektrophorese.....	34
6.5	Klonierungen.....	34
6.5.1	pNTR1.....	34
6.5.2	pUC57-NTRo.....	34
6.5.3	pMSCVhTph2NTRpA.....	34
6.5.4	pGNTR und pGNTRo.....	35
6.5.5	pTph2DsRED.....	35
6.5.6	pXL-TPH2-Konstrukte.....	35
6.5.7	TPH2-Expressionskonstrukte.....	36
6.5.8	Klonierung der TPH2-Exone.....	36
6.6	Sequenzierung.....	36
6.7	Lagerung.....	36
6.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	36
6.9	Reverse Transkription.....	37
6.10	Realtime PCR (qPCR).....	37
<b>7</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>38</b>
7.1	Denaturierende Zellextrakte.....	38
7.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	38
7.3	SDS-PAGE.....	38
7.4	Westernblot.....	39
7.5	Aufarbeitung von Zellen und Geweben für die 5-HT-Messung.....	39
7.6	TPH-Aktivitätsassay.....	39
7.7	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	40
<b>8</b>	<b>Zellkulturmethoden.....</b>	<b>40</b>
8.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	40
8.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	41
8.3	Kultivierung serotonerger Rapheneuronen der Ratte.....	41
8.4	Immunzytochemie (ICC).....	41
8.5	Manipulation von Säugerzellen.....	42
8.5.1	Transfektion.....	42
8.5.2	Stabile Zelllinien.....	42
8.5.3	Herstellung von rekombinanten Retroviren.....	42
8.6	Proliferationsassays.....	43
8.6.1	Zellzahlbestimmung durch Auszählen.....	43

---

8.6.2	MTT-Assay .....	43
8.7	Fluoreszenzmikroskopie .....	44
8.8	Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau .....	44
<b>9</b>	<b>Arbeiten mit Versuchstieren .....</b>	<b>44</b>
9.1	Tierstämme und Haltung .....	44
9.2	Transgene Techniken .....	44
9.2.1	Superovulation .....	45
9.2.2	Isolierung von Zygoten .....	45
9.2.3	Mikroinjektion von Retroviren .....	45
9.2.4	Leihmütter, Vasektomie, Retransfer .....	46
9.2.5	Schwanzbiopie .....	46
9.3	Pharmakologische Untersuchungen mit CB1954 .....	47
9.4	Antikörpergenerierung .....	47
9.5	Immunhistochemische Methoden .....	47
9.5.1	Perfusion .....	47
9.5.2	Immunhistochemie (IHC) .....	48
9.5.3	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	48
<b>10</b>	<b>Patientenkollektive .....</b>	<b>49</b>
10.1	Kollektiv für die RNA-Extraktion .....	49
10.2	Kollektiv für die SNP <i>rs4290270</i> -Genotypisierung .....	50
10.3	SNP <i>rs4290270</i> -Genotypisierung .....	51
<b>11</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>51</b>
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>1</b>	<b>Generierung transgener NTR1-Mäuse .....</b>	<b>52</b>
1.1	Die Aktivität des humanen <i>Tph2</i> -Promotors in <i>Rodentia</i> .....	52
1.1.1	Primäre 5-HT-Rapheneuronen der Ratte .....	52
1.1.2	TPH2-Expression in murinen 5-HT-Rapheneuronen .....	52
1.1.3	Expression des Reportergens <i>DsRed</i> in 5-HT-Neuronen .....	53
1.2	NTR1-Tiere durch retroviralen Gentransfer .....	53
1.3	NTR-Expressionsnachweis im Gehirn .....	54
1.4	Vorversuche mit CB1954 .....	55
<b>2</b>	<b><i>In vitro</i>-Charakterisierung des NTR/CB1954-Systems .....</b>	<b>56</b>
2.1	Proteinaggregation nach <i>gntr</i> -Expression in COS7-Zellen .....	56
2.2	Codonoptimierung des bakteriellen <i>ntr</i> -Gens .....	57
2.3	Expression des codonoptimierten <i>gntr</i> -Gens in COS7-Zellen .....	59
2.4	Sensitivität GNTR-exprimierender COS7-Zellen gegenüber CB1954 .....	59
2.5	CB1954-Sensitivität stabiler Zelllinien .....	61
<b>3</b>	<b>Generierung spezifischer <math>\alpha</math>TPH-Antikörper .....</b>	<b>63</b>
3.1	Auswahl der Regionen zur Antikörpergenerierung .....	63
3.2	Immunreaktivität der erhaltenen Antiseren .....	64
3.3	Spezifität des $\alpha$ TPH2-Antikörpers im Immunblot .....	64
3.4	Immunhistochemischer Nachweis der TPH2-Expression im murinen Gehirn .....	65
<b>4</b>	<b>Identifizierung von humanen <i>TPH2</i>-Genvarianten .....</b>	<b>65</b>
4.1	Sequenzierung humaner <i>TPH2</i> -cDNAs .....	65
4.2	Posttranskriptionale Modifikationen des humanen <i>TPH2</i> -Gens .....	67
4.2.1	Alternatives Spleißen .....	67
4.2.2	Nachweis der Spleißvarianten <i>TPH2a</i> und <i>TPH2b</i> .....	68
4.2.3	Editierung der <i>TPH2a</i> und <i>TPH2b</i> prä-RNAs .....	69
4.2.4	Spezifität der <i>TPH2</i> -RNA-Editierung .....	72

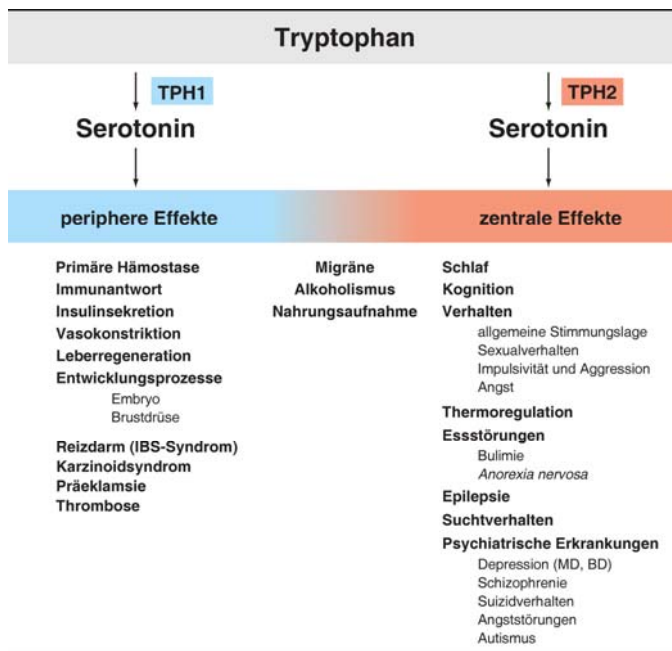
4.3	Biochemische Charakterisierung der TPH2-Varianten.....	73
4.3.1	Kinetiken bezüglich Trp in stabilen PC12-Zellen .....	73
4.3.2	5-HT-Gehalte TPH2-exprimierender PC12-Zellen.....	74
4.3.3	Kinetische Untersuchungen in HEK293-Zellen mit BH4 .....	75
4.4	Untersuchung der Patientenkollektive .....	76
4.4.1	Expression der <i>TPH2</i> -Spleißvarianten.....	76
4.4.2	<i>TPH2</i> -Editierung in der Amygdala .....	77
4.4.3	RFLP-Genotypisierung des SNPs <i>rs4290270</i> .....	78
4.4.4	Assoziationsstudie bezüglich SNP <i>rs4290270</i> .....	79
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>80</b>
<b>1</b>	<b>Die NTR1-Mäuse.....</b>	<b>80</b>
1.1	Die Spezifität der NTR-Expression.....	80
1.2	Der Phänotyp der NTR1-Mäuse der ersten Konstruktgeneration .....	81
<b>2</b>	<b>Codonoptimierung des NTR/CB1954-Systems .....</b>	<b>82</b>
2.1	Überwindung der NTR-Expressionsprobleme in Säugerzellen .....	82
2.2	Bedeutung der <i>ntro</i> für <i>in vivo</i> -Zellablationstudien .....	83
2.3	Anwendung der <i>ntro</i> in der humanen Gentherapie .....	85
<b>3</b>	<b>Der spezifische <math>\alpha</math>TPH2-Antikörper.....</b>	<b>87</b>
<b>4</b>	<b>Regulation der 5-HT-Biosynthese .....</b>	<b>88</b>
4.1	Identifizierung von SNPs im humanen <i>TPH2</i> -Gen .....	88
4.2	Aktivität der humanen Tryptophan-Hydroxylase 2 .....	89
4.2.1	Alternatives Spleißen humaner <i>TPH2</i> -Transkripte .....	89
4.2.2	RNA-Editierung .....	91
4.2.3	Heteromerisierung.....	95
4.2.4	Bedeutung des SNPs <i>rs4290270</i> .....	96
4.3	Klinische Zusammenhänge .....	97
4.3.1	Dysregulation der <i>TPH2</i> -Editierung bei psychiatrischen Erkrankungen .....	97
4.3.2	Drogenmissbrauch .....	98
4.3.3	Suizid.....	99
4.3.4	Schizophrenie .....	101
4.3.5	Physiologische Signifikanz der RNA-Editierungsenzyme .....	102
4.4	Konsequenzen für die psychiatrische Forschung.....	103
<b>V</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>105</b>
<b>VI</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>118</b>
<b>A</b>	<b>Tabellen.....</b>	<b>118</b>
<b>B</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>121</b>
<b>C</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>122</b>
<b>D</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>123</b>
<b>E</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>124</b>
<b>F</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>125</b>
<b>G</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>126</b>
<b>H</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>127</b>

# I Einleitung

## 1 Das serotonerge System

### 1.1 Vorkommen und Bedeutung von 5-HT

Das biogene Monoamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) gehört zu den phylogenetisch ältesten Botenstoffen und ist im Tier- und Pflanzenreich sehr weit verbreitet. In *Mammalia* wirkt Serotonin als Neurotransmitter im zentralen (ZNS) und peripheren Nervensystem (PNS), erfüllt aber auch zahlreiche hormonelle Aufgaben in extra-neuronalen Geweben (Abb. I.1, Tabelle I.1). Diese funktionelle Dualität des serotonergen Systems ist für alle Vertebraten charakteristisch (Absch. I.2.2) [WALTHER und BADER, 2003].



**Abbildung I.1** Die Dualität des serotonergen Systems. Die Synthese von Serotonin (5-HT) wird durch die zwei Isoformen der Tryptophan-Hydroxylase (TPH) katalysiert, mit TPH1 in peripheren Geweben und TPH2 im Gehirn. Die peripheren und zentralen Funktionen von 5-HT werden unterschiedlich reguliert und können unabhängig voneinander manipuliert werden. Dysregulationen der beiden serotonergen Systeme führen zu spezifischen pathologischen Zuständen. An der Pathogenese von Migräne und Alkoholismus scheint hingegen 5-HT aus beiden Quellen beteiligt zu sein. Modifiziert nach [WALTHER *et al.*, 2003a].

Der Trivialname Serotonin leitet sich von dessen ursprünglicher Entdeckung im Blutserum ab, wo es durch Kontraktion der glatten Gefäßmuskeln den Tonus der Blutgefäße reguliert [RAPPORT *et al.*, 1947, 1948]. Jedoch konnte bereits im Jahr 1937 eine Enteramin genannte Substanz aus der Darmschleimhaut isoliert werden, welche die Darmmotilität stimuliert und später als 5-HT identifiziert wurde [ERSPAMER und ASERO, 1952; ERSPAMER und VIALLY, 1937]. Erst anschließend wurde 5-HT im Gehirn und vielen weiteren Organen und Geweben nachgewiesen und seine vielseitige funktionelle Bedeutung in zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in ZNS und Peripherie gezeigt (Abb. I, Tabelle I.1) [TWAROG und PAGE, 1953].

**Tabelle I.1** Organe und Gewebe, die 5-HT enthalten und TPH1 bzw. TPH2 exprimieren. Modifiziert nach [PETER, 2006].

Organ / Gewebe	Zelltyp	Biomolekül	Referenz
Gehirn	Rapheneuronen	5-HT und TPH2*	[WEBER und HORITA, 1965]
PNS	enterische Neuronen	5-HT und TPH2	[COTE <i>et al.</i> , 2003]
Epiphyse	Pinealozyten	5-HT und TPH1	[SUGDEN, 2003]
Auge	retinale Zellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[GREEN und BESHARSE, 1994]
gastrointestinaler Trakt	enterochromaffine Zellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[WEBER und HORITA, 1965]
Nebenniere	adrenochromaffine Zellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[DELARUE <i>et al.</i> , 1992]
Niere	Tubuli, Cortex, glomeruläre Epithelzellen, mesangiale Zellen	5-HT und TPH	[SOLE <i>et al.</i> , 1986]
Blut	Thrombozyten	5-HT und <i>Tph1</i> -mRNA <sup>#</sup>	[CHAMPIER <i>et al.</i> , 1997]
	Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[FINOCCHIARO <i>et al.</i> , 1988]
Milz	T-Lymphozyten?	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[YOUNG <i>et al.</i> , 1993]
Pankreas	Langerhanssche $\beta$ -Zellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[BARBOSA <i>et al.</i> , 1998]
Lunge	neuroendokrine Zellen	5-HT und TPH1 <sup>#</sup>	[NEWMAN <i>et al.</i> , 1993]
Hoden	Leydigzellen	5-HT und TPH	[FRUNGIERI <i>et al.</i> , 1999]
Zunge	Geschmacksknospen	5-HT und TPH	[FUJIMOTO <i>et al.</i> , 1987]
Brustdrüse	Epithelzellen	5-HT und TPH1	[MATSUDA <i>et al.</i> , 2004]
Embryo	Zygoten, Blastozysten	5-HT und TPH	[WALTHER und BADER, 1999]

<sup>#,\*</sup> Dabei handelt es sich nach heutigem Kenntnisstand auf Grundlage der gewebespezifischen Expression der beiden TPH-Isoformen um TPH1<sup>#</sup> oder TPH2\*.

In *Mammalia* kommt peripheres Serotonin hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt vor (60 - 90 %) und spielt eine wichtige Rolle bei der Verdauung [MCLEAN *et al.*, 2007]. 5-HT wird überwiegend in den enterochromaffinen Zellen (EC) der Magen-Darm-Schleimhaut gebildet, findet sich aber auch in Neuronen des enterischen Nervensystems (ENS), von denen 2 - 20 % 5-HT bilden. EC-Zellen setzen in Reaktion auf intraluminale mechanische und chemische Reize 5-HT frei, das als parakrines Signalmolekül entweder direkt auf die sekretorische und motorische Aktivität benachbarter Epithel- und glatter Muskelzellen wirkt oder als Neurotransmitter neuronale Schaltkreise des ENS aktiviert, welche Darmmotilität, gastrointestinalen Blutfluss und Sekretion regulieren [LOMAX *et al.*, 2006; ORMSBEE und FONDACARO, 1985]. Pathologische Zustände, wie Erbrechen, Diarrhöe und Reizdarmsyndrom (IBS, *irritable bowel syndrome*) wurden mit intestinalem Serotonin in Verbindung gebracht. Von EC-Zellen ins Blut freigesetztes 5-HT wird von Thrombozyten aufgenommen und in großen Mengen in Vesikeln gespeichert [ORMSBEE und FONDACARO, 1985]. Seiner Freisetzung aus Thrombozyten kommt eine entscheidende Bedeutung bei der primären Hämostase und der Leberregeneration zu [HOLLAND, 1976; LESURTEL *et al.*, 2006; WALTHER *et al.*, 2003b].



Die höchsten peripheren 5-HT-Konzentrationen finden sich jedoch in der Epiphyse, die für die Synthese des Neurohormons Melatonin verantwortlich ist (Absch. I.1.2.2), das als neuroendokrines Signal die zirkadianen und saisonalen Biorhythmen, wie sexuelle Reifung und Fortpflanzungsverhalten, Thermoregulation und Schlaf vermittelt [SHEDPURE und PATI, 1995].

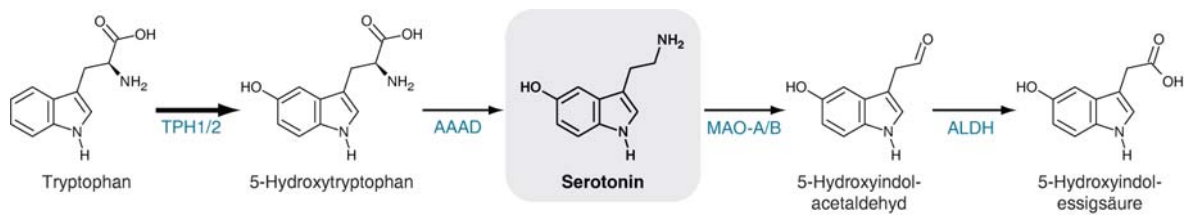
Serotonin spielt zudem eine Rolle in der Embryonal- und Milchdrüsenentwicklung [GASPAR *et al.*, 2003; MATSUDA *et al.*, 2004; WALTHER und BADER, 1999], der Herzfunktion [COTE *et al.*, 2003], bei Krebs [CATTANEO *et al.*, 1993; WALTHER *et al.*, 2002], pulmonärer Hypertonie [MORECROFT *et al.*, 2007] und T-Zell vermittelter Immunantwort [FINOCCHIARO *et al.*, 1988; GEBA *et al.*, 1996] sowie der Insulinausschüttung aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen [PAULMANN *et al.*, eingereicht].

Da 5-HT hydrophil ist, kann es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren und wird im Gehirn durch die serotonergen Neuronen des Hirnstamms gebildet (Absch. I.4.1). Als zentraler Neurotransmitter (Absch. I.3) ist Serotonin u. a. an der Regulation der allgemeinen Stimmungslage [LUCKI, 1998], dem Sexualverhalten [GIAMMANCO *et al.*, 1997], der Nahrungsaufnahme [MAURI *et al.*, 1996] und des Schlafes [DUGOVIC, 2001] beteiligt (Abb. I.1). Dysregulationen im serotonergen System konnten zudem mit einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebracht werden (Abb. I.1, Absch. I.4.2) [LUCKI, 1998].

## 1.2 Der 5-HT-Stoffwechsel

### 1.2.1 Biosynthese und Katabolismus

Die Biosynthese von 5-HT ist hochgradig reguliert und erfolgt in zwei Schritten ausgehend von der natürlich vorkommenden essentiellen Aminosäure L-Tryptophan (Trp, Abb. I.2) [WALTHER *et al.*, 2003a]. Im ersten und zugleich geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert. Diese Reaktion erfordert  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als Kofaktor sowie molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Kosubstrate und wird durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TPH) katalysiert [LOVENBERG *et al.*, 1967]. Die anschließende schnelle Decarboxylierung von 5-HTP zum 5-Hydroxytryptamin wird durch ubiquitär exprimierte Vitamin B<sub>6</sub>-abhängige Aromatische-Aminosäure-Decarboxylasen (AADC) katalysiert, die auch an der Biosynthese der Katecholamine (Absch. I.2.1) beteiligt sind. Das Enzym Tryptophan-Hydroxylase kommt in zwei Isoformen (TPH1 und TPH2) vor und spiegelt die funktionelle Dualität des serotonergen Systems auf molekularer und biochemischer Ebene wider (Absch. I.2.2.) [WALTHER und BADER, 2003].

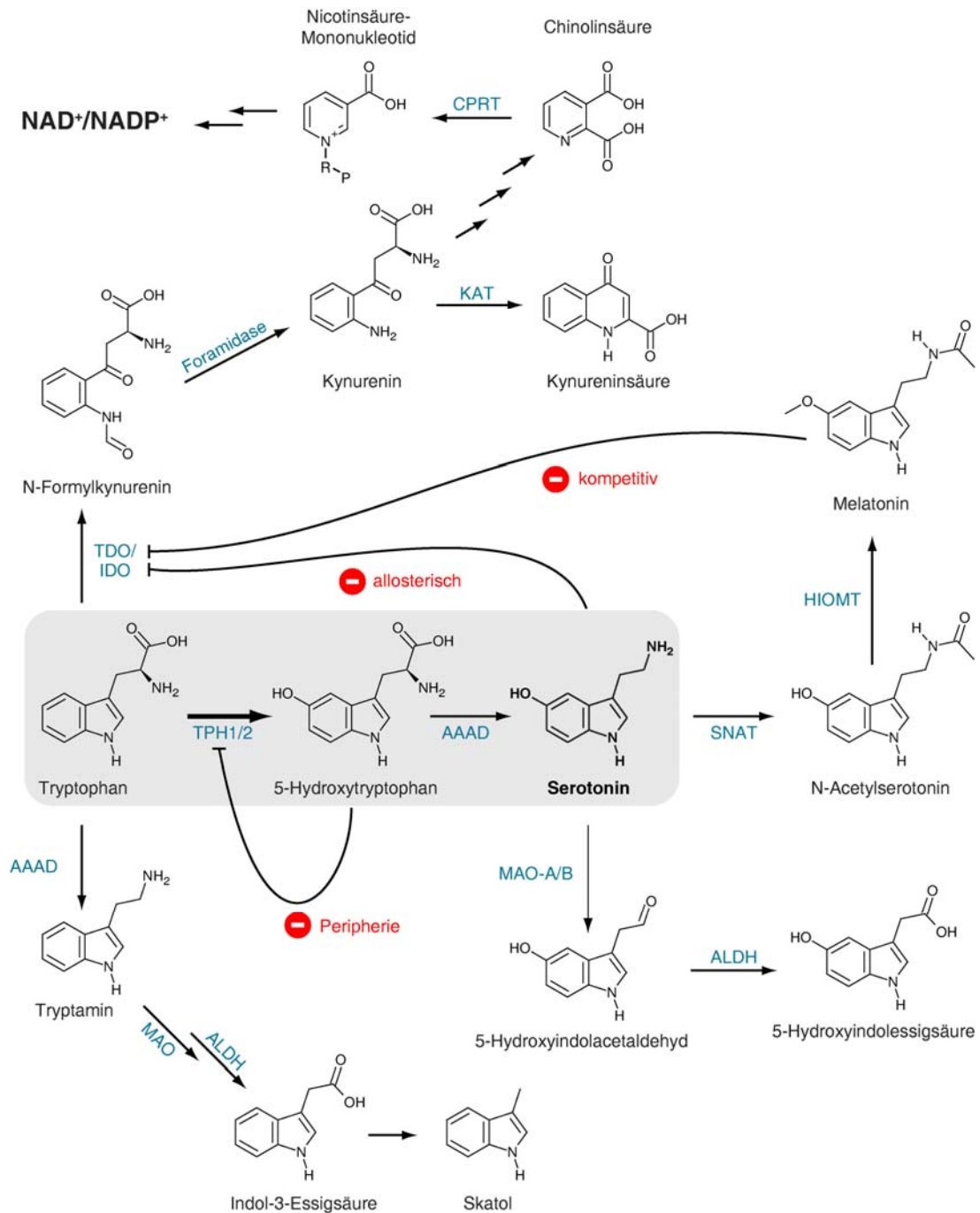


**Abbildung I.2 Der Metabolismus von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT).** Die Tryptophan-Hydroxylase (TPH1/2), als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der 5-HT-Biosynthese, katalysiert die Hydroxylierung von Tryptophan (Trp) zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) mit  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen als Kofaktor sowie molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) und Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) als Kosubstrate. Die Decarboxylierung von 5-HTP durch Aromatische-Aminosäure-Decarboxylasen (AAAD) resultiert in der Bildung von 5-HT. Der Abbau von 5-HT erfolgt in zwei Schritten zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) unter Beteiligung der Monoamin-Oxidase (MAO-A/B) und der Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH).

Der Abbau von 5-HT erfolgt durch Oxidation zum 5-Hydroxyindolacetaldehyd (5-HIAL) durch die Monoamin-Oxidase (MAO-A/B). 5-HIAL wird anschließend durch die Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert und über die Niere mit dem Urin ausgeschieden (Abb. I.2).

### 1.2.2 Biochemische Zusammenhänge

Der Trp-Metabolismus umfasst weitere Stoffwechselwege, die mit der 5-HT-Biosynthese um die Aminosäure Trp konkurrieren (Abb. I.3) [RUDDICK *et al.*, 2006]. So bildet Trp den Ausgangspunkt des Kynurenin-Stoffwechselweges der zu den essentiellen Redoxmetaboliten  $\text{NAD}^+$  und  $\text{NADP}^+$  führt. In peripheren Geweben werden schätzungsweise nur 1 % des nicht zur Proteinbiosynthese verwendeten Trp in 5-HT umgewandelt, während 95 % über den Kynureninweg metabolisiert werden [BOTTING, 1995]. Der Kynureninweg beginnt mit der oxidativen Öffnung des Indol-Ringes von Trp zum N-Formylkynurenin, welche durch die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert wird [BOTTING, 1995]. Die TDO reguliert als hepatisches Enzym die Trp-Homöostase im Plasma und beeinflusst somit die Trp-Verfügbarkeit im Gehirn (Absch. I.2.4.3). Die Aktivierung der TDO durch stressinduzierte Glucocorticoide sowie ihre Hemmung durch Antidepressiva (ADs) lassen einen Einfluss des Enzyms bei der Ätiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen vermuten (Absch. I.4.2) [BADAWY *et al.*, 1996; GREENGARD *et al.*, 1963]. Während die TDO spezifisch für Trp ist, besitzt die in peripheren Geweben und ZNS (Astrozyten, Makrophagen, Mikroglia und dendritische Zellen) vorkommende IDO ein breites Substratspektrum und kann neben Trp auch 5-HTP, 5-HT und Melatonin umsetzen [BOTTING, 1995]. Die Aktivierung der IDO durch proinflammatorische Zytokine (z. B. Interferon  $\gamma$ ) beeinflusst die Verfügbarkeit von Trp



**Abbildung I.3** Die 5-HT-Biosynthese und konkurrierende Stoffwechselwege des Trp-Metabolismus. Neben der 5-HT-Biosynthese dient Trp als Ausgangspunkt für die Synthese von Melatonin, Tryptamin und des Kynureninweges, der zu den essentiellen Redoxmetaboliten NAD<sup>+</sup> und NADP<sup>+</sup> führt. AAAD: Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase; ALDH: Aldehyd-Dehydrogenase; HIOMT: Hydroxyindol-O-Methyltransferase; MAO-A/B: Monoamin-Oxidase A und B; SNAT: Serotonin-N-Acetyl-Transferase; TDO: Tryptophan-2,3-Dioxygenase; IDO: Indolamin-2,3-Dioxygenase, TPH1/2, Tryptophan-Hydroxylase 1 und 2, KAT: Kynurenin-Aminotransferase; CPRT: Chinolinat-Phosphoribosyltransferase.

bei chronischen Entzündungsreaktionen (z. B. systemische Infektionen, Krebs und Autoimmunerkrankungen) und wurde mit depressiven Symptomen (Absch. I.4.2.1) bei physisch-kranken Menschen in Verbindung gebracht [DANTZER *et al.*, 2008].

In weiteren Schritten des Kynureninweges werden die neurotoxische Chinolinsäure und die neuroprotektive Kynureninsäure gebildet. Chinolinsäure kann selektiv NMDA-sensitive Glutamatrezeptoren aktivieren, wodurch Neuronen nicht nur angeregt, sondern durch Überstimulation des Rezeptors auch geschädigt werden können [STONE *et al.*, 1987]. Die pathologische Bedeutung der Chinolinsäure konnte bei neurodegenerativen Störungen, wie *Chorea Huntington* und *Morbus Alzheimer* gezeigt werden [CARLOCK *et al.*, 1995; GUILLEMIN und BREW, 2002]. Die Kynureninsäure agiert hingegen als NMDA-Rezeptorantagonist, die durch Hemmung der glutamergen Neurotransmission Gehirnschäden nach Ischämie limitiert und einen pharmakologischen Ansatz für die Behandlung von Schlaganfall bietet [GERMANO *et al.*, 1987].

In der Epiphyse und Retina wird Trp zu Melatonin metabolisiert [GERN und RALPH, 1979]. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melatoninbiosynthese ist dabei die Serotonin-N-Acetyltransferase (SNAT), die 5-HT in N-Acetylserotonin umwandelt, bevor im abschließenden Schritt durch die Wirkung der Hydroxyindol-O-Methyltransferase (HIOMT) Melatonin entsteht. Die Regulation der SNAT variiert tageszeitabhängig, mit hoher Aktivität während der Dunkelphase [KLEIN und WELLER, 1970].

Durch die Decarboxylierung von Trp durch AAAD entsteht das Spurenamin (*trace amine*) Tryptamin, das an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren TAAR1 und 4 (*trace amine associated receptors*) bindet [LINDEMANN *et al.*, 2005]. Elektrophysiologische Untersuchungen belegen die modulative Wirkung von Tryptamin auf die cortikale serotonerge Neurotransmission [JONES, 1982], wodurch Spurenamine eine Rolle bei neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie Depression und Schizophrenie, spielen könnten (Absch. I.4.2) [BERRY, 2004; DAVIS und BOULTON, 1994; LINDEMANN und HOENER, 2005].

## 2 Die Tryptophan-Hydroxylasen TPH1 und TPH2

### 2.1 Superfamilie der AAHs

Die Phenylalanin- (PAH), Tyrosin- (TH) und Tryptophan- (TPH)-Hydroxylasen bilden die Familie der biopterinabhängigen Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen (AAHs) mit einem nicht Häm-gebundenen  $Fe^{2+}$  im katalytischen Zentrum [FITZPATRICK, 1999, 2003]. Die hepatische PAH katalysiert den Abbau von überschüssigem Phenylalanin aus der Nahrung zu Tyrosin, der Ausgangssubstanz für die Katecholaminbiosynthese. Mutationen im *PAH*-Gen sind die häufigste Ursache für die angeborene Stoffwechselstörung

---

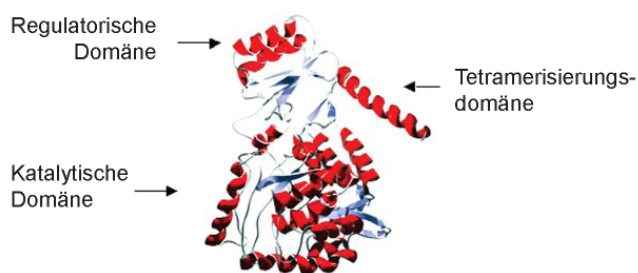
Phenylketonurie (PKU), die ohne Behandlung schwere mentale Retardierung beim Menschen hervorruft [ZSCHOCKE, 2003]. Über 500 Mutationen wurden bereits im *PAH*-Gen identifiziert, die mehr oder minder schwere Formen der Erkrankung hervorrufen [SCRIVER *et al.*, 2003]. Die TH findet sich im ZNS/PNS bzw. im Nebennierenmark und leitet durch die Bildung von Dihydroxyphenylalanin (DOPA) aus Tyrosin die Biosynthese der catecholaminergen Neurotransmitter Dopamin (DA), Norepinephrin (NE) und Epinephrin ein. Die genetische Ausschaltung des *Th*-Gens der Maus ist embryonal lethal und Dysfunktionen der humanen TH-Aktivität wurden mit *Morbus Parkinson* und Herz-Kreislaufkrankungen in Zusammenhang gebracht [KOBAYASHI *et al.*, 1995]. Die TPHs katalysieren die Umwandlung von Tryptophan zu 5-HTP, den geschwindigkeitsbestimmenden ersten Schritt in der 5-HT-Biosynthese (Absch. I.1.2.1). TH und TPH sind evolutiv durch Genduplikationen aus der PAH hervorgegangen [GRENETT *et al.*, 1987; PETER, 2006], wodurch die AAAHs eine hohe Sequenzhomologie aufweisen und viele strukturelle und funktionelle Eigenschaften teilen (Absch. I.2.3) [FITZPATRICK, 1999].

## 2.2 Die Dualität des serotonergen Systems

Über 30 Jahre wurde angenommen, dass die TPHs aus Hirnstamm und Epiphyse von einem einzigen Genprodukt stammen, mit unterschiedlichen enzymatischen Eigenschaften der neuronalen und nicht-neuronalen Enzyme [WALTHER und BADER, 2003]. Durch genetische Manipulation wurde das *Tph*-Gen (*Tph1*) der Maus ausgeschaltet [WALTHER *et al.*, 2003a]. Die generierten *Tph1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten entgegen aller Erwartung nahezu normale 5-HT-Level im ZNS, während in der Peripherie, einschließlich der Epiphyse, kein 5-HT mehr detektiert werden konnte. Dies führte zur Entdeckung eines bereits lange postulierten zweiten *Tph*-Gens (*Tph2*), das hauptsächlich in den serotonergen Rapheneuronen des Hirnstamms (Absch. I.4.1) exprimiert wird und die zentrale 5-HT-Biosynthese kontrolliert [WALTHER *et al.*, 2003a; ZHANG *et al.*, 2004]. Die bekannte TPH1 stellt hingegen die vorherrschende Isoform in der Peripherie dar, wo es überwiegend in der Epiphyse und den enterochromaffinen Zellen des Darms gebildet wird [PATEL *et al.*, 2004; SUGDEN, 2003]. Obwohl beide Isoformen von unterschiedlichen Genen auf verschiedenen Chromosomen exprimiert werden, teilen die Proteine in Mensch, Maus und Ratte eine durchschnittliche Identität von 70 % [WALTHER und BADER, 2003], unterscheiden sich jedoch in ihren kinetischen Eigenschaften [MCKINNEY *et al.*, 2005]. Die bestehende Dualität des serotonergen Systems ermöglicht die unabhängige genetische Manipulation der peripheren und zentralen Funktionen von Serotonin.

## 2.3 Struktur der Tryptophan-Hydroxylasen

TPH1 und TPH2 der Vertebraten teilen den grundsätzlichen Aufbau aller AAHs, bestehend aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, einer katalytischen Domäne und einer C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (Abb. I.4) [FITZPATRICK, 1999]. Wenig ist über die Funktion der regulatorischen Domänen bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass sie der Feinregulation und Substratspezifität dient, wobei die absolute Spezifität durch die katalytische Domäne bestimmt wird [DAUBNER *et al.*, 1997; LEDLEY *et al.*, 1985]. Allgemein herrscht die Vorstellung vor, dass die N-terminale Domäne im nicht aktivierten Grundzustand, wie ein Scharnierdeckel den Zugang zum katalytischen Zentrum verhindert und dadurch die Enzymaktivität hemmt [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; FITZPATRICK, 1999]. Die katalytische Domäne der AAHs ist hoch konserviert (ca. 80 %) und spiegelt den gemeinsamen enzymatischen Reaktionsmechanismus wider. Basierend auf den Kristallstrukturen der PAH [ERLANDSEN *et al.*, 1997], TH [GOODWILL *et al.*, 1997] und TPH1 [WANG *et al.*, 2002] konnte die Struktur des aktiven Zentrums aufgeklärt und die an der Substrat- und Kofaktorbindung beteiligten Aminosäurereste identifiziert werden, die auch in der TPH2 konserviert sind [WALTHER und BADER, 2003]. Wie alle eukaryotischen AAHs agieren TPH1 und TPH2 in ihrer aktiven Form als Homotetramere, wobei die Oligomerisierung durch einen Leucin-Zipper am C-Terminus vermittelt wird [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; FITZPATRICK, 1999]. Die Tetramerisierung ermöglicht eine erhöhte Stabilität gegenüber Monomeren und führt *in vivo* zu längeren Halbwertszeiten [VRANA *et al.*, 1994].



**Abbildung I.4** Struktur der humanen Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2). TPH2 besteht aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, einer katalytischen Domäne und einer Tetramerisierungsdomäne am C-Terminus. Im Vergleich zur TPH1 ist die humane TPH2 N-terminal um 44 Aminosäuren verlängert. Modifiziert nach [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006].

## 2.4 Regulation der Tryptophan-Hydroxylasen

### 2.4.1 Genexpression

Das *Tph1*-Gen ist in Mensch, Maus und Ratte auf den Chromosomen 11, 7 und 1, das *Tph2*-Gen auf den Chromosomen 12, 10 und 7 lokalisiert [WALTHER und BADER, 2003]. Beide Gene bestehen aus jeweils 11 Exonen. Die Promotoren für *Tph1* und *Tph2* weisen

keine Sequenzhomologie auf und spiegeln die unterschiedliche transkriptionelle Regulation beider Gene wider.

Die *Tph1*-Expression wird in der Epiphyse durch cAMP induziert [EHRET *et al.*, 1991]. Die cAMP-gesteuerte Aktivierung des humanen *Tph1*-Promotors ist CRE-unabhängig und hängt von der Bindung der Transkriptionsfaktoren NF-Y und SP1 an ein invertiertes CCAAT-Motiv bzw. eine benachbarte GC-reiche Region ab, die auch für die basale Promotoraktivität entscheidend ist [BOULARAND *et al.*, 1995b; COTE *et al.*, 2002].

Die Aktivität des *Tph2*-Promotors von Mensch und Ratte wird hingegen durch intrazelluläres Calcium induziert und ist spezifisch für die serotonergen Rapheneuronen [LENICOV *et al.*, 2007]. Die Ca<sup>2+</sup>-sensitiven Elemente liegen im Bereich des basalen *Tph2*-Promotors mit den putativen Bindemotiven für die Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Transkriptionsfaktoren AP1 und AP2. Durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Aktivierung der *Tph2*-Expression kann bei neuronaler Aktivität eine erhöhte 5-HT-Synthese *in vivo* erfolgen. Die *TPH2*-Expression unterliegt zudem einer zirkadianen Rhythmik [MALEK *et al.*, 2004; MALEK *et al.*, 2007] und wird hormonell durch Stressfaktoren (Glucocorticoide) und Östrogen beeinflusst [CLARK *et al.*, 2005; HIROI *et al.*, 2006; SANCHEZ *et al.*, 2005]. Die glucocorticoidvermittelte Repression der *Tph2*-Expression ist besonders relevant für die psychiatrische Forschung, da depressive Patienten (Absch. I.4.2.1) erhöhte Blutcortisolwerte aufweisen, die mit einer Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA; *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) in Zusammenhang stehen [BELMAKER und AGAM, 2008].

#### 2.4.2 Regulation auf RNA-Ebene

Die *Tph1*-Expression zeichnet sich zudem durch eine hohe Spleißvariabilität aus. So konnten aus Mensch und Ratte mehrere mRNA-Varianten isoliert werden, die durch alternatives Spleißen der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs) entstehen [AUSTIN und O'DONNELL, 1999; BOULARAND *et al.*, 1995a; DARMON *et al.*, 1988; DELORT *et al.*, 1989; DUMAS *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 1998]. Erst kürzlich wurden zwei *Tph2*-Spleißvarianten in den dorsalen Raphekernen der Ratte beschrieben, die sich in der Länge ihrer 3'-UTRs unterscheiden [ABUMARIA *et al.*, 2008]. Alternatives Spleißen der UTRs kann durch eine veränderte Translationseffizienz und/oder RNA-Stabilität Einfluss auf die Genexpression nehmen (Absch. I.6.1) [WANG und COOPER, 2007].

### 2.4.3 Substratkontrolle

Die 5-HT-Biosynthese (Absch. I.1.2.1) im Gehirn hängt in erster Linie von der Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäure Trp ab, die über die Nahrung (Milch, Früchte, Nüsse und Fleisch) aufgenommen werden muss [MANDELL und KNAPP, 1977]. Der Transport von Trp über die Blut-Hirn-Schranke (BBB, *blood brain barrier*) spielt eine kritische Rolle in der Regulation des zentralen 5-HT-Metabolismus und wird durch den L1-Transporter kontrolliert (Absch. I.3.2.1), der Trp kompetitiv mit den anderen großen neutralen Aminosäuren (LNAAs; *large neutral amino acids*) in die extrazelluläre Flüssigkeit (ECF; *extracellular fluid*) des ZNS transportiert [HAWKINS *et al.*, 2006]. TPH2 besitzt einen  $K_m(\text{Trp})$ -Wert von 40 - 50  $\mu\text{M}$  (TPH1: 10 - 20  $\mu\text{M}$ ) und ist unter normalen Bedingungen bei zentralen Trp-Konzentrationen zwischen 10 - 30  $\mu\text{M}$  nicht gesättigt [BOADLE-BIBER, 1993; MCKINNEY *et al.*, 2005]. Entsprechend erhöhen sich die 5-HT- und 5-HIAA-Werte nach einer Mahlzeit oder durch direkte Beladung mit Trp [ASHCROFT *et al.*, 1965; ECCLESTON *et al.*, 1965].

Neben Trp liegt auch molekularer Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) für TPH2 in untersättigten Konzentrationen vor. Der Einfluss des Sauerstoffpartialdrucks konnte durch den Abfall der 5-HT-Synthese bei induzierter Hypoxie ( $\text{Po}_2 < 60 \text{ mmHg}$ ) gezeigt werden [DAVIS und CARLSSON, 1973; DAVIS *et al.*, 1973]. Weiterhin ist das Kosubstrat BH4 mit einer mittleren zellulären Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bei einem  $K_m(\text{BH}_4)$  von 30  $\mu\text{M}$  [FRIEDMAN *et al.*, 1972] limitierend für die TPH2-vermittelte 5-HT-Biosynthese, obwohl BH4 in monoaminergen Neuronen wesentlich höher konzentriert ist [LEVINE *et al.*, 1979; LEVINE *et al.*, 1981].

### 2.4.4 Biochemische Aktivierung

Auf Proteinebene erfolgt die Regulation der enzymatischen Aktivität von TPH1 und TPH2 durch Phosphorylierung, die allgemein aktivierend wirkt. TPH1 wird an Ser<sup>58</sup> und Ser<sup>260</sup> phosphoryliert, die den Positionen Ser<sup>104</sup> und Ser<sup>306</sup> der TPH2 entsprechen [JIANG *et al.*, 2000; KUHN *et al.*, 1997; KUMER *et al.*, 1997]. TPH2 wird jedoch hauptsächlich an Ser<sup>19</sup> phosphoryliert und erst kürzlich konnte das Ser<sup>104</sup> als weitere Phosphorylierungsstelle identifiziert werden [KUHN *et al.*, 2007; MCKINNEY *et al.*, 2005; WINGE *et al.*, 2007]. Beide Enzyme sind sowohl Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) [EHRET *et al.*, 1989; JIANG *et al.*, 2000; JOHANSEN *et al.*, 1995; KUHN *et al.*, 2007; KUMER *et al.*, 1997; MCKINNEY *et al.*, 2005; WINGE *et al.*, 2007; YAMAUCHI und FUJISAWA, 1979]. Die phosphorylierten TPH-Isoformen werden durch Proteine der 14-3-3-Familie gebunden und vor Dephosphoylierung geschützt [BANIK *et al.*, 1997; WINGE *et al.*, 2007]. Die 14-3-3-Bindung übt zudem eine

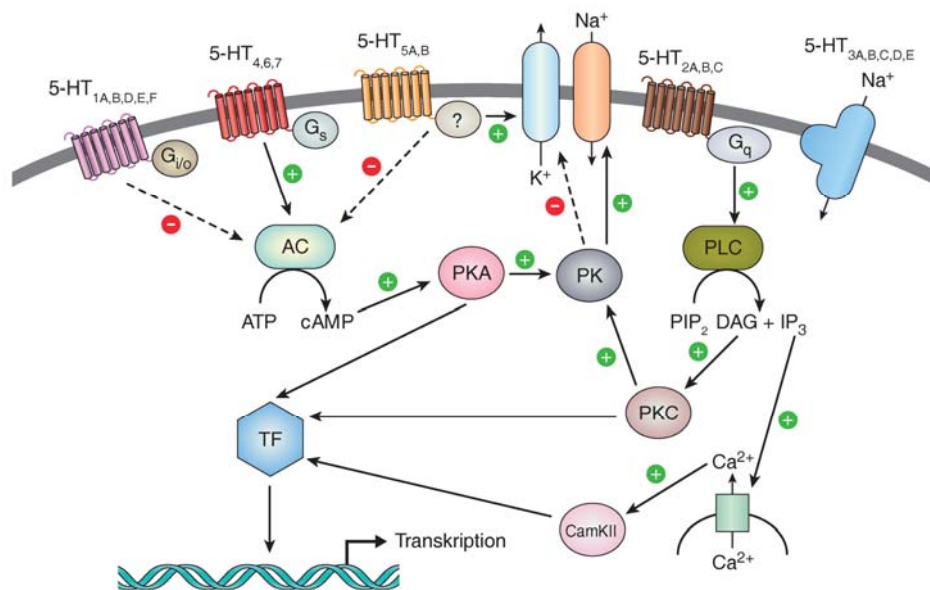


stabilisierende Wirkung aus, die als eigentliche Ursache für die phosphorylierungsabhängige Aktivierung der beiden TPH-Proteine angesehen wird [WINGE *et al.*, 2007].

### 3 Signalvermittlung durch 5-HT

#### 3.1 5-HT-Rezeptoren

Die vielfältigen Wirkungen von Serotonin werden durch plasmamembranständige 5-HT-Rezeptoren (5-HTRs) vermittelt, die in ZNS/PNS und zahlreichen peripheren Geweben exprimiert werden [ADAYEV *et al.*, 2005; HOYER *et al.*, 2002; NICHOLS und NICHOLS, 2008]. Entsprechend ihrer strukturellen und mechanistischen Profile werden sie in sieben Klassen (5-HT<sub>1</sub>R bis 5-HT<sub>7</sub>R) eingeteilt, wobei sechs zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und die 5-HT<sub>3</sub>Rs zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle gehören.



**Abbildung I.6** Intrazelluläre Signalwege der 5-HT-Rezeptoren. AC: Adenylatzyklase, PKA: Proteinkinase A, PK: Proteinkinase, PLC: Phospholipase C, PKC: Proteinkinase C, CamKII: Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, TF: Transkriptionsfaktoren. Modifiziert nach [LAM und HEISLER, 2007].

5-HTRs übertragen Signale durch heterotrimerе GTP-bindende Proteine (G-Proteine), die entweder stimulierend (G<sub>s</sub>/G<sub>q</sub>) oder inhibierend (G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>) auf einen nachgeschalteten Signalweg wirken (Abb. I.6). Die G<sub>s</sub>-gekoppelten 5-HTRs (5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) aktivieren die Adenylatzyklase (AC), die wiederum durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Synthese die PKA aktiviert. Die PKA moduliert durch Phosphorylierung

intermediärer Proteinkinasen (PK) die Aktivität von Kationenkanälen und führt zur Depolarisation des Neurons. Die Aktivierung von G<sub>i</sub>-gekoppelten 5-HT<sub>1</sub>Rs (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>) hemmt hingegen die AC und resultiert in einer Hyperpolarisation der Membran. 5-HT<sub>2</sub>Rs (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>) koppeln durch G<sub>q</sub> an den Effektor Phospholipase C (PLC), deren Aktivierung zur Hydrolyse von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG) führt. IP<sub>3</sub> bewirkt durch die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) die Depolarisation des Neurons. DAG aktiviert die Phosphokinase C (PKC), welche indirekt die Aktivität von Kationenkanälen moduliert und somit ebenfalls zur Depolarisation beiträgt. Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktivieren die CamKII, die zusammen mit PKA und PKC, die Transkription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert. Die Funktion der 5-HT<sub>5</sub>Rs ist noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch scheinen sie negativ an die AC und positiv an IP<sub>3</sub>-sensitive Ca<sup>2+</sup>-Kanäle gekoppelt zu sein. Die 5-HT<sub>3</sub>Rs (5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>, 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> und 5-HT<sub>3E</sub>) bewirken als ligandengesteuerte, nichtselektive Kationenkanäle die schnelle Depolarisation der Membran infolge eines Aktionspotentials [ADAYEV *et al.*, 2005; HOYER *et al.*, 2002; NICHOLS und NICHOLS, 2008]. Während alle 5-HTRs postsynaptisch auf den 5-HT-Zielzellen lokalisiert sind, finden sich auf Zellkörpern und Dendriten der 5-HT-Neuronen auch präsynaptische 5-HT<sub>1A,B/D</sub>Rs, die als Autorezeptoren die Feuerungsrate der serotonergen Rapheneuronen (Absch. I.4.1) regulieren [ALEX und PEHEK, 2007].

Die 18 bekannten 5-HTRs unterstreichen die enorme physiologische Bedeutung von 5-HT (Abb. I.1, Tabelle I.1), stellen jedoch nicht die gesamte physische Diversität der 5-HTRs dar, da deren Anzahl durch postgenomische Modifikationen, wie alternatives Spleißen (5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), RNA-Editierung (5-HT<sub>2C</sub>) sowie Homo- und Heterodimerisierung (5-HT<sub>1B</sub> und 5-HT<sub>1D</sub>) noch weiter erhöht wird [BOCKAERT *et al.*, 2006; HOYER *et al.*, 2002; NICHOLS und NICHOLS, 2008]. Durch die große Diversität der 5-HTRs kann Serotonin vielfältig auf Zellen wirken, von schneller Neurotransmission durch 5-HT-gesteuerte Ionenkanäle bis hin zu kurz- oder langfristiger Neuromodulation durch intrazelluläre Signalkaskaden.

## 3.2 Transporter des 5-HT-Systems

### 3.2.1 Der Transport großer neutraler Aminosäuren

Da 5-HT als hydrophile Substanz die BBB nicht überwinden kann, muss es direkt im Gehirn gebildet werden. Dabei hängt die zentrale 5-HT-Biosynthese von der Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäure Trp ab (Absch. I.2.4.3), die zusammen mit den anderen

LNAAs Leucin, Valin, Methionin, Isoleucin, Tyrosin, Phenylalanin und Threonin durch den Na<sup>+</sup>-unabhängigen L1-Transporter vom Blut über die BBB in die ECF des Gehirns transportiert wird [HAWKINS *et al.*, 2006]. Der L1-Transporter befindet sich in den Membranen der luminalen und abluminalen Seite der Gehirnkapillarendothelzellen und ist unter physiologischen Bedingungen in Mensch und Ratte gesättigt [HARGREAVES und PARDRIDGE, 1988; OLDENDORF und SZABO, 1976; PARDRIDGE, 1977; SANCHEZ DEL PINO *et al.*, 1995]. Der Trp-Transport ins Gehirn erfolgt somit kompetitiv mit den anderen großen LNAAs und wird durch das im Plasma vorherrschende Trp : LNAA-Verhältnis bestimmt [FERNSTROM, 2005; FERNSTROM und WURTMAN, 1972]. Durch den Transport der aromatischen Aminosäuren Phe und Tyr hat der L1-Transporter zudem Einfluss auf die Bildung der katecholaminergen Neurotransmitter DA und NE.

### 3.2.2 Die vesikuläre Speicherung von Monoaminen

Die vesikulären Monoamintransporter (VMAT) der SLC18-Familie sind integrale Bestandteile der Lipiddoppelschicht sekretorischer Vesikel in neuronalen und endokrinen Zellen, deren Funktion im Transport von 5-HT und Katecholaminen besteht [EIDEN *et al.*, 2004]. Der Transport der leicht positiv-geladenen Amine erfolgt entlang eines elektrochemischen Gradienten durch H<sup>+</sup>-Antiport. Der für den Transport notwendige Protonengradient wird durch eine ATP-abhängige Protonenpumpe (ATPase) aufrechterhalten. Infolge eines Aktionspotentials fusionieren die Vesikel mit der Zellmembran und entladen sich durch Exozytose in den extrazellulären Raum.

Der VMAT kommt in *Mammalia* in zwei Isoformen vor, VMAT1 und VMAT2. In den neuroendokrinen Zellen des Menschen werden VMAT1 und VMAT2 etwa gleich stark exprimiert, während VMAT2 ausschließlich in Neuronen vorkommt [EIDEN *et al.*, 2004; ERICKSON *et al.*, 1996].

### 3.2.3 Die 5-HT-Wiederaufnahme

Der Serotonintransporter (SERT) ist in der präsynaptischen Plasmamembran verankert und transportiert 5-HT selektiv aus dem synaptischen Spalt zurück in die Nervenzelle. Auf diese Weise bestimmt der SERT die Dauer der 5-HT-vermittelten Neurotransmission an extrazellulären 5-HT-Rezeptoren und ermöglicht die erneute vesikuläre Speicherung (Absch. I.3.2.2) oder den Abbau von Serotonin durch die mitochondriale MAO. Der SERT-vermittelte Transport von 5-HT erfolgt im Symport mit Na<sup>+</sup>-und Cl<sup>-</sup>-Ionen bei gleichzeitigem Antiport von K<sup>+</sup>-Ionen [RUDNICK, 2006].

---

Viele psychotrope Substanzen interferieren mit dem SERT-Transporter und verstärken die serotonerge Neurotransmission durch Erhöhung der extrazellulären 5-HT-Konzentration. Dabei unterscheiden sich die Wirkungsmechanismen der Psychostimulanzien, die entweder die Freisetzung von 5-HT aus der präsynaptischen Nervenzelle fördern (z. B. 3,4-Methylen-N-dioxymethamphetamin, MDMA, Ecstasy) oder seine Wiederaufnahme aus der ECF hemmen (z. B. Kokain) [HOWELL und KIMMEL, 2008]. Während 5-HT-Wiederaufnahmehemmer den SERT durch extrazelluläre Bindung direkt blockieren, bewirken die sogenannten 5-HT-Freisetzer intrazellulär einen Efflux von Serotonin durch reversen SERT-Transport.

Durch seine zentrale Rolle in der serotonergen Neurotransmission ist der SERT ein idealer Angriffspunkt für die medikamentöse Behandlung psychiatrischer Erkrankungen, als deren Grundlage ein chronischer Serotoninmangel im Gehirn gilt (Absch. I.4.2). So finden selektive 5-HT-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs), z. B. Fluoxetin (Prozac<sup>®</sup>) und Sertralin (Zolof<sup>®</sup>), als Antidepressiva (ADs) u. a. Anwendung in der Behandlung von Depressionen und Angststörungen (Absch. I.4.2.1).

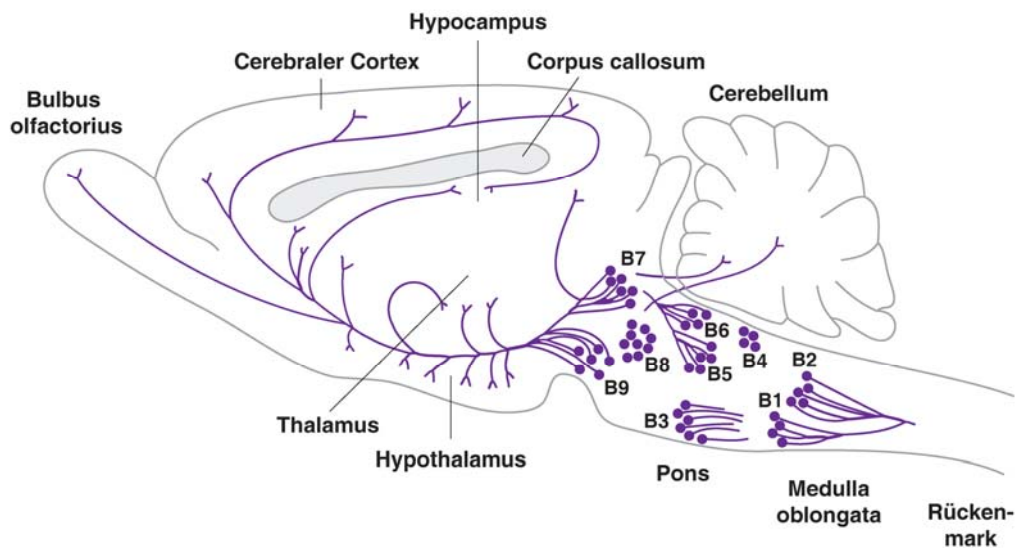
## 4 Pathologie des zentralen 5-HT-Systems

### 4.1 Anatomie des serotonergen Systems

Das serotonerge System ist das umfangreichste monoaminerge Neurotransmittersystem im Gehirn von Vertebraten. Es wird von einer handvoll Neuronen gebildet, deren Wurzeln im evolutiv ältesten Bereich des Gehirns, dem Hirnstamm (Mesencephalon, Pons und Medulla oblongata) liegen (Abb. I.5). Der Großteil der serotonergen Neuronen befindet sich in den Raphekernen B1 - B9 entlang der Mittellinie des Hirnstammes [DAHLSTROEM und FUXE, 1964]. Man unterscheidet eine caudale Gruppe (B1 – B5) mit den Nuclei *raphe pallidus*, *magnus*, *obscurus* und *pontis*; die rostrale Gruppe (B6 – B9) wird von den Nuclei *raphe dorsalis* und *medianus* gebildet [GASPAR *et al.*, 2003].

Die Gesamtzahl der 5-HT-Neuronen im Gehirn der Ratte ist mit ca. 20000 von insgesamt  $10^{10}$  Neuronen verhältnismäßig gering (beim Menschen ca.  $10^6/10^{11}$  Neuronen) [JACOBS und AZMITIA, 1992]. Durch ihre massive Verzweigung innervieren diese wenigen serotonergen Neuronen die meisten cortikalen und subcortikalen Gehirnareale (rostrale Gruppe) sowie das Rückenmark (caudale Gruppe). Zu den Projektionsarealen gehören der präfrontale Cortex (PFC) und das limbische System (u. a. Amygdala, Absch. I.4.4), Strukturen, die Gemütslage, emotionsassoziiertes Lernen und Verhalten regulieren und an der Manifestierung psychopathologischer Erkrankungen (Absch. I.4.2) beteiligt sind.

---



**Abbildung I.5** Serotonerge Neuronen im Gehirn der Ratte und deren Projektionsareale. B1 – B5: Nuclei *raphe pallidus; magnus; obscurus* und *pontis*; B6 –B9: Nuclei *raphe dorsalis* und *medianus*. Modifiziert nach [HEDLUND und SUTCLIFFE, 2004].

## 4.2 Psychiatrische Erkrankungen

### 4.2.1 Depression

Serotonin ist ein wichtiger Modulator verhaltensbedingter Prozesse in Vertebraten [LUCKI, 1998]. Zahlreiche psychiatrische und neuropathologische Erkrankungen des Menschen wurden mit einer serotonergen Hypofunktion des Gehirns in Zusammenhang gebracht (Abb. I.1, Absch. I.4.3.1), darunter Depressionen [BELMAKER, 2004; BELMAKER und AGAM, 2008], Angststörungen [GROSS und HEN, 2004; LESCH *et al.*, 2003], Aggression [NELSON und TRAINOR, 2007], Suizidal- [MANN, 2003] und Suchtverhalten [FELTENSTEIN und SEE, 2008].

Affektive Erkrankungen sind pathologische Störungen der Stimmungslage, unter denen die unipolare Depression (MD, *major depression*) am weitesten verbreitet ist [BELMAKER und AGAM, 2008]. Die Symptome der MD sind vielfältig und reichen von Anhedonie, Schlafstörungen, vermindertem Selbstwertgefühl bis hin zu Selbstmordgedanken und Halluzinationen. In der US-amerikanischen Bevölkerung liegt das Risiko zu Lebzeiten an MD zu erkranken bei 17 % [KESSLER *et al.*, 2005]. Wesentlich seltener ist die bipolare Depression (auch manische Depression, BD), die zu einem Anteil von 4 % in der US-amerikanischen Bevölkerung vorkommt [KESSLER *et al.*, 2005]. Im Gegensatz zur MD wechseln sich bei der BD depressive Phasen mit manischen Episoden ab, die durch Euphorie, Selbstüberschätzung und erhöhte Energie bei reduziertem Schlafbedarf charakterisiert sind [BELMAKER, 2004]. Depressionen treten häufig in Verbindung mit

Angststörungen auf, zu denen allgemeine Angststörungen, Panikattacken, Zwangsstörungen, spezifische und soziale Phobien, Posttraumatisches Stresssyndrom (PTSD) und das Borderline-Syndrom gehören [BELL und NUTT, 1998; GOODMAN und NEW, 2000; JANN und KURTZ, 1987; MURPHY *et al.*, 1989]. Zudem ist das komorbide Auftreten von aggressivem und impulsivem Verhalten für depressive Patienten charakteristisch [KEELE, 2005; LUCKI, 1998] und könnte ihren hohen Anteil von 60 % unter den Suizidfällen erklären [MANN, 2003].

#### 4.2.2 Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwere mentale Erkrankung, die durch positive Symptome, wie Halluzinationen und Wahnvorstellungen, aber auch Negativsymptome, wie soziale Abgrenzung und kognitive Defizite charakterisiert ist und ursprünglich mit einer Überaktivität des subcortikalen dopaminergen Systems in Zusammenhang gebracht wurde [HARRISON, 1999]. Serotonin scheint jedoch über 5-HT<sub>2A</sub>Rs und 5-HT<sub>2C</sub>Rs an der Pathophysiologie und Behandlung von Schizophrenie beteiligt zu sein [BUSATTO und KERWIN, 1997; MELTZER, 1999]. So werden die verhaltensmodulierenden und hallozinogenen Wirkungen von LSD und Psilocybin (beide 5-HT-Agonisten), welche den Positivsymptomen der Schizophrenie ähneln, durch 5-HT<sub>2A,C</sub>Rs vermittelt [BURRIS *et al.*, 1991; VOLLENWEIDER *et al.*, 1998]. Zudem werden inverse 5-HT<sub>2A,C</sub>R-Agonisten als atypische Neuroleptika (z. B. Clozapin) erfolgreich zur Behandlung von Schizophrenie eingesetzt [HERRICK-DAVIS *et al.*, 2000; WEINER *et al.*, 2001]. Schizophrene zeigten zudem eine verringerte 5-HT<sub>2A</sub>R-Dichte im PFC [DEAN und HAYES, 1996] und die Assoziation allelischer *5HTR*-Genvarianten hinsichtlich Krankheitsprädisposition und therapeutischer Wirkung von atypischen Neuroleptika [ARRANZ *et al.*, 1998; SEGMAN *et al.*, 1997; SODHI *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 1996].

#### 4.2.3 Drogenmissbrauch

Psychiatrische Erkrankungen stehen häufig in Zusammenhang mit dem Missbrauch psychotroper Drogen (u. a. Alkohol, Kokain, Amphetamin und Heroin), die ihre Wirkung durch Verstärkung der mesocorticolimbischen Dopaminaktivität entfalten [FELTENSTEIN und SEE, 2008]. Dieser neuronale Schaltkreis vermittelt normalerweise die belohnenden Eigenschaften natürlicher Reize (z. B. Essen, Trinken und Sex) und nimmt seinen Ursprung in den dopaminergen Neuronen des ventralen Tegmentums (VTA) im Mittelhirn, die zu limbischen und cortikalen Strukturen, einschließlich Nucleus accumbens, (NAc), Amygdala (Absch. I.4.4) und PFC projizieren [HOWELL und KIMMEL, 2008]. Die

---

mesolimbische Bahn fördert durch Glücksgefühle das Verstärken bestimmter Verhaltensmuster, die mit Belohnung in Verbindung stehen, wobei der NAc eine entscheidende Rolle bei der Organisation motivierten Verhaltens spielt. Die chronische Einnahme von Drogen führt zu dauerhaften, neuroadaptiven Veränderungen des dopaminergen Systems (Desensibilisierung, Toleranz oder Sensibilisierung) und zum Suchtverhalten, das sich durch eine abgeschwächte kognitive Kontrolle und Hyperreaktivität auf drogenassoziierte Reize auszeichnet [FELTENSTEIN und SEE, 2008; KALIVAS und VOLKOW, 2005].

Trotz der zentralen Bedeutung von DA weisen Studien auf eine modulierende Rolle von 5-HT bei der Wirkung von Psychostimulanzien hin, die sich bereits auf neuroanatomischer Ebene andeutet. So werden die dopaminergen VTA-Neuronen des mesocorticolimbischen DA-Systems stark durch serotonerge Neuronen der dorsalen und medianen Raphe innerviert [HERVE *et al.*, 1987]. 5-HT hemmt die Feuerungsrate des mesocorticolimbischen DA-Systems durch Stimulierung der 5-HT<sub>2C</sub>Rs inhibitorischer GABA-Interneuronen [DI MATTEO *et al.*, 2001; EBERLE-WANG *et al.*, 1997]. Die pharmakologische Manipulation des 5-HT-Systems zeigte, dass Fluoxetin (SSRI) die Selbstverabreichung von Kokain und Amphetaminen in *Rodentia* und Rhesusaffen reduzieren kann und 5-HT-Agonisten in der Lage sind, die verhaltensstimulierenden Wirkungen von Kokain in Primaten abzuschwächen [HOWELL und KIMMEL, 2008]. Eine erhöhte 5-HT-Aktivität im Gehirn ist somit in der Lage, die Wirkung von Psychostimulanzien zu unterdrücken. Entsprechend assoziieren Genvarianten von Genen des serotonergen Systems (*SERT*, *5HT2AR*, *MAOA* und *TPH2*) mit Drogenmissbrauch und Suchtverhalten [NIELSEN *et al.*, 2008].

### 4.3 Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen

#### 4.3.1 Monoaminhypothese und weitere Theorien

Erste Hinweise auf die Beteiligung monoaminerger Neurotransmittersysteme an der Pathophysiologie von Depressionen wurden eher zufällig in den 1960er Jahren erbracht, als die Behandlung von Bluthochdruck mit Reserpin (VMAT-Inhibitor) Depressionen in über 20 % der Patienten verursachte [CASTREN, 2005]. Das Antihistaminikum Imipramin und das Tuberkulose-Medikament Iproniazid verbesserten hingegen die Stimmung von depressiven Patienten. Beide Substanzen entfalten ihre antidepressive Wirkung durch Hemmung der SERT/NET-vermittelten Wiederaufnahme von 5-HT und NE aus dem synaptischen Spalt bzw. deren Abbaus durch die MAO, wodurch sich ihre extrazellulären Konzentrationen im Gehirn erhöhen. Infolgedessen wurde die Hypothese von der zentralen Regulation der Stimmungslage durch Monoamine (5-HT und/oder NE) formuliert

[CASTREN, 2005]. Die Hypofunktion des serotonergen Systems konnte daraufhin in klinischen Studien mit depressiven Patienten belegt werden, die geringere Mengen des 5-HT-Metaboliten 5-HIAA in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) aufwiesen [MANN, 2003]. Durch Einnahme einer Trp-freien Diät konnte zudem ein transienter Rückfall symptomfreier MD-Patienten ausgelöst werden [SMITH *et al.*, 1997]. Letztendlich zeigte sich die Bedeutung der 5-HT-Homöostase für die normale Hirnfunktion durch die erfolgreiche Behandlung psychiatrischer Erkrankungen mit selektiven 5-HT-Wiederaufnahmehemmern (SSRIs), die durch Hemmung des SERT die serotonerge Neurotransmission verstärken (Absch. 1.3.2.3).

Der Wirkungsmechanismus der Antidepressiva blieb für lange Zeit ein großes Paradoxon, da sich trotz sofortiger Wirkung auf die synaptische 5-HT-Neurotransmission ihre therapeutische Wirkung erst nach mehreren Wochen einstellt [ARTIGAS *et al.*, 2002]. Mittlerweile geht man davon aus, dass Verhaltensstörungen durch strukturelle und funktionelle Langzeitveränderungen bestimmter Moleküle im Gehirn verursacht werden und dass ADs diesen Veränderungen entgegenwirken (*Molekulare Hypothese*) [CASTREN, 2005]. Zu diesen AD-vermittelten Modifikationen gehört u. a. die Desensibilisierung der präsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren und eine verstärkte *TPH2*-Expression [ARTIGAS *et al.*, 2002; DYGALO *et al.*, 2006; SHISHKINA *et al.*, 2007]. Neuste Erkenntnisse gehen davon aus, dass Verhaltensstörungen neuronale Kommunikationsprobleme widerspiegeln und dass Antidepressiva die Informationsverarbeitung in den betroffenen neuronalen Netzwerken graduell verbessern (*Netzwerk-Hypothese*) [CASTREN, 2005]. Dafür spricht die Stimulierung der hippocampalen Neurogenese durch Fluoxetin in *Rodentia*, die für die verhaltensmodulierende Wirkung von ADs essentiell ist [MALBERG *et al.*, 2000; SANTARELLI *et al.*, 2003; VAN PRAAG *et al.*, 2002]. Die Differenzierung und Integration der neugebildeten Neuronen in bestehende neuronale Schaltkreise dauert zwei bis drei Wochen und könnte die verzögerte Wirkung der ADs erklären.

#### **4.3.2 *TPH2*-SNPs und andere Faktoren**

*TPH2* ist durch seine zentrale Rolle in der 5-HT-Biosynthese (Absch. 1.1.2.1) im Gehirn ein Kandidatengen für 5-HT-verwandte neuropsychiatrische Erkrankungen [WALTHER und BADER, 2003; ZHANG *et al.*, 2004]. Entsprechend belegen zahlreiche Assoziationsstudien den Einfluss meist intronischer *TPH2*-Genvarianten bei Depression [HARVEY *et al.*, 2007; HARVEY *et al.*, 2004; ZILL *et al.*, 2004a], Angststörungen [SHEEHAN *et al.*, 2005], Autismus [COON *et al.*, 2005], Schizophrenie [CHOTAI *et al.*, 2003], Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHD) [WALITZA *et al.*, 2005], Suizidal- [ZILL *et al.*, 2004b] und Suchtverhalten [NIELSEN *et al.*, 2008].



Eine der wenigen funktionellen Studien zeigte den Einfluss des Promotor-SNPs *rs11178997* auf den Grad der *TPH2*-Expression und die Regulation durch den neuronalen Transkriptionsfaktor Brn-2 [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Zhang *et al.* berichtete von einem kodierenden SNP (G1463A, p.R441H) in Patienten mit unipolarer Depression und einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber SSRIs [ZHANG *et al.*, 2005b]. Die *TPH2*-R441H zeigte eine um 80 % verringerte 5-HT-Syntheseaktivität nach Expression in PC12-Zellen. Dieser SNP ist jedoch sehr umstritten, da er von mehreren Laboren weltweit auf genomischer Ebene nicht bestätigt werden konnte [DELORME *et al.*, 2006; GLATT *et al.*, 2005; HENNINGSSON *et al.*, 2006; MOSSNER *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 2008; VAN DEN BOGAERT *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005a; ZHOU *et al.*, 2005]. Erst kürzlich wurden zwei weitere kodierende *TPH2*-SNPs in Patienten mit BD (c.757C>T, p.P206S) und ADHD (c.907C>T, p.R303W) beschrieben, welche die Löslichkeit der resultierenden Proteine beeinträchtigen und die 5-HT-Synthese teilweise vollständig ausschalten [CICHON *et al.*, 2008; MCKINNEY *et al.*, 2008]. Das 5-HT-System bietet jedoch noch weitere Regulationsebenen, deren Gene, darunter *SERT*, *MAOA* und *5HTRs*, ebenfalls mit psychiatrischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden [CANLI und LESCH, 2007; LESCH, 2007; MANN, 2003].

In Interaktion mit genetischen Faktoren erhöhen auch umweltbedingte Einflüsse, wie negative Kindheitserfahrungen und Stress, das Risiko für psychiatrische Erkrankungen [CHARNEY und MANJI, 2004]. So führt der Entzug der mütterlichen Fürsorge bei Rattenbabies im adulten Stadium zu einer erhöhten Stressanfälligkeit, die auf eine HPA-Hyperfunktion zurückgeführt wurde und die Trp-Verfügbarkeit (TDO, Absch. I.1.2.2) und 5-HT-Biosynthese (Absch. I.2.4.1) im ZNS beeinflusst. Letztendlich können aber auch krankheitsbedingte Ursachen, z. B. das *Cushing*-Syndrom (Hypercortisolämie) und die Trp-Depletion durch neuroendokrine Tumore (Karzinome) und chronische Immunaktivität (IDO, Absch. I.1.2.2) für psychiatrische Erkrankungen verantwortlich sein [DANTZER *et al.*, 2008; SHIBLI-RAHHAL *et al.*, 2006; VAN DER HORST-SCHRIVERS *et al.*, 2004].

#### 4.4 Die Amygdala

Die Amygdala (Mandelkern) ist eine paarige Ansammlung heterogener Kerne innerhalb des medialen Temporallappens im Gehirn von Vertebraten [SWANSON und PETROVICH, 1998], die als Teil des limbischen Systems eine entscheidende Rolle bei der emotionalen Bewertung sensorischer Reize und komplexer Situationen sowie der Auslösung von Emotionen und emotionsgesteuerten Verhaltensmustern spielt [BAXTER und MURRAY, 2002; LEDOUX, 2000; PHILLIPS *et al.*, 2003]. Dysfunktionen der Amygdala wurden mit zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen, wie Autismus, Depression, Suizidalverhalten

---

und Schizophrenie, aber auch Impulsivität, Aggression und Drogenmissbrauch in Verbindung gebracht [ALEMAN und KAHN, 2005; KEELE, 2005; NELSON und TRAINOR, 2007; PARSEY *et al.*, 2006; ROSEN und SCHULKIN, 1998; STEIN und STAHL, 2000; TALAROVICOVA *et al.*, 2007; WHITE *et al.*, 2008].

Der basolaterale Komplex (BLA) der Amygdala verarbeitet sensorische Signale vom Thalamus und Cortex und projiziert u. a. zum Hippocampus und Cortex; Areale, die für den Kontextbezug bzw. die Verhaltenskontrolle verantwortlich sind. Der zentrale Nukleus der Amygdala empfängt Informationen der BLA und löst über Projektionen zum Hirnstamm und Hypothalamus autonome (Reflexe) und endokrine (HPA-Aktivierung) Verhaltensreaktionen aus, die mit einer physiologischen Erregung in Zusammenhang stehen [DAVIDSON *et al.*, 2000].

Die Amygdala wurde lange Zeit als Zentrum der Angstantwort angesehen, die potentiellen Gefahrensituationen durch die Auslösung geeigneter Verhaltensmuster begegnet, aber auch auf Reize reagiert, die eine Belohnung versprechen [BAXTER und MURRAY, 2002]. Da die Amygdala auch für das Lernen und die Erinnerung emotionaler Ereignisse verantwortlich ist, können Reize im Zuge der Konditionierung motivierende Eigenschaften erwerben, die entweder eine Belohnung oder Bestrafung versprechen und bei späterer Exposition das zielgerichtete Verhalten kontrollieren (*approach or avoidance*).

Läsionen der Amygdala führen bei Primaten zu einem veränderten Sozialverhalten (Hypersexualität, soziale Abgrenzung, Abstieg in der sozialen Rangfolge) und Verlust des normalen Aggressions- und Angstverhaltens (Hypoemotionalität) [WEISKRANTZ, 1956]. Beim Menschen wurden Defizite in der Emotionsverarbeitung, die durch eine beeinträchtigte Wahrnehmung von Emotionen, z. B. in Reaktion auf ängstliche Gesichter und Angstkonditionierung charakterisiert ist, beobachtet [KEELE, 2005].

Die Amygdala wird stark durch 5-HT-Neuronen der DR innerviert [SADIKOT und PARENT, 1990], wobei 5-HT über zahlreiche 5-HTRs (5-HT<sub>1,2,3,4,6,7</sub>) inhibitorisch auf die Amygdalaaktivität wirkt [KEELE, 2005; RAINNIE, 1999; STUTZMANN und LEDOUX, 1999]. Eine serotonerge Hypofunktion, die für psychiatrische Erkrankungen (z. B. Angststörungen) typisch ist (Absch. I.4.3), resultiert in einer Hyperaktivität der Amygdala und erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sensorische Signale der Umwelt als erregend und aversiv wahrgenommen und erinnert werden [DREVETS, 2003]. Entsprechend assoziieren *TPH2*-SNPs mit einer Hyperaktivität der Amygdala in Reaktion auf emotionale Reize [BROWN *et al.*, 2005; CANLI *et al.*, 2005; HERRMANN *et al.*, 2007]. 5-HT-potenzierende Pharmaka (z. B. SSRIs) sind zudem in der Lage, die Angstkonditionierung bei *Rodentia* zu reduzieren und können u. a. zur Behandlung von Angststörungen eingesetzt werden [HASHIMOTO *et al.*, 1996; INOUE *et al.*, 2004].

---

## 5 Bedeutung von 5-HT in der Ontogenese

Serotonin kommt bereits früh, noch vor der Ausbildung neuronaler Strukturen, in der Embryonalentwicklung von Seeigel, Frosch, Huhn und Maus vor und ist an der Regulation der Zellproliferation und Organogenese beteiligt [BUZNIKOV *et al.*, 1996; LAUDER, 1993; WALTHER und BADER, 1999]. Die Behandlung schwangerer Mäuse mit p-Chlorophenylalanin (PCPA, TPH-Inhibitor) blockiert die Zellteilung früher Embryonen und führt in postimplantativen Stadien zur anormalen Organogenese der Augen, Kiefer und des vaskulären Systems [KHOZHAI *et al.*, 1995].

5-HT ist zudem ein wichtiger morphogener Faktor in der Gehirnentwicklung, der den Aufbau neuronaler Schaltkreise durch Modulation der neuronalen Proliferation, Migration, Differenzierung, Synaptogenese und Apoptose reguliert [AZMITIA, 2001; LAUDER, 1993; VITALIS und PARNAVELAS, 2003]. Die serotonergen Neuronen werden früh in der Entwicklung, an den embryonalen Tagen E10 bis E12 in der Maus und zwischen der 5. und 6. Schwangerschaftswoche beim Menschen, ausgebildet [GASPAR *et al.*, 2003; WHITAKER-AZMITIA, 2005]. Die volle axonale Ausreifung des serotonergen Netzwerkes wird jedoch erst nach der Geburt erreicht [LIDOV und MOLLIVER, 1982]. Beim Menschen korreliert die zeitliche Reifung des serotonergen Systems mit der zentralen 5-HT-Konzentration, die in den ersten zwei bis fünf Lebensjahren ein Maximum erreicht, um danach auf adultes Niveau abzufallen [WHITAKER-AZMITIA, 2005].

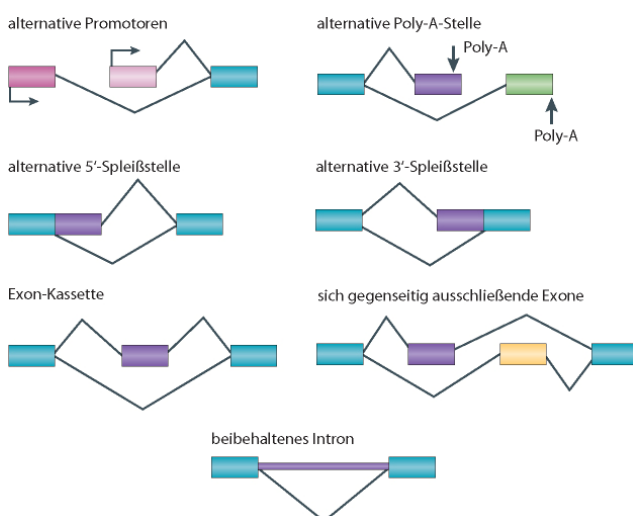
Überraschenderweise verursachen genetische Manipulationen des serotonergen Systems (Metabolismus und Rezeptoren) keine schwerwiegenden Anomalitäten in der Gehirnentwicklung [CASES *et al.*, 1995; FON *et al.*, 1997; HENDRICKS *et al.*, 2003]. Störungen der 5-HT-Homöostase durch Überstimulierung oder Inaktivierung von Rezeptoren verändern jedoch die Feinstruktur neuronaler Schaltkreise und führen zur Manifestierung adulter Verhaltensphänotypen [BONASERA und TECOTT, 2000; GASPAR *et al.*, 2003; GINGRICH und HEN, 2001]. So führt beispielsweise das 5-HT-Überangebot in *Maoa* und *Sert* KO-Mäusen zu einer gestörten Clusterbildung und Segregation der thalamocortikalen Fasern im somatosensorischen Cortex und der retinothalamischen Projektionen des visuellen Systems [CASES *et al.*, 1996; PERSICO *et al.*, 2001; SALICHON *et al.*, 2001; UPTON *et al.*, 1999]. Im adulten Stadium zeichnen sich beide Mausmodelle durch verstärkte Aggression bzw. Depression und gesteigertes Angstverhalten aus [CASES *et al.*, 1995; HOLMES *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2003]. Die schwachen Effekte der serotonergen KO-Modelle lassen sich möglicherweise mit der Vielzahl unterschiedlicher 5-HTRs erklären, die spezifische zeitliche und räumliche Expressionsmuster während der Entwicklung aufweisen und somit nur für eine begrenzte Anzahl von Aktionen während spezifischer Phasen der Ontogenese verantwortlich sind [GASPAR *et al.*, 2003]. Aufgrund

dieser Ergebnisse könnten Störungen der 5-HT-Homöostase in der Embryogenese und frühen postnatalen Entwicklung der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen beteiligt sein (Absch. I.4.3) [GINGRICH und HEN, 2001; GROSS *et al.*, 2002; WHITAKER-AZMITIA, 2001, 2005].

## 6 Posttranskriptionale RNA-Modifikationen

### 6.1 Alternatives Spleißen

Die Expression eukaryotischer Gene erfordert die posttranskriptionale Prozessierung primärer RNA-Transkripte, u. a. durch 5'-Capping, Spleißen und 3'-Polyadenylierung, bevor die Translation der reifen mRNAs in die kodierten Proteine erfolgen kann [BENTLEY, 2005]. Humane Gene exprimieren komplexe prä-mRNAs, deren proteinkodierende Exone durch extrem lange nichtkodierende intronische Sequenzen voneinander getrennt sind. Im Verlauf der prä-mRNA-Reifung werden die Introne herausgeschnitten und die einzelnen Exone präzise miteinander verknüpft. Dieser Prozess des Spleißens wird durch das Spleißosom, einen RNP-Komplex aus fünf snRNAs (kleine nukleäre RNAs) und über 150 assoziierten Proteinen, vermittelt [THANARAJ und CLARK, 2001; ZHOU *et al.*, 2002]. Das Spleißosom wird durch spezifische *cis*-regulatorische Sequenzen (*splicing code*) der prä-mRNA gesteuert, welche die Exon-Intron-Sequenzen definieren und das Spleißen erleichtern (Abb. I.7). Die Aktivität des Spleißosoms wird zudem durch zahlreiche *trans*-regulatorische Aktivator- oder Repressorproteine kontrolliert, die an spezifische Verstärker- bzw. Suppressorelemente der prä-mRNA binden [BLACK, 2003].



**Abbildung I.7** Formen alternativen Spleißens primärer RNA-Transkripte eines Gens. Die Verwendung alternativer Promotoren oder Poly-A-Stellen führt zu Proteinen mit unterschiedlichen N- bzw. C-terminalen Domänen. Durch alternative 5'- oder 3'-Spleißstellen kann die Länge bestimmter Exone variiert werden. Das häufigste alternative Spleißereignis sind Exon-Kassetten, die entweder in die mRNA eingebaut oder übersprungen werden. Ein Spezialfall ist das Auftreten paarweiser Exon-Kassetten, von denen entweder die eine oder die andere, nicht aber beide, Teil der mRNA werden. Durch partielle Unterdrückung von Spleißereignissen können Introne in der mRNA erhalten bleiben. Modifiziert nach [LI *et al.*, 2007].

Durch die differentielle Wahl von Spleißstellen können durch alternatives Spleißen verschiedene Kombinationen von Exonen in die reife mRNA eingebaut werden, wodurch ein einzelnes Gen für mehrere Proteinisoformen mit unterschiedlichen Eigenschaften kodieren kann (Abb. I.7). Interessanterweise werden mindestens 70 % der humanen Gene alternativ gespleißt, was entscheidend zur proteomischen Diversität des Menschen beiträgt [WANG und COOPER, 2007]. Auf Proteinebene führt die Verwendung alternativer Exone zu funktionell verschiedenen Isoformen, die sich beispielsweise in ihren Bindungseigenschaften für Liganden, der subzellulären Lokalisation, spezifischen Aktivität und Regulation durch Signalwege unterscheiden. Variationen der nichtkodierenden Sequenzen innerhalb der 5'- und 3'-UTRs können hingegen die Stabilität, Translation oder Lokalisation der mRNA beeinflussen [HUGHES, 2006]. Durch die Änderung des Leserahmens oder das Einfügen von vorzeitigen Stopcodonen können alternative Spleißereignisse die RNA-Degradierung durch NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) bewirken und somit die Genexpression vollständig ausschalten [LEJEUNE und MAQUAT, 2005].

Alternatives Spleißen tritt besonders häufig im Gehirn auf [LEE und IRIZARRY, 2003] und bestimmt durch die Expression massgeschneiderter Proteine die Eigenschaften einer Vielzahl von Neuronen [BLACK und GRABOWSKI, 2003; LIPSCOMBE, 2005]. Viele Bereiche der neuronalen Entwicklung werden durch diesen Prozess kontrolliert, u. a. die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen, das gerichtete Auswachsen der Axone und die Synaptogenese [LI *et al.*, 2007]. Im adulten Gehirn wird das alternative Spleißen durch die neuronale Aktivität bestimmt und beinhaltet Gene für Ionenkanäle, membrangebundene Rezeptoren und Proteine, die an der Neurotransmitterfreisetzung und Speicherung beteiligt sind. Durch die Feinregulierung ihrer funktionellen Proteinzusammensetzung können Neuronen optimal auf veränderte Signale reagieren und somit einen wichtigen Beitrag zur homöostatischen Plastizität des Gehirns leisten [LI *et al.*, 2007]. Dysregulationen im alternativen Spleißen durch Mutationen *trans*-agierender Spleißfaktoren konnten mit neurologischen und neuromuskulären Erkrankungen, z. B. Prader-Willi-Syndrom (PWS) und Spinale Muskelatrophie (SMA) in Zusammenhang gebracht werden [WANG und COOPER, 2007].

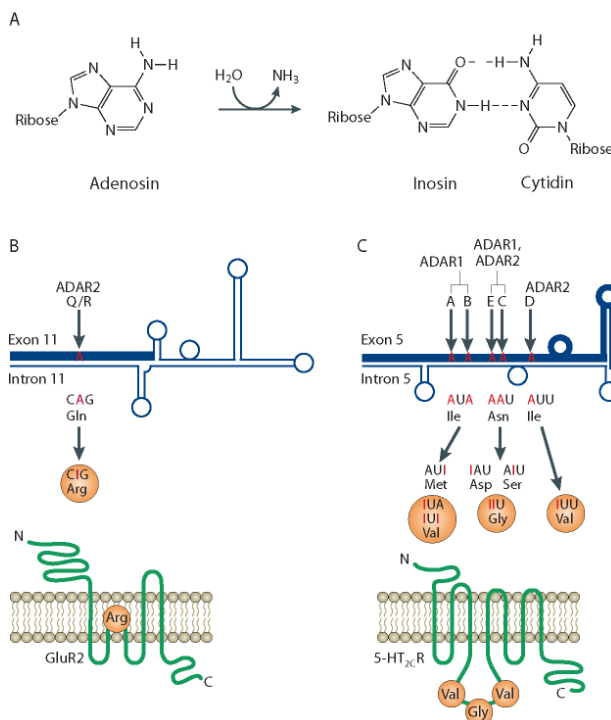
## 6.2 RNA-Editierung

Unter RNA-Editierung werden alle zellulären Prozesse zusammengefasst, welche ko- oder posttranskriptional die Sequenz primärer RNA-Transkripte (mRNA, tRNA, rRNA) durch Insertion, Deletion oder Basenmodifikation von Nukleotiden verändern [NISHIKURA, 2006]. RNA-Editierung innerhalb der kodierenden Region kann den Leserahmen

---

verändern oder Stopcodone und Aminosäuresubstitutionen einfügen, wodurch die resultierenden Proteine entweder verkürzt sind und/oder von der primär kodierten Aminosäuresequenz abweichen. RNA-Editierung ist somit ein weiterer Mechanismus, der durch die Generierung multipler Proteinvarianten eines Genes zur proteomischen und funktionellen Vielfalt beiträgt.

RNA-Editierung wurde erstmals für das mitochondriale *coxII*-Gen von Trypanosomen beschrieben, dessen primäres Transkript durch die Insertion und Deletion von Uridinresten modifiziert wird [BENNE *et al.*, 1986]. Beim Menschen wurde RNA-Editierung erstmals für die mRNA des Apolipoproteins B (*APOB*) beschrieben, bei der durch hydrolytische Deaminierung eines Cytidins zu Uridin (C>U) ein Glutaminocodon in ein Stopcodon umgewandelt wird [POWELL *et al.*, 1987]. Die editierte mRNA führt im Dünndarm zur Synthese des APOB48-Proteins, einer verkürzten Version des APOB100, das in der Leber von der uneditierten RNA gebildet wird. APOB48 vermittelt die Lipidabsorption im Dünndarm, während APOB100 endogen gebildete Lipide (Cholesterole, Triacylglyceride) im Blutkreislauf transportiert [CHESTER *et al.*, 2000; DAVIDSON und SHELNESS, 2000]. Die C>U-Editierung wird durch die APOBEC1-Cytidineaminase in Verbindung mit essentiellen Hilfsproteinen katalysiert [NAVARATNAM und SARWAR, 2006].



**Abbildung 1.8** Funktionelle Veränderungen durch A>I-RNA-Editierung. **(A)** Hydrolytische Deaminierung von Adenosin zu Inosin durch Adenosindeaminasen der ADAR-Familie. Inosin wird während der Translation als Guanodin erkannt und paart mit Cytidin. **(B)** A>I-Editierung an der Q/R-Stelle des GluR2-Untereinheit verursacht einen Gln/Arg-Austausch, wodurch der Rezeptor impermeabel für  $Ca^{2+}$  wird. **(C)** Die Editierung des 5-HT<sub>2c</sub>R erfolgt an fünf Positionen. Durch dynamische Editierung werden drei Codone (I, N und I) verändert, wodurch max. 24 verschiedene Isoformen entstehen können. Die 5-HT<sub>2c</sub>R-Editierung bestimmt die Stärke der intrazellulären Signaltransduktion durch Modulation der 5-HT-Wirkung, G-Protein-Kopplung und Agonistenbindung, wobei der uneditierte Rezeptor (INI) die höchste Effizienz besitzt. Modifiziert nach [NISHIKURA, 2006].

Die A>I-Editierung stellt hingegen die häufigste Form der RNA-Editierung in *Mammalia* dar, welche die Stärke der Neurotransmission im ZNS durch Modulation der funktionellen Eigenschaften von Neurotransmitterrezeptoren bestimmt. Die GluR2-Untereinheit des

AMPA-Glutamatrezeptors wird an der Q/R-Stelle nahezu quantitativ (> 99,9 %) editiert und macht den Ionenkanal undurchlässig für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abb. I.8) [SEEBURG *et al.*, 1998]. Ein weiteres Beispiel ist der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor, der an fünf benachbarten Positionen (A, B, C, D und E/C') in Exon V dynamisch editiert wird (Abb. I.8). Dadurch werden drei Aminosäuren innerhalb des zweiten intrazellulären Schleife geändert, wodurch die Intensität der 5-HT<sub>2C</sub>R-vermittelten Signaltransduktion moduliert wird [BURNS *et al.*, 1997; FITZGERALD *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 1999]. Im Vergleich zu den nicht editierten Rezeptoren (INI-Form) ist die G-Protein-vermittelte Aktivierung des intrazellulären Signalweges durch die editierten Varianten weniger effizient [FITZGERALD *et al.*, 1999; HERRICK-DAVIS *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 1999]. Die A>I-Editierung erfolgt durch hydrolytische Deaminierung und wird durch die dsRNA-spezifische Adenosindeaminasen der ADAR-Familie katalysiert [NISHIKURA, 2006]. Da RNA-Editierung an der Feinregulation der neuronalen Informationsübertragung beteiligt ist, wurden Dysregulationen mit neurologischen Erkrankungen, wie Depression, Schizophrenie, Epilepsie und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) in Zusammenhang gebracht [MAAS *et al.*, 2006].

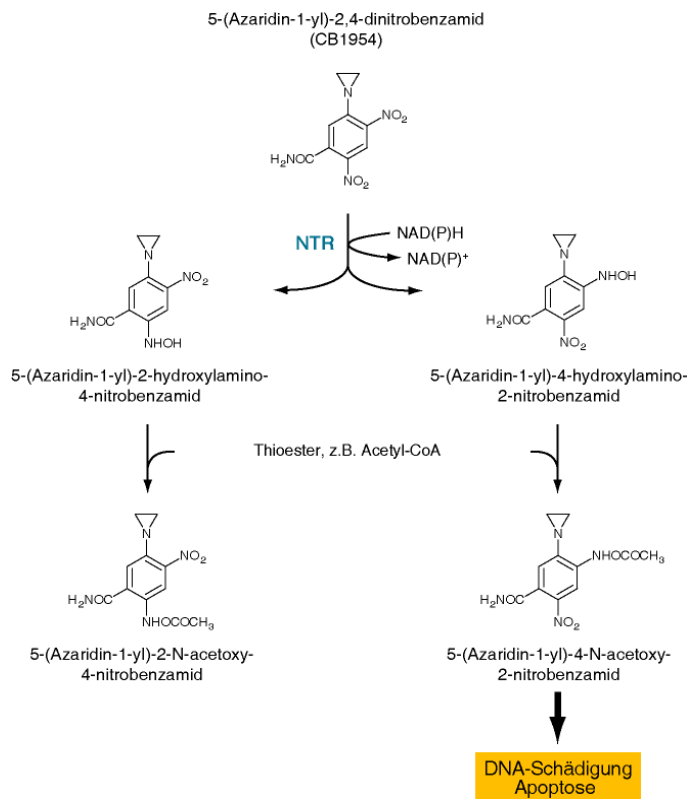
## 7 Das NTR/CB1954-System

Zur Klärung grundlegender funktioneller Fragen können Zellen *in vivo* durch die Verwendung von Enzym-Protoxin-Kombinationen (EP) konditional ablatiert werden [PORTSMOUTH *et al.*, 2007]. Prinzipiell erfordert das die genetische Manipulation von Zellen zur Produktion von Enzymen, die inaktive chemische Vorläufersubstanzen (Protoxine) zu potenten Zytotoxinen metabolisieren können. Dabei haben Enzym und Protoxin allein keinen Einfluss auf die Zelle und die zytotoxische Wirkung entfaltet sich erst durch Kombination beider Komponenten.

Eines der am besten untersuchten protoxinaktivierenden Enzyme ist die Tymidinkinase des *Herpes Simplex-Virus* Typ 1, welche das antivirale Ganciclovir durch Phosphorylierung aktiviert [MOOLTEN *et al.*, 1990]. Die *E. coli*-Cytosindeaminase katalysiert hingegen die Deaminierung von 5-Fluorocytosin zu 5-Fluorouracil, das bevorzugte Chemotherapeutikum bei vielen gastrointestinalen Tumoren [MULLEN *et al.*, 1992; PORTSMOUTH *et al.*, 2007]. Die aktive Spezies beider EP-Systeme sind Nukleotidanaloga, die mit der DNA-Synthese interferieren und den Zelltod ausschließlich proliferierender Zellen verursachen, weshalb ihre Anwendungsmöglichkeiten in Hinblick auf Zellen mit geringem mitotischen Index limitiert sind.

Das *E. coli* *ntr*-Gen kodiert für eine FMN-abhängige Nitroreduktase (NTR), welche die schwach monofunktional alkylierende Substanz 5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid (CB1954) in ein wirkungsvolles Zytotoxin umsetzen kann [KNOX *et al.*, 1992]. In

Anwesenheit des Kofaktors NADH oder NADPH katalysiert die NTR die aerobe Reduktion einer der beiden Nitrogruppen von CB1954 (Abb. I.9). Die 2- und 4-Hydroxylaminderivate reagieren in einer weiterführenden nicht-enzymatischen Reaktion mit einem Thioester zu den entsprechenden N-Acetoxyhydroxylaminen. Von beiden Reaktionsprodukten ist das 4-N-Acetoxyhydroxylamin ein potentes bifunktionales DNA-quervernetzendes Agens [KNOX *et al.*, 1993]. Die verursachten DNA-Schäden werden nur unzureichend repariert und induzieren den Zelltod durch p53-unabhängige Apoptose [CLARK *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 1999].



**Abbildung I.9** Aktivierung von CB1954 durch die *E. coli*-Nitroreduktase (NTR). In Anwesenheit des Kofaktors (NADH oder NADPH) wird eine der beiden Nitrogruppen des Protoxins CB1954 durch NTR zum entsprechenden Hydroxylaminderivat reduziert. Diese Reduktionen erfolgen gleichwertig und mit der gleichen Geschwindigkeit. In einer weiteren nicht-enzymatischen Reaktion mit einem Thioester werden die N-Acetoxyhydroxylamine gebildet, von denen das 4-Hydroxylaminderivat ein potentes DNA-quervernetzendes Agens ist. Die verursachten DNA-Schäden werden unzureichend repariert und führen zum apoptotischen Zelltod. Modifiziert nach [SPOONER *et al.*, 2001].

Da alkylierende Substanzen unabhängig vom Zellzyklus wirken, können mit dem NTR/CB1954-System auch terminal differenzierte Zellen, z. B. Neuronen, ablatiert werden [ISLES *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002]. Für die Anwendung des Systems *in vivo* ist jedoch eine spezifische Expression der NTR in den Zielzellen erforderlich, die durch die Verwendung zelltypspezifischer Promotoren erreicht wird. Auf diese Weise konnte die Wirksamkeit des NTR/CB1954-Systems bereits in zahlreichen Studien und Geweben mit transgenen Mäusen bestätigt werden, u. a. durch Ablation von Luminalzellen der Milchdrüse [CLARK *et al.*, 1997], Adipozyten [FELMER *et al.*, 2002], Astrozyten [CUI *et al.*, 2001] und olfaktorischen Neuronen [ISLES *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002].



## 8 Zielsetzung

Dysregulationen des serotonergen Systems im ZNS wurden mit einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen des Menschen in Zusammenhang gebracht. Durch seine zentrale Bedeutung in der 5-HT-Biosynthese im Gehirn ist *TPH2* ein Kandidatengen für die Neuropsychiatrie und zahlreiche Studien belegen die positive Kopplung vorwiegend intronischer Genvarianten mit psychiatrischen Störungen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte deshalb nach weiteren kodierenden SNPs im *TPH2*-Gen gesucht werden, deren möglicher Einfluss auf die enzymatische Aktivität der TPH2 zur Ätiologie neuropsychiatrischer Erkrankungen beitragen könnte. Dazu sollten aus *post mortem*-RNA-Proben des menschlichen Gehirns von Betäubungsmittel-toten, Suizidopfern und schizophrenen Patienten sowie psychopathologisch unauffälligen Kontrollen die *TPH2*-cDNAs mittels RT-PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Der Vergleich der cDNA-Sequenzen mit der *TPH2*-Referenzsequenz erlaubt anschließend die Identifizierung von SNPs im *TPH2*-Gen. Identifizierte *TPH2*-Varianten sollten zudem in Zellkultur exprimiert und deren Funktionalität hinsichtlich der enzymatischen Aktivität durch Ermittlung der kinetischen Parameter ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) untersucht werden.

Weiterhin sollte im Verlauf der Doktorarbeit ein Mausmodell generiert werden, das die konditionale Ablation der serotonergen Rapheneuronen des Stammhirns ermöglicht, um einen chronischen 5-HT-Mangel im Gehirn zu induzieren, der als Grundlage vieler psychiatrischer Erkrankungen gilt. Zu diesem Zweck sollte das aus der Literatur bekannte NTR/CB1954-System verwendet werden, bei dem die spezifische Expression der *E. coli*-Nitroreduktase die Ablation der Zielzellen durch Applikation des inaktiven Protoxins CB1954 erlaubt. Die Spezifität der NTR-Expression sollte durch Verwendung des humanen *Tph2*-Promotors gewährleistet werden, dessen Aktivität *in Rodentia* zunächst in primären Rapheneuronen der Ratte überprüft werden sollte. Da das NTR/CB1954-System *in vivo* jedoch hohe CB1954-Konzentrationen erfordert, die Nebenwirkungen verursachen können, soll ggf. nach Optimierungsmöglichkeiten gesucht werden, um die NTR-Aktivität in den Zielzellen zu erhöhen.

## II Materialien und Methoden

### 1 Chemikalien und Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich und Fluka bezogen.

### 2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung	
<b>Primäre Antikörper</b>			<b>WB</b>	<b>ICC/IHC</b>
$\alpha$ Aktin (polyklonal)	Ziege	SC Biotechnology	1:5000	
$\alpha$ GFP (monoklonal)	Maus	Roche	1:2000	
$\alpha$ TPH (WH3, monoklonal)	Maus	Sigma	1:3000	
$\alpha$ TPH (polyklonal)	Schaf	Chemicon	1:1000	1:1000
$\alpha$ TPH2 (polyklonal)	Kaninchen	eigene Herstellung	1:200-1000	1:100-200
<b>Sekundäre Antikörper</b>			<b>WB</b>	<b>ICC/IHC</b>
$\alpha$ Esel-Alexa Fluor 594	Ziege	Molecular Probes		1:600
$\alpha$ Kaninchen-HRP	Maus	Sigma, A2074	1:100000	
$\alpha$ Kaninchen-HRP	Esel	Amersham	1:3000	
$\alpha$ Maus-HRP	Ziege	Sigma, A0168	1:60000	
$\alpha$ Schaf-Biotin + Streptavidin-HRP	Kaninchen	Vector Labs	1:3000	1:500
$\alpha$ Ziege-HRP	Esel	SC Biotechnology, sc-2020	1:60000	

### 3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma BIOTEZ (Berlin) synthetisiert.

Name	Position	Orientierung	5'-3'-Sequenz
<b><i>Tph2</i></b>			
4kbTph2-s	<i>Tph2</i> -Promotor	+	GTA ATC TGT TTG CAT TAT TTT GTT CAG AGC
4kbTph2-as	<i>Tph2</i> -Promotor	-	CGC TGT CCA GAA CCC TGG TGC
6xHisTph2-f	<i>TPH2</i>	+	GCC GCC ACC ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC ATG CAG CCA GCA ATG ATG ATG TTT TCC
hsntphORFs	<i>TPH2</i>	+	CAT TGC TCT TCA GCA CCA GGG TTC TGG
hsntphORFas	<i>TPH2</i>	-	TGA CAT TGA CTG AAC TGC TGC TAA GC
OWB 05	<i>TPH2</i> -Intron 2	+	GAT TGT CTC TTC CTC TTG TGT GG
OWB 06	<i>TPH2</i> -Intron 4	-	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC ATA CCA TCC TTC TAA CCC CGT TCC
OWB 09	<i>TPH2</i> -Intron 5	+	GAT CCT TTC AGA CGC TCA TGT GC
OWB 10	<i>TPH2</i> -Intron 6	-	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC GAG TCC CTT GCT CTG CTT CC
OWB 11	<i>TPH2</i> -Intron 6	+	TAT GTC ACT CAG TTG TCA AGA GG
OWB 12	<i>TPH2</i> -Intron 7	-	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAA GCA GAT GGC TCA GTG TTG G
OWB 15	<i>TPH2</i> -Intron 8	+	GGC TTC TGA ATT CAG GAA GCG

OWB 16	<i>TPH2</i> -Intron 9	-	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC TGC TCA TCC ATT TGA GTC ACA CC
OWB 17	<i>TPH2</i> -Intron 9	+	AGT TTC CAA TTT ACC CTG CAC AC
OWB 18	<i>TPH2</i> -3'UTR	-	CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC AAT TGC ATG CTT ATT AGC CAA GCC
NTPHEX3A	<i>TPH2</i> -Exon 3	+	GAA TTC AAT GAG CTC ATC CAG TTG C
NTPH2Ex7A	<i>TPH2</i> -Exon 7	-	GTA CTG GGT GCA GTG GAA TAC TCT GTA GG
NTPHEX9A	<i>TPH2</i> -Exon 9	+	TGC AAG CAA GAA GGG CAA CTG C
NTPHSPL_for	<i>TPH2</i>	+	GCT GCT ACC GAA AGT GGC AAG ACA GC
NTPHSPL-A	<i>TPH2a</i>	-	CCA GGG CAC ATC CTC TAG CTC TTC TTC
NTPHSPL2	<i>TPH2b</i>	-	CCA GGG CAC ATC CTC TAG CTC CTT GC
nTPHSPLrat	<i>rTph2b</i>	+	CCA CGG CAC ATC CTC TAG TTC CTT GC
NTPHEX3_526s	<i>TPH2</i> -Exon 3	-	TGC TGA AAT TTC AAA CCA CTA TTG TGA CGC
NTPHEX3_526as	<i>TPH2</i> -Exon 3	+	AGC GTC ACA ATA GTG GTT TGA AAT TTC AGC
<b>Gapdh</b>			
humGAPDHs	<i>GAPDH</i>	+	CAT TGA CCT CAA CTA CAT GG
humGAPDHas	<i>GAPDH</i>	-	TGG ACT GTG GTC ATG AGT
mGP3	<i>Gapdh</i>	+	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
mGP5	<i>Gapdh</i>	-	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC
<b>ntr</b>			
NTR1	<i>ntr</i>	+	GTC TTT ATG GAT ATC ATT TCT GTC G
NTR2	<i>ntr</i>	-	AGA GAG AAT TAC ACT TCG GTT AAG G

## 4 Lösungen, Puffer und Medien

Die verwendeten Lösungen, Puffer und Medien sind mit ihrer genauen Zusammensetzung bei den dazugehörigen Methoden dieses Kapitels zu finden. Bei Puffern handelt es sich im allgemeinen um wässrige Lösungen, die in der Regel bei Raumtemperatur gelagert und bei Bedarf für 30 min bei 125 °C autoklaviert wurden.

## 5 Zellkulturen und Mikroorganismen

### 5.1 Säugerzellen

Zellline	Spezies	Gewebe	Quelle
COS7	Affe	Niere	ATCC, CRL-1651
HEK293	Mensch	Niere	ATCC, CRL-1573
P815	Maus	Mastozytom	ATCC, TIB-64
PC12	Ratte	Pheochromozytom	ATCC, CRL-1721
SHP77	Mensch	kleinzelliges Lungenkarzinom	ATCC, CRL-2195
SH-SY5Y	Mensch	Neuroblastom	ATCC, CRL-2266
ψ/Cre	Maus	Fibroblasten	Danos <i>et al.</i> (1988)
r5HT	Ratte	primäre serotonerge Rapheneuronen	eigene Arbeit

## 5.2 Bakterien

### 5.2.1 Stämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurden unter Verwendung der nachfolgend aufgeführten *E. coli*-Stämme durchgeführt.

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 $\alpha$	<i>F</i> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>rk</i> , <i>mk</i> ) <i>phoA supE44 thi1 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math></i>	Gibco
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [ <i>F'</i> <i>proAB lac<sup>R</sup>Z</i> $\Delta$ M15 Tn10 ( <i>Tet<sup>R</sup></i> )]	Stratagene
TOP10	<i>F mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr hsdRMS mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> ( <i>Str<sup>R</sup></i> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
GM2163	<i>F ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm6 hisG4 rfbD1 rpsL136 dam13::Tn9</i> ( <i>Cam<sup>R</sup></i> ) <i>xylA5 mtl1 thi1 mcrB1 hsdR2</i>	NEB

### 5.2.2 Kulturbedingungen

Die unterschiedlichen *E. coli*-Stämme wurden für Klonierungsarbeiten zur Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator. Transformierte Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit 100  $\mu$ g/mL Ampicillin oder 50  $\mu$ g/mL Kanamycin bei 37 °C im Brutschrank selektiert.

**LB-Medium**.....0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Bactotrypton; 1 % (w/v) NaCl  
in ddH<sub>2</sub>O

**LB-Agar**.....0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Bactotrypton; 1 % (w/v) NaCl;  
2 % (w/v) Agar in ddH<sub>2</sub>O

### 5.2.3 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurden 100 mL LB-Medium mit 1 mL einer frischen *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,45 - 0,55 im Schüttler angezogen, auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 30 mL kaltem TFB I resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in 4 mL eiskaltem TFB II wurde die Zellsuspension aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und die Aliquots bei - 80 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C und 700 x g für 10 min.

**TFB I**.....50 mM MnCl<sub>2</sub>; 100 mM KCl; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15 % (v/v) Glycerin;  
30 mM KOAc; pH 6,1; sterilfiltriert

**TFB II** .....75 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 10 mM MOPS; 15 % (v/v) Glycerin;  
pH 7,0; sterilfiltriert

#### 5.2.4 Transformation

Für die Transformation wurden chemisch-kompetente Bakterien der Stämme DH5 $\alpha$  und XL1-Blue verwendet. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 5 – 10  $\mu$ L Ligationsansatz vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und Inkubation für 2 min auf Eis wurden die Zellen mit 450  $\mu$ L LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C im Thermomixer regeneriert. Die Bakterien wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Herstellung unmethylierter Plasmid-DNA wurden methylasedefiziente (*dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup>*) GM2163-Zellen verwendet.

## 6 Molekularbiologische Methoden

### 6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### 6.1.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden Schwanzbiopsien von transgenen Mäusen für 2 - 4 h unter leichtem Schütteln bei 55 °C in 350  $\mu$ L Tail-Puffer mit 0,5 g/L Proteinase K verdaut. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden zur Ausfällung der Proteine 150  $\mu$ L einer gesättigten NaCl-Lösung (~ 6 M) zu den Proben gegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 20 mg/L RNase A versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 mL Isopropanol und Zentrifugation für 20 min wurde die DNA gefällt. Nach Waschen des Pellets mit 1 mL 70 % Ethanol wurde die DNA luftgetrocknet und in 100  $\mu$ L TE<sub>PCR</sub> über Nacht bei RT resuspendiert. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und standardmäßig auf 100 ng/ $\mu$ L eingestellt. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C und 20000 x g durchgeführt. Fünfzig ng der isolierten genomischen DNA wurden zur PCR-basierten Genotypisierung der transgenen NTR1-Mäuse mit den Oligonukleotiden NTR1 und NTR2 eingesetzt.

**Tail-Puffer** .....50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS;  
100 mM NaCl;  
**RNase A** .....10 g/L RNase A in TE-Puffer  
**TE<sub>PCR</sub>** .....10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,1 mM EDTA

### 6.1.2 Analytische Plasmid-DNA-Isolierung

Die quantitative Isolierung von Plasmid-DNA (*Mini Prep*) erfolgte aus 2 – 4 mL frischer Bakterienkultur nach der RAL-Methode (*Rapid Alkaline Lysis*, [BIRNBOIM und DOLY, 1979]) mit anschließender Präzipitation der DNA-Plasmide durch Ethanolfällung. Alternativ wurden DNA-Säulen des *NucleoSpin® Plasmid Kits* (Macherey-Nagel, nach Protokoll des Herstellers) verwendet.

### 6.1.3 Präperative Plasmid-DNA-Isolierung

Die qualitative Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte aus 200 mL frischer Bakterienkultur mit dem *Nucleobond®-PC 500 Kit* nach Protokoll des Herstellers (Macherey-Nagel).

### 6.1.4 DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen

Gewünschte DNA-Banden wurden nach der Gelelektrophorese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und durch Verwendung des *NucleoSpin® Extract II Kit* (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers aus dem Gelstück isoliert.

### 6.1.5 RNA-Isolierung aus Zellen und Geweben

Die Isolierung von Total-RNA aus Zellkulturen und Geweben erfolgte mit dem *Trizol®*-Reagenz (Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers. Die von Pathologen während der Autopsie entnommenen humanen *post mortem*-Gehirnproben wurden mit dem *RNAlater RNA Stabilization Reagent* (Qiagen) gesammelt und bis zur Weiterverwendung bei - 80 °C eingefroren. Nach Homogenisierung der Gewebe wurde die Gesamt-RNA mit dem *RNeasy Lipid Tissue Midi Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

## 6.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

DNA-Konzentrationen von Lösungen wurden photometrisch bei 260 nm gemessen und nach der Formel  $OD_{260} = 1 \cong 50 \mu\text{g/mL dsDNA}$  berechnet. Für RNA wurde die Formel  $OD_{260} = 1 \cong 40 \mu\text{g/mL RNA}$  angewendet.

---

## 6.3 Manipulation von Nukleinsäuren

### 6.3.1 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firmen NEB und Fermentas geschnitten (nach Angaben des Herstellers). Die eingesetzte Enzymmenge betrug dabei im allgemeinen 1 U, um 1 µg DNA in einer Stunde vollständig zu verdauen.

### 6.3.2 Dephosphorylierung

Um die Selbstligation linearisierter DNA-Vektoren mit kompatiblen intramolekularen Enden zu vermeiden, wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen hydrolytisch durch *Antarctic Phosphatase* (NEB) nach Protokoll des Herstellers entfernt.

### 6.3.3 Generierung stumpfer Enden

Zur Generierung stumpfer DNA-Enden wurden durch Restriktionsverdau entstandene 5'-Überhänge von DNA-Fragmente durch Verwendung der T4-DNA-Polymerase (NEB) nach Protokoll des Herstellers aufgefüllt.

### 6.3.4 Erzeugung von 3'-A-Überhängen

Die Verwendung des *pTarget™ Mammalian Expression System* (Promega) erforderte 3'-A-Überhänge der zu ligierenden PCR-Fragmente, die bei der Verwendung von DNA-Polymerasen mit Korrekturlesefunktion nicht generiert werden. PCR-Fragmente wurden nach Aufreinigung aus Agarosegelen mit 200 µM dATP, 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 µL *Taq*-Polymerase (laboreigene Herstellung) versetzt, für 10 min bei 72 °C inkubiert und anschließend für die Ligation eingesetzt.

### 6.3.5 Ligation

Für Klonierungen notwendige Ligationen von DNA-Fragmenten mit linearisierten DNA-Vektoren erfolgten im molaren Verhältnis von 2 : 1 bis 5 : 1 in Ligationspuffer mit 200 U T4-DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 16 °C. Chemisch-kompetente Bakterien wurden anschließend mit dem Ligationsansatz transformiert (Absch. II.5.2.4).

---

## 6.4 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente einer Größe von 0,1 bis 20 kb wurden in 0,7 bis 3 %igen (w/v) Agarosegelen mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid aufgetrennt und unter UV-Licht (300 nm) visualisiert (GelDoc 2000, BioRad). Durch Vergleich mit geeigneten Molekulargewichtsmarkern bekannter Zusammensetzung konnten Fragmentgrößen und Probenkonzentrationen abgeschätzt werden. Die DNA-Proben wurden mit 0,2 Volumeneinheiten 6 x DNA-Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch bei 120 V in TBE-Puffer aufgetrennt.

6 x DNA-Probenpuffer.....50 % (w/v) Glycerin; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau

TBE-Puffer.....90 mM Tris/HCl; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA

## 6.5 Klonierungen

### 6.5.1 pNTR1

Das Nitroreduktasegen (*ntn*) wurde von genomischer DNA des *E. coli*-Stammes DH5α mit *Taq*-DNA-Polymerase und den Oligonukleotiden NTR1 und NTR2 mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene 654 bp-Amplikon wurde in den *pGEM*<sup>®</sup>-*T easy*-Vektor (Promega, nach Angaben des Herstellers) kloniert und durch Sequenzierung bestätigt.

### 6.5.2 pUC57-NTRo

Der Codongebrauch des *E. coli ntr*-Gens wurde *in silico* durch Austausch synonymer Codone an *Mus musculus* angepasst [NAKAMURA *et al.*, 2000]. Das codonoptimierte *ntro*-Gen wurde von der Firma GeneScript (NJ, USA) synthetisiert, verifiziert und im Vektor pUC57 zur Verfügung gestellt.

### 6.5.3 pMSCVhTph2NTRpA

Die Herstellung des retroviralen Konstruktes pMSCVhTph2NTRpA, kodierend für das *ntn*-Gen unter der Kontrolle des humanen *Tph2*-Promotors, erfolgte durch sequentielle Klonierung. Die SV40-Polyadenylierungssequenz (pA; 0,9 kb) wurde zunächst mit *Bam*H I und *Xba* I aus pNSEpA (Diego J. Walther, MPIMG) ausgeschnitten und das 0,9 kb-Fragment durch Verwendung der Schnittstellen *Bgl* II und *Spe* I in den Subklonierungsvektor pMCS5 (MoBiTec) kloniert. Das entstandene Konstrukt pMCSpA wurde mit *Xho* I und *Sac* II oberhalb der pA-Sequenz geschnitten und das *ntn*-kodierende *Sal* I/*Sac* II-Fragment (0,7 kb) von pNTR1 eingefügt. Unter Verwendung der Schnittstellen



*Pst* I und *Spe* I wurde anschließend das 4 kb *Tph2*-Promotorfragment oberhalb des *ntr*-Gens in den Vektor pMCSNTRpA kloniert, wozu der *Tph2*-Promotor zuvor mit *Pst* I und *Spe* I aus dem Konstrukt p13-7 (Diego J. Walther, MPIMG) herausgeschnitten wurde. Das resultierende Konstrukt phTph2NTRpA wurde durch *Hind* III und *Cla* I von der Vektorsequenz befreit und das *Tph2-ntr-pA*-Fragment in die entsprechenden Schnittstellen des retroviralen Vektors pMSCVhyg (BD Clontech) kloniert. Der retrovirale Vektor verfügt über das Verpackungssignal  $\Psi^+$  und die retroviralen 5'- und 3'-LTRs, die für die Integration des Provirus in das Wirtsgenom entscheidend sind. Durch Transformation der Verpackungszelllinie  $\psi$ /Cre wurden rekombinante Retroviren für die Generierung der transgenen NTR1-Mäuse erhalten (Absch. II.8.5.3).

#### 6.5.4 pGNTR und pGNTRo

Für die Expression des GNTR-Fusionsproteins wurde die Gene *ntr* und *ntro* mit *Eco*R I aus pNTR1 bzw. pUC57-NTRo herausgeschnitten (je 0,7 kb) und in den *Eco*R I -geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pEGFP-C1 (BD Clontech) kloniert. Die resultierenden Expressionskonstrukte pGNTR und pGNTRo wurden anschließend für alle Zellkulturexperimente verwendet.

#### 6.5.5 phTph2DsRED

Für die Expression des Reportergens *DsRed* unter der Kontrolle des humanen *Tph2*-Promotors wurde das Konstrukt phTph2DsRED hergestellt [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Das 4 kb-Fragment des humanen *Tph2*-Promotors wurde mit den Oligonukleotiden 4kbTph2-s und 4kbTph2-as vom Plasmid phTph2NTRpA amplifiziert und in den Expressionsvektor pDsRed-Express-N1 (BD Clontech) durch Verwendung der geglätteten Schnittstellen *Pci* I und *Bgl* II kloniert. Das Konstrukt wurde anschließend zur Transfektion primärer 5-HT-Rapheneuronen der Ratte verwendet.

#### 6.5.6 pXL-TPH2-Konstrukte

Die *TPH2*-cDNAs der humanen *post mortem*-Proben der Amygdala wurden mit dem *Expand Long Template PCR System* (Roche) mit den Oligonukleotiden hsnTphORFs und hsnTphORFas amplifiziert, aufgereinigt und durch Klonierung in *pXL-TOPO* (*TOPO*<sup>®</sup>*XL PCR Cloning Kit*, Invitrogen) nach Angaben des Herstellers gesichert.

### 6.5.7 *TPH2*-Expressionskonstrukte

Die *TPH2*-Varianten *TPH2a* (Diego J. Walther, MPIMG) und *TPH2a 1234* (Tabelle VI.1, BTM868-1) wurden von pXL-*TPH2*-Konstrukten der jeweiligen Patienten mit den Oligonukleotiden 6xHishtph2-f und hstntphORFas und der *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) amplifiziert. Die Fragmente (1,7 kb) wurden aus Agarosegelen aufgereinigt und nach Generierung der 3'-A-Überhänge in den pTarget-Vektor (*pTarget™ Mammalian Expression System*, Promega) kloniert. Für die Expression von *TPH2b* und *TPH2b 234* wurde zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese der Editierungsposition 1 (c.385C>T) mit den Oligonukleotiden NTPHEx3\_526s und NTPHEx3\_562as der genomische Zustand (c.385C) in den entsprechenden Patientenklonen SZ947-1 und SZ947-3 (*TPH2b 1* und *TPH2b 1234*, Tabelle VI.1) wiederhergestellt und die korrigierten cDNAs anschließend in den pTarget-Vektor kloniert. Die *TPH2*-Expressionskonstrukte wurden im folgenden zur Generierung stabiler HEK293-Zellen eingesetzt.

### 6.5.8 Klonierung der *TPH2*-Exone

Die *TPH2*-Exone wurden mit den OWB-Oligonukleotiden (Absch. II.3) von genomischer DNA des untersuchten *post mortem*-Patientenkollektivs amplifiziert, durch Ligation in *pGEM®-T easy* (Promega, nach Angaben des Herstellers) gesichert und sequenziert.

## 6.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte durch die Firma MWG Biotech nach der Didesoxymethode [SANGER *et al.*, 1977].

## 6.7 Lagerung

DNA wurde in TE-Puffer bei - 20 °C aufbewahrt oder langfristig bei - 80 °C gelagert. Die Lagerung von RNA erfolgte bei - 80 °C in DEPC-Wasser.

TE-Puffer.....10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

DEPC-Wasser.....0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC), autoklaviert

## 6.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis pipettiert und enthielt die Matrizen-DNA (10 ng Plamid-DNA oder 50 ng genomische DNA), 0,4 - 0,6 µM Oligonukleotide (Absch. II.3),

---

200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1 - 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 x PCR-Puffer und  $\text{ddH}_2\text{O}$  zu einem Endvolumen von 25 bis 50  $\mu\text{L}$ . Jedem Reaktionsansatz wurde abschließend DNA-Polymerase zugesetzt. Für Genotypisierungen und die Amplifikation kleiner Fragmente (< 700 bp) wurde standardmäßig 1  $\mu\text{L}$  *Taq*-Polymerase (laboreigene Herstellung) verwendet. Die Amplifikation großer Fragmente (> 1,5 kb) erfolgte mit dem DNA-Polymerase-Mix des *Expand Long Template PCR Systems* (Roche) oder der *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) nach Protokoll des Herstellers. Die PCR-Programme setzten sich standardmäßig aus der Prä-Denaturierung der DNA für 5 min bei 94 - 98 °C, gefolgt von 30 - 45 Zyklen mit 10 - 30 s Denaturierung bei 94 - 98 °C, 10 - 30 s Hybridisierung bei 60 - 75 °C und 30 - 90 s Elongation bei 72 °C zusammen. Zum Abschluss erfolgte die finale Elongation für 5 min bei 72 °C.

10 x PCR-Buffer.....100 mM Tris; 500 mM KCl; pH 8,8 in  $\text{ddH}_2\text{O}$

## 6.9 Reverse Transkription

Das Umschreiben von mRNA in cDNA erfolgte durch reverse Transkription. Die isolierte RNA (2  $\mu\text{g}$ ) wurde zuvor mit DNase I (Promega) in DEPC- $\text{ddH}_2\text{O}$  für 30 min bei 37 °C behandelt (nach Protokoll des Herstellers) und in Gegenwart von 400 U MMLV-Reverse Transkriptase; 3,3  $\mu\text{M}$  *Random Hexamer Primer*; 30 U RNasin (alle Promega); 10 mM DTT und 500  $\mu\text{M}$  dNTPs für eine Stunde bei 42 °C inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung der MMLV für 10 min bei 80 °C wurden 1 - 4  $\mu\text{L}$  der synthetisierten cDNAs als Matrize für die PCR-Amplifikation der spezifischen cDNAs eingesetzt.

## 6.10 Realtime PCR (qPCR)

Die quantitative *realtime* PCR für die Bestimmung der *TPH2a*- und *TPH2b*-Expression in humanen *post mortem*-cDNA-Proben der Amygdala wurde mit den Oligonukleotiden NTPHSPL\_for und NTPHSPL-A bzw. NTPHSPL\_for und NTPHSPL2 wie beschrieben durchgeführt [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Die Reaktionen wurden durch Verwendung des *LightCycler FastStart DNA Master Kit* angesetzt und in einem LightCycler 2.0 ausgeführt (Roche, nach Angaben des Herstellers).

## 7 Proteinbiochemische Methoden

### 7.1 Denaturierende Zellextrakte

Nach Waschen mit eiskaltem PBS-Mg wurden die Zellen in 30 - 100  $\mu$ L RIPA-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (*Complete™*, Roche) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Die löslichen Fraktionen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm erhalten. Alle aufgeführten Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Überstand mit 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die Proteinextrakte wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert oder direkt für die SDS-PAGE eingesetzt (Absch. II.7.3).

<b>PBS</b> .....	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in ddH <sub>2</sub> O
<b>PBS-Mg</b> .....	0,37 mM MgCl <sub>2</sub> in PBS
<b>RIPA-Puffer</b> .....	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40; 0,5 % DOC; 0,1 % (w/v) SDS
<b>2 x Probenpuffer</b> .....	130 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 2 mM EDTA; 20,2 % (v/v) Glycerol; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol

### 7.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BRADFORD-Reagenz (Sigma) nach Protokoll des Herstellers [BRADFORD, 1976].

### 7.3 SDS-PAGE

Zur Auftrennung der Zellextrakte wurden 12 % SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die SDS-PAGE wurde bei 80 V für 20 min im Sammelgel und für 90 min bei 200 V im Trenngel in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt.

<b>Sammelgel</b> .....	130 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8; 4,8 % (w/v) Acrylamid:BIS (29:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED
<b>Trenngel</b> .....	375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 14 % (w/v) Acrylamid:BIS (29:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,04 % (v/v) TEMED
<b>Laufpuffer</b> .....	25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

#### 7.4 Westernblot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *Semidry*-Verfahren für 45 min bei 16 V in Transferpuffer auf Nitrozellulose (NC)-Membranen (Semi-qui Blot™, Amersham) transferiert, mit 3 % BSA in PBST für 30 min bei RT blockiert und mit einem primären Antikörper (Absch. II.2) in PBST mit 1 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBST erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper (Absch. II.2) in PBST für eine Stunde bei RT. Nach weiteren Waschschritten wurden immunreaktive Banden mit der ECL<sup>+</sup>-Detektionsmethode visualisiert (Perkin Elmer, nach Protokoll des Herstellers). Die Rehybridisierung von NC-Membranen erfolgte nach Waschen mit PBST.

**PBST**.....137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;  
0,1 % (w/v) Tween™ 20 in ddH<sub>2</sub>O

#### 7.5 Aufarbeitung von Zellen und Geweben für die 5-HT-Messung

Für die Bestimmung der 5-HT-Gehalte in stabilen PC12-Zellen wurden jeweils  $1,7 \times 10^6$  Zellen geerntet, dreimal mit PBS gewaschen und für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Vorher erfolgte die Bestimmung der Lebendzellanzahl durch Trypanblau-Färbung (Absch. II.8.8). Die Zellpellets wurden auf Trockeneis eingefroren, in 100 µL 4 °C kalten Aufschlusspuffer I mit einem Pistill homogenisiert und für 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden nach dreimaligem Spülen der Pellets in frische Eppendorfgefäße überführt, erneut für 5 min bei 20000 rpm zentrifugiert und anschließend für die HPLC-FD-Messung eingesetzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten durchgehend bei 4 °C. Die Pellets wurden anschließend in 100 µL 1 x Laemmli-Probenpuffer aufgekocht und zur Normalisierung der 5-HT-Gehalte auf die TPH2-Proteinmenge mittels Westernblot analysiert. Die Aufarbeitung von Gewebeproben des Gehirns erfolgte auf die gleiche Weise.

**Aufschlusspuffer I**.....5 mM Natriummetabisulfit; 300 mM PCA in ddH<sub>2</sub>O  
**1 x Probenpuffer**.....65 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA;  
10,1 % (v/v) Glycerol; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau;  
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

#### 7.6 TPH-Aktivitätsassay

Die Aktivität der Zellhomogenate wurde durch Messung der 5-HTP-Anreicherung in Anwesenheit von Substrat, Kosubstrat und dem AAAD-Inhibitor NSD1015 durch

HPLC-FD bestimmt [WALTHER und BADER, 1999; WALTHER *et al.*, 2003]. Stabile HEK293-Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und in Aufschlusspuffer homogenisiert. Das Homogenat wurde zunächst mit dem Präinkubationspuffer für 10 min bei 30 °C und abschließend für 30 min bei 37 °C in Assaypuffer inkubiert. Beide Inkubationsschritte erfolgten unter Lichtausschluss. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Perchlorsäure zu einer Endkonzentration von 300 mM gestoppt und zur Deproteinierung für 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die 5-HTP-Gehalte der Überstände wurden direkt mittels HPLC-FD (Shimadzu) analysiert (Absch. II.7.7) und auf die TPH2-Menge in jedem Zelllysat normalisiert. Zu diesem Zweck wurde das restliche Homogenat nach Bestimmung der Proteinkonzentration für die Bestimmung der TPH2-Expression mittels Westernblotanalyse eingesetzt.

**Aufschlusspuffer**.....75 mM Tris/Acetat, pH 7,6 ; 2 mM PMSF

**Präinkubationspuffer**.....2 mg/mL Katalase ; 25 mM DTT und 100 µM Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

**Assaypuffer**.....15 mM Tris/Acetat, pH 7,6; 0 - 4 mM L-Trp ; 300 µM  
6MPH4/BH<sub>4</sub>; 2 mM NSD1015 ; 2 mM PMSF

## 7.7 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Bestimmung von 5-HTP und 5-HT in den Zelllysaten erfolgte durch HPLC-FD-Messung (Schimazu) über eine C18-Reverse-Phase-Säule nach beschriebener Methode [YAMAUCHI *et al.*, 1981]. Die Retentionszeiten von Trp, 5-HTP, 5-HT und 5-HIAA wurden mit einem Fluoreszenzdetektor (Shimazu) bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Emissionswellenlänge von 345 nm bestimmt. Die Durchflussrate des HPLC-Puffers betrug 1 mL/min. Die Peakhöhen und -flächen der einzelnen Metaboliten wurden gemessen und anhand von Eichgeraden quantifiziert.

**HPLC-Puffer**.....30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,165 mM EDTA; 5 % (v/v) Methanol in ddH<sub>2</sub>O

## 8 Zellkulturmethoden

### 8.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Alle Zelllinien wurden im jeweiligen Kulturmedium unter Zusatz von 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (P/S, Cambrex) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. Notwendige Zentrifugationsschritte erfolgten standardmäßig mit 400 x g für 5 min bei RT.

Zelllinie	Medium
COS7, HEK293; SH-SY5Y, $\psi$ /Cre	DMEM; 10 % (v/v) FBS; P/S
PC12	DMEM; 15 % (v/v) DHS; 2,5 % (v/v) FBS; P/S
P815; SHP77	RPMI; 10 % (v/v) FBS; P/S

Die Zellen wurden je nach Proliferationsgeschwindigkeit alle 2 - 3 Tage passagiert. Adhärente Zellen wurden mit PBS oder PBS-Mg gewaschen und zur Ablösung von der Kulturschale und Vereinzelung der Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt. Die erneute Einsaat der Zellen erfolgte nach Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von Kulturmedium in der gewünschten Zelldichte. Suspensionszelllinien wurden im gewünschten Verhältnis mit Medium verdünnt und in eine neue Kulturschale eingesät.

## 8.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren von Zellen erfolgte im jeweiligen Cryomedium durch langsames Abkühlen (ca. 2 °C/min) auf - 80 °C und anschließender Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Bei Bedarf wurden eingefrorene Zellen schnellstmöglich bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und zur vollständigen Entfernung des im Cryomedium enthaltenen DMSO mit vorgewärmten Medium gewaschen, in Kulturmedium resuspendiert und anschließend auf eine Kulturschale ausgesät.

**Cryomedium**.....10 % (v/v) FBS; 10 % (v/v) DMSO in zellspezifischem Kulturmedium

## 8.3 Kultivierung serotonerger Rapheneuronen der Ratte

Primäre serotonerge Rapheneuronen wurden, wie beschrieben [LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2000], von Wistar-Ratten der embryonalen Entwicklungsstadien E14 - E15 isoliert und kultiviert. Die Transfektion der primären Neuronen erfolgte mit *Lipofectamine 2000* (Invirogen) zwischen den Tagen 8 und 14 *in vitro* (Absch. II.8.5.1).

## 8.4 Immunzytochemie (ICC)

Die TPH-Färbung primärer serotonerger Rapheneuronen wurde wie beschrieben durchgeführt [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Zunächst wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 20 min fixiert. Nach Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O für 10 min wurden die Zellen in PBS mit

5 % Kaninchenserum, 0,3 % Triton X-100 und 0,2 % Tween 20 für 30 min blockiert und mit dem  $\alpha$ TPH-Antikörper (Schaf, Chemicon, 1 : 1000) oder dem spezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörper (Kaninchen, eigene Arbeit, 1 : 200) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen mit PBST erfolgte die Hybridisierung des biotinylierten anti-Schaf-Sekundärantikörpers (Kaninchen, Vector, 1 : 500). Die Visualisierung der Färbung erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (ABC Elite, Vector) und DAB-Detektion (SigmaFAST™ DAB with Metal Enhancer, Sigma) nach Protokoll der Hersteller. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und in *Vectashield Mounting Medium* eingedeckelt. Das Weglassen des primären Antikörpers diente als Negativkontrolle.

## 8.5 Manipulation von Säugerzellen

### 8.5.1 Transfektion

Die Transfektion von Zellen erfolgte im allgemeinen durch liposomenvermittelten Gentransfer. Dazu wurden Zellen zu einer Konfluenz von 80 - 95 % auf einer Kulturschale eingesät und mit der entsprechenden Plasmid-DNA mittels *DreamFect* (OZ Biosciences) oder *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Für die Generierung stabiler Zelllinien wurden die Plasmide vorher mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert.

### 8.5.2 Stabile Zelllinien

Zur Generierung stabiler Zelllinien (HEK293, SH-SY5Y, PC12) wurden die Zellen 24 - 48 h nach der Transfektion abhängig vom verwendeten Resistenzgen entweder mit 500  $\mu$ g/mL des Neomycin-Analogons G418 oder Hygromycin für zwei Wochen selektiert. Nach der Selektion wurden die antibiotikaresistenten HEK293-Zellen vereinigt und für die weiterführenden Experimente expandiert. Von den stabilen SH-SY5Y-Zellen wurden aufgrund der heterogenen GNTR-Expression mehrere Zellklone gepickt, expandiert und die exprimierenden Zellen durch Verwendung von GFP als Fluoreszenzmarker mittels FACS (FACSsort™ Cell Sorter, BD) sortiert, expandiert und hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber CB1954 analysiert.

### 8.5.3 Herstellung von rekombinanten Retroviren

Die Herstellung rekombinanter Retroviren erfolgte durch transiente Transfektion der ecotropen Verpackungszelllinie  $\psi$ /Cre (enthalten das Helfergenom, bestehend aus den

---



retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env*) mit dem Plasmid pMSCVhTph2ntrpA (Absch. II.6.5.3). Nach 48 h wurde das mit Retroviren angereicherte Kulturmedium (Virusüberstand) abgenommen, durch einen PVDF-Spritzenfilter (0,45 µm Porengröße, Roth) filtriert und mit Polybren zu einer Endkonzentration von 5 µg/mL versetzt. Polybren, ein Polykation, erleichtert das Eindringen der Viren durch Abschirmung von Ladungen an der Zelloberfläche [DOEBIS *et al.*, 2002]. Zur Generierung der NTR1-Mäuse erfolgte die Injektion der rekombinanten Retroviren mittels Mikroinjektion unter die *Zona pellucida* befruchteter Eizellen (Absch. II.9.2.3).

## 8.6 Proliferationsassays

### 8.6.1 Zellzahlbestimmung durch Auszählen

Um den Einfluss von CB1954 auf die Überlebensrate der Zellen zu untersuchen, wurden COS7-Zellen (pEGFP-C1, pGNTR und pGNTRo) 24 h nach Transfektion in sechsfacher Ausführung auf eine 96-Kavitäten-Platte mit verschiedenen CB1954-Konzentrationen (0 - 150 µM) eingesät. Nach 48 h wurden die überlebenden grünen Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 40, Zeiss) in einem Ausschnitt bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Insgesamt wurde die Zellzahl von sechs zufällig ausgewählten Ausschnitten pro experimenteller Bedingung bestimmt.

### 8.6.2 MTT-Assay

Der MTT-Assay basiert auf der Umwandlung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen in dunkelblaue wasserunlösliche Formazan-Kristalle [MOSMANN, 1983], deren Intensität nach Auflösung in saurem Isopropanol colorimetrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden kann, wodurch Aussagen über die Zytotoxizität der untersuchten Substanz getroffen werden können. Stabile Zellen wurden in vierfacher Ausführung auf eine 24-Kavitäten-Platte (je  $2 \times 10^5$  Zellen) in DMEM ohne PhenolRed mit unterschiedlichen CB1954-Konzentrationen (0 - 100 µM) eingesät. Nach 48 h wurde MTT-Lösung zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/mL zugegeben und die Zellen für weitere 2 h inkubiert. Nach Ablösen und Waschen mit PBS wurden die Zellen zur Auflösung der Formazan-Kristalle in 1 mL MTT-Stopplösung resuspendiert und die Extinktion der Überstände nach Zentrifugation bei 570 nm gemessen.

**CB1954-Lösung**.....0,3 mg/mL (1,2 mM) in DMEM

**4 x MTT-Lösung**.....2 mg/mL in DMEM ohne PhenolRed

MTT-Stopplösung.....0,04 M HCl in Isopropanol

### 8.7 Fluoreszenzmikroskopie

Transient transfizierte COS7-Zellen (pEGFP-C1, pGNTR und pGNTRo) wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24 h mit CB1954 kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und für 10 min mit 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Nach Anfärben der genomischen DNA mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI (1 µg/mL in ddH<sub>2</sub>O) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Moviol auf einem Objektträger fixiert. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem *Axiovert 200*-Mikroskop (Zeiss), ausgestattet mit Phasenkontrast- und Epifluoreszenzoptik.

### 8.8 Lebendzellzahlbestimmung mit Trypanblau

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl einer Zellpopulation wurden 20 µL einer Zellsuspension mit 80 µL einer 0,4 % Trypanblaulösung in HBSS (Gibco) verdünnt und in einer Neugebauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen erscheinen blau, da der Farbstoff durch die permeablen Zellmembranen toter Zellen eindringen und zytoplasmatische Proteinstrukturen anfärben kann. Die Lebendzellzahl einer Zellsuspension berechnet sich aus der Differenz der Gesamtzellzahl und der Anzahl toter Zellen.

## 9 Arbeiten mit Versuchstieren

### 9.1 Tierstämme und Haltung

Für die durchgeführten Experimente wurden die Mauslinien C57BL/6 und FVBN des Stammes *Mus musculus* verwendet. Die Tiere wurden unter kontrolliert pathogenfreien Bedingungen entweder einzeln (Männchen) oder in kleinen Gruppen von 3 bis 6 Tieren in klimatisierten Räumen mit einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 h gehalten. Der Zugang zu Wasser und Futter erfolgte *ad libitum*.

### 9.2 Transgene Techniken

Alle angegebenen Methoden, inklusive der Medien zur Manipulation von Mäuseembryonen wurden, wenn nicht anders angegeben, wie beschrieben durchgeführt [HOGAN *et al.*, 1994].

---

### 9.2.1 Superovulation

Zur Gewinnung von Zygoten wurden weibliche C57BL/6-Spendertiere zur Superovulation stimuliert und mit Männchen des gleichen Stammes verpaart. Für die Superovulation wurden 3 - 4 Wochen alte Weibchen intraperitoneal (i.p.) mit 5 IU PMS (*Pregnant Mares Serum*, Intervent) injiziert. Nach 46 bis 48 h wurde die Ovulation durch Injektion (i.p.) von 5 IU hCG (*human Chorionic Gonadotropin*, Intervent) induziert und 1 : 1-Verpaarungen mit fertilen Männchen angesetzt. Am nächsten Morgen wurden die Weibchen auf einen Vaginalpropf untersucht, der aus koagulierten Proteinen der männlichen Seminalflüssigkeit besteht und indikativ für eine erfolgte Kopulation ist. Tiere mit einem Vaginalpropf wurden für die Isolierung von befruchteten Oozyten verwendet (Absch. II.9.2.2).

### 9.2.2 Isolierung von Zygoten

Die Isolierung der Zygoten erfolgte 0,5 d *post coitum* (p.c.). Dazu wurden die Weibchen durch zervikale Dislokation getötet und die Ovidukte operativ entnommen und in M2-Medium gewaschen. Die von Cumuluszellen umgebenen Zygoten befinden sich zu diesem Zeitpunkt in einer transparenten Verdickung am oberen Ende des Eileiters, der *Ampulla oblongata*. Durch Punktierung der *Ampulla oblongata* wurden die Zygoten in M2-Medium (Sigma) mit 300 µg/mL Hyaluronidase (Sigma) zur Entfernung der Cumuluszellen freigesetzt. Nach Abfallen der Cumuluszellen wurden die Zygoten in M2-Medium gewaschen und bis zur Mikroinjektion in M16-Mikrokulturen überführt. Dazu wurden in der Vorbereitung Tropfen von M16-Medium auf eine Kulturschale gegeben, mit ultraleichtem Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 2 - 3 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> äquilibriert. Die Handhabung der Embryonen erfolgte mit einer Mundkapillare.

<b>M2-Medium</b> .....	94,66 mM NaCl; 4,78 mM KCl; 1,17 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1,19 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,19 mM MgSO <sub>4</sub> ; 4,15 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 20,85 mM HEPES; 23,28 mM Natriumlactat; 0,33 mM Natriumpyruvat; 5,56 mM Glucose; 50 mg/L Penicillin G-Kaliumsalz, 50 mg/L Streptomycinsulfat; 10 mg/L Phenolrot
<b>M16-Medium</b> .....	25 mM NaHCO <sub>3</sub> in M2-Medium

### 9.2.3 Mikroinjektion von Retroviren

Zur Herstellung transgener Mäuse wurden Zygoten superovulierter C57BL/6-Weibchen verwendet (Absch. II.9.2.2). Der Gentransfer erfolgte durch Transduktion mittels

rekombinanter Retroviren (Absch. II.8.5.3), die unter die *Zona pellucida* befruchteter Oozyten injiziert wurden. Die Injektion der Zygoten erfolgte in M2-Medium durch Verwendung einer Mikroinjektionsanlage, die im wesentlichen aus zwei Mikromanipulatoren (TransferMan® Nk 2, Eppendorf), einem Mikroskop (DMIRB, Leica) und einem Mikroinjektor (Transjector 5246, Eppendorf) bestand. Die Injektion erfolgte mit Spüldruck (~ 7 bar) bis ein deutliches Anschwellen der *Zona pellucida* beobachtet wurde. Die manipulierten Embryonen wurden anschließend bis zum Retransfer in M16-Mikrokulturen überführt. Die für die Mikroinjektion benötigten Injektions- und Haltekapillaren wurden von Biomedical Instruments (*Pronucleus Injection Pipette, Type PI-0.4*) und Eppendorf bezogen.

#### 9.2.4 Leihmütter, Vasektomie, Retransfer

Am Vorabend der Mikroinjektion wurden adulte FVB/N-Weibchen durch Verpaarung mit vasektomierten Männchen zur Scheinträchtigkeit stimuliert. Die Vasektomie erfolgte durch die Durchtrennung des Samenleiters (*Vas deferens*), wodurch eine Spermienübertragung unmöglich wird. Die Fähigkeit zur Übertragung von Seminalflüssigkeit bleibt erhalten, so dass die erfolgte Kopulation weiterhin durch das Auftreten eines Vaginalpropfs festgestellt werden kann. Der Retransfer der manipulierten Embryonen wurde nach Narkotisierung der Leihmütter durchgeführt. Durch einen Einschnitt am Rücken wurde das Ovar und ein Teil des Uterus am umgebenen Fettgewebe mit einer Pinzette gegriffen und herausgezogen. Das Ovar und Eileiter umgebene Häutchen wurde aufgerissen, das *Infundibulum* freigelegt und mittels einer Mundkapillare ca. 20 Zygoten in M2-Medium injiziert. Anschließend wurde das Ovar zurück in die Bauchhöhle geschoben und die Wunde mit Wundklammern verschlossen, bevor auf der gegenüberliegenden Seite entsprechend verfahren wurde. Die Geburt der Jungtiere erfolgte nach einer 3-wöchigen Schwangerschaft.

Narkotikum.....150 µg/g Körpergewicht Ketamin, 2 µg/g Körpergewicht  
Rompun in PBS

#### 9.2.5 Schwanzbiopsie

Für die Genotypisierung wurde nach dem Absetzen der potentiell transgenen Jungtiere von der Mutter drei bis vier Wochen nach der Geburt eine Schwanzbiopsie durchgeführt. Dafür wurde den Tieren ca. 2 mm der Schwanzspitze abgeschnitten und für die Isolierung genomischer DNA aufgearbeitet (Absch. II.6.1.1).

### 9.3 Pharmakologische Untersuchungen mit CB1954

Die NTR1-Mäuse wurden zur konditionellen Ablation der serotonergen Neuronen mit 5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid (CB1954) behandelt. Die Tiere erhielten drei Injektionen i.p. von 50 mg/kg Körpergewicht über 6 Tage. Jeden Tag wurden die Tiere visuell hinsichtlich phänotypischer Auffälligkeiten untersucht. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere durch Dekapitation getötet, die Gehirne entnommen und bis zur Aufarbeitung und Bestimmung der 5-HT-Gehalte mittels HPLC-FD bei - 80 °C eingefroren (Absch. II.7.5 und II.7.7).

**CB1954-Stammlösung**.....20 mg/mL CB1954 in NMP:PEG300 (2 : 7)

**CB1954-Lösung**.....5 mg/mL CB1954 in NMP:PEG:Saline (2 : 7 : 31)

### 9.4 Antikörpergenerierung

Für die Generierung der monospezifischen polyklonalen  $\alpha$ TPH-Antikörper wurden die Peptide E<sup>8</sup>NKDHSSERGRVTLI<sup>22</sup> und P<sup>3</sup>AMMMFSSKYWARRG<sup>17</sup> für TPH1 bzw. TPH2 synthetisiert, mit einem Trägermolekül konjugiert und zur Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen injiziert. Die erhaltenen Antiseren wurden hinsichtlich ihrer spezifischen TPH-Reaktivität getestet und durch Isolierung der spezifischen IgG-Fraktion durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Arbeiten erfolgten durch die Firma BioGenes (Potsdam, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers.

### 9.5 Immunhistochemische Methoden

#### 9.5.1 Perfusion

Für den immunhistochemischen Nachweis der TPH2-Expression im Gehirn wurden C57BL/6-Mäuse und Ratten nach Narkotisierung transkardial perfundiert. Nach Öffnung des Brustkorbes wurde eine 27G-Kanüle, verbunden mit einem Schwerkraft-getriebenen Perfusionssystem, in der linken Herzkammer positioniert. Zum Druckausgleich wurde der rechte Vorhof geöffnet, das Blut mit 20 mL PBS ausgewaschen und das Gewebe mit Perfusionslösung I (Maus) oder Perfusionslösung II (Ratte) für die Dauer von 10 min fixiert. Die Gehirne wurden nach der Entnahme zuerst über Nacht bei RT in Perfusionslösung nachfixiert, dann bei 4 °C bis zur Sättigung in Gefrierschutzlösung überführt und abschließend in trockenisgekühltem Hexan bei einer Temperatur von - 50 bis - 60 °C eingefroren. Die Lagerung der Gehirne erfolgte bis zur Durchführung der Cryosektion bei - 80 °C (Absch. II.9.5.2).

- Perfusionslösung I**.....2 % (w/v) Paraformaldehyd; 0,2 % (w/v) Glutaraldehyd;  
0,5 % (v/v) Pikrinsäure in PBS
- Perfusionslösung II**.....4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
- Gefrierschutzlösung**.....30 % (w/v) Saccharose in PBS

### 9.5.2 Immunhistochemie (IHC)

Die Färbungen der Hirnschnitte der Ratten wurden wie von Scheuch *et al.* (2007) beschrieben durchgeführt. Von Gehirnen der Maus wurden 30 µm Coronalschnitte vom caudalen Mittelhirn angefertigt (Cryostat CM 1900, Leica) und in PBS aufgenommen und gewaschen. Glutaraldehydfixierte Gewebe wurden mit 1 % NaBH<sub>4</sub> in PBS für 15 min reduziert und nach Waschen mit PBS für 30 min in Blockierlösung (mit Phenylhydrazin zur Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität) inkubiert. Die Zugabe des primären αTPH2-Antikörpers (Kaninchen, eigene Arbeit, 1 : 100 - 200) erfolgte für 48 h bei 4 °C. Nach Waschen mit PBSTX wurde der biotinkoppelte sekundäre anti-Kaninchen-Antikörper (Ziege, Vector, 1 : 200) über Nacht bei 4 °C zugegeben. Die Visualisierung der Antikörperhybridisierung erfolgte mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex (*Vectastain Elite ABC*, Vector) und DAB-Detektion (*SigmaFAST*) nach Protokoll des Herstellers. Die Schnitte wurden anschließend auf Objektträger aufgezogen, nach Lufttrocknung über eine aufsteigende EtOH-Reihe (70, 90, 95 und 100 %, je 1 min) entwässert und für 10 min in Xylol transferiert, bevor sie mit Roti<sup>®</sup> Histokitt II (Roth) eingedeckelt und über Nacht im Dunkeln ausgehärtet wurden. Alle Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Das Weglassen des primären Antikörpers diente bei allen Färbungen als Negativkontrolle. Die Analyse der Zellen erfolgte mit einem *Axiovert 200*-Mikroskop (Zeiss).

- PBSTX**.....0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
- Blockierlösung**.....10 % (v/v) Ziegen Serum; 0,1 % (w/v) Phenylhydrazin  
in PBSTX
- Primäre Antikörperlösung**.....10 % (v/v) Ziegen Serum; 0,01 % (w/v) Natriumazid;  
0,01 % (w/v) Thimerosal in PBSTX
- Sekundäre Antikörperlösung**.....5 % (v/v) Ziegen Serum in PBSTX

### 9.5.3 *In situ*-Hybridisierung

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden frische Gehirne von NTR1-Mäusen entnommen, auf Trockeneis eingefroren und bei - 80 °C gelagert. Transversale, 7 µm-dicke Cryoschnitte (Cryostat CM 1900, Leica) wurden auf Objektträger aufgezogen, bei 37 °C getrocknet und

in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden erfolgte durch *in vitro*-Transkription mit dem *DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)* nach Angaben des Herstellers (Roche). Die *ntn*-Sonde (kompletter ORF) wurde vom Plasmid pNTR1, linearisiert mit *Spe*I, in Gegenwart von T7-RNA-Polymerase transkribiert. Die *Tph2*-Sonde wurde durch SP6-RNA-Polymerase von dem *Apa*I-linearisierten Plasmid p10p93'13 (Exon 9 bis einschließlich 3'-UTR des *TPH2*-ORFs; Diego J. Walther, MPIMG) generiert. Die hergestellten RNA-Transkripte wurden mit DNase I (RNase-frei, Promega) für 15 min bei 37 °C behandelt mittels Phenol/Chloroformextraktion aufgereinigt, in DEPC-ddH<sub>2</sub>O aufgelöst und bei -20 °C gelagert. Die *in situ*-Hybridisierung erfolgte nach Standardprotokoll der Firma Roche [ROCHE, 2007]. Das Weglassen des primären Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten  $\alpha$ DIG-Antikörpers diente als Negativkontrolle.

## 10 Patientenkollektive

### 10.1 Kollektiv für die RNA-Extraktion

Die Gehirnprouben wurden im Verlauf der Autopsie am Institut für Rechtsmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München entnommen und stammten von 11 Individuen, die infolge der Abhängigkeit von Opiaten starben (8 Männer, 3 Frauen; Durchschnittsalter: 30,4 ± 9,8 Jahre; *post mortem*-Intervall (PMI): 14,5 ± 9,6 h) und von zwei Suizidopfern (1 Mann, 1 Frau; Durchschnittsalter: 55,5 ± 2,1 Jahre; PMI: 11,5 ± 2,1 h). Eine Person verübte einen gewaltsamen Suizid (Elektroschock durch einen Fön in der Badewanne) und die andere führte einen sanften Suizid durch Vergiftung aus. Zu den Schizophreniepatienten lagen keine expliziten Angaben vor; eine Auskunft kann jedoch durch Dr. Peter Zill (LMU, München) erfolgen. Die Kontrollgewebe wurden von 10 Personen entnommen, die plötzlich an Erkrankungen starben, die nicht direkt mit dem ZNS in Verbindung standen (5 Männer, 5 Frauen; Durchschnittsalter 44,7 ± 15,8 Jahre; PMI 19,9 ± 7,6 h). Die Todesursachen waren akuter Herzinfarkt (n = 5), Unfall (n = 3) und Mord (n = 2). Die klinischen und medizinischen Datenblätter der Kontrollindividuen waren dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München zugänglich und gaben keinen Hinweis auf psychiatrische oder neurologische Störungen zu deren Lebzeiten. Entsprechend der medizinischen Aufzeichnungen lag keine Krankengeschichte mit psychopharmakologischer Medikation, Alkohol- oder Drogenmissbrauch vor. Zusätzlich stand ein toxikologischer Bericht aller Individuen zur Verfügung, hingegen fehlten Informationen über vorher vorhandene psychiatrische Störungen bei den Suizidopfern. Alle Individuen waren Kaukasier aus der gleichen geographischen Region Süddeutschlands. Das Projekt

wurde nach den anerkannten Richtlinien der lokalen Ethikkommission der LMU München durchgeführt.

## 10.2 Kollektiv für die SNP *rs4290270*-Genotypisierung

Die Suizidopfer wurden am Institut für Rechtsmedizin der LMU München rekrutiert. Als Aufnahmekriterium galt gesicherter Suizid. Die Fallstudie bestand aus 369 Individuen mit erfolgtem Suizid (269 Männer, 100 Frauen; Durchschnittsalter:  $46,42 \pm 17,77$  Jahre). Von diesen verübten 290 einen gewaltsamen Suizid, z. B. durch Erhängen (36 %), Erschießen (18 %), eindringende Läsionen (7 %), Ertrinken und Springen von Höhen oder vor Züge (17 %). 79 Personen wendeten so genannte sanfte Suizidmethoden an, wie Vergiftung mit Drogen oder anderen Substanzen (21 %). Für die DNA-Extraktion wurden im Verlauf der Autopsie am Institut für Rechtsmedizin der LMU München Blutproben genommen. Es lagen keine Informationen über vorher vorhandene psychiatrische Störungen vor.

Insgesamt wurden 436 Patienten kaukasischer Abstammung mit unipolarer Depression (270 Männer, 166 Frauen; Durchschnittsalter:  $48,69 \pm 14,07$  Jahre), die in die Psychiatrische Abteilung der LMU München eingeliefert und entsprechend der DSM-IV- und ICD-Kriterien diagnostiziert wurden, in die Studie einbezogen. Alle Patienten wurden von erfahrenen Psychiatern entsprechend dem *Structured Clinical Interview for DSM-IV disorders (SCID-I)* befragt. Der Schweregrad der Depression wurde mittels der 17-Punkte Hamilton-Bewertungsskala für Depression (HAMD-17) und der *Clinical Global Impression Scale (CGI)* beurteilt. Nur Personen mit einer minimalen Punktzahl von 18 auf der HAMD-17-Skala wurden in die Studie aufgenommen. Personen mit schweren Organschäden wurden aus der Studie ausgeschlossen, um Fälle von sekundärer Depression zu vermeiden. Weiterhin wurden alle Patienten ausgeschlossen, die komorbid für andere psychiatrische Erkrankungen (z. B. Substanz- oder Alkoholabhängigkeit, Persönlichkeits- und Angststörungen) waren. In dem Patientenkollektiv waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant mehr Frauen als Männer (62 % / 38 % versus 48 % / 52 %;  $p = 0.001$ ,  $c^2 = 11.3$ ,  $df = 1$ ) vertreten. Da es jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der anderen Variablen (Alter, klinische Parameter, wie CGI- und HAMD-17-Werte) gab, wurden Männer und Frauen nicht getrennt voneinander untersucht. Als Kontrollgruppe dienten 373 ethnisch abgestimmte Personen aus der breiten Bevölkerung Süddeutschlands (185 Männer, 188 Frauen; Durchschnittsalter:  $44,42 \pm 16,00$  Jahre). Alle Probanden wurden durch Persönlichkeitsfragebögen (MMPI, NEOFI, TCI) und ein kurzes Interview mit einem Psychiater überprüft, um psychiatrische Probleme auszuschließen. Probanden mit einer bekannten psychiatrischen Krankengeschichte wurden von der Studie ausgeschlossen. Alle Patienten und Kontrollen



waren kaukasischen Ursprungs aus der deutschen Bevölkerung der gleichen geographischen Region Süddeutschlands. Die Studie wurde durch die lokale Ethikkommission genehmigt; Patienten und Kontrollen gaben ihre schriftliche Zustimmung zur Studie.

### 10.3 SNP *rs4290270*-Genotypisierung

Die Genotypisierung des *TPH2*-SNPs c.1125A>T (GenBank *rs4290270*) erfolgte durch Anwendung der *TaqMan*<sup>®</sup>-Technologie (*Assay-on-Demand*) mit dem ABI7000-System (Applied Biosystems) und der Assay-ID: C\_26385365 [ZILL *et al.*, 2004]. Die PCR-Reaktion wurde standardmäßig mit dem *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix Reagent Kit* in einem 10 µl Volumen durchgeführt (Applied Biosystems, nach Angaben des Herstellers).

## 11 Statistik

Die statistische Auswertung der Datenreihen erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2003. Alle in den Diagrammen dargestellten Werte sind, wenn nicht anders angegeben, die Mittelwerte der Datenreihen mit den dazugehörigen Mittelabweichungen als Fehlerbalken. Das Signifikanzniveau zwischen Datenreihen wurde mit dem STUDENT *t*-Test (zweiseitig, Typ 3) ermittelt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant betrachtet, Irrtumswahrscheinlichkeiten zwischen  $0,09 > p \geq 0,05$  wurden als statistischer Trend angesehen.

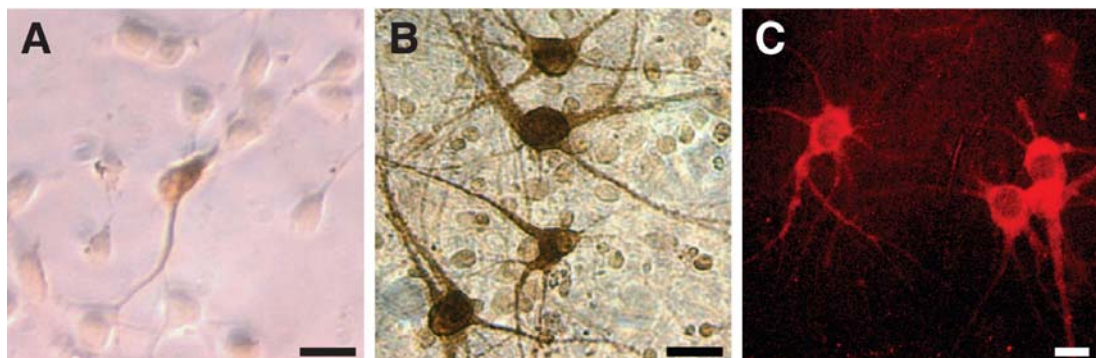
### III Ergebnisse

#### 1 Generierung transgener NTR1-Mäuse

##### 1.1 Die Aktivität des humanen *Tph2*-Promotors in *Rodentia*

###### 1.1.1 Primäre 5-HT-Rapheneuronen der Ratte

Die Verwendung des NTR/CB1954-Systems *in vivo* erfordert die spezifische Expression des bakteriellen *ntr*-Gens in den Zielzellen, um eine systemische Schädigung des Organismus nach CB1954-Applikation zu vermeiden. Die Spezifität der NTR-Expression in den serotonergen Neuronen der Maus sollte durch Verwendung des 4 kb-Fragmentes des putativen humanen *Tph2*-Promotors gewährleistet werden, dessen Aktivität zunächst in murinen Zellen überprüft werden musste. Dazu wurden serotonerge Neuronen der Raphe von Rattenembryonen (r5HT, E14 - E15) isoliert, kultiviert [LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2000] und hinsichtlich der TPH-Expression charakterisiert.



**Abbildung III.1** Primäre serotonerge Rapheneuronen der Ratte exprimieren selektiv TPH2. (A) Nachweis der TPH-Expression durch Verwendung des unspezifischen  $\alpha$ TPH-Antikörpers, der sowohl TPH1 als auch TPH2 erkennt. Am Tag 1 *in vitro* exprimieren nur vereinzelte, unreife Neuronen TPH. (B) Anzahl und Differenzierungsgrad der TPH-immunoreaktiven Neuronen nimmt bis zum Tag 8 *in vitro* weiter zu. Die schrittweise Reifung der serotonergen Neuronen wird durch die Ausbildung von Axonen und dendritischen Verzweigungen deutlich. (C) Nachweis der TPH2-Expression am Tag 10 *in vitro* mit dem monospezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörper (Absch. III.3). Maßstab: 10  $\mu$ M.

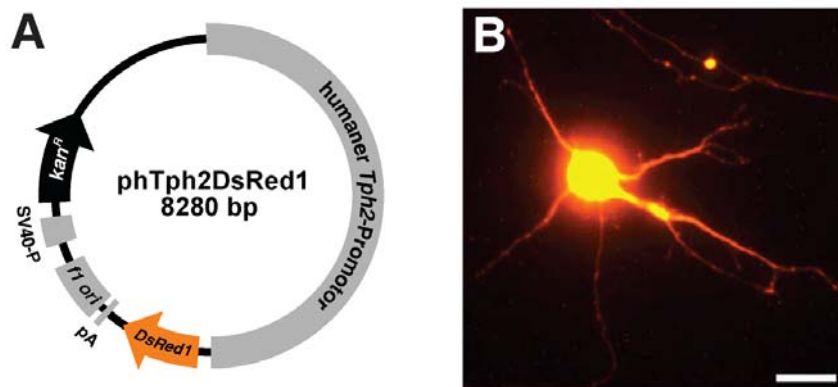
###### 1.1.2 TPH2-Expression in murinen 5-HT-Rapheneuronen

Die ersten TPH-immunoreaktiven Neuronen wurden am Tag 1 *in vitro* detektiert (Abb. III.1A), deren Anzahl mit anhaltender Kultivierungsdauer weiter zunahm, wobei sich die schrittweise Reifung der serotonergen Neuronen durch die Ausbildung von Axonen und dendritischen Verzweigungen zeigte (Abb. III.1B). Am Tag 14 *in vitro* exprimierten 8 - 10 % der kultivierten Neuronen TPH. Da der verwendete  $\alpha$ TPH-Antikörper beide Isoformen erkennt, wurde die TPH2-Expression durch qPCR validiert und zeigte eine

starke *Tph2*-Expression von  $25,1 \pm 6,1$  % normalisiert auf *Gapdh*. Die Expression von *Tph1* konnte hingegen in cDNAs von drei verschiedenen Neuronenpräparationen zwischen Tag 10 und 12 *in vitro* nicht nachgewiesen werden [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte die TPH2-Expression durch den im Verlauf dieser Arbeit generierten monospezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörper durch Westernblotanalyse und Immunfluoreszenzfärbung in den etablierten primären r5HT-Kulturen auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. III.1C; Absch. III.3).

### 1.1.3 Expression des Reportergens *DsRed* in 5-HT-Neuronen

Um die Funktionalität des humanen *Tph2*-Promotors in der Ratte zu überprüfen, wurden primäre r5HT-Rapheneuronen mit dem Reporterkonstrukt pH*Tph2DsRed1* transfiziert (Abb. III.2A) [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Bereits zwei Tage nach Transfektion konnte eine starke Expression des Reportergens *DsRed* in Perikaryon, Axon und Dendriten der r5HT-Neuronen beobachtet werden (Abb. III.2B), im Gegensatz zu den nicht-neuronalen Zellen der Primärkultur. Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Transfektion eines 1 kb-Promotorfragmentes erreicht, allerdings war die beobachtete Fluoreszenz deutlich schwächer (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das 4 kb-Fragment des humanen *Tph2*-Promotors für die Generierung transgener Mäuse verwendet.

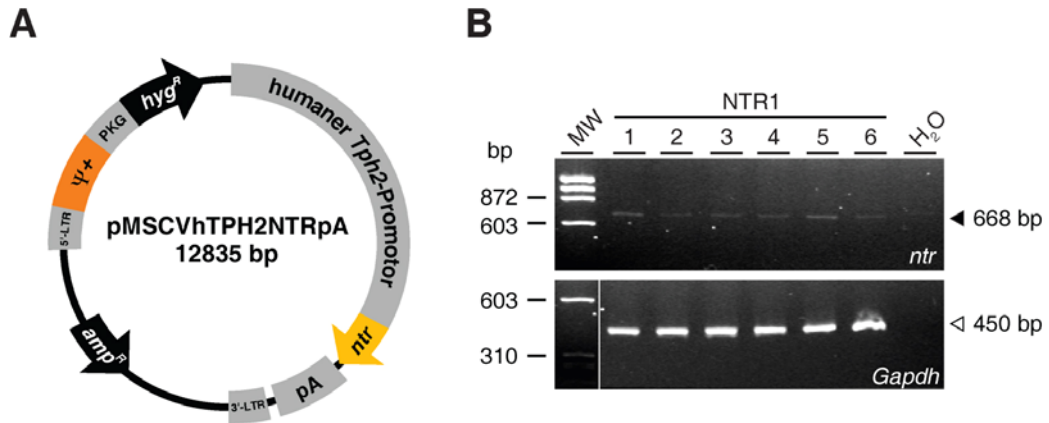


**Abbildung III.2** Der humane *Tph2*-Promotor ist in serotonergen Rapheneuronen der Ratte aktiv. (A) Graphische Darstellung des Reporterkonstruktes pH*Tph2DsRed1*. (B) Expression des Reportergens *DsRed* in primären 5-HT-Rapheneuronen der Ratte [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Maßstab: 10  $\mu$ M.

## 1.2 NTR1-Tiere durch retroviralen Gentransfer

Die Generierung der transgenen NTR1-Mäuse erfolgte durch Transduktion von Zygoten mit rekombinanten, replikationsinkompetenten Retroviren (auf der Basis des murinen embryonalen Stammzellvirus, MESC), die durch Transfektion der Verpackungszelllinie

$\psi$ /Cre mit dem Konstrukt pMSCVhTph2NTRpA erhalten wurden (Abb. III.3A). Nach Transfer der manipulierten Embryonen in Leihmütter wurden 21 Nachkommen ausgetragen und 18 Foundertiere (78 %) durch PCR identifiziert (Daten nicht gezeigt). Von sechs Foundertieren wurden die Mauslinien NTR1/1 bis NTR1/6 etabliert.

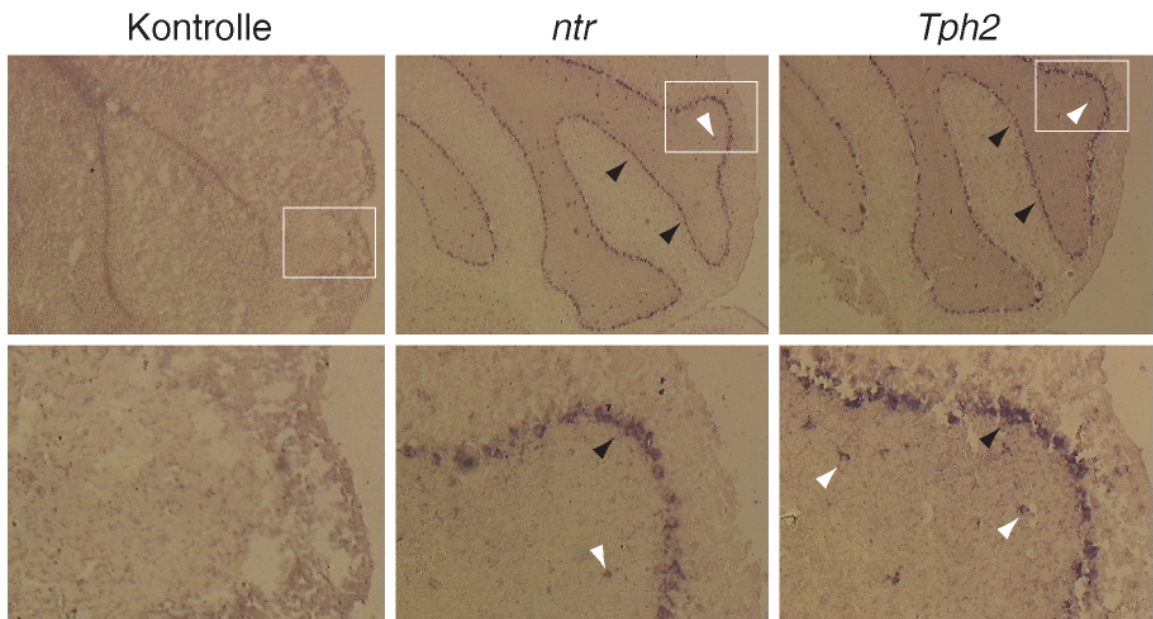


**Abbildung III.3** Expression der Nitroreduktase (*ntr*) im Gehirn transgener Mäuse. **(A)** Graphische Darstellung des retroviralen Expressionskonstruktes pMSCVhTph2NTRpA. **(B)** Semiquantitative RT-PCR der *ntr*-Expression in F1-Tieren der Mauslinien NTR1/1-6. mit *Gapdh* als Ladekontrolle. MW:  $\phi$ X174/*Hinf*I

### 1.3 NTR-Expressionsnachweis im Gehirn

Die Keimbahntransmission des Transgens von den Foundern auf die Nachkommen der F1-Generation wurde durch semiquantitative RT-PCR überprüft. Die Expression des *ntr*-Gens konnte im Gehirn aller etablierten Mauslinien nachgewiesen werden (Abb. III.3B) und bestätigte die Aktivität des humanen *Tph2*-Promotors in der Maus. Die stärksten Signale wurden in den Mauslinien NTR1/1 und NTR1/5 detektiert (Abb. III.3B).

Die Lokalisation der *ntr*-Expression im Gehirn (NTR1/5) erfolgte durch nicht-radioaktive *in situ*-Hybridisierung von transversalen Gehirnschnitten mit einer *ntr*-spezifischen RNA-Sonde. Dabei wurden starke Signale im Cerebellum detektiert, die sich überwiegend in der Purkinje-Zellschicht und vereinzelt im Bereich der Granulazellen fanden (Abb. III.4). Da den Signalen jedoch die typische Zellmorphologie fehlte, handelt es sich dabei wahrscheinlich um Projektionen serotonerger Rapheneuronen zum Cerebellum. Die Expression der *Tph2* kolokalisierte perfekt mit den Signalen der *ntr*-Sonde und zeigte die spezifische Expression der Nitroreduktase in den serotonergen Neuronen. Da kein kommerzieller  $\alpha$ NTR-Antikörper zur Verfügung stand, konnte der NTR-Nachweis auf Proteinebene hingegen nicht erfolgen.



**Abbildung III.4** Die Koexpression von *ntr* und *Tph2* im Cerebellum transgener Mäuse. Transversale Gehirnschnitte des Cerebellums der Mauslinie NTR1/5 (oben, Kantenlänge ~ 2 mm). Ausschnittsweise Vergrößerung der eingerahmten Bereiche (unten). Weiße und schwarze Pfeilspitzen markieren Afferenzen der 5-HT-Rapheneuronen zu den Granula- bzw. Purkinjzellschicht im Cerebellum.

#### 1.4 Vorversuche mit CB1954

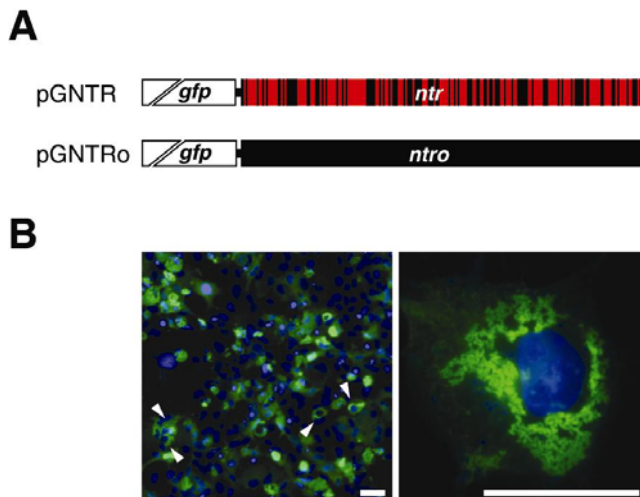
Transgenen Mäusen der Linien NTR1/1 und NTR1/5 wurde in Vorversuchen das Protoxin CB1954 verabreicht, um die Ablation der serotonergen Neuronen zu induzieren. Die CB1954-behandelten Tiere zeigten jedoch im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen eindeutigen Phänotyp, der auf eine verminderte serotonerge Neurotransmission schließen ließ. Die Messung der 5-HT-Gehalte im Gehirn CB1954-behandelter NTR1-Mäuse ergab keine signifikante Reduzierung im Vergleich zu den Kontrolltieren und spiegelte den fehlenden Phänotyp auf molekularer Ebene wider (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der schwachen Expression des Transgens in den NTR1-Mäusen, der fehlenden Möglichkeit die NTR auf Proteinebene nachzuweisen und dem mangelnden Phänotyp nach CB1954-Applikation wurde beschlossen, dass NTR/CB1954-System *in vitro* zu verifizieren (Absch. III.2).



## 2 *In vitro*-Charakterisierung des NTR/CB1954-Systems

### 2.1 Proteinaggregation nach *gntr*-Expression in COS7-Zellen

Aufgrund der Ergebnisse mit den transgenen NTR1-Mäusen sollte die Wirksamkeit des NTR/CB1954-Systems in Zellkultur verifiziert werden. Um eine Aussage über die Effizienz der Genexpression des bakteriellen Nitroreduktasegens (*ntr*) in Säugerzellen zu treffen, wurde ein *gfp/ntr*-Fusionskonstrukt (pGNTR) hergestellt, um die Expression des GNTR-Fusionsproteins mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Immundetektion zu analysieren (Abb. III.5A). Interessanterweise wurden in ca. 10 % der pGNTR-transfizierten COS7-Zellen perinukleäre Proteinaggregate im Zytoplasma 48 h nach der Transfektion detektiert (Abb. III.5B), die auf eine beeinträchtigte Translation des GNTR-Fusionsproteins hindeuteten.



**Abbildung III.5** Die Expression des bakteriellen *gntr*-Gens in COS7-Zellen führt zur Proteinaggregation. (A) Schematische Darstellung der relevanten kodierenden Bereiche der Expressionskonstrukte pGNTR und pGNTRo. Zahlreiche synonyme Codone der bakteriellen *ntr*-Gensequenz sind kritisch (rote Balken) für die Expression in Säugerzellen und wurden in pGNTRo auf die Präferenzen der Maus angepasst (schwarze Balken). Beide Gene wurden N-terminal mit *gfp* fusioniert. (B) Nachweis perinukleärer Proteinaggregate (weiße Pfeilspitzen) in ca. 10 % der *gntr*-exprimierenden COS7-Zellen 48 h nach der Transfektion. Die GFP-markierte Nitroreduktase (grün) und DAPI-gefärbten Zellkerne (blau) sind übereinander gelagert dargestellt. Maßstab: 50 µM.

Deshalb kam die Frage auf, ob Unterschiede im synonymen Codongebrauch zwischen Prokaryoten und *Mammalia* für die beobachtete Aggregation des GNTR-Fusionsproteins verantwortlich sind. In der Tat zeigte der Vergleich des synonymen Codongebrauchs von *E. coli* und *M. musculus*, dass ca. 60 % der bakteriellen *ntr*-Codone im Genom der Maus unterrepräsentiert sind, was die beobachteten translationellen Probleme erklären könnte (Tabelle III.1). Die Tabellen für den synonymen Codongebrauch beider Spezies wurden von der Webseite [www.kazusa.or.jp](http://www.kazusa.or.jp) entnommen [NAKAMURA *et al.*, 2000].

**Tabelle III.1** Der synonyme Codongebrauch des *E. coli*-Nitroreduktasegens (*ntr*) und der codonoptimierten synthetischen *ntr*-Version, in der kritische Codone an die Präferenzen der Maus (*M. Musculus*) angepasst wurden.

AS	Codon	Häufigkeit (%) <sup>#</sup>		Anzahl		Häufigkeit (%)		
		<i>E. coli</i>	<i>M. musculus</i>	<i>ntr</i>	<i>ntr</i>	<i>ntr</i>	<i>ntr</i>	
A	Ala	GCT	15	30	4	19	15	70
		GCC	28	42	12	8	44	30
		GCA	21	22	5	-	19	-
R	Arg	GCG	36	6	6	-	22	-
		CGT	35	12	5	-	71	-
		CGC	40	18	2	-	29	-
		CGA	5	11	-	-	-	-
		CGG	11	19	-	-	-	-
		AGA	5	17	-	-	-	-
N	Asn	AGG	4	22	-	7	-	100
		AAT	57	40	1	-	13	-
		AAC	43	60	7	8	88	100
D	Asp	GAT	66	30	13	11	76	65
		GAC	34	70	4	6	24	35
		TGT	42	42	1	-	100	-
C	Cys	TGC	58	58	-	1	-	100
		CAA	35	13	2	-	29	-
Q	Gln	CAG	65	87	5	7	71	100
		GAA	62	36	9	5	69	38
E	Glu	GAG	38	64	4	8	31	62
		GGT	30	22	8	-	73	-
G	Gly	GGC	41	35	3	11	27	100
		GGA	10	21	-	-	-	-
		GGG	18	23	-	-	-	-
		CAT	56	37	4	-	57	-
H	His	CAC	44	63	3	7	43	100
		ATT	48	32	2	-	29	-
I	Ile	ATC	45	55	5	7	71	100
		ATA	7	13	-	-	-	-
		TTA	14	6	2	-	11	-
L	Leu	TTG	15	13	-	-	-	-
		CTT	11	12	2	-	11	-
		CTC	12	18	3	3	16	16
		CTA	3	8	1	-	5	-
		CTG	45	42	11	16	58	84
		AAA	77	35	14	3	78	17
K	Lys	AAG	23	65	4	15	22	83
		ATG	100	100	5	5	100	100
		TTT	61	34	6	-	55	-
M	Met	TTC	39	66	5	11	45	100
		CCT	14	26	-	6	-	75
P	Pro	CCC	6	35	1	2	13	25
		CCA	18	28	1	-	13	-
		CCG	61	11	6	-	75	-
		TCT	15	16	2	-	15	-
		TCC	14	26	4	3	31	23
		TCA	11	13	-	-	-	-
S	Ser	TCG	20	5	1	-	8	-
		AGT	16	13	1	-	8	-
		AGC	25	28	5	10	38	77
		ACT	14	24	1	-	9	-
		ACC	47	35	6	11	55	100
		ACA	11	32	-	-	-	-
W	Trp	ACG	27	9	4	-	36	-
		TGG	100	100	3	3	100	100
Y	Tyr	TAT	69	40	1	-	25	-
		TAC	31	60	3	4	75	100
V	Val	GTT	25	14	8	-	40	-
		GTC	18	28	4	-	20	-
		GTA	14	7	2	-	10	-
		GTG	43	51	6	20	30	100
		TAA	64	24	1	-	100	-
*	Stop	TAG	9	41	-	-	-	-
		TGA	27	34	-	1	-	100

<sup>#</sup> basierend auf [www.kazusa.or.jp](http://www.kazusa.or.jp)

## 2.2 Codonoptimierung des bakteriellen *ntr*-Gens

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine synthetische Version des *ntr*-Gens hergestellt, in der alle seltenen Codone des *E. coli*-Gens durch die bevorzugten synonymen Codone des Mausgenoms ausgetauscht wurden (Abb. III.6). Da die notwendigen Veränderungen für eine klassische Optimierung durch Punktmutagenese zu

zahlreich waren, wurde das codonoptimierte *ntro*-Gen vollständig *de novo* synthetisiert. Insgesamt wurden 144 Basenaustausche in 124 Codonen vorgenommen, ohne die deduzierte Aminosäuresequenz des *ntr*-Gens zu verändern. Die codonoptimierte NTR-Version wurde mit *ntro* bezeichnet.

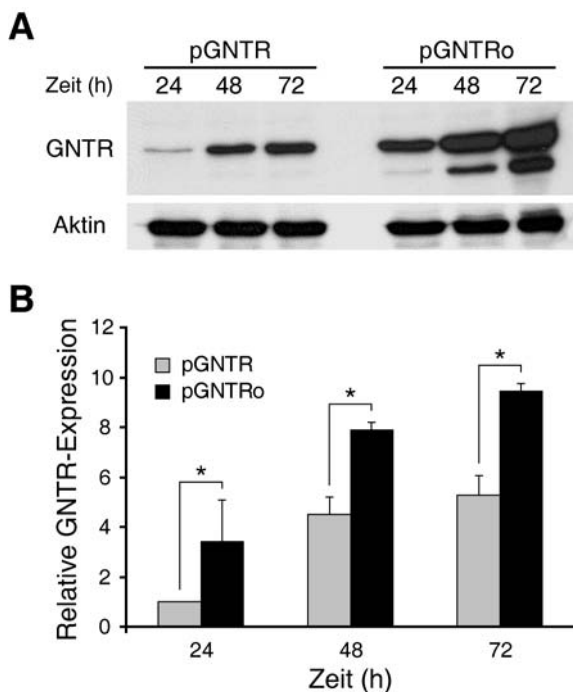
	M	D	I	I	S	V	A	L	K	R	H	S	T	K	A	F	D
<i>ntr</i>	ATG	GAT	ATC	ATT	TCT	GTC	GCC	TTA	AAG	CGT	CAT	TCC	ACT	AAG	GCA	TTT	GAT
<i>ntro</i>	----	--C	----	--C	AGC	--G	--T	C-G	----	A-G	--C	----	--C	----	--T	--C	--C
	A	S	K	K	L	T	P	E	Q	A	E	Q	I	K	T	L	L
<i>ntr</i>	GCC	AGC	AAA	AAA	CTT	ACC	CCG	GAA	CAG	GCC	GAG	CAG	ATC	AAA	ACG	CTA	CTG
<i>ntro</i>	--T	TC-	--G	----	--G	----	--T	----	----	----	----	----	----	--G	--C	--G	--C
	Q	Y	S	P	S	S	T	N	S	Q	P	W	H	F	I	V	A
<i>ntr</i>	CAA	TAC	AGC	CCA	TCC	AGC	ACC	AAC	TCC	CAG	CCG	TGG	CAT	TTT	ATT	GTT	GCC
<i>ntro</i>	--G	----	----	--T	AG-	TC-	----	----	AG-	----	--T	----	--C	--C	--C	--G	--T
	S	T	E	E	G	K	A	R	V	A	K	S	A	A	G	N	Y
<i>ntr</i>	AGC	ACG	GAA	GAA	GGT	AAA	GCG	CGT	GTT	GCC	AAA	TCC	GCT	GCC	GGT	AAT	TAC
<i>ntro</i>	----	--C	--G	----	--C	----	--T	A-G	--G	--T	--G	AG-	--C	--T	--C	--C	----
	V	F	N	E	R	K	M	L	D	A	S	H	V	V	V	F	C
<i>ntr</i>	GTG	TTC	AAC	GAG	CGT	AAA	ATG	CTT	GAT	GCC	TCG	CAC	GTC	GTG	GTG	TTC	TGT
<i>ntro</i>	----	----	----	----	A-G	--G	----	--G	----	--T	AGC	----	--G	----	----	----	--C
	A	K	T	A	M	D	D	V	W	L	K	V	V	D	Q	Q	E
<i>ntr</i>	GCA	AAA	ACC	GCG	ATG	GAC	GAT	GTC	TGG	CTG	AAG	CTG	GTT	GTT	GAC	CAG	GAA
<i>ntro</i>	--T	--G	----	--C	----	----	----	--G	----	----	----	----	--G	--G	--T	----	----
	D	A	D	G	R	F	A	T	P	E	A	K	A	A	N	D	K
<i>ntr</i>	GAT	GCC	GAT	GGC	CGC	TTT	GCC	ACG	CCG	GAA	GCG	AAA	GCC	GCG	AAC	GAT	AAA
<i>ntro</i>	----	--T	----	----	A-G	--C	--T	--C	--T	----	--T	--G	----	--T	----	--C	--G
	G	R	K	F	F	A	D	M	H	R	K	D	L	H	D	D	A
<i>ntr</i>	GGT	CGC	AAG	TTC	TTC	GCT	GAT	ATG	CAC	CGT	AAA	GAT	CTG	CAT	GAT	GAT	GCA
<i>ntro</i>	--C	A-G	----	----	----	--C	--C	----	----	A-G	--G	----	----	--C	----	----	--T
	E	W	M	A	K	Q	V	Y	L	N	V	G	N	F	L	L	G
<i>ntr</i>	GAG	TGG	ATG	GCA	AAA	CAG	GTT	TAT	CTC	AAC	GTC	GGT	AAC	TTC	CTG	CTC	GGC
<i>ntro</i>	----	----	----	--C	--G	----	--G	--C	--G	----	--G	--C	----	----	----	----	----
	V	A	A	L	G	L	D	A	V	P	I	E	G	F	D	A	A
<i>ntr</i>	GTG	GCG	GCT	CTG	GGT	CTG	GAC	GCG	GTA	CCC	ATC	GAA	GGT	TTT	GAC	GCC	GCC
<i>ntro</i>	----	--T	--C	----	--C	--C	--T	--T	--G	----	----	----	--C	--C	--T	--T	--T
	I	L	D	A	E	F	G	L	K	E	K	G	Y	T	S	L	V
<i>ntr</i>	ATC	CTC	GAT	GCA	GAA	TTT	GGT	CTG	AAA	GAG	AAA	GGC	TAC	ACC	AGT	CTG	GTG
<i>ntro</i>	----	--G	----	--C	--G	--C	--C	----	--G	----	----	----	----	----	--C	----	----
	V	V	P	V	G	H	H	S	V	E	D	F	N	A	T	L	P
<i>ntr</i>	GTT	GTT	CCG	GTA	GGT	CAT	CAC	AGC	GTT	GAA	GAT	TTT	AAC	GCT	ACG	CTG	CCG
<i>ntro</i>	--G	--G	--T	--G	--C	--C	----	----	--G	--G	--C	--C	----	----	--C	----	--T
	K	S	R	L	P	Q	N	I	T	L	T	E	V	*			
<i>ntr</i>	AAA	TCT	CGT	CTG	CCG	CAA	AAC	ATC	ACC	TTA	ACC	GAA	GTG	TAA			
<i>ntro</i>	--G	AGC	A-G	----	--C	--G	----	----	----	C-G	----	--G	----	--G			

**Abbildung III.6** Nukleotid- und deduzierte Aminosäuresequenz der Nitroreduktase-cDNA von *E. coli*. Die eingefügten Punktmutationen der *ntro*-Sequenz sind unter den ausgetauschten Nukleotiden dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren sind über den einzelnen Codonen angezeigt.



### 2.3 Expression des codonoptimierten *gntr*-Gens in COS7-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Codonoptimierung eine effizientere Expression in *Mammalia* bewirkt, wurde das synthetische *ntro*-Gen ebenfalls mit *gfp* fusioniert (pGNTRo; Abb. III.5A) und in COS7-Zellen exprimiert. In der Tat konnten die zytoplasmatischen Proteinaggregate *gntr*-exprimierender Zellen nicht länger in *gntr*-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin war die Expression des GNTR-Fusionsproteins nach Codonoptimierung im Vergleich zu *gntr*-exprimierenden Zellen deutlich verbessert (Abb. III.7). Die Quantifizierung der Proteinmengen durch Westernblotanalyse ergab 3,4-fach höhere Werte in *gntr*-exprimierenden Zellen 24 h nach der Transfektion. Die erhöhte *gntr*-Expression blieb über einen Zeitraum von 48 bis 72 h stabil, mit einer durchschnittlichen Verdopplung der GNTR-Proteingehalte im Vergleich zum wt-Gen (Abb. III.7B).

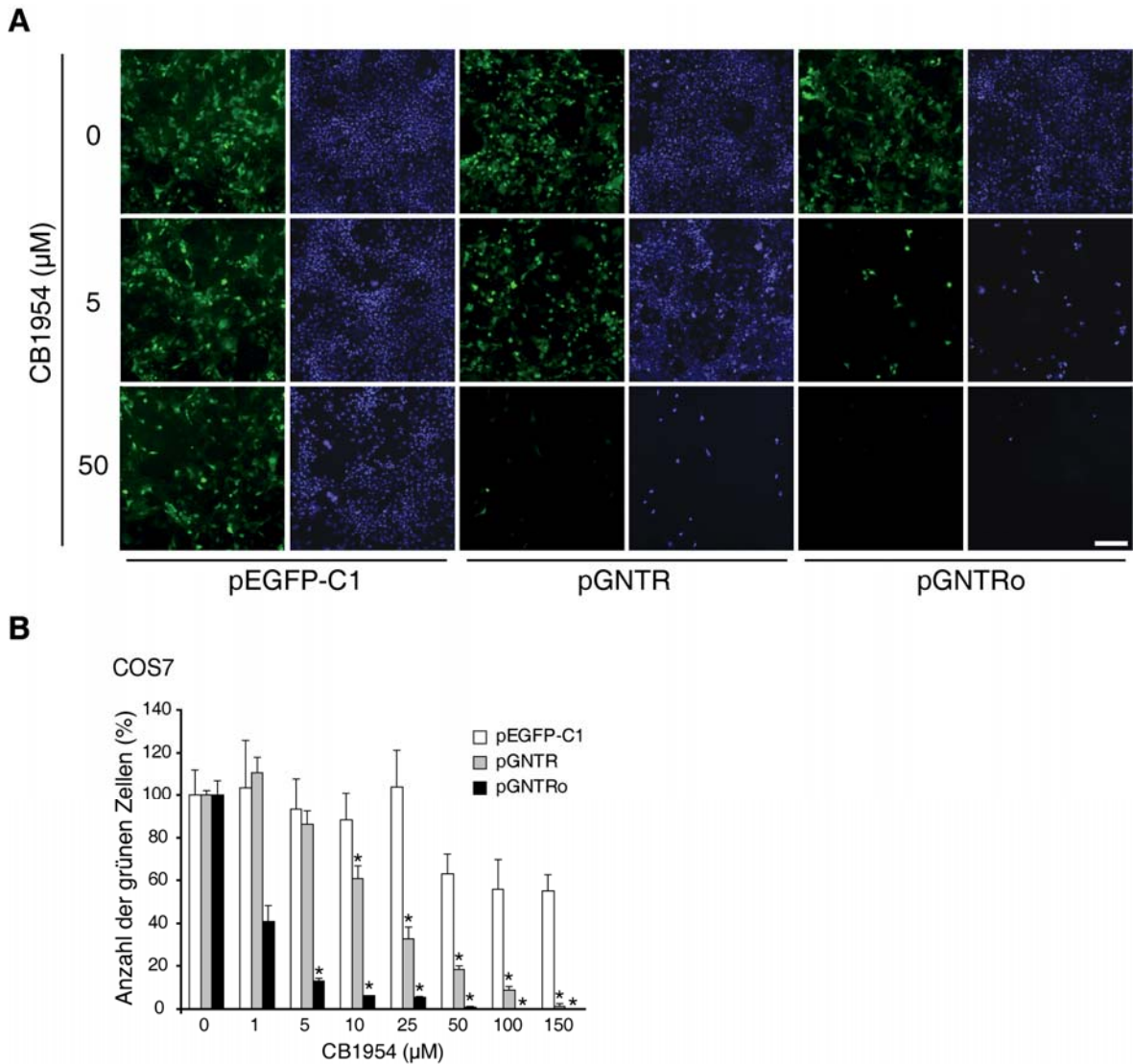


**Abbildung III.7** Zeitverlauf der Proteinexpression in pGNTR- und pGNTRo-transfizierten COS7-Zellen. **(A)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die löslichen Fraktionen der zellulären Lysate durch Immundetektion mit  $\alpha$ GFP- und  $\alpha$ Aktin-Antikörpern (Ladkontrolle) analysiert. **(B)** Densitometrische Auswertung der GNTR-Proteingehalte normalisiert auf Aktin. Die kombinierten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

### 2.4 Sensitivität GNTR-exprimierender COS7-Zellen gegenüber CB1954

Um die enzymatische Aktivität der GFP-markierten Nitroreduktase zu testen, wurden Zytotoxizitätsassays durchgeführt, um die Sensitivität der beiden GNTR-exprimierenden Zelllinien gegenüber dem Protoxin CB1954 zu bestimmen (Abb. III.8A). Dazu wurden transfizierte COS7-Zellen für 24 h mit unterschiedlichen CB1954-Konzentrationen behandelt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Eine effiziente Ablation *gntr*-exprimierender Zellen konnte bei 50  $\mu$ M CB1954 nachgewiesen werden, hingegen

zeigten *gntro*-exprimierende Zellen vergleichbare Ergebnisse schon bei einer 10-fach geringeren Protoxinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  CB1954 (Abb. III.8A). Die *gfp*-exprimierenden Kontrollzellen wurden hingegen nicht durch 5  $\mu\text{M}$  CB1954 beeinträchtigt, zeigten jedoch eine unspezifische Hemmung der Zellproliferation bei 50  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung III.8** GNTR-exprimierende COS7-Zellen sind sensitiv gegenüber dem Protoxin CB1954. COS7-Zellen, transduziert mit pGNTR, pGNTRo oder pEGFP-C1 (Kontrolle), wurden in Anwesenheit zunehmender CB1954-Konzentrationen kultiviert. (A) Die Überlebensrate der transduzierten Zellen (grün) wurde 24 h nach Zugabe von CB1954 mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Anfärbung der DNA erfolgte mit DAPI (blau). Maßstab: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Quantifizierung des CB1954-vermittelten Zelltodes durch Auszählen der überlebenden GNTR-exprimierenden Zellen (grün). *Gntro*-exprimierende Zellen wurden bei Protoxinkonzentrationen von < 25  $\mu\text{M}$  nahezu vollständig dezimiert, wobei ein vergleichbarer Effekt in *gntro*-exprimierenden Zellen erst bei CB1954-Konzentrationen von > 100  $\mu\text{M}$  beobachtet wurde. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei unabhängigen Wiederholungen. \*: t-Test 2;3  $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

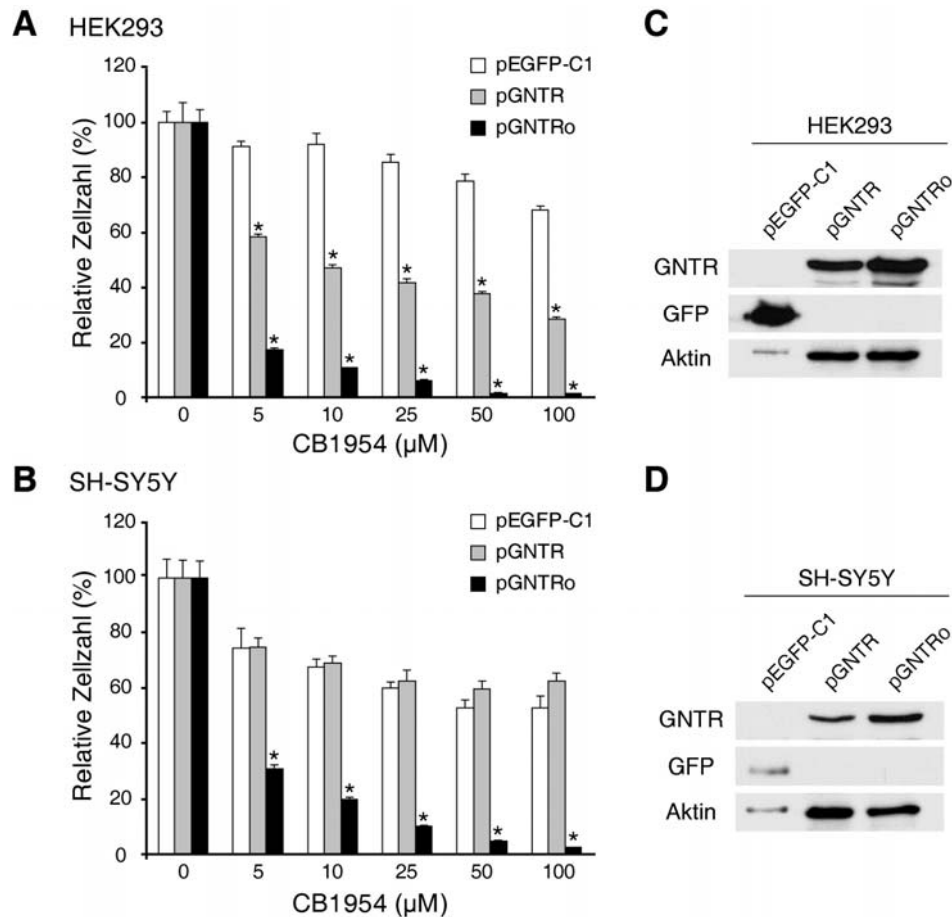
Um den effektiven Konzentrationsbereich weiter einzuschränken, wurden transfizierte COS7-Zellen über einen Zeitraum von 48 h mit 0 bis 150  $\mu\text{M}$  CB1954 kultiviert (Abb. III.8B). Dabei reagierten *gntro*-exprimierende Zellen bereits auf 1  $\mu\text{M}$  CB1954 mit einer Reduktion der Zellzahl um 59 %. Hingegen wurde bei *gntr*-exprimierenden Zellen kein Effekt beobachtet und erst bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  CB1954 starben 39 % bzw. 67 % der Zellen ab. Bei diesen Konzentrationen überlebten nur 5 % der *gntro*-exprimierenden Zellen. Eine vergleichbare Zellablation *gntr*-exprimierender Zellen konnte erst bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  CB1954 nachgewiesen werden (Abb. III.8B). Allerdings war bei diesen hohen Konzentrationen auch die Anzahl der *gfp*-exprimierenden Kontrollzellen reduziert. Die mikroskopische Analyse zeigte jedoch, dass dieser Rückgang auf eine Hemmung der Zellproliferation zurückzuführen war (Daten nicht gezeigt).

## 2.5 CB1954-Sensitivität stabiler Zelllinien

COS7-Zellen stellen ein sehr artifizielles System der ektopischen Genexpression dar [MELLON *et al.*, 1981], weshalb stabile Zelllinien verschiedener Gewebe benötigt wurden, um die Verbesserung des codonoptimierten NTR/CB1954-Systems unter nativen Bedingungen zu bestätigen. Dazu wurden humane embryonale Nieren- (HEK293) und humane Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y), die stabil *gntr*, *gntro* und *gfp* (Kontrolle) exprimieren, generiert und mit unterschiedlichen CB1954-Konzentrationen behandelt (Abb. III.9). Nach 48 h konnten wiederum markante konzentrationsabhängige Unterschiede in den Überlebensraten der einzelnen Zelllinien detektiert werden (Abb. III.9A, B). Beide *gntro*-exprimierenden Zelllinien, HEK293 und SH-SY5Y, zeigten schon bei 5  $\mu\text{M}$  CB1954 einen starken Rückgang der jeweiligen Zellzahlen um 83 % bzw. 70 % im Vergleich zu den Kontrollzellen; bei 50  $\mu\text{M}$  CB1954 konnten kaum noch lebende Zellen nachgewiesen werden. CB1954 bewirkte jedoch auch einen konzentrationsabhängigen Rückgang der absoluten Zellzahl in *gntr*-exprimierenden HEK293-Zellen, jedoch war ihre Sensitivität gegenüber *gntro*-exprimierenden Zellen deutlich schwächer. Tatsächlich überlebten 58 % der *gntr*-exprimierenden HEK293-Zellen eine Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und selbst bei 100  $\mu\text{M}$  waren erst 72 % der Zellen im betrachteten Zeitraum abgestorben (Abb. III.9A).

Überraschenderweise hatte die Expression von *gntr* in SH-SY5Y-Zellen keinen Effekt auf die Sensitivität gegenüber CB1954 (Abb. III.9B). Der beobachtete Rückgang der Zellzahl von ca. 40 % unterschied sich nicht von dem der *gfp*-exprimierenden Kontrollzellen und wurde wahrscheinlich durch eine CB1954-vermittelte Inhibierung der Zellproliferation verursacht, da durch mikroskopische Analyse keine toten Zellen nachgewiesen werden

konnten. Die Ergebnisse waren konsistent mit anderen neuronalen (NG108-15) oder neuroendokrinen Zelllinien (SH-P77 und P815), die im Verlauf der Arbeit getestet wurden (Daten nicht gezeigt) und sind wahrscheinlich auf Unterschiede im gewebespezifischen Codongebrauch zurückzuführen [DITTMAR *et al.*, 2006; PLOTKIN *et al.*, 2004].



**Abbildung III.9** Toxizität von CB1954 in stabilen GNTR-exprimierenden humanen Zelllinien. (A) HEK293- und (B) SH-SY5Y-Zellen wurden stabil mit pGNTR, pGNTRo oder pEGFP-C1 (Kontrolle) transfiziert und mit verschiedenen CB1954-Konzentrationen kultiviert. Die Bestimmung der relativen Zellvitalität erfolgte nach 48 h durch MTT-Assays. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt (n = 3). \*: t-Test 2;3 p < 0,05; n = 4 bzw. n = 3. (C, D) Nachweis der GNTR-Expression durch Immundetektion unter Verwendung von  $\alpha$ GFP- und  $\alpha$ Aktin Antikörpern (Ladekontrolle). Die Menge an geladenem Lysat betrug 3  $\mu$ g (pEGFP-C1) und 20  $\mu$ g (pGNTR, pGNTRo).

Das Vorhandensein des GNTR-Proteins konnte in Lysaten aller Zelllinien durch Immundetektion mit einem  $\alpha$ GFP-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. III.9C). Die Expression von *gntr* war in beiden Zelllinien im Vergleich zu *gntr*o weniger effizient und korrelierte mit der geringen Sensitivität der Zellen gegenüber CB1954. Die hier gezeigte Verbesserung des NTR/CB1954-Systems durch Codonoptimierung sollte in einer zweiten Generation transgener Tiere eine erfolgreiche Ablation der serotonergen Neuronen im Gehirn der Maus ermöglichen.

### 3 Generierung spezifischer $\alpha$ TPH-Antikörper

#### 3.1 Auswahl der Regionen zur Antikörpergenerierung

Zur grundlegenden Charakterisierung des serotonergen Systems werden monospezifische TPH-Antikörper benötigt, die entweder TPH1 oder TPH2 erkennen. Kommerziell verfügbare  $\alpha$ TPH-Antikörper erfüllen diese Anforderung nicht und reagieren mit beiden Isoformen [HAYCOCK *et al.*, 2002]. Diese Kreuzreaktivität begründet sich auf der hohen Sequenzidentität von TPH1 und TPH2, die in Mensch, Maus und Ratte 72 %, 68 % bzw. 70 % der Aminosäuren ausmacht (Abb. III.10).

	$\alpha$ TPH2	$\alpha$ TPH1	
hsTPH2	MQPAMMMFSSKYWARRGLSDSAVPEEHQLLGSSTLNKPNKNDKGNKGSKREAAATSGKTAVVPSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		100
musTPH2	MQPAMMMFSSKYWARRGLSDSAVPEEHQLLGSSTLNKPNKNDKGNKGSKREAAATSGKTAVVPSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		98
ratTPH2	MQPAMMMFSSKYWARRGLSDSAVPEEHQLLGSSTLNKPNKNDKGNKGSKREAAATSGKTAVVPSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		95
hsTPH1	-----MIEDNKE---NKDHSLEGRGRATLIFSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		54
musTPH1	-----MIEDNKENKNDHSSERGRVTLIFSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		57
ratTPH1	-----MIEDNKE---NKDHSLEGRGRATLIFSLKNEVGGVVKALRLFQEKRVNMLHIESRKS		54
hsTPH2	RRSSEVEIFVDCCECGKTEFNELIQLLKQFTTIVTLNPPENIWTETEEEDLVVWPFPRKISELDKCSHRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFVDVAMG		200
musTPH2	RRSSEVEIFVDCCECGKTEFNELIQLLKQFTTIVTLNPPENIWTETEEEDLVVWPFPRKISELDKCSHRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFVDVAMG		198
ratTPH2	RRSSEVEIFVDCCECGKTEFNELIQLLKQFTTIVTLNPPENIWTETEEEDLVVWPFPRKISELDKCSHRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFVDVAMG		195
hsTPH1	RRNSEFEIFVDCDTHREQLNDIFPLLSKSHATVLSVTPDNFTMKEEGMESVWPFPRKISDLDCANRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFVDSAMS		154
musTPH1	QRNSEFEIFVDCDTHREQLNDIFPLLSKSHATVLSVTPDNFTMKEEGMESVWPFPRKISDLDCANRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFAELAMN		157
ratTPH1	RRNSEFEIFVDCDTHREQLNDIFPLLSKSHATVLSVTPDNFTMKEEGMESVWPFPRKISDLDCANRVLMYGSELDADHPGFKDNVYRQRKYFAELAMN		154
hsTPH2	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		300
musTPH2	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		298
ratTPH2	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		295
hsTPH1	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		254
musTPH1	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		254
ratTPH1	YKYGQPIERVEYTEEETKTWGVVFRLESKLYPTHACREYLKLNPLLLTKYCGYREDNVQLEDVSMFLKERSGFTVTRPVAGYLSPRDFLAGLAYRVFHCTQ		257
hsTPH2	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		400
musTPH2	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		398
ratTPH2	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		395
hsTPH1	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		354
musTPH1	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		357
ratTPH1	YVRHGSDFLYTPEPDTCHELLGHVPLLADPKFAQFSQEI GLASLGASDEEDVQKLATCYFFTFEFLGCKQEGQLRAYGAGLLSSIGELKHALSDKACVKAF		354
hsTPH2	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		490
musTPH2	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		488
ratTPH2	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		485
hsTPH1	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		444
musTPH1	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		447
ratTPH1	DPKTTCLQECLITTFQDAYFVSDSFEEAKEKMRDFAKSITRPFVSYFNRYTQSIIEILKDRSIEENVQDLRSDELNTVCDALNKNQYLGI		444

**Abbildung III.10** Die TPH1 und TPH2 weisen auf Proteinebene eine hohe Identität zueinander auf. Vergleich der deduzierten Aminosäuresequenzen von TPH1 und TPH2 der Spezies Mensch (*Homo sapiens sapiens*; hs), Maus (*Mus musculus*; mus) und Ratte (*Rattus norvegicus*; rat). Die identischen Bereiche sind grün unterlegt und zeigen die höchste Konservierung im Bereich der katalytischen Domäne (AS 150 bis 450 bezüglich der hsTPH2). Die größten Unterschiede treten im Bereich des N-Terminus auf. Die Regionen für die Generierung der  $\alpha$ TPH-Antikörper sind rot markiert [WALTHER *et al.*, 2003].

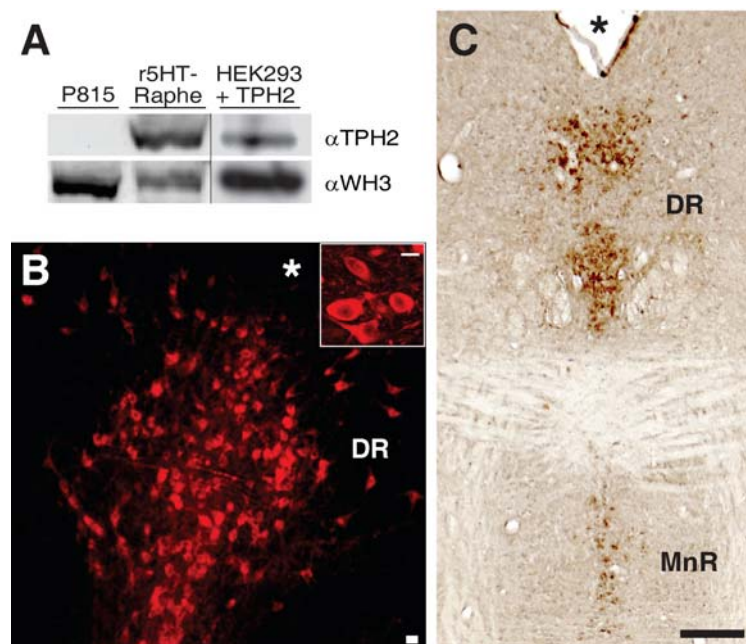
Der N-Terminus der TPH2 ist im Vergleich zur TPH1 verlängert und stellt eine geeignete Region für die Generierung eines spezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörpers dar. Aus dieser Region wurde das Peptid P<sup>3</sup>AMMMFSSKYWARRG<sup>17</sup> für die Antikörpergenerierung ausgewählt (Abb. III.10). Diese Sequenz ist in Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert und sollte ein breites Anwendungsspektrum des Antikörpers ermöglichen. Für die Generierung eines



$\alpha$ TPH1-spezifischen Antikörpers wurde die Sequenz E<sup>8</sup>NKDHSSEGRVTLI<sup>22</sup> der N-terminalen TPH1-Domäne der Maus gewählt (Abb. III.10), die in einigen Positionen von Mensch und Ratte abweicht. Die ausgesuchten Peptide wurden synthetisiert und für die Immunisierung von Kaninchen verwendet.

### 3.2 Immunreaktivität der erhaltenen Antiseren

Das TPH1-Peptid führte zu keiner ausreichenden Immunantwort in den injizierten Tieren, hingegen zeigte das erhaltene  $\alpha$ TPH2-Antiserum eine spezifische Reaktivität gegenüber TPH2 (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung III.11** Die Spezifität des generierten  $\alpha$ TPH2-Antikörpers. (A) Immundetektion der TPH2 mit dem monospezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörper in primären serotonergen Rapheneuronen der Ratte und humanen TPH2-exprimierenden HEK293-Zellen. Der Antikörper zeigte keine Reaktivität gegenüber TPH1-exprimierenden P815-Zellen (oben). Die Rehybridisierung der Membranen erfolgte mit dem unspezifischen  $\alpha$ WH3-Antikörper, der sowohl TPH1 (51 kDa) als auch TPH2 (56 kDa) detektierte (unten). (B, C) Nachweis der TPH2-Expression in coronalen Gewebeschnitten des adulten Stammhirns von Ratte (B) und Maus (C) mit dem monospezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörper. Die TPH2-Immunreaktivität konnte in den dorsalen (DR) und medianen (MnR) Raphekernen ventral des Aquädukts (\*) entlang der Mittellinie detektiert werden. Maßstab: 10  $\mu$ M (B) und 200  $\mu$ M (C).

### 3.3 Spezifität des $\alpha$ TPH2-Antikörpers im Immunblot

Der affinitätsaufgereinigte polyklonale  $\alpha$ TPH2-Antikörper wurde hinsichtlich seiner Reaktivität und Spezifität in TPH-exprimierenden Zelllinien getestet. Dazu wurden P815-Zellen und primäre serotonerge Rapheneuronen der Ratte verwendet, die endogen TPH1 bzw. TPH2 exprimieren. Zusätzlich wurde die humane *TPH2*-cDNA rekombinant in

stabilen HEK293-Zellen exprimiert. Der  $\alpha$ TPH2-Antikörper reagierte spezifisch mit TPH2 auf einer Höhe von 56 kDa in Lysaten beider Zelllinien. Eine Kreuzreaktivität mit TPH1 in P815-Lysaten konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. III.11A). Der kommerziell verfügbare monoklonale  $\alpha$ TPH-Antikörper (WH3, Epitop E<sup>103</sup>-P<sup>109</sup>) zeigte die bekannte Kreuzreaktivität und detektierte sowohl TPH1 als auch TPH2, die im Westernblot nur aufgrund der Größenunterschiede von 51 kDa (TPH1) bzw. 56 kDa (TPH2) unterscheidbar waren (Abb. III.11A).

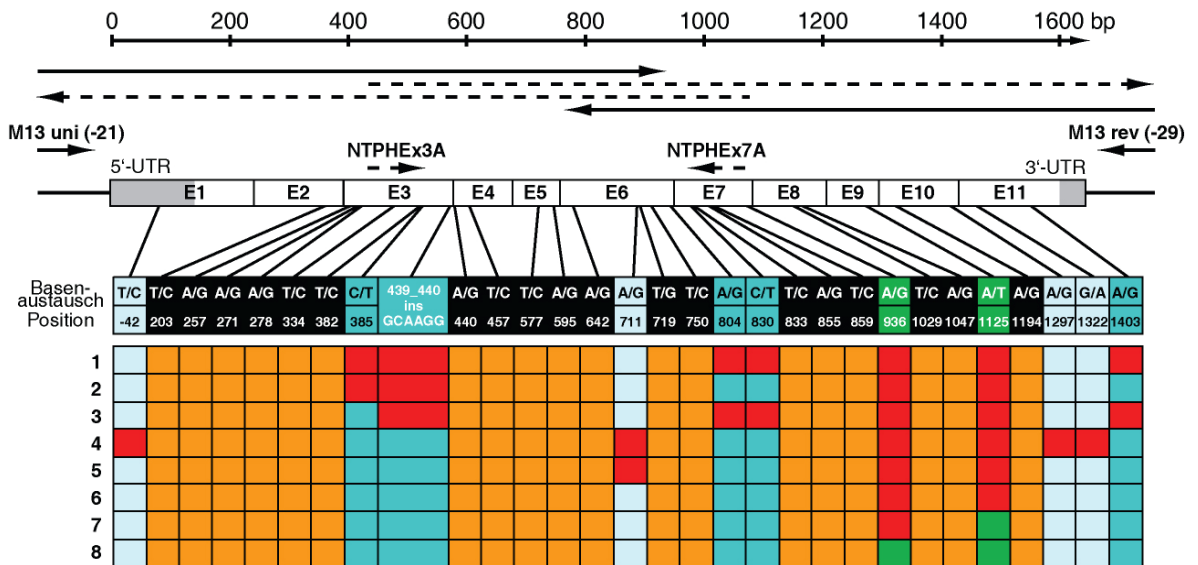
### 3.4 Immunhistochemischer Nachweis der TPH2-Expression im murinen Gehirn

Letztendlich wurde die immunhistochemische Anwendbarkeit des generierten  $\alpha$ TPH2-Antikörper an coronalen Gewebeschnitten des Stammhirns von Maus und Ratte getestet, wobei die charakteristischen Muster der dorsalen (DR) und medianen (MnR) Raphekerne spezifisch angefärbt wurden (Abb. III.11B, C). Mit Hilfe des spezifischen  $\alpha$ TPH2-Antikörpers gelang zudem der direkte immunzytochemische Nachweis der TPH2-Expression in den primären r5HT-Neuronen (Absch. III.1.1.1), der das Protein im Zytoplasma von Soma, Axonen und Dendriten lokalisierte (Abb. III.1C) [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse die Spezifität des generierten  $\alpha$ TPH2-Antikörpers und die spezieübergreifende Reaktivität in Mensch, Maus und Ratte.

## 4 Identifizierung von humanen *TPH2*-Genvarianten

### 4.1 Sequenzierung humaner *TPH2*-cDNAs

In einer einleitenden Studie zur Identifizierung von funktionellen SNPs im humanen *TPH2*-Gen wurden *post mortem*-RNA-Proben von zehn Betäubungsmittel-toten, acht Suizidopfern und sieben Schizophreniepatienten untersucht. Als entsprechende Kontrollen dienten zehn Individuen, die allgemein durch Herzinfarkt oder Unfall verstarben, jedoch zeitlebens psychopathologisch unauffällig blieben. Von jedem Individuum lagen RNA-Proben der Hirnareale: Cortex, Thalamus, Hippocampus, Amygdala, Hypophyse, Cerebellum, Hypothalamus sowie teilweise von Raphe, Pons und Striatum vor. Da psychiatrische Erkrankungen, wie Angstzustände, Autismus, Depression, PTSD und Phobien mit anormaler Funktion der Amygdala, u. a. verursacht durch Neurotransmitter-Ungleichgewichte, in Zusammenhang gebracht wurden, wurde zuerst in diesem Hirnareal nach kodierenden SNPs im *TPH2*-Gen gesucht.



**Abbildung III.12** Identifizierung zahlreicher SNPs im humanen *TPH2*-Gen. Strategie zur Sequenzierung von humanen *TPH2*-cDNA-Klonen der Amygdala von Patienten mit psychopathologischen Erkrankungen und Kontrollen. Der Sequenzvergleich mit der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz (GenBank NM\_173353) führte zur Identifizierung von 29 SNPs und einer 6 bp Insertion in Exon 3 ( $n = 104$  unabhängige Sequenzen). Gezeigt ist eine Zusammenstellung repräsentativer *TPH2*-cDNA-Klone (1 - 8) sowie die Positionen aller gefundenen SNPs; rote Boxen markieren vorhandene SNPs in den jeweiligen Klonen. Acht SNPs treten in Abhängigkeit der Insertion auf und bilden zwei Muster, die sich gegenseitig ausschließen. Dunkelblau gekennzeichnete SNPs finden sich ausschließlich bei Vorhandensein der Insertion, hellblau unterlegte SNPs jedoch nur in ihrer Abwesenheit. Grüne Positionen entsprechen den Datenbank-SNPs *rs7305115* und *rs4290270*. Die Insertion c.439\_440insGCAAGG ist das Produkt alternativen Spleißens in Intron 3.

Dazu wurden die RNA-Proben der Amygdala in cDNAs umgeschrieben und die *TPH2*-ORFs einschließlich der 5'-UTR und eines Teils der 3'-UTR amplifiziert und kloniert (die ersten 1679 bp der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz; GenBank NM\_173353). Von jedem Individuum wurden mehrere Klone sequenziert (Tabelle VI.1 und VI.2), wobei die Sequenzierung beidsträngig erfolgte, um DNA-Polymerase- und Sequenzierungsfehler zu erkennen. Basenaustausche wurden als SNPs anerkannt, wenn sie in mindestens zwei unabhängigen Klonen nachgewiesen wurden, um auch mögliche Fehler bei der reversen Transkription zu berücksichtigen. Durch Vergleich der erhaltenen cDNA-Sequenzen mit der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz (GenBank NM\_173353) konnten insgesamt 29 SNPs in nahezu allen Exonen des humanen *TPH2*-Gens identifiziert werden (Abb. III.12, Tabelle III.2; Einzelaufistung nach Patienten in Tabelle VI.1). Darunter befanden sich auch die Datenbank-SNPs *rs7305115* (c.936A>G) und *rs4290270* (c.1125A>T) und der bereits beschriebene SNP c.1322G>A (auch bekannt als G1463A, [ZHANG *et al.*, 2005]).



**Tabelle III.2** Identifizierte SNPs im humanen *TPH2*-Gen. Die Positionen der einzelnen Basenaustausche sind bezüglich der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz (GenBank NM\_173353) und nach beschriebener Nomenklatur angegeben [DEN DUNNEN und ANTONARAKIS, 2001].

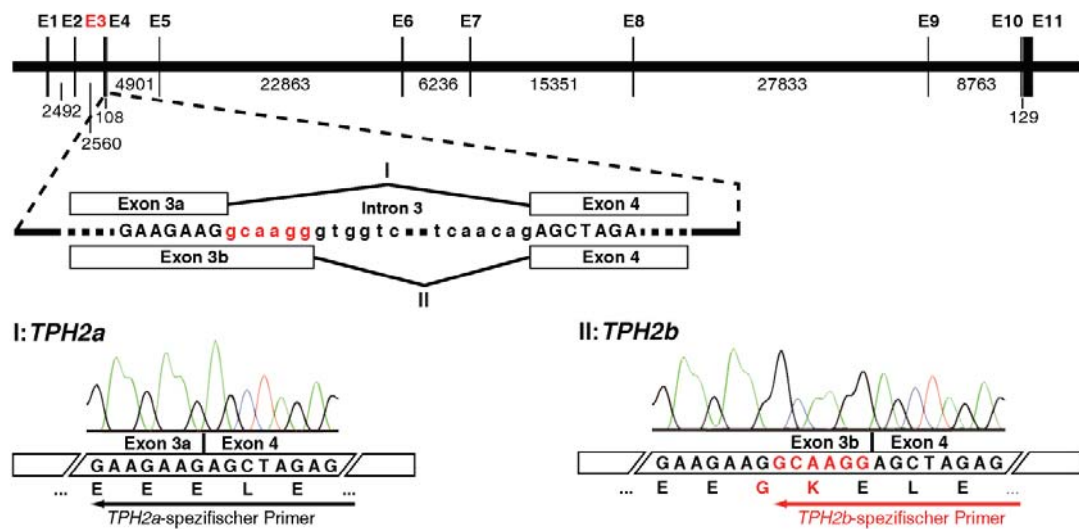
Position (cDNA)	Basenaustausch	SNP-ID	Typ <sup>a</sup>	Aminosäure	Exon
100	c.-42T>C		n. k.	n. k.	5'-UTR
344	c.203T>C		n. s.	p.F68S	3
398	c.257A>G		n. s.	p.E86G	3
412	c.271A>G		n. s.	p.M91V	3
419	c.278A>G		n. s.	p.H93R	3
475	c.334T>C		n. s.	p.C112R	3
523	c.382T>C		n. s.	p.F128L	3
526	c.385C>T		n. s.	p.Q129X	3
581	c.440A>G		n. s.	p.E147G	4
598	c.457T>C		n. s.	p.W153R	4
718	c.577T>C		n. s.	p.Y193H	5
736	c.595A>G		n. s.	p.M199V	5
783	c.642A>G		s.	p.E214	6
852	c.711A>G		s.	p.E237	6
860	c.719T>G		n. s.	p.L240W	6
891	c.750T>C		s.	p.C250	6
945	c.804A>G		s.	p.K268	6
971	c.830C>T		n. s.	p.P277L	7
974	c.833T>C		n. s.	p.V278A	7
996	c.855A>G		s.	p.R285	7
1000	c.859T>C		n. s.	p.F287L	7
1077	c.936A>G	<i>rs7305115</i>	s.	p.P312	7
1170	c.1029T>C		s.	p.S343	8
1188	c.1047A>G		s.	p.E349	8
1266	c.1125A>T	<i>rs4290270</i>	s.	p.A375	9
1335	c.1194A>G		s.	p.K398	10
1438	c.1297A>G		n. s.	p.R433G	10
1463	c.1322G>A		n. s.	p.R441H	11
1544	c.1403A>G		n. s.	p.Q468R	11

<sup>a</sup>: n. k. - nicht kodierend; s. - synonym kodierender SNP; n. s. - nicht synonym kodierender SNP

## 4.2 Posttranskriptionale Modifikationen des humanen *TPH2*-Gens

### 4.2.1 Alternatives Spleißen

Interessanterweise konnte in 8 von 23 untersuchten Individuen, sowohl Patienten als auch Kontrollen, neben den zahlreichen SNPs auch eine Insertion von 6 bp (c.439\_440insGCAAGG) in Exon 3 des *TPH2*-Gens detektiert werden (Abb. III.12), die durch alternatives Spleißen in Intron 3 entsteht (Abb. III.13). Intron 3 beginnt mit einem GC-Dinukleotid, einer eher untypischen Spleißdonorstelle (SpDS), deren Verwendung zur Verknüpfung von Exon 3a mit Exon 4 entsprechend der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz (GenBank NM\_173353) führt. In Intron 3 befindet sich jedoch 6 bp abwärts der GC-SpDS ein GT-Dinukleotid, das als eine alternative SpDS fungiert und zum Einschluss von zwei zusätzlichen Triplets (Exon 3b), kodierend für die Aminosäuren G und K, führt (Abb. III.13). Die neue Spleißisoform wurde aufgrund der besseren Unterscheidung von der Referenzsequenz NM\_173353 (*TPH2a*) mit *TPH2b* bezeichnet.

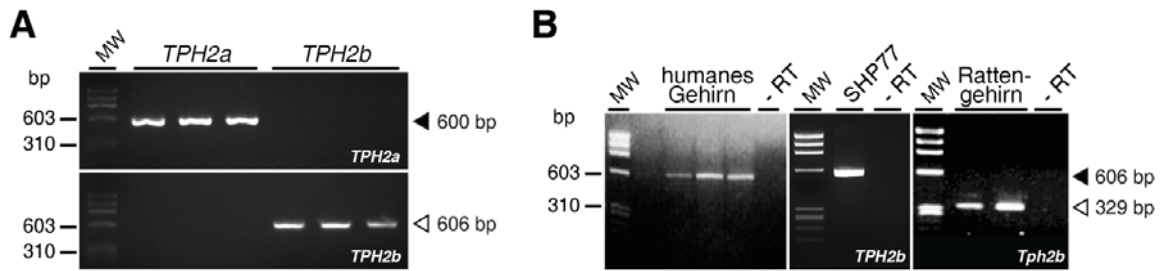


**Abbildung III.13** Die humane *TPH2* existiert in zwei Spleißvarianten. Schematische Darstellung des alternativen Spleißens der *TPH2*-prä-mRNA. In höheren Vertebraten erfolgt das Spleißen von Intron 3 gewöhnlich an der stark konservierten GC-Spleißdonorstelle (SpDS), wodurch die bekannte *TPH2*, jetzt *TPH2a*, entsteht. In Mensch, Primat und Ratte existiert 6 bp abwärts der üblichen GC-SpDS ein GT-Dinukleotid, welches als alternative SpDS dient und die zwei zusätzlichen Aminosäuren, G und K, einbezieht. Die daraus resultierende längere *TPH2*-Isoform wurde als *TPH2b* bezeichnet.

Auf Proteinebene bedeutet die GK-Insertion (p.E146\_E147insGK) eine Unterbrechung des negativ geladenen Glutamat-Abschnitts nahe der Scharnierregion zwischen der regulatorischen und der katalytischen Domäne durch den positiven Lysinrest (Abb. III.13). Da die Scharnierregion für die Substratzugänglichkeit aller Aromatischen-Aminosäure-Hydroxylasen entscheidend ist [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; FITZPATRICK, 1999] wurde ein Einfluss der Insertion auf die *TPH2*-Enzymaktivität postuliert und konnte zu einem späteren Zeitpunkt bestätigt werden (Absch. III.4.3.3).

#### 4.2.2 Nachweis der Spleißvarianten *TPH2a* und *TPH2b*

Für den direkten Nachweis der beiden *TPH2*-Isoformen wurden die spleißspezifischen Oligonukleotide NTPHSPL-A (*TPH2a*) und NTPHSPL2 (*TPH2b*) generiert und optimale PCR-Bedingungen etabliert (Abb. III.14). *TPH2b*-Transkripte konnten in allen Individuen, unabhängig einer psychopathologischen Krankengeschichte, als auch im Rattenhirn und der humanen neuroendokrinen kleinzelligen Lungenkarziomzelllinie SHP77 nachgewiesen werden (Abb. III.14). Somit deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass *TPH2B* zur allgemeinen Biosynthese von 5-HT im Gehirn beiträgt.



**Abbildung III.14** Die *TPH2*-Isoformen, *TPH2a* und *TPH2b*, können durch Verwendung spleißspezifischer Oligonukleotide leicht nachgewiesen werden. (A) Spezifität der spleißspezifischen Oligonukleotide NTPHSPL-A (*TPH2a*) und NTPHSPL2 (*TPH2b*) in der PCR mit Plasmid-DNA. (B) RT-PCR mit spleißspezifischen Oligonukleotiden (nTPHSPLrat für die Anwendung in der Ratte) zeigte das Vorhandensein von *TPH2b*-Transkripten im gesunden Gehirn von Mensch und Ratte als auch in humanen SHP77-Zellen. MW:  $\phi$ X174/*Hinf*I

#### 4.2.3 Editierung der *TPH2a* und *TPH2b* prä-RNAs

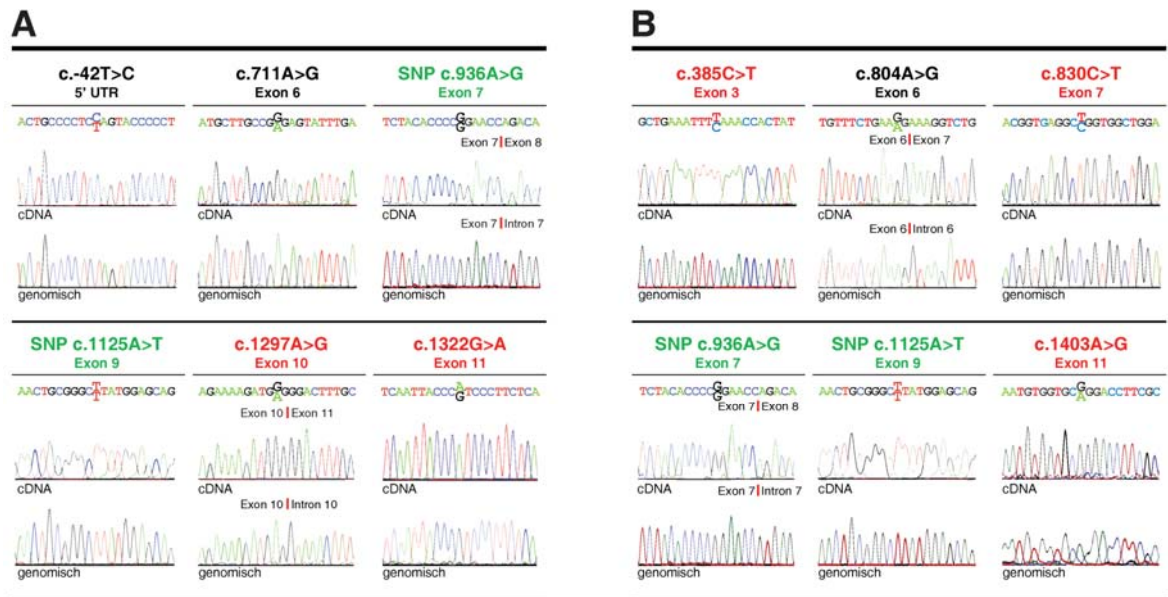
Die *TPH2b*-Transkripte unserer Proben enthielten fast ausschließlich eine Kombination aus sechs SNPs (Abb. III.12, Tabelle VI.1), c.385C>T (p.Q129X; Exon 3), c.804A>G (p.K268; Exon 6), c.830C>T (p.P277L; Exon 7), c.936A>G (p.P312; Exon 7), c.1125A>T (p.A375; Exon 9) und c.1403A>G (p.Q468R; Exon 11), welche anfänglich als eine allelische Variante (Haplotyp) des *TPH2b*-Gens mit einer erhöhten intrinsischen Aktivität für alternatives Spleißen angesehen wurde (Abb. III.12, Tabelle III.3). Jedoch entspricht der SNP c.385C>T (p.Q126X) einer *nonsense*-Mutation an der Verbindungsstelle zwischen der regulatorischen und der katalytischen Domäne der TPH2 [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006] und würde in Hinblick auf die TPH2-Aktivität einer *null*-Mutation entsprechen. Eine solche Situation ist allerdings nur schwer vorstellbar, da der SNP c.385C>T auch in gesunden Individuen ohne psychopathologische Krankengeschichte nachgewiesen werden konnte (Tabelle VI.1, z. B. KON604). Weiterhin würde die c.385C>T-Variante durch das vorzeitige Translationsstopcodon ein geeignetes Substrat für die RNA-Degradierung durch *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) sein [HENTZE und KULOZIK, 1999; REED und HURT, 2002], eine Situation, die aufgrund der leichten Detektierbarkeit von *TPH2b* offensichtlich nicht gegeben ist (Abb. III.14 und III.20). Aufgrund dieser Ergebnisse kam die Hypothese auf, dass *TPH2*-Transkripte posttranskriptional durch RNA-Editierung modifiziert werden.

**Tabelle III.3** SNP-Muster von *TPH2a* und *TPH2b*. Positionsangaben entsprechend der *TPH2*-mRNA-Referenzsequenz NM\_173353.

Position (cDNA)	Basenaustausch	SNP-ID	Typ <sup>a</sup>	Aminosäure	Exon
<b><i>TPH2a</i></b>					
100	c.-42T>C		n. k.	n. k.	5'-UTR
852	c.711A>G		s.	p.E237	6
1077	c.936A>G	<i>rs7305115</i>	s.	p.P312	7
1266	c.1125A>T	<i>rs4290270</i>	s.	p.A375	9
1438	c.1297A>G		n. s.	p.R433G	10
1463	c.1322G>A		n. s.	p.R441H	11
<b><i>TPH2b</i></b>					
526	c.385C>T		n. s.	p.Q129X	3
945	c.804A>G		s.	p.K268	6
971	c.830C>T		n. s.	p.P277L	7
1077	c.936A>G	<i>rs7305115</i>	s.	p.P312	7
1266	c.1125A>T	<i>rs4290270</i>	s.	p.A375	9
1544	c.1403A>G		n. s.	p.Q468R	11

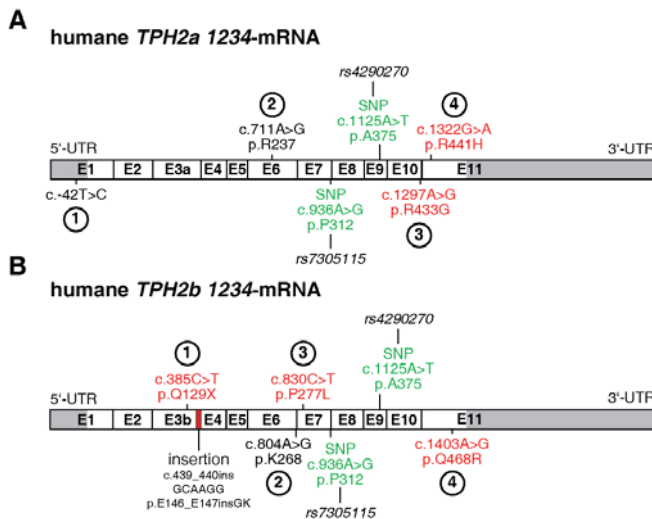
<sup>a</sup>: n. k. - nicht kodierend; s. - synonym kodierender SNP; n. s. - nicht synonym kodierender SNP

Tatsächlich konnten die Basenaustausche c.385C>T, c.804A>G, c.830C>T und c.1403A>G durch Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden genomischen Exone 3, 6, 7, 9 und 11 von Individuen mit detektierbarer *TPH2b* in keiner Probe nachgewiesen werden. Nur die Datenbank-SNPs *rs7305115* (c.936A>G) und *rs4290270* (c.1125A>T) wurden auf genomischer Ebene verifiziert (Abb. III.15B).



**Abbildung III.15** *TPH2a* und *TPH2b* prä-mRNAs werden posttranskriptional editiert. Vergleich genomischer Sequenzen mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen zeigte, dass weder die *TPH2a*-SNPs c.-42T>C, c.711A>G, c.1297A>G und c.1322G>A (**A**) noch die *TPH2b*-SNPs c.385C>T, c.804A>G, c.830C>T und c.1403A>G genomisch kodiert waren (**B**). Nur die Datenbank-SNPs *rs7305115* (c.936A>G) und *rs4290270* (c.1125A>T) konnten auf genomischer Ebene verifiziert werden.

Interessanterweise zeigten die *TPH2a*-Transkripte ebenfalls ein spezifisches Muster an SNPs (Tabelle III.3), welche im Block und fast ausnahmslos zusammen mit den bereits identifizierten SNPs *rs7305115* und *rs4290270* auftraten (Abb. III.12, Tabelle VI.1). In Übereinstimmung mit *TPH2b* konnten durch Analyse der Exone 1, 6, 7, 10 und 11 nur die SNPs *rs7305115* und *rs4290270* auf genomischer Ebene bestätigt werden, während die anderen Basenaustausche c.-42T>C (5'-UTR), c.711A>G (p.R237; Exon 6), c.1297A>G (p.R433G; Exon 10) und c.1322G>A (p.R441H; Exon 11) wiederum auf RNA-Editierung beruhten (Abb. III.15A). Die *TPH2a* und *TPH2b* prä-mRNAs besitzen somit zwei spezifische, sich gegenseitig ausschließende Editierungsmuster (Abb. III.12 und III.15), die mit *TPH2a* 1234 und *TPH2b* 1234 bezeichnet wurden (Abb. III.16).



**Abbildung III.16** *TPH2a* und *TPH2b* werden posttranskriptional editiert. (A, B). Die Editierungsmuster von *TPH2a* und *TPH2b* sind jeweils spezifisch und schließen sich gegenseitig aus. Für jede Spleißvariante existieren je vier editierte Positionen, die mit arabischen Zahlen 1 bis 4 gekennzeichnet sind. Die Angabe der einzelnen *TPH2b*-Polymorphismen erfolgte bezüglich der *TPH2*-Referenzsequenz NM\_173353. (A) Schematische Darstellung der *TPH2a* 1234 und *TPH2b* 1234 (B). Auf RNA-Editierung beruhende nicht synonyme Basenaustausche sind rot, genomisch kodierte SNPs in grün dargestellt.

Unter den analysierten *TPH2*-Klonen befanden sich jedoch auch *TPH2b*-Transkripte, die an Position c.385C>T nicht editiert waren (*TPH2b* 234), wodurch ein vollständiges Protein mit der bereits erwähnten Insertion der Aminosäuren G und K gebildet werden würde (Abb. III.12, Tabelle VI.1; SZ190-1). Letztendlich wurden auch *TPH2b* 1-Transkripte gefunden, die keine Editierung an den Positionen 2, 3 und 4 aufwiesen (Abb. III.12, Tabelle VI.1; SUIZ947-1). Auf der anderen Seite wurden die partiell editierten *TPH2a*-Transkripte *TPH2a* 2 und *TPH2a* 134 detektiert (Tabelle VI.1; KON285-1 und SUIZ1778-10). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der *TPH2*-Editierung um einen dynamischen Prozess handelt, der zu *TPH2*-Proteinvarianten mit unterschiedlichsten Eigenschaften führt, wodurch sich die biochemische Diversität und Komplexität der 5-HT-Biosynthese weiter erhöht.

#### 4.2.4 Spezifität der *TPH2*-RNA-Editierung

RNA-Editierung tritt hauptsächlich im ZNS auf und ist oft auf diskrete Hirnareale beschränkt [BARLATI und BARBON, 2005]. Aufgrund dieser Tatsache wurden *TPH2*-Transkripte aus anderen Hirnarealen (Cortex, Thalamus, Hippocampus, Hypophyse, Cerebellum, Hypothalamus, Raphe, Pons und Striatum) kloniert, sequenziert und hinsichtlich ihres Editierungsstatus analysiert (Tabelle III.5; Einzelaufistung nach Patienten und Hirnareal in Tabelle VI.2). Dabei zeigte sich, dass die Editierung von *TPH2a*-Transkripten ausschließlich in der Amygdala auftrat, jedoch nicht in anderen Hirnarealen nachgewiesen werden konnte (Tabelle III.4). *TPH2b*-Transkripte wurden hingegen in allen untersuchten Hirnarealen editiert vorgefunden (Tabelle III.4 und VI.2), ebenso in der humanen kleinzelligen Lungenkrebszelllinie SHP77 (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle III.4** Spezifität der *TPH2a*-Editierung in der Amygdala. Die prozentuale Verteilung der editierten Positionen zeigte, dass *TPH2a* nur in der Amygdala editiert vorlag, während *TPH2b*-Editierung in allen untersuchten Gehirnarealen\* auftrat. Bei Vorhandensein des SNPs *rs4290270 A* (c.1125A) konnte weder die Editierung von *TPH2a* noch die Expression von *TPH2b* beobachtet werden.

Gehirnareal und <i>TPH2</i> -Variante	Klone (n)	Editierungsposition und prozentuale Verteilung			
<b>Amygdala</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
	65	25 %	23 %	25 %	25 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
	27	78 %	96 %	96 %	96 %
<b>andere Gehirnareale *</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
	27	0 %	0 %	0 %	0 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
	11	100 %	100 %	100 %	100 %

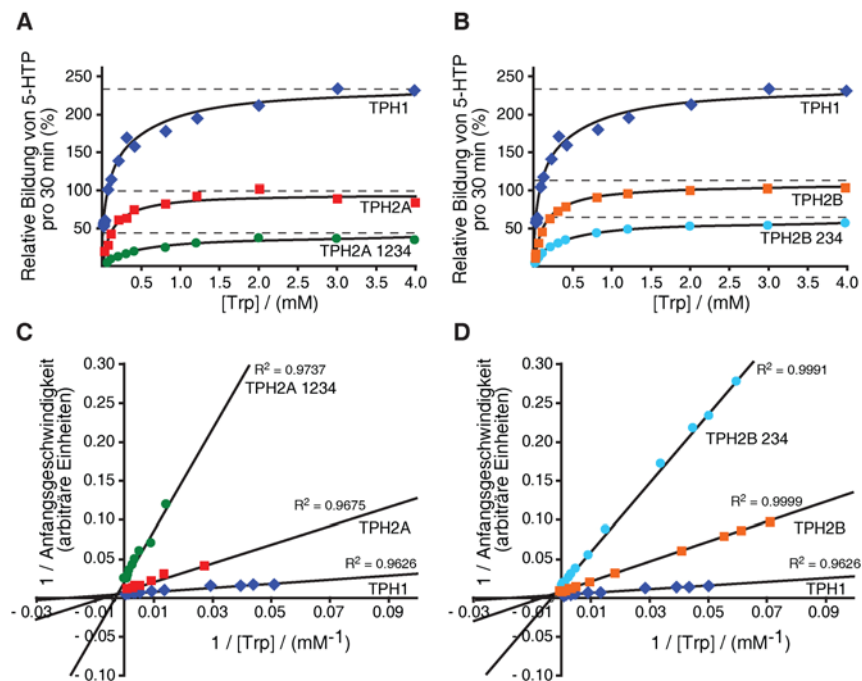
\* Cortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, Cerebellum, Mediane Raphe, Pons und Striatum.



### 4.3 Biochemische Charakterisierung der TPH2-Varianten

#### 4.3.1 Kinetiken bezüglich Trp in stabilen PC12-Zellen

Um die kinetischen Eigenschaften der TPH2-Varianten bezüglich Trp zu untersuchen, wurden Expressionskonstrukte für *TPH2a*, *TPH2b*, *TPH2a 1234* und *TPH2b 234*, hergestellt und stabil in PC12-Zellen exprimiert. Die anschließenden Enzymassays wurden mit Zelllysaten dieser Zelllinien unter Verwendung des synthetischen Kofaktors 6-Methyl-Tetrahydrobiopterin (6MPH4) durchgeführt. Synthetische Analoga werden häufig benutzt, da sie im Vergleich zum natürlichen Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH4) deutlich höhere  $K_m$ -Werte liefern und damit oft erst die Auflösung der katalytischen Unterschiede zwischen TPHs verschiedener Gewebe ermöglichen (Tabelle VI.3) [FITZPATRICK, 1999; MCKINNEY *et al.*, 2005]. Die im TPH-Assay gebildeten Mengen an 5-HTP wurden mittels HPLC-FD über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 4 mM Trp gemessen und ergaben entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung hyperbolische Plots für TPH2A, TPH2B, TPH2A 1234 und TPH2B 234 (Abb. III.17A, B). Entsprechende Kinetiken wurden für TPH1 aus P815-Zellen aufgenommen, um die hier angewandte Methode anhand der bereits publizierten und in der Arbeitsgruppe ermittelten  $K_m$ -Werte zu validieren (Tabelle VI.3).



**Abbildung III.17** Die kinetischen Parameter von TPH2A und TPH2B werden durch RNA-Editierung bestimmt. Kinetische Eigenschaften der TPH2-Varianten. (A, B) 5-HTP-Bildung der einzelnen TPH2-Varianten in Abhängigkeit der Trp-Konzentration und in Gegenwart von 300  $\mu$ M 6MPH4. (C, D) Lineweaver-Burk-Plots zur Bestimmung der  $K_m(\text{Trp})$ -Werte der TPH2-Varianten. Bei Verwendung des synthetischen Kofaktors 6MPH4 waren die enzymatischen Aktivitäten von TPH2A und TPH2B bzw. TPH2A 1234 und TPH2B 234 gleich. TPH1 diente als Kontrolle.

Die Auswertung der Enzymkinetiken durch doppelt-reziproke Lineweaver-Burk-Plots (Abb. III.17C, D) ermöglichte die Bestimmung der  $K_m(\text{Trp})$ -Werte für alle vier TPH2-Varianten (Tabelle III.5). Die ermittelten  $K_m(\text{Trp})$ -Werte für TPH2A und TPH2B zeigten dabei keinen Unterschied und lagen im Bereich der bereits publizierten Konstanten für TPH2 (Tabelle VI.3) [MCKINNEY *et al.*, 2005]. Infolge von RNA-Editierung erhöhten sich die  $K_m(\text{Trp})$ -Werte für TPH2A 1234 und TPH2B 234 jedoch um mehr als das Doppelte, was einen Verlust an enzymatischer Aktivität andeutet (Tabelle III.5). Alle TPH2-Varianten zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur eine deutlich geringere enzymatische Aktivität gegenüber TPH1 [MCKINNEY *et al.*, 2005].

**Tabelle III.5** Kinetische Konstanten der TPH2-Varianten. RNA-Editierung führt zur Erhöhung der  $K_m$ -Werte bezüglich Trp.

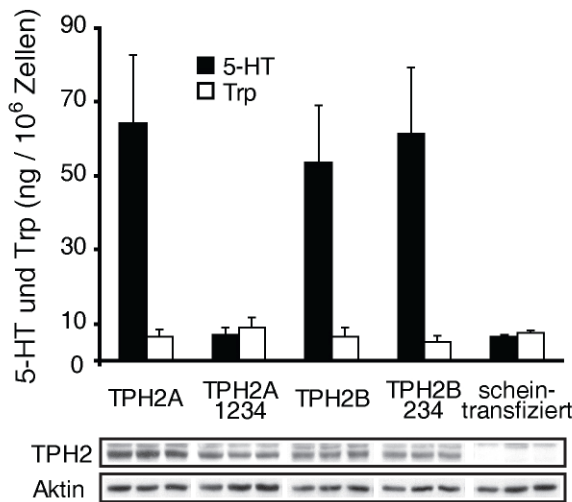
	$K_{m, L-\text{Trp}}$ ( $\mu\text{M}$ ) 6MPH4 (300 $\mu\text{M}$ )	$K_{m, L-\text{Trp}}$ ( $\mu\text{M}$ ) BH4 (300 $\mu\text{M}$ )
TPH2A	126 $\pm$ 9 (n = 6)	16 $\pm$ 11 (n = 6)
TPH2A 1234	292 $\pm$ 97 (n = 7)*	23 $\pm$ 3 (n = 6)
TPH2B	124 $\pm$ 11 (n = 4)	37 $\pm$ 6 (n = 6)#
TPH2B 234	304 $\pm$ 77 (n = 7)*	116 $\pm$ 18 (n = 6)*,#

\*:  $p < 0,05$  vs. nichteditierte TPH2-Varianten; #:  $p < 0,05$  vs. alle anderen TPH2-Varianten.

#### 4.3.2 5-HT-Gehalte TPH2-exprimierender PC12-Zellen

Murine Pheochromozytomzellen (PC12) wurden kürzlich verwendet, um die 5-HT-Syntheseaktivität rekombinanter TPH2-Mutanten zu beurteilen [ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005]. Die stabile Expression der vier TPH2-Varianten in PC12-Zellen zeigte vergleichbare 5-HT-Gehalte für TPH2A und TPH2B, überraschenderweise aber auch für TPH2B 234, für die aufgrund des höheren  $K_m(\text{Trp})$ -Wertes (Tabelle III.5) eine geringere Aktivität erwartet wurde (Abb. III.18). Es wurde jedoch schon früher gezeigt, dass PC12-Zellen nur eine begrenzte Menge an Neurotransmittern in ihren Vesikeln speichern können [SCHONN *et al.*, 2003]. Somit ist es denkbar, dass die TPH2-Aktivitäten in den drei Zelllinien die maximale vesikuläre 5-HT-Speicherkapazität dieser Zellen bei weitem überstieg. Interessanterweise enthielten scheintransfizierte und untransfizierte PC12-Zellen mit ca. 18 % der detektierbaren Maximalwerte beträchtliche Mengen an 5-HT (Abb. III.18); eine Tatsache, die bei der Beschreibung von PC12-Zellen als ein geeignetes Modell für TPH2-Studien ignoriert wurde [ZHANG *et al.*, 2005]. Die Expression von TPH2A 1234 zeigte keine signifikante Erhöhung der 5-HT-Gehalte im Vergleich zu den scheintransfizierten Zellen, was für eine Inaktivierung der TPH2A durch RNA-Editierung spricht.

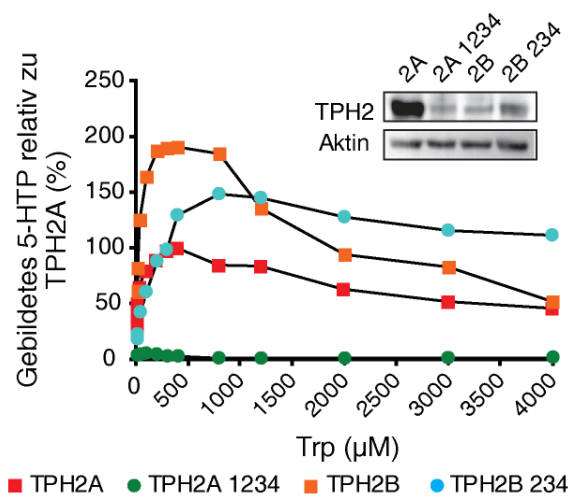




**Abbildung III.18** 5-HT- und Trp-Gehalte stabil transfizierter PC12-Zellen und Westernblots der TPH2-Varianten ( $\alpha$ WH3-Antikörper) für die Normalisierung der 5-HT-Gehalte (n = 10 unabhängige Experimente).

### 4.3.3 Kinetische Untersuchungen in HEK293-Zellen mit BH4

Um störende Einflüsse der PC12-Zellen auf die Bestimmung der 5-HT-Gehalte zu umgehen, wurden die TPH2-Varianten in nicht-neuronalen HEK293-Zellen exprimiert und die  $K_m$ (Trp)-Werte mit dem natürlichen Kofaktor BH4 bestimmt.



**Abbildung III.19** Enzymatische Aktivitäten der TPH2-Varianten nach Expression in HEK293-Zellen. Die Bildung von 5-HTP wurde durch Verwendung des natürlichen Kofaktors BH4 bestimmt. Die Rangfolge der relativen maximalen Geschwindigkeiten (*rel. V<sub>max</sub>*) nach Normalisierung auf die TPH2-Proteingehalte (siehe Westernblot mit  $\alpha$ TPH2-Antikörper, Abschn. III.3) ist TPH2B > TPH2B 234 > TPH2A > TPH2A 1234. Bei Konzentrationen außerhalb des physiologischen Trp-Bereichs von 30 - 50  $\mu$ M zeigen alle Varianten, mit Ausnahme der TPH2B 234, eine starke Substrathemmung. Die Daten von sechs unabhängigen Experimenten sind gezeigt.

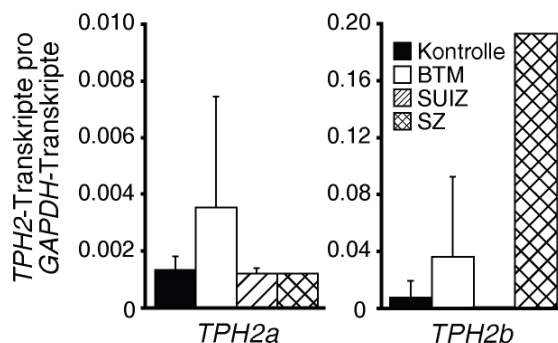
Bei physiologischen Trp-Konzentrationen von 30 - 50  $\mu$ M verhielten sich die vier TPH2-Varianten entsprechend der Michaelis-Menten-Gleichung, wobei signifikante Substrathemmungen bei höheren Trp-Konzentrationen auftraten (Abb. III.19). TPH2B 234 zeigte den höchsten  $K_m$ -Wert aller untersuchten Varianten (Tabelle III.5), aber eine 50 % höhere relative Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) bezüglich TPH2A (Abb. III.19). Dagegen wies TPH2A 1234 im Vergleich zu TPH2A die niedrigste  $V_{max}$  (5 %) und die stärkste

Substrathemmung ( $\geq 50 \mu\text{M}$  Trp) aller vier Varianten auf. Interessanterweise ergab sich die höchste  $V_{max}$  für TPH2B, entsprechend der Vorhersage, dass die GK-Insertion innerhalb der Scharnierregion einen besseren Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum erlaubt.

#### 4.4 Untersuchung der Patientenkollektive

##### 4.4.1 Expression der TPH2-Spleißvarianten

Die Regulation der TPH2-Aktivität durch alternatives Spleißen und RNA-Editierung führte zur Frage nach einer möglichen Dysregulation beider Prozesse bei neuropsychiatrischen Erkrankungen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung erfolgte der quantitative Nachweis der Expression von *TPH2a* und *TPH2b* in *post mortem*-Proben psychopathologisch auffälliger Individuen und gesunden Kontrollen mittels qPCR unter Verwendung der spleißspezifischen Primer NTPHSPL-A und NTPHSPL2 (Abb. III.20). Dabei lag die *TPH2a*-Expression der Suizidopfer und eines Schizophreniepatienten im Bereich der Kontrollen. Die Betäubungsmitteltoten (BTM) wiesen hingegen eine erhöhte Expression von *TPH2a* und *TPH2b* gegenüber den Kontrollen auf, jedoch bestand aufgrund großer individueller Unterschiede innerhalb der Patientengruppe keine statistische Signifikanz (Abb. III.20). Die *TPH2b*-Expression zeigte sich hingegen sehr variabel und war in den Kontrollen um eine Größenordnung stärker exprimiert als *TPH2a*. Auffällig war die extrem hohe Expression von *TPH2b* in dem Schizophreniepatienten, die gegenüber den Kontrollen um das 20-fache erhöht war. Hingegen konnte in den Suiziden nur eine extrem schwache *TPH2b*-Expression (25 %) im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden (Abb. III.20). Demnach könnte eine Dysregulation des alternativen Spleißens an der Ätiologie psychopathologischer Erkrankungen beteiligt sein.



**Abbildung III.20** Quantitative *realtime*-PCR mit spleißspezifischen Primern zeigt starke Unterschiede in der Expression von *TPH2a* und *TPH2b* in Patienten mit psychopathologischen Erkrankungen und gesunden Kontrollen. *TPH2b* ist in den Kontrollen im Vergleich zu *TPH2a* um eine Größenordnung höher exprimiert. BTM: Betäubungsmitteltote,  $n = 11$ ; SUIZ: Suizidopfer,  $n = 2$ ; SZ: Schizophrenie,  $n = 1$ .

#### 4.4.2 *TPH2*-Editierung in der Amygdala

Betrachtet man das Auftreten von RNA-Editierung in den einzelnen Patientengruppen, so trat die *TPH2a* 1234-Editierung (Abb. III.16A) in den analysierten *TPH2*-Klonen von Betäubungsmittel-toten und Suizidopfern im Vergleich zu den Kontrollen um 20 % häufiger auf (Tabelle III.6). In den Schizophreniepatienten konnte hingegen keine Editierung von *TPH2a* nachgewiesen werden.

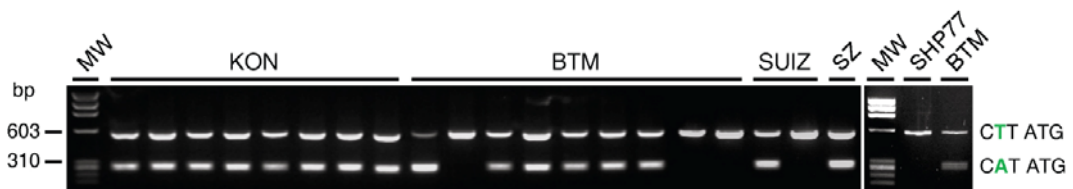
**Tabelle III.6** RNA-Editierung der *TPH2*-mRNAs in der Amygdala von Patienten und Kontrollen. *TPH2a* 1234-Editierung ist anormal in Betäubungsmittel-toten, Suiziden und Schizophrenen.

Proben	Klone (n)	Editierungsposition und prozentuale Verteilung			
<b>Kontrollen</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
<i>rs4290270</i> T	15	13 %	20 %	13 %	13 %
<i>rs4290270</i> A	3	0 %	0 %	0 %	0 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
<i>rs4290270</i> T	8	100 %	93 %	93 %	93 %
<i>rs4290270</i> A	-	-	-	-	-
<b>Betäubungsmittel-tote</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
<i>rs4290270</i> T	18	33 %	33 %	33 %	33 %
<i>rs4290270</i> A	2	0 %	0 %	0 %	0 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
<i>rs4290270</i> T	4	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>rs4290270</i> A	-	-	-	-	-
<b>Suizidopfer</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
<i>rs4290270</i> T	13	38 %	23 %	31 %	31 %
<i>rs4290270</i> A	4	0 %	0 %	0 %	0 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
<i>rs4290270</i> T	4	50 %	100 %	100 %	100 %
<i>rs4290270</i> A	-	-	-	-	-
<b>Schizophrenie</b>					
<b><i>TPH2a</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		-42	711	1297	1322
<i>rs4290270</i> T	2	0 %	0 %	0 %	0 %
<i>rs4290270</i> A	8	0 %	0 %	0 %	0 %
<b><i>TPH2b</i></b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
		385	804	830	1403
<i>rs4290270</i> T	11	71 %	91 %	91 %	91 %
<i>rs4290270</i> A	-	-	-	-	-

Die *TPH2b*-Transkripte waren in Kontrollen und Betäubungsmitteltoten an Position 1 (c.385C>T) immer editiert, während bei Suiziden und Schizophreniepatienten auch *TPH2b*-Transkripte ohne c.385C>T detektiert wurden. BTMs und Suizide zeigten zudem eine leichte Erhöhung (7 %) der *TPH2b*-Editierung an den Positionen 2, 3 und 4 (Abb. III.16B). Somit könnte eine deregulierte *TPH2*-Editierung, insbesondere von *TPH2a*, eine mögliche Ursache für psychiatrische Erkrankungen oder aber eine Konsequenz von Drogenmissbrauch bzw. Medikamentenkonsum sein.

#### 4.4.3 RFLP-Genotypisierung des SNPs *rs4290270*

Interessanterweise konnten in Anwesenheit von SNP *rs4290270* A (c.1125A) weder *TPH2b*-Transkripte noch RNA-Editierung detektiert werden (Tabelle III.4 und III.6), wodurch der SNP *rs4290270* T eine wichtige Rolle bei der Regulation von alternativen Spleißen und RNA-Editierung spielen könnte. Der individuelle Genotyp bezüglich der Position c.1125 kann als Teil der palindromischen Erkennungssequenz von *Nde* I leicht durch einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bestimmt werden. Mit dieser Methode zeigte sich, dass das untersuchte Kollektiv entweder heterozygot oder homozygot für den SNP *rs4290270* T war (Abb. III.21). Homozygote A/A-Träger konnten nicht nachgewiesen werden.

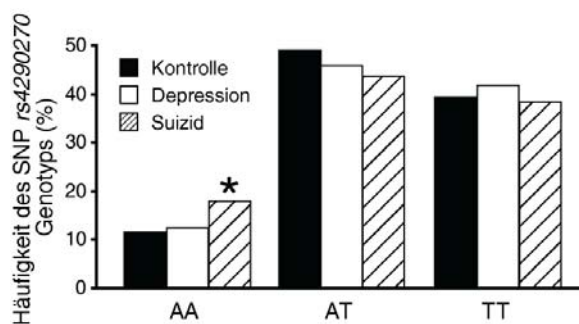


**Abbildung III.21** Der Genotyp an Position c.1125 kann im analysierten Patientenkollektiv leicht durch einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) mit *Nde* I bestimmt werden. BTM: Betäubungsmitteltote; SUIZ: Suizidopfer; SZ: Schizophrenie.

In SHP77-Zellen trat der SNP *rs4290270* T ebenfalls homozygot auf und steht damit im Einklang mit dem Auftreten von alternativen Spleißen und der Editierung von *TPH2b* in dieser Zelllinie (Abb. III.21). Damit stellen SHP77-Zellen möglicherweise ein geeignetes Zellkultursystem dar, um alternatives Spleißen und Editierung von *TPH2*-Transkripten zu untersuchen.

#### 4.4.4 Assoziationsstudie bezüglich SNP *rs4290270*

In einer umfangreicheren *TPH2*-Assoziationsstudie bezüglich SNP *rs4290270* trat der A/A-Genotyp in einer Gruppe von 369 Individuen mit erfolgtem Suizid im Vergleich zu 436 Patienten mit unipolarer Depression und 373 Individuen ohne psychopathologische Krankengeschichte signifikant häufiger auf (Abb. III.19). Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus, in welcher Form der SNP *rs4290270* A alternatives Spleißen und Editierung der *TPH2*-mRNA beeinflusst, noch unbekannt bleibt, zeigt der Genotyp *rs4290270* A/A eine genetische Prädisposition für Suizidalität an (Abb. III.22).



**Abbildung III.22** Genotypisierung des SNPs *rs4290270* zeigte in einer umfangreichen Assoziationsstudie die genetische Prädisposition homozygoter A/A-Träger für Suizid. Alle Verteilungen sind im Hardy-Weinberg-Equilibrium. \*:  $p < 0,05$ ; Kontrollen:  $n = 373$ ; Patienten mit unipolarer Depression:  $n = 436$ ; Suizide:  $n = 369$ .

## IV Diskussion

### 1 Die NTR1-Mäuse

#### 1.1 Die Spezifität der NTR-Expression

In dieser Arbeit sollte durch Verwendung des NTR/CB1954-Systems ein Tiermodell generiert werden, das die konditionelle Ausschaltung der serotonergen Neuronen im Gehirn der Maus erlaubt, um ihre Funktion *in vivo* zu studieren. Die Generierung der transgenen Mäuse erfolgte durch retroviralen Gentransfer mit einer Effizienz von 78 % und ermöglichte die Etablierung von sechs NTR1-Mauslinien (Abb. III.3B).

Eine Hauptanforderung hinsichtlich der Verwendung des NTR/CB1954-Systems ist die spezifische Expression des *ntr*-Gens in den Zielzellen, um unspezifische Nebenwirkungen nach Applikation des Protoxins CB1954 zu vermeiden. Zu diesem Zweck wurde ein 4 kb-Fragment des humanen *Tph2*-Promotors verwendet, dessen Aktivität sich durch Expression des Reportergens *DsRed* in primären Rapheneuronen der Ratte zeigte (Abb. III.2) [SCHEUCH *et al.*, 2007]. Serotonerge Rapheneuronen sind besonders gut geeignet, um die Expression und Funktion von *Tph2* zu studieren, da sie die Hauptquelle der *Tph2*-Expression im Gehirn darstellen [PATEL *et al.*, 2004; ZILL *et al.*, 2007] und zudem die Fähigkeit zur Aufnahme, Freisetzung und Speicherung von 5-HT besitzen [LAUTENSCHLAGER *et al.*, 2000]. Die Aktivität des humanen *Tph2*-Promotors in der Ratte wurde aufgrund der starken Konservierung der 5'-regulatorischen Region in Mensch, Maus und Ratte erwartet, die innerhalb der Kernsequenz von 0,5 kb oberhalb des ATGs eine Identität von ca. 80 % in den drei Spezies aufweist. Da die *Tph2*-Promotoren von Maus und Ratte über einen Bereich von 10 kb nahezu identisch sind, erlaubte der Aktivitätsnachweis des humanen *Tph2*-Promotors in der Ratte auch eine Aussage über seine Funktion in der Maus. Entsprechend konnte die Expression des *ntr*-Gens in den generierten NTR1-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. III.3B und III.4).

Die etablierten primären Raphekulturen der Ratte konnten zudem im Verlauf dieser Arbeit als geeignetes Modell für *Tph2*-Promotorstudien des Menschen etabliert werden. So offenbarte die Expression von *Tph2*-Promotorvarianten psychisch kranker Individuen, den Einfluss des Promotor-SNPs *rs11178997* auf den Grad der *TPH2*-Expression und die Regulation durch den neuronalen Transkriptionsfaktor Brn-2 [SCHEUCH *et al.*, 2007].

Die Hybridisierung von Gehirnschnitten transgener NTR1-Mäuse mit einer *ntr*-spezifischen Sonde ergab deutliche Signale im Cerebellum, dessen serotonerge Innervierung in *Mammalia* schon seit langem bekannt ist und bereits in Katze, Ratte [TAKEUCHI *et al.*, 1982], Opossum [BISHOP *et al.*, 1985] und Maus [CRIVELLATO *et al.*, 1992]

gezeigt werden konnte. Untersuchungen am Cerebellum der Maus zeigten eine starke Innervierung des cerebralen Cortexes durch serotonerge Afferenzen, die besonders dichte Kontakte mit den Somata der Purkinjezellen (PC) ausbildeten. Nur geringe Signale konnten in der Granula- und molekularen Zellschicht detektiert werden [CRIVELLATO *et al.*, 1992]. Entsprechend wurden in den transgenen NTR1-Mäusen *ntr*-positive Afferenzen hauptsächlich in der cerebralen PC-Schicht nachgewiesen, wo sie einen Plexus um die Somata der PC-Zellen bildeten (Abb. III.4). In Analogie zu früheren Ergebnissen zeigten sich nur vereinzelte *ntr*-Signale im Bereich der Granulazellen [CRIVELLATO *et al.*, 1992] (Abb. III.4). Zudem kolokalisierte die Expression des *ntr*-Gens im Kleinhirn perfekt mit dem Ort der *Tph2*-Expression und zeigte die spezifische Expression des Transgens in diesem bekannten serotonergen Projektionsareal (Abb. III.4). Die zentrale Bedeutung des Cerebellums beim Erlernen und der Koordination von Bewegungsabläufen könnte das Auftreten von Ataxie nach chronischen MDMA-Konsum erklären, welches die 5-HT-Rapheneuronen schädigt [GREEN *et al.*, 2003].

## 1.2 Der Phänotyp der NTR1-Mäuse der ersten Konstruktgeneration

In Vorversuchen mit CB1954 zeigte sich jedoch kein klarer verhaltenstypischer Phänotyp, wie z. B. erhöhte Aggression und Angst, der auf eine verminderte serotonerge Neurotransmission im Gehirn der NTR1-Mäuse schließen lässt. Diese Ergebnisse deckten sich mit dem Befund, dass keine signifikante Reduzierung der 5-HT-Gehalte im Gehirn CB1954-behandelter NTR1-Mäuse detektiert werden konnte, wodurch von einer unzureichenden CB1954-metabolisierenden Aktivität in den serotonergen Neuronen auszugehen ist. Da kein kommerzieller  $\alpha$ NTR-Antikörper zur Verfügung stand, konnte über die Expression der NTR auf Proteinebene keine Aussage getroffen werden. Basierend auf den im folgenden Abschnitt (Absch. IV.2.1) diskutierten *in vitro*-Daten zur Expression des bakteriellen *ntr*-Gens in verschiedenen Säugerzellen muss jedoch von erheblichen Expressions- und Faltungsproblemen der NTR in den transgenen Mäusen ausgegangen werden, die durch Unterschiede im synonymen Codongebrauch hervorgerufen werden (Absch. III.2). Pharmakokinetische Untersuchungen zeigten zudem, dass der Zugang des Protoxins *in vivo* durch die BBB erschwert wird und nur ca. 50 % des systemisch applizierten CB1954 ins Gehirn gelangt [WORKMAN *et al.*, 1986]. Trotzdem wurde das NTR/CB1954-System bereits erfolgreich für Ablationsstudien im Gehirn transgener Mäuse angewendet [CUI *et al.*, 2001; ISLES *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002], so dass auch Positionseffekte und Mosaizismus für die schwache NTR-Expression und den fehlenden Phänotyp der transgenen NTR1-Mäuse der ersten Konstruktgeneration verantwortlich sein können.

## 2 Codonoptimierung des NTR/CB1954-Systems

### 2.1 Überwindung der NTR-Expressionsprobleme in Säugerzellen

Die Expression heterologer Gene in Säugerzellen wird häufig durch Unterschiede im synonymen Codongebrauch zwischen Donor- und Wirtszelle beeinträchtigt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine geringe Expression des bakteriellen *gfp*-fusionierten *ntr*-Gens (*gntr*) in Säugerzellen beobachtet (Abb. III.7A und III.9C), die von einer Aggregation des rekombinanten GNTR-Fusionsproteins in COS7-Zellen begleitet wurde (Abb. III.5). Eine synthetische *ntr*-Version, in der die *E. coli*-spezifischen Codone an die Präferenzen der Maus angepasst wurden (Tabelle III.1, Abb. III.6), zeigte deutlich verbesserte Expressionseigenschaften in verschiedenen Säugerzellen und sensibilisierte *gntr*-exprimierende Zellen effizient gegenüber CB1954 (Abb. III.8 und III.9).

Durch die Degenerierung des genetischen Codes werden die meisten Aminosäuren durch mehrere Tripletts - synonyme Codone - verschlüsselt, die unterschiedlich häufig innerhalb einer Spezies verwendet werden [SHARP *et al.*, 1988]. Der Codongebrauch zwischen taxonomisch entfernten Spezies ist nicht konserviert und charakteristische Präferenzen existieren in Hinblick auf die Verwendung einzelner synonyme Codone [IKEMURA, 1985; SHARP *et al.*, 1988]. In vielen Spezies (Bakterien, Hefen, Mensch) korreliert ihre Frequenz mit der Expression verwandter tRNAs in der Zelle [IKEMURA, 1985; LAVNER und KOTLAR, 2005; SHARP *et al.*, 1988], deren Verfügbarkeit im Zytoplasma die Translationgeschwindigkeit einer mRNA durch das Ribosom moduliert [KOMAR und JAENICKE, 1995; KRASHENINNIKOV *et al.*, 1991]. So führte die rekombinante Expression bakterieller Gene in Säugerzellen in der Vergangenheit häufig zu geringen Proteinausbeuten [PATTERSON *et al.*, 2005; SHIMSHEK *et al.*, 2002; WELLS *et al.*, 1999], da die Häufung seltener Codone die Translation durch schnelle Depletion der verwandten tRNAs in der Wirtszelle verlangsamt [KANE, 1995]. Da 60 % Prozent der synonymen Codone des bakteriellen *ntr*-Gens in *Mammalia* unterrepräsentiert sind (Tabelle III.1), wurde das *gntr*-Gen in verschiedenen Säugerzelllinien im Vergleich zur synthetischen *gntr*-Variante nur zu etwa 50 % exprimiert (Abb. III.7A und III.9C).

Weitere Einschränkungen hinsichtlich der Expression ergeben sich aus der Korrelation zwischen synonymen Codongebrauch und Proteinstruktur. Die Faltung der Polypeptidkette erfolgt kotranslational, wobei bestimmte Abschnitte der Polypeptidkette Schritt für Schritt in die richtige Konformation falten [FEDOROV und BALDWIN, 1997; JOHNSON und CRAIG, 1997]. Das erfordert eine koordinierte zeitliche Trennung partieller Faltungseignisse, die durch seltene Codone der mRNA vermittelt werden. Diese werden häufig in Windungen, Schleifen und Domänenverbindungen gefunden [ORESIC und SHALLOWAY, 1998; THANARAJ und ARGOS, 1996], wo sie Translationspausen vermitteln, um initiale



Faltungsschritte des bereits synthetisierten Proteinabschnitts zu ermöglichen. Der Einfluss codonspezifischer Translationsraten auf die Proteinfaltung konnte experimentell durch Mutagenesestudien gezeigt werden [CORTAZZO *et al.*, 2002; CROMBIE *et al.*, 1994; IVANOV *et al.*, 1997; KOMAR *et al.*, 1999]. So führte der Austausch seltener Codone im Gen der *E. coli* Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT) durch bevorzugte synonyme Codone zu einer Beschleunigung der allgemeinen CAT-Proteinsynthese *in vitro*, jedoch zeigte das synthetisierte Protein trotz unveränderter Aminosäuresequenz eine um 20 % geringere Aktivität im Vergleich zum Wildtyp [KOMAR *et al.*, 1999]. Eine stille Mutation im *Echinococcus granulosus* EgFABP (*fatty acid binding protein 1*)-Gen resultierte in einer verringerten Löslichkeit des Proteins und der Induktion von Chaperonen nach Expression in *E. coli* [CORTAZZO *et al.*, 2002]. Entsprechend führte die *gntr*-Expression in COS7-Zellen ebenfalls zur Aggregation des GNTR-Fusionsproteins (Abb. III.5) und zeigt die Bedeutung des synonymen Codongebrauchs für die rekombinante Genexpression.

Zusammenfassend beeinflusst der differentielle synonyme Codongebrauch des bakteriellen *ntr*-Gens nicht nur die Geschwindigkeit der GNTR-Proteinsynthese in Säugerzellen, sondern auch die kotranslationale Proteinfaltung der naszierenden Proteinkette. Missgefaltete Proteine werden bereits während der Translation erkannt und durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert [SATO *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 1998], wodurch sich die Proteinausbeute weiter reduziert. Die Anpassung des *E. coli*-spezifischen Codongebrauchs an die Präferenzen der Maus verhinderte die Aggregation des GNTR-Fusionsproteins in *gntr*-exprimierenden COS7-Zellen (Daten nicht gezeigt) und ermöglichte eine hohe Proteinausbeute in Säugerzellen (Abb. III.7A und III.9C). Eine entsprechende Strategie wurde bereits für die rekombinante Expression anderer bakterieller Gene in Säugerzellen erfolgreich angewendet, darunter die Repressorproteine *lacI* und Tet [SCRABLE und STAMBROOK, 1997; WELLS *et al.*, 1999] sowie die Cre-Rekombinase [SHIMSHEK *et al.*, 2002] und Luciferase [PATTERSON *et al.*, 2005].

## 2.2 Bedeutung der *ntr* für *in vivo*-Zellablationstudien

Das NTR/CB1954-System ist ein geeignetes System, um die Funktion bestimmter Zellpopulationen *in vivo* zu studieren und wurde bereits in zahlreichen Geweben erfolgreich angewendet [CLARK *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 2001; DRABEK *et al.*, 1997; FELMER *et al.*, 2002; ISLES *et al.*, 2001; KWAK *et al.*, 2007; MA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004b]. Die Effizienz der Zellablation hängt dabei direkt von der CB1954-metabolisierenden Aktivität in den Zielzellen ab. Die NTR-vermittelte Aktivierung von CB1954 erfolgt relativ langsam mit einer Umsatzrate von  $k_{cat} = 6/s$  bei einem  $K_m$ -Wert von 860  $\mu M$  [ANLEZARK *et al.*, 1992],

wodurch das Enzym bei den erreichbaren Protoxinkonzentrationen *in vivo* (ca. 6  $\mu\text{M}$  beim Mensch) mit einer Effizienz von weniger als 1 % der maximalen Umsatzrate operiert. Kürzliche Publikationen haben sich deshalb auf die Verbesserung der katalytischen Aktivität der NTR fokussiert [GROVE *et al.*, 2003; GUISE *et al.*, 2007]. Basierend auf den NTR-Kristallstrukturen [JOHANSSON *et al.*, 2003; LOVERING *et al.*, 2001; PARKINSON *et al.*, 2000] wurden im Bereich des katalytischen Zentrums Aminosäuresubstitutionen eingeführt und die resultierenden Mutanten hinsichtlich ihrer CB1954-metabolisierenden Aktivität analysiert [GROVE *et al.*, 2003]. Die effektivste F124K-Mutante erhöhte die Sensitivität von SKOV3-Karzinomzellen gegenüber CB1954 um das ~ 5-fache bei klinisch relevanten Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ . Erst kürzlich konnten eine Reihe von TURBO-NTR-Varianten identifiziert werden, von denen die effizienteste T41Q/N71S/F124T-Triplemutante SKOV3-Zellen bereits bei 40- bis 80-fach geringeren CB1954-Konzentrationen im Vergleich zu wt-Protein sensibilisierte [GUISE *et al.*, 2007]. Trotzdem bleibt die Sensitivität der Zellen gegenüber dem Protoxin durch die intrazelluläre Menge an funktioneller NTR limitiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NTR-Expression Säugerzellen durch Unterschiede im synonymen Codongebrauch limitiert ist. Durch Anpassung des bakteriellen Codongebrauchs an die Präferenzen der Maus konnte die Expression der Nitroreduktase in verschiedenen *gntr*-exprimierenden Säugerzelllinien verdoppelt werden (Abb. III.7A und III.9C). Die damit verbundene Erhöhung der CB1954-metabolisierenden Aktivität korrelierte direkt mit der Sensibilisierung *gntr*-exprimierender Zellen, die gegenüber *gntr*-exprimierenden Vergleichszellen bereits bei 10-fach geringeren CB1954-Konzentrationen effizient abgetötet wurden (Abb. III.8B und III.9A, B).

Hohe CB1954-Konzentrationen von 20 bis 50 mg/kg sind erforderlich, um eine effiziente Ablation der Zielzellen in transgenen Tiermodellen zu ermöglichen, infolgedessen es zu Nebenwirkungen kommt [CUI *et al.*, 2001; DRABEK *et al.*, 1997; ISLES *et al.*, 2001]. Mehrere Studien berichteten von einem temporalen Gewichtsverlust (ca. 10 %) transgener Mäuse und Ratten nach CB1954-Applikation [COBB, 1970; CUI *et al.*, 2001; DRABEK *et al.*, 1997; ISLES *et al.*, 2001], was mit einer Beeinflussung der Darmflora (Enteritis) in Zusammenhang gebracht wurde, die *ntr*-positive *E. coli*-Bakterien enthält [CLARK *et al.*, 1997]. Die Behandlung transgener NTR1-Mäuse und Kontrollen offenbarte jedoch auch eine Atrophie der Testis, die bei Verwendung der in der Literatur beschriebenen CB1954-Konzentrationen von 50 mg/kg auf ein Drittel ihrer normalen Größe schrumpften (Daten nicht gezeigt). Auch beim Menschen führten CB1954-Konzentrationen von 37,5 mg/m<sup>2</sup> zu Durchfall und Leberschäden in klinischen Studien der Phase I [CHUNG-FAYE *et al.*, 2001]. In Hinblick auf die beobachteten Nebeneffekte erlaubt die effizientere

Expression des synthetischen *ntro*-Gens den Einsatz geringerer CB1954-Konzentrationen *in vitro* (Abb. III.8 und III.9). Nachfolgestudien müssen nun zeigen, ob der hohe Wirkungsgrad der *ntro* auch *in vivo* erreicht werden kann. Jedoch ist davon auszugehen, dass die Verwendung geringerer CB1954-Konzentrationen zur Minimierung der beobachteten Nebenwirkungen in transgenen Mäusen beitragen kann.

Trotz früherer Berichte über die erfolgreiche Verwendung des NTR/CB1954-Systems in verschiedenen Anwendungen im murinen Gehirn [CUI *et al.*, 2001; ISLES *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2002] sensibilisierte die *gntr*-Expression neuronale Zelllinien nur unzureichend gegenüber CB1954 (Abb. III.9B). Stabile *gntr*-exprimierende SH-SY5Y-Zellen wurden zwar im Wachstum gehemmt, jedoch im Gegensatz zu *gntr*-exprimierenden Zellen nicht durch CB1954 abgetötet. Interessanterweise wurden sowohl *gntr*- als auch *gntr*-exprimierende HEK293-Nierenzellen effizient gegenüber dem Protoxin sensibilisiert (Abb. III.9A). In diesem Zusammenhang wurde von Unterschieden im synonymen Codongebrauch zwischen sechs adulten Geweben des Menschen und der differentiellen Expression verwandter tRNA-Spezies in acht humanen Geweben berichtet [DITTMAR *et al.*, 2006; PLOTKIN *et al.*, 2004]. Dadurch ist es vorstellbar, dass Differenzierung und Regulation gewebespezifischer Gene des Menschen einer codonvermittelten Translationskontrolle unterliegen. Diese Befunde könnten die beobachteten Sensitivitätsunterschiede zwischen den humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und den Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) gegenüber CB1954 erklären (Abb. III.9).

In Hinblick auf die Generierung transgener Mäuse sollte die Verwendung der synthetischen *ntro*-Version die Expressionsprobleme des bakteriellen *ntn*-Gens in transgenen NTR1-Mäusen überwinden und eine effektive Ablation der Zielzellen *in vivo* ermöglichen. So konnte in unserer Gruppe bereits die erfolgreiche Ablation von pankreatischen  $\beta$ -Zellen in transgenen Mäusen gezeigt werden, die *gntr* unter Kontrolle des  $\beta$ -zellspezifischen *NkX2.2*-Promotors der Maus exprimierten. Im Glukosetoleranztest zeigten diese Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren eine veränderte Glukosehomöostase mit einem diabetischen Phänotyp nach CB1954-Behandlung [PAULMANN, 2008]. Diese Ergebnisse sind in Hinblick auf die Etablierung einer zweiten Generation von transgenen NTR-Mäusen zur Ablation der serotonergen Neuronen im Gehirn äußerst vielversprechend. Die Arbeiten dazu wurden bereits begonnen, konnten jedoch im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr abgeschlossen werden.

### 2.3 Anwendung der *ntro* in der humanen Gentherapie

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern, mit weltweit 7,6 Millionen (13 %) Toten im Jahr 2005 [WHO, 2006]. Die konventionelle

Krebsbehandlung beinhaltet meist die Anwendung von Chemotherapie, die jedoch aufgrund der schweren Nebenwirkungen stark dosislimitiert ist [CHABNER und ROBERTS, 2005]. Angesichts der wachsenden Zahl an Neuerkrankungen besteht jedoch ein großes Interesse an der Entwicklung neuartiger und effektiver Behandlungsmethoden. GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*) mit protoxinaktivierenden Enzymen bietet eine vielversprechende Alternative zur konventionellen Krebsbehandlung, mit der Möglichkeit hohe lokal begrenzte Zytotoxinkonzentrationen in Tumorzellen aufzubauen, ohne eine systemische Schädigung des Körpers zu verursachen [PORTSMOUTH *et al.*, 2007]. Da die Anzahl proliferierender Zellen in soliden humanen Tumoren nur schätzungsweise 6 % beträgt [TUBIANA und MALAISE, 1976], sind Systeme notwendig, die unabhängig vom Zellzyklus wirken. Das NTR/CB1954-System erfüllt diese Voraussetzung und vermittelt zudem den apoptotischen Zelltod unabhängig vom Tumorsuppressorgen *p53*, das in über 50 % aller humanen Tumore inaktiv ist [CUI *et al.*, 1999; MOLL und SCHRAMM, 1998].

Eine erste klinische Studie der Phase I hinsichtlich der Verträglichkeit von CB1954 im Menschen zeigte eine dosislimitierende Toxizität des Protoxins bei einer Dosis von  $37,5 \text{ mg/m}^2$ , die Diarrhöe und Leberschäden verursachte [CHUNG-FAYE *et al.*, 2001]. Eine Dosis von  $24 \text{ mg/m}^2$  CB1954 wurde hingegen gut vertragen und entspricht einer Serumkonzentration von etwa  $6 \mu\text{M}$ , bei der die NTR mit weniger als 1 % der maximalen Umsatzrate arbeitet [ANLEZARK *et al.*, 1992]. In diesem Konzentrationsbereich ist die *ntr* deutlich besser in der Lage humane Zelllinien gegenüber CB1954 zu sensibilisieren (Abb. III.9), wodurch sich der therapeutische Index einer potentiellen GDEPT-Behandlung erhöhen sollte.

Eine effiziente Anwendung in der humanen Krebsbehandlung durch GDEPT erfordert die spezifische Manipulation von Tumorzellen mit protoxinaktivierenden Genen; ein Problem, das bislang noch nicht gelöst werden konnte. In vorklinischen Studien konnten durch Verwendung retro- und adenoviraler Vektoren humane Tumorzellen durch die Expression von NTR gegenüber CB1954 sensibilisiert werden [BRIDGEWATER *et al.*, 1995; GREEN *et al.*, 1997; MCNEISH *et al.*, 1998; WEEDON *et al.*, 2000]. Zudem konnte durch Transduktion von Tumorexocraften mit *ntr*-Adenoviren *in vivo* die mittlere Überlebensrate von Mäusen verlängert, das Tumorstadium reduziert und teilweise eine totale Remission bewirkt werden [DJEHA *et al.*, 2001; WEEDON *et al.*, 2000]. Der *ntr*-Gentransfer mit dem replikationsdefizienten Adenovirus CTL102 wurde zudem in einer ersten klinischen Studie der Phase I an Patienten mit operierbarem Leberkrebs untersucht und zeigte die Durchführbarkeit und Verträglichkeit dieser Methode [PALMER *et al.*, 2004].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die Verbesserung des NTR/CB1954-Systems durch Verwendung einer codonoptimierten „*mousenized*“ *ntr*-Version (*ntr*). Da die meisten Säuger, einschließlich Mensch und Maus, ähnliche

Präferenzen hinsichtlich ihres synonymen Codongebrauchs haben, sollte das synthetische *ntro*-Gen auch für humane Anwendungen geeignet sein. Das konnte durch die Expression von *gntro* in mehreren humanen Zelllinien gezeigt werden, die eine erhöhte Expression und verstärkte Sensibilität gegenüber CB1954 im Vergleich zu *gntr*-exprimierenden Zellen zeigten (Abb. III.9).

Der Bystandereffekt ist ein wichtiger Aspekt der Tumorbehandlung durch GDEPT, der ausdrücklich erwünscht ist, um Limitierungen im Gentransfer zu überwinden und eine effektive Tumorregression, auch mit wenigen Suizidgen-exprimierenden Zellen zu ermöglichen. Dieser Effekt beruht auf der Freisetzung des aktiven Zytotoxins von sterbenden Zellen und der darauffolgenden Aufnahme durch benachbarte untransfizierte Zellen. Mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnten einen starken Bystandereffekt des NTR/CB1954-Systems zeigen, der gemischte Zellpopulationen bereits bei einem Anteil *ntr*-exprimierender Zellen von nur 5 - 10 % signifikant gegenüber CB1954 sensibilisierte [BRIDGEWATER *et al.*, 1997; DJEHA *et al.*, 2000; MCNEISH *et al.*, 1998]. Ein Bystandereffekt konnte auch bei GNTR-exprimierenden COS7-Zellen detektiert werden, der aufgrund der verbesserten Expressionseigenschaften bei *gntro*-exprimierenden Zellen noch stärker ausgeprägt war (Abb. III.8A).

Schlußfolgernd konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das NTR/CB1954-System durch Codonoptimierung auf translationeller Ebene effizient verbessert wurde, wodurch sich sein Potential als GDEPT in der humanen Krebsbehandlung enorm erhöht. Die Kombination der synthetischen *ntro* mit den publizierten Mutationen des katalytischen Zentrums sowie alternativen Substraten versprechen zudem eine weitere Erhöhung des therapeutischen Indexes einer potentiellen GDEPT-Behandlung [GROVE *et al.*, 2003; GUISE *et al.*, 2007; SEARLE *et al.*, 2004]. Letztendlich sollte die Optimierung des synonymen Codongebrauchs auch für andere EP-Systeme von Relevanz sein und ihren Wirkungsgrad erhöhen, um eine zweite Generation therapeutischer Gene zu ermöglichen, in denen natürliche Funktionen spezifisch an klinische Erfordernisse angepasst wurden.

### 3 Der spezifische $\alpha$ TPH2-Antikörper

Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein  $\alpha$ TPH2-Antikörper durch Verwendung eines Peptidantigens im N-Terminus des Proteins - einer Region ohne Homologie zu TPH1 - generiert. Im Immunblot reagierte der Antikörper spezifisch mit Zellextrakten von TPH2-exprimierenden primären 5-HT-Rapheneuronen [SCHEUCH *et al.*, 2007] und stabilen HEK293-Zellen, jedoch nicht mit TPH1-exprimierenden P815-Mastozytomzellen (Abb. III.11). Die Reaktivität des generierten  $\alpha$ TPH2-Antikörpers blieb in

immunhistochemischen Untersuchungen erhalten und konnte durch die spezifische Anfärbung serotonerger Rapheneuronen im Hirnstamm von Ratte und Maus belegt werden (Abb. III.11). Insgesamt zeigte sich eine breite spezieübergreifende Reaktivität des generierten  $\alpha$ TPH2-Antikörpers durch die Exposition entsprechender Antigene von Mensch, Ratte und Maus (Abb. III.11) und spiegelt die absolute Konservierung des verwendeten Peptidantigens in allen drei Spezies wider (Abb. III.10).

Die ersten  $\alpha$ TPH-Antikörper wurden bereits vor Entdeckung der TPH2 im Jahr 2003 gegen aufgereinigte TPH1 aus P815-Mastozymazellen oder gegen rekombinante TPH1 hergestellt, die jedoch aufgrund der hohen Identität der beiden Isoformen mit TPH2 im Gehirn kreuzreagieren [HAYCOCK *et al.*, 2002; YU *et al.*, 1999]. Der erste kommerziell verfügbare monoklonale  $\alpha$ WH3-Antikörper (E<sup>103</sup>SVPWFP<sup>109</sup> der Maus-TPH1) zeigte zwar eine Präferenz für TPH2 im Gehirn, detektiert aber auch TPH1 in der Epiphyse [HAYCOCK *et al.*, 2002] (Abb. III.11A). Erst kürzlich konnten mehrere  $\alpha$ TPH2-spezifische Peptidantikörper generiert werden, die z.T. mit dem hier verwendeten Antigen überlappen [CLARK *et al.*, 2007; KERMAN *et al.*, 2006; SAKOWSKI *et al.*, 2006]. Der in dieser Arbeit generierte  $\alpha$ TPH2-Antikörper sollte in der Lage sein, die Verteilung von TPH2 im ZNS von *Mammalia* zu untersuchen, um modulative Veränderungen der Proteinexpression unter physiologischen und pathologischen Zuständen zu detektieren.

## 4 Regulation der 5-HT-Biosynthese

### 4.1 Identifizierung von SNPs im humanen *TPH2*-Gen

*TPH2* ist seit seiner Entdeckung ein Kandidatengen für die Psychopathologie des menschlichen Gehirns. Genetische und biochemische Daten weisen auf daraufhin, dass genetische Variationen im humanen *TPH2*-Gen (*hTPH2*) an der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen beteiligt sind. Zahlreiche Assoziationsstudien konnten eine positive Kopplung überwiegend intronischer *hTPH2*-SNPs mit psychiatrischen Erkrankungen zeigen [HARVEY *et al.*, 2004; KULIKOV *et al.*, 2005; WALITZA *et al.*, 2005; ZILL *et al.*, 2004a; ZILL *et al.*, 2004b], jedoch wurden bislang nur wenig funktionelle Daten in Hinblick auf *hTPH2*-Genvarianten erbracht. Bis heute konnten nur drei funktionelle SNPs im kodierenden Bereich des *hTPH2*-Gens identifiziert werden, welche die enzymatische Aktivität beeinflussen und mit psychiatrischen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wurden (c.1322G>A, c.757C>T und c.907C>T) [CICHON *et al.*, 2008; MCKINNEY *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2005b]. Hingegen wurden im nahe verwandten *hPAH*-Gen bereits über 400 Mutationen gefunden, die über 300 Aminosäuresubstitutionen in der kodierenden Region verursachen [SCRIVER *et al.*, 2003].

In dieser Arbeit wurden durch Vergleich von *TPH2*-cDNA-Sequenzen von humanen *post mortem*-Proben psychiatrisch auffälliger Individuen und Kontrollen mit der *TPH2*-Referenzsequenz (GenBank NM\_173353) weitere 29 SNPs im kodierenden Bereich des humanen *TPH2*-Gens identifiziert (Abb. III.12, Tabelle III.2), von denen nur die Datenbank-SNPs *rs7305115* und *rs4290270* [HARVEY *et al.*, 2007; LIM *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2005b] sowie der von Zhang *et al.* beschriebene SNP 1463G>A (c.1322G>A) [ZHANG *et al.*, 2005b] bekannt waren. Einige der identifizierten Basenaustausche waren genomisch nicht kodiert und wurden auf posttranskriptionale Modifikationen der *hTPH2* prä-mRNA durch RNA-Editierung zurückgeführt (Abb. III.15 und III.16). Neben den zahlreichen SNPs konnte eine bislang unbekannte *hTPH2*-Spleißvariante identifiziert werden, die zur Unterscheidung von der *TPH2*-Referenzsequenz NM\_173353 (*TPH2a*) als *TPH2b* bezeichnet wurde (Abb. III.13).

## 4.2 Aktivität der humanen Tryptophan-Hydroxylase 2

### 4.2.1 Alternatives Spleißen humaner *TPH2*-Transkripte

Das präzise Herausschneiden der intronischen Sequenzen einer prä-mRNA während des Spleißens erfordert spezielle *cis*-regulatorische Elemente an den 5'- und 3'-Enden der Introne [WANG und COOPER, 2007]. Die intronische 5'-Spleißdonorstelle (SpDS) wird meist durch ein kanonisches GT-Dinukleotid gebildet, während die 3'-Spleißakzeptorstelle (SpAS) ein konserviertes AG aufweist [MOUNT, 1982]. GT-AG-Introne kommen beim Menschen mit einer Häufigkeit von 99,2 % vor [FARRER *et al.*, 2002]. Wesentlich seltener sind humane GC-AG-Introne (0,7 %), von denen 60 % alternativ gespleißt werden [THANARAJ und CLARK, 2001]. Die humane *TPH2* prä-mRNA wird überwiegend an GT-AG-Intronen gespleißt; mit Ausnahme von Intron 3, das zur GC-AG-Klasse gehört (Abb. III.13). Die Sequenzierung der *TPH2*-cDNAs offenbarte eine bislang unbekannte Spleißvariante, die durch alternatives Spleißen in Intron 3 entsteht (Abb. III.13). Dort befindet sich 6 bp abwärts der regulären GC-SpDS ein GT-Dinukleotid, das als alternative 5'-SpDS fungiert und eher der Konsensussequenz C/AAG\_GTA/GAGT entspricht (Tabelle IV.1) [MOUNT, 1982].

Die als *TPH2b* bezeichnete Spleißvariante unterscheidet sich von der *TPH2*-Referenzsequenz (*TPH2a*) in der Insertion von 6 bp in Exon 3, was auf Proteinebene zur Insertion der Aminosäuren G und K (p.E146\_E147insGK) führt (Abb. III.13, Tabelle IV.1). Strukturell unterbricht die GK-Insertion eine Reihe negativ geladener Glutamatreste in unmittelbarer Nähe der Scharnierregion (Pentapeptid <sup>151</sup>VPWFP<sup>155</sup> der humanen TPH2A) zwischen der regulatorischen und katalytischen

Domäne (Abb. III.13); einer Region, die für die Substratzugänglichkeit aller AAAs entscheidend ist [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; FITZPATRICK, 1999]. Allgemein herrscht die Vorstellung vor, dass die N-terminale Domäne im nicht aktivierten Grundzustand, wie ein Scharnierdeckel, den Zugang zum katalytischen Zentrum verhindert und dadurch die Enzymaktivität hemmt [FITZPATRICK, 1999]. Kinetische Studien zeigten eine erhöhte 5-HTP-Syntheseaktivität *TPH2b*-exprimierender Zellen mit einer Verdopplung der  $V_{max}$  im Vergleich zu *TPH2A* (Abb. III.19, Tabelle III.5). Die Verlängerung bzw. eine daraus resultierende strukturelle Veränderung der Scharnierregion könnte somit eine bessere Substratzugänglichkeit ermöglichen und die erhöhte Aktivität der *TPH2B* erklären.

**Tabelle IV.1** Exon-Intron-Grenzen der *Tph2*-Gene höherer Vertebraten.

Position	Spezies	Spleißakzeptorstelle	Spleißdonorstelle	
Exon 3	Mensch	...gtgtttccacag	GAAAAACGTG...GAGGAAGAAG	<b>GCAAGG</b> gtgggtc...
	Maus	...atgtttccctag	GAAAAACATG...GAGGAAGAAG	gcaaggctgatt...
	Ratte	...tgttttccacag	GAAAAACACG...GAGGAAGAAG	<b>GCAAGG</b> gtgggtt...
	Huhn	...ttctttcttcag	GAGAAGCATG...GATGAGGAAG	gcaaggctactt...
	Fisch	...ttgtgtttaaag	GAGAAGCATG...GCAGAGACCG	gtaagtctgaaa...
	Konsensus	<b>dkbtktyyhag</b>	<b>GARAARCRYG</b> ... <b>GMDGARRMMG</b>	<b>gyaagkstrvwh</b> ...
Exon 4	Mensch	...tgttttcaacag	AGCTAGAGGA...TGACCACCCA	gtaagtgtccag...
	Maus	...tgttacctgcag	ATCTCGAGGA...CGACCATCCA	gtaagtgtccgt...
	Ratte	...tgtttt <b>cagCAG</b>	AACTAGAGGA...CGACCACCCA	gtaagtgtccgt...
	Huhn	...tatcttctgcag	ATCTTGACTG...AGATCACCCCT	gtaagtgttaaca...
	Fisch	...tcttctttccag	ACTGTTTGGA...TGATCATCCA	gtaagttaatat...
	Konsensus	<b>tvtyhywvcag</b>	<b>AXYKHWSKR</b> ... <b>HGAYCAYCCW</b>	<b>gtaagtkwmhvd</b> ...

Betrachtet man die Exon-Intron-Grenzen des *Tph2*-Gens aller höheren Vertebraten, so beginnt Intron 3 stets mit einer untypischen GC-SpDS. Eine Ausnahme bilden die Fische, die anstelle des GC eine kanonische GT-SpDS aufweisen (Tabelle IV.1), wodurch sich für die GC-SpDS ein Konservierungszeitraum von mindestens 450 Millionen Jahren ableitet. Die im Mensch vorkommende alternative GT-SpDS findet sich auch bei Primaten und der Ratte. Letztere besitzt jedoch zusätzlich eine alternative 3'-SpAS 3 bp oberhalb der konstitutiven AG-SpAS. Damit lassen sich theoretisch vier *rTPH2*-Spleißisoformen ableiten, die sich von der Referenzsequenz NM\_173839 durch Insertionen von 3, 6 und 9 bp (c.424\_425insCAG, c.424\_425insGCAAGG und c.424\_425insGCAAGGCAG) unterscheiden. Alle vier postulierten *rTPH2*-Spleißisoformen konnten experimentell durch unsere Kooperationspartner am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC, Berlin) nachgewiesen werden [TENNER, 2007]. Auf Proteinebene resultieren die alternativ gespleißten *rTph2*-mRNAs in Isoformen mit den Insertionen p.E141\_E142insA, p.E141\_E142insGK und p.E141\_E142insGKA. Kinetische Untersuchungen der Spleißvarianten der Ratte müssen jedoch noch zeigen, ob die Insertionen in Analogie zur hTPH2B eine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität der rTPH2 haben. Durch die hohe Identität der beiden TPH2-Orthologe ist eine solche Korrelation durchaus



wahrscheinlich. Interessanterweise findet sich in Intron 3 von Maus und Huhn keine alternative SpDS (Tabelle IV.1), wodurch diese Spezies als Tiermodelle für die Untersuchung des alternativen Spleißens im *Tph2*-Gen ausscheiden.

Alternatives Spleißen konnte auch für andere Mitglieder der AAAHs gezeigt werden. So wurden beim Menschen vier TH-Spleißisoformen (hTH1 - 4) mit unterschiedlichen N-terminalen regulatorischen Domänen nachgewiesen [GRIMA *et al.*, 1987; KANEDA *et al.*, 1987; O'MALLEY *et al.*, 1987]. Beim Gorilla finden sich hingegen zwei TH-Varianten [ICHINOSE *et al.*, 1993], in Fischen und der Ratte nur noch eine Isoform [BOULARAND *et al.*, 1998], was auf eine evolutive Verfeinerung des katecholaminergen Neurotransmittersystems hindeutet. Das Auftreten von alternativem Spleißen im *hTPH2*-Gen zeigt ebenfalls eine zunehmende Komplexität des serotonergen Systems im Gehirn von Mensch, Primat und Ratte und spiegelt möglicherweise die besonderen Anforderungen an die synaptische Plastizität des serotonergen Systems im Gehirn höherer Vertebraten wider.

*TPH2b* wurde in allen Individuen unabhängig einer psychopathologischen Krankengeschichte detektiert und kann auch leicht im Gehirn der Ratte und der *TPH2*-exprimierenden humanen kleinzelligen Lungenkrebszelllinie SHP77 nachgewiesen werden (Abb. III.14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TPH2B zur allgemeinen 5-HT-Biosynthese im Gehirn beiträgt. Jedoch sind weiterführende Studien notwendig, um die physiologische Bedeutung der TPH2B aufzuklären.

#### 4.2.2 RNA-Editierung

Der Prozess der RNA-Editierung dient der Erzeugung molekularer und funktioneller Diversität und ist im ZNS meist auf bestimmte Hirnareale beschränkt [BARLATI und BARBON, 2005]. In dieser Arbeit konnte die Editierung von *TPH2a*-Transkripten ausschließlich in der Amygdala, die Editierung von *TPH2b*-Transkripten hingegen im gesamten Gehirn und SHP77-Zellen nachgewiesen werden (Tabelle III.4). *TPH2a* und *TPH2b* zeigen spezifische, sich gegenseitig ausschließende RNA-Editierungsmuster (*TPH2a* 1234 und *TPH2b* 1234, Abb. III.16), welche die Aktivität der resultierenden Proteinisoformen negativ modulieren und sogar vollständig ausschalten können (Abb. III.17, III.18 und III.19). Neben den überwiegend vollständig editierten *TPH2*-Transkripten spricht das Auftreten partiell editierter Versionen, wie *TPH2a* 2 und *TPH2b* 234 (Abb. III.12, Tabelle VI.1), für einen dynamischen Prozess, der kumulative Effekte der einzelnen Editierungspositionen auf die enzymatische Aktivität vermuten lässt. *TPH2a*-Transkripte werden an den Positionen c.-42T>C, c.711A>G (p.R237), c.1297A>G (p.R433G) und c.1322G>A (p.R441H) editiert (Abb. III.17). Interessant ist der

Basenaustausch c.1322G>A (auch bekannt als G1463A) an Editierungsposition 4, der bereits von Zhang *et al.* (2005b) als SNP beschrieben wurde und auf Proteinebene den Austausch von Arginin<sup>441</sup> (CGT) gegen Histidin<sup>441</sup> (CAT) verursacht. Die Expression der R441H-Mutante resultierte in PC12-Zellen in einer Verringerung der 5-HT-Gehalte um 80 % im Vergleich zu wtTPH2-exprimierenden Zellen [ZHANG *et al.*, 2005b]. Interessanterweise haben seitdem mehrere Labore weltweit vergeblich versucht, den SNP c.1322G>A auf genomischer Ebene von über 5000 Individuen zu verifizieren [BICALHO *et al.*, 2006; BLAKELY, 2005; GARRIOCK *et al.*, 2005; GLATT *et al.*, 2005; NIELSEN *et al.*, 2008; VAN DEN BOGAERT *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005a; ZHOU *et al.*, 2005a]. In der vorliegenden Arbeit konnte der Basenaustausch c.1322G>A auf RNA-Editierung zurückgeführt werden (Abb. III.15A). Die Expression von *TPH2a 1234* mit dem Aminosäureaustausch R441H zeigte ebenfalls eine verringerte 5-HT-Syntheseaktivität, jedoch waren die gemessenen 5-HT-Gehalte im Vergleich zu scheintransifizierten PC12-Zellen, die endogen ca. 20 % 5-HT enthielten, nicht signifikant erhöht (Abb. III.18). Deshalb stellte sich zwingend die Frage, ob die von Zhang *et al.* beobachtete 80 %ige Reduktion der 5-HT-Biosynthese infolge der R441H-Substitution nicht vielmehr einen totalen Funktionsverlust der TPH2A darstellt und die gemessene 20 %ige Restaktivität nur die geringe intrinsische 5-HT-Synthesekapazität der PC12-Zellen widerspiegelt. Letzteres kann durch eine geringe endogene TPH-Expression oder die bekannte Substratpromiskuität der Tyrosin-Hydroxylase [FITZPATRICK, 1999], welche stark in diesen katecholaminergen Zellen exprimiert wird, bewirkt werden. Entsprechend zeigte die Expression von *TPH2a 1234* in nicht-neuronalen HEK293-Zellen einen nahezu vollständigen Funktionsverlust der TPH2A 1234 mit 5 % der  $V_{max}$  des wt-Proteins (Abb. III.19).

Das Arg<sup>441</sup> ist innerhalb der AAAH-Familie in Mensch, Maus und Ratte hoch konserviert und unterstreicht seine essentielle Bedeutung für die enzymatische Funktion. Kinetische Untersuchungen mit rekombinanter TPH2-R441H offenbarten eine Verringerung der  $V_{max}$  auf 40 % des wt-Proteins bei signifikant erniedrigten  $K_m$ -Werten für Trp und BH4 [WINGE *et al.*, 2007]. Die Deletion der letzten 51 C-terminalen Aminosäuren ( $\Delta C51$ ), einschließlich des R<sup>441</sup>, führte zudem zum vollständigen Verlust der TPH2-Aktivität [TENNER *et al.*, 2007] und wurde auch für die entsprechende  $\Delta C55$ -Mutante der TPH1 beobachtet [YANG und KAUFMAN, 1994]. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Arg<sup>441</sup> einen direkten Einfluß auf die intrinsische Aktivität der TPH2A hat, da es sich zu weit entfernt vom Fe<sup>2+</sup>-Ion des katalytischen Zentrums befindet. Vielmehr scheinen sekundäre Effekte für die beobachtete Verringerung der 5-HT-Syntheseaktivität des R441H-Proteins verantwortlich zu sein, wofür seine stark verringerte Löslichkeit und Thermostabilität im Vergleich zum wt-Protein spricht [WINGE *et al.*, 2007]. Interessanterweise führt die R408W-Mutation an

der entsprechenden Position der PAH ebenfalls zum Verlust der Enzymaktivität und wurde als die pathogene Mutation in ~ 10 % der PKU-Patienten identifiziert [SCRIVER *et al.*, 2003; ZSCHOCKE, 2003]. Die R408W-Mutation beeinträchtigt die Faltung der PAH, wodurch sich dessen Stabilität verringert und die Degradierung durch zelluläre Proteasen beschleunigt wird [PEY *et al.*, 2003]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die R441H-Substitution die Proteinstruktur destabilisiert und so die enzymatische Aktivität der TPH2 reduziert.

Neben der zentralen Rolle des Basenaustausches c.1322G>A können kumulative Effekte die anderen Editierungspositionen zur enzymatischen Inaktivierung der TPH2 1234 beitragen. So führt die c.1297A>G-Editierung zum Austausch von Arg<sup>433</sup> gegen Gly<sup>433</sup>, einer ebenfalls hoch konservierten AS innerhalb der AAAHs, die zudem in unmittelbarer Nähe der inaktivierenden  $\Delta$ C51-Deletion liegt [TENNER *et al.*, 2007]. Zusätzlich werden *TPH2a*-Transkripte innerhalb der 5'-UTR an Position c.-42 durch T>C-Editierung modifiziert. Für den benachbarten *hTPH2*-SNP c.-52A>G konnte eine erhöhte Promotoraktivität in serotonergen RN46A-Rapheneuronen gezeigt werden, die möglicherweise infolge einer veränderten mRNA-Sekundärstruktur und/oder Bindung *trans*-wirkender Faktoren hervorgerufen wird [CHEN *et al.*, 2007]. Ein entsprechender Einfluss der Editierungsposition c.-42T>C auf die *TPH2*-Genexpression ist somit denkbar. Interessanterweise sind *TPH2b*-Transkripte durch ein eigenes Editierungsmuster charakterisiert und werden an den Positionen c.385C>T (p.Q126X), c.804A>G (p.K268), c.830C>T (p.P277L) und c.1403A>G (p.Q468R) modifiziert. Durch c.385C>T-Editierung entsteht in Exon 3 ein verfrühtes Stopcodon zwischen der regulatorischen und der katalytischen Domäne [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006], wodurch diese Transkripte ein hervorragendes Substrat für die mRNA-Degradierung durch NMD darstellen [HENTZE und KULOZIK, 1999; REED und HURT, 2002]. *TPH2b 1*-Transkripte lassen sich jedoch leicht detektieren (Abb. III.14 und III.20) und könnten in Analogie zum Apolipoprotein B vor NMD geschützt sein [BLANC und DAVIDSON, 2003; CHESTER *et al.*, 2003; WEDEKIND *et al.*, 2003]. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen, die Expression der resultierenden TPH2B 1 auf Proteinebene nachzuweisen. Jedoch kann über eine physiologische Bedeutung der enzymatisch inaktiven TPH2B 1 spekuliert werden, die beispielsweise durch Interaktion mit der langen Isoform oder *trans*-wirkenden Bindungspartnern/Mediatoren durch einen dominant-negativen Effekt regulierend auf die TPH2-Aktivität wirken könnte. Als Beispiel dienen katalytisch inaktive Spleißisoformen des *Drosophila dNOS*-Gens, die als dominant-negative Regulatoren die NO-Synthese modulieren [STASIV *et al.*, 2001]. Zudem wurde von Transkriptionsfaktoren berichtet, deren DNA-Bindeaktivität durch alternatives Spleißen moduliert wird, wodurch Aktivator und Repressor von einem Gen exprimiert

werden [LOPEZ, 1995]. Weiterführende Studien sind notwendig, um die biologische Signifikanz der TPH2B 1 aufzuschlüsseln.

Nichtsdestotrotz wurden auch *TPH2b* 234-Transkripte gefunden, die zur Expression eines vollständigen TPH2B-Proteins mit den Aminosäuresubstitutionen p.P277L (c.830C>T) und p.Q468R (c.1403A>G) führen (Tabelle III.4). Basierend auf der TPH1-Kristallstruktur findet der Austausch des hoch konservierten P<sup>277</sup> gegen L<sup>277</sup> in unmittelbarer Nähe eines Sequenzmotivs für die Bindung von BH4 und Trp statt [WALTHER und BADER, 2003; WANG *et al.*, 2002], wodurch ein Einfluss auf die katalytische TPH2B-Aktivität denkbar ist. Der Aminosäureaustausch p.Q468R könnte hingegen mit der Oligomerisierung des TPH2B-Proteins interferieren, da er sich nahe dem C-terminalen Leucin-Zippers befindet, dessen Deletion zu Monomeren mit deutlich verringerter Aktivität ( $V_{max} = 50\%$ ) führt [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; TENNER *et al.*, 2007].

Einige Editierungspositionen der *TPH2a*- und *TPH2b*-Transkripte verursachen hingegen synonyme Basenaustausche ohne Auswirkung auf die Aminosäuresequenz. Jedoch wurde kürzlich unter physiologischen Bedingungen von einem synonymen SNP im humanen *MDR1*-Gen berichtet, der die Konformation und Transporteigenschaften des kodierten P-Glykoproteins moduliert und mit einer veränderten Translationskinetik in Zusammenhang gebracht wurde [KIMCHI-SARFATY *et al.*, 2007]. Die stillen Basenaustausche c.711A>G (p.R237) und c.804A>G (p.K268) könnten demnach durch Änderungen im synonymen Codongebrauch Einfluss auf die Translationskinetik und kotranslationale Proteinfaltung nehmen und so die enzymatische Aktivität der TPH2 modulieren [CORTAZZO *et al.*, 2002; KOMAR *et al.*, 1999].

Die RNA-Editierung humaner *TPH2*-Transkripte ist sehr vielfältig (Abb. III.16). Am häufigsten ist der Mechanismus der A>I-Editierung, der durch die Adenosindeaminasen der ADAR-Familie katalysiert wird und bei *Mammalia* mit Abstand am häufigsten vertreten ist [MAAS *et al.*, 2006; NISHIKURA, 2006]. So wird die Aktivität zahlreicher Neurotransmitterrezeptoren durch A>I-Editierung bestimmt, darunter der 5-HT<sub>2C</sub>R und die GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors [BURNS *et al.*, 1997; HIGUCHI *et al.*, 1993]. Weiterhin findet sich die C>U-Editierung, die bei Säugern für Apolipoprotein B (*APOB*), Neurofibromin (*NF1*) und den GlyR $\alpha$ 3-Rezeptor beschrieben wurde [MEIER *et al.*, 2005; POWELL *et al.*, 1987; SKUSE *et al.*, 1996]. Diese Form der RNA-Editierung wird durch die Mitglieder der APOBEC-Familie reguliert, deren Ziele noch weitestgehend unbekannt sind [NAVARATNAM und SARWAR, 2006; WEDEKIND *et al.*, 2003]. *TPH2b* könnte demnach das Ziel für ein oder mehrere APOBEC-Proteine sein, deren Identität jedoch noch aufgeklärt werden muss, um ihren möglichen Einfluss auf die 5-HT-Homöostase zu verstehen. U>C-Editierung ist selten und wurde in *Mammalia* nur für *WT-1* (Wilms-Tumor-Gen 1) und *C18ORF1*, ein Gen mit noch unbekannter Funktion, beschrieben [KIKUCHI *et al.*, 2003;

SHARMA *et al.*, 1994]. Die *TPH2a*-Position c.1322G>A stellt jedoch die interessanteste aller Editierungsformen dar, die bislang ausschließlich für die provirale RNA des HI-Virus beschrieben werden konnte [BOURARA *et al.*, 2000], wodurch *TPH2* eine einzigartige Möglichkeit bietet, die seltenste aller bekannten Editierungsmechanismen in einem physiologischen Kontext zu untersuchen.

Andere neuronale Gene sprechen dafür, dass RNA-Editierung eine entscheidende Rolle bei der Feinregulation der neuronalen Informationsübertragung spielt [BURNS *et al.*, 1997; HIGUCHI *et al.*, 1993; KOHLER *et al.*, 1993; MEIER *et al.*, 2005]. Das am besten untersuchte Beispiel in der Psychopharmakologie ist der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor (Absch. I.6.2), der ausgiebig editiert und dessen alternatives Spleißen durch diesen Prozess beeinflusst wird [BURNS *et al.*, 1997; FLOMEN *et al.*, 2004; KISHORE und STAMM, 2006]. Zusätzlich zur Dichotomie des serotonergen Systems, definiert durch die zwei geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme TPH1 und TPH2, in peripheren bzw. neuronalen Geweben, bietet die *TPH2a/b*-Editierung einen noch feineren Mechanismus, um die zentrale 5-HT-Biosynthese in einem optimalen Bereich zu halten.

#### 4.2.3 Heteromerisierung

Die Generierung funktioneller Diversität durch alternatives Spleißen und RNA-Editierung des *TPH2*-Gens erlaubt eine komplexe Feinregulierung der 5-HT-synthetisierenden Aktivität im Gehirn. Die AAHs sind jedoch multimere Enzyme, die in ihrer physiologisch aktiven Form hauptsächlich als Tetramere wirken [CARKACI-SALLI *et al.*, 2006; FITZPATRICK, 1999]. Durch alternatives Spleißen und RNA-Editierung werden katalytisch unterschiedliche TPH2-Isoformen generiert (Abb. III.19), deren C-terminale Oligomerisierungsdomäne jedoch unverändert bleibt. Eine Heteromerisierung verschiedener Isoformen ist bereits von der PAH bekannt [LEANDRO *et al.*, 2006; WATERS *et al.*, 2001]. Koexpressionsstudien zeigten zudem, dass die wtTPH2 ebenfalls in der Lage ist, mit den TPH2-Varianten R441H und P206S funktionelle Heterotetramere zu bilden, wobei die enzymatische Aktivität der resultierenden Hybride im Vergleich zu wt-Homotetrameren reduziert war [CICHON *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2005b]. Letzteres wurde mit einer Destabilisierung der TPH2-Heterotetramere in Zusammenhang gebracht [CICHON *et al.*, 2008]. Zudem konnten TPH1-TPH2-Heterotetramere *in vitro* nachgewiesen werden, deren physiologische Relevanz aufgrund der spezifischen Expressionsorte der beiden TPHs jedoch fraglich ist [TENNER *et al.*, 2007]. Es ist somit wahrscheinlich, dass eine weitere Regulation der 5-HT-Biosynthese auf Ebene der Proteinassemblierung erfolgt, die eine noch feinere Regulation der TPH2-Aktivität erlaubt.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass die zentrale 5-HT-Biosynthese ein hoch regulierter Prozess ist, der durch die Generierung von TPH2-Varianten mit den unterschiedlichsten kinetischen Eigenschaften eine umfangreiche biochemische Diversität und Komplexität aufweist. Diese komplexe Feinregulation der TPH2 sollte es ermöglichen, die 5-HT-Biosynthese den Erfordernissen der synaptischen Aktivität anzupassen, um die serotonerge Neurotransmission in einem optimalen Bereich zu halten.

#### 4.2.4 Bedeutung des SNPs *rs4290270*

Ein interessanter Befund der vorliegenden Arbeit war das Fehlen von *TPH2b*-Transkripten oder RNA-Editierung in Abwesenheit des SNPs *rs4290270* (c.1125A>T) (Abb. III.12, Tabelle III.4 und VI.1). Diese Tatsache spiegelt möglicherweise die kürzlich entdeckte Regulation des alternativen Spleißens beim 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor durch die snoRNA HBII-52 wider [KISHORE und STAMM, 2006]. HBII-52 ist komplementär zu einem exonischen Spleißsuppressorelement (ESS) in Exon Vb nahe der alternativen 5'-SpDS, dessen Bindung den Einschluss von Exon Vb und damit die Bildung eines funktionellen Rezeptors fördert. Durch Mutagenese der ESS-Bindungsstelle wird hingegen Exon Va eingebaut [KISHORE und STAMM, 2006], wodurch ein trunkierter inaktiver Rezeptor entsteht [WANG *et al.*, 2000b].

Die Regulation von alternativem Spleißen durch snoRNAs ist auch für das *TPH2*-Gen vorstellbar, jedoch wurde keine komplementäre snoRNA für den SNP *rs4290270* in den existierenden Datenbanken gefunden. Allerdings generiert der SNP *rs4290270* T ein exonisches Spleißverstärkermotiv (ESE) für die Spleißfaktoren SC35 und SRp40, was den allelspezifischen Einfluss des SNPs auf das alternative Spleißen erklären könnte [NIELSEN *et al.*, 2008]. Letztendlich könnten aber auch c.1125A>T-bedingte Unterschiede in der mRNA-Sekundärstruktur unterschiedliche Expressionseffizienzen verursachen und so für das Fehlen von *TPH2b*-Transkripten verantwortlich sein.

Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten humanen TPH2-exprimierenden SHP77-Zellen sind homozygot für den SNP *rs4290270* T (Abb. III.21) und zeigten entsprechend der *rs4290270*-Hypothese alternatives Spleißen und RNA-Editierung von *TPH2b*-Transkripten (Daten nicht gezeigt). Die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen stellt eine große Herausforderung dar, wobei SHP77-Zellen als ein geeignetes Zellkultursystem dienen könnten.

### 4.3 Klinische Zusammenhänge

#### 4.3.1 Dysregulation der *TPH2*-Editierung bei psychiatrischen Erkrankungen

Die Analyse von *post mortem*-Gehirnproben von Patienten mit einer psychopathologischen Krankengeschichte ergab eine 20 %ige Erhöhung der *TPH2a* 1234-Editierung der mRNAs von Betäubungsmittel-toten und Suiziden im Vergleich zu den Kontrollen, während in Schizophreniepatienten keine Editierung von *TPH2a* nachgewiesen werden konnte (Tabelle III.6). Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die *TPH2a*-Editierung die Ursache psychiatrischer Erkrankungen oder eine Konsequenz von Drogenmissbrauch bzw. Medikamentenkonsum sein.

In diesem Zusammenhang soll der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor betrachtet werden, dessen prä-mRNA an fünf Positionen in Exon V dynamisch editiert wird. Funktionell resultiert die 5-HT<sub>2C</sub>R-Editierung in unterschiedlichen Rezeptorisoformen, wodurch die Stärke der intrazellulären Signaltransduktion in Abhängigkeit von der serotonergen Neurotransmission moduliert wird [BURNS *et al.*, 1997; FITZGERALD *et al.*, 1999; GUREVICH *et al.*, 2002a; HERRICK-DAVIS *et al.*, 1999; NISWENDER *et al.*, 1999]. Entsprechend konnten Veränderungen im Editierungsstatus des 5-HT<sub>2C</sub>Rs mit Depression, Suizidalverhalten und Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden [DRACHEVA *et al.*, 2007; GUREVICH *et al.*, 2002b; IWAMOTO und KATO, 2003; NISWENDER *et al.*, 1999; SODHI *et al.*, 2001]. So zeichnen sich die 5-HT<sub>2C</sub>R-Isoformen im PFC von depressiven Suizidopfern im Vergleich zu gesunden Kontrollen durch eine verringerte basale Aktivität und reduzierte Bindungseigenschaften für 5-HT aus. Der 5-HT<sub>2C</sub>R-Editierungsstatus kann jedoch durch Antidepressiva moduliert werden, die in *Rodentia* die Bildung von Rezeptoren mit erhöhter Aktivität fördern [GUREVICH *et al.*, 2002b; IWAMOTO *et al.*, 2005].

Diese komplexe Feinregulation des 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptors wird als ein entscheidender Mechanismus betrachtet, die Rezeptorfunktion an die synaptische Aktivität anzupassen, um eine optimale Informationsverarbeitung nach Agonistenstimulierung zu gewährleisten [GUREVICH *et al.*, 2002a]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die zentrale 5-HT-Biosynthese ebenfalls durch *TPH2*-prä-mRNA-Editierung reguliert wird und dass dieser Mechanismus durch Drogenmissbrauch oder Medikamentenkonsum in Analogie zum 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor beeinträchtigt wird. Da das zur Verfügung stehende Kollektiv von *post mortem*-Gehirnproben jedoch sehr klein war, müssen Schlußfolgerungen vorsichtig gezogen und die Ergebnisse in einer umfangreicheren Folgestudie verifiziert werden.

### 4.3.2 Drogenmissbrauch

Die untersuchten *post mortem*-Gehirnproben von Betäubungsmittel-toten stammten hauptsächlich von Heroinabhängigen. Heroin stimuliert das körpereigene Belohnungssystem durch Bindung der  $\mu$ -Opioidrezeptoren inhibitorischer GABA-Interneuronen, wodurch die dopaminergen Neuronen der VTA enthemmt werden und verstärkt DA im NAc und anderen terminalen mesocorticolimbischen Gehirnregionen, einschließlich der Amygdala und des medialen PFCs, freigesetzt wird [FELTENSTEIN und SEE, 2008]. Serotonin wirkt dem entgegen und verstärkt über 5-HT<sub>2C</sub>Rs die GABA-vermittelte Hemmung der dopaminergen VTA-Neuronen [DI MATTEO *et al.*, 2001; EBERLE-WANG *et al.*, 1997]. Die Verstärkung der serotonergen Neurotransmission durch Fluoxetin (SSRI), Trp oder D-Fenfluramin (5-HT-Freisetzung) führte zu einer reduzierten Selbstverabreichungstendenz psychotroper Drogen [FLETCHER *et al.*, 1999; HIGGINS *et al.*, 1994; MCGREGOR *et al.*, 1993], wodurch 5-HT in der Lage ist, die Wirkung von Psychostimulanzien zu unterdrücken. Die verstärkte *TPH2a* 1234-Editierung in den Heroinabhängigen (Tabelle III.6) könnte demnach die Wirkung von Psychostimulanzien potenzieren und zu einem verstärkten Suchtverhalten beitragen.

Heroinabhängige werden meist nach periodischer Abstinenz oder langjährigem Entzug rückfällig [CHUTUAPE *et al.*, 2001; GOSSOP *et al.*, 1989]. Auslöser sind häufig Reize, die mit der Drogeneinnahme assoziiert werden (z. B. der Anblick von Drogenbesteck), wodurch die subjektive Sehnsucht nach der Droge ausgelöst und entsprechende Verhaltensmuster initiiert werden, die in einem erneuten Drogenkonsum resultieren [CHILDRESS *et al.*, 1994; EHRMAN *et al.*, 1992]. Entsprechend kann bei Ratten, die auf die Einnahme von Heroin in Anwesenheit eines neutralen Reizes (z. B. akustisches Signal, Pawlowsche Konditionierung) trainiert wurden, ein bereits ausgelöschtes heroinsuchendes Verhalten (z. B. das Betätigen eines Schalters) in Reaktion auf den konditionierten Reiz wiederhergestellt werden [FUCHS und SEE, 2002; GRACY *et al.*, 2000; MCFARLAND und ETTENBERG, 1997]. Für die initiale Ausbildung von Droge-Reiz-Assoziationen ist die BLA entscheidend, deren Inaktivierung bei Ratten die konditionierte Wiederaufnahme der Drogensuche hemmt [FUCHS und SEE, 2002] und zudem das Erlernen neuer Assoziationen blockiert [HATFIELD *et al.*, 1996; WHITELAW *et al.*, 1996]. PET-Studien beim Menschen zeigten eine verstärkte neuronale Aktivität der Amygdala nach Exposition konditionierter Reize, was die Bedeutung dieser Hirnregion für die konditionierte Verhaltenskontrolle unterstreicht [CHILDRESS *et al.*, 1999; KILTS, 2001]. Da die Aktivität der Amygdala durch 5-HT kontrolliert wird [RAINNIE, 1999; STUTZMANN und LEDOUX, 1999] und eine Hyperaktivität der Amygdala mit Genvarianten des serotonergen Systems in Zusammenhang gebracht wurde [BROWN *et al.*, 2005; CANLI *et al.*, 2005; CANLI und LESCH,



2007; HERRMANN *et al.*, 2007; KEELE, 2005], könnte eine erhöhte *TPH2a* 1234-Editierung zu einer verstärkten Reaktion auf drogenkonditionierte Reize beitragen.

Dopaminerge Projektionen des mesolimbischen Systems zur BLA spielen eine entscheidende Rolle beim Erlernen und Abrufen von Droge-Reiz-Assoziationen. Elektrophysiologische Daten zeigen, dass DA den Eingang sensorischer Signale zur BLA verstärkt und die inhibitorische Kontrolle des PFCs hemmt [GRACE und ROSENKRANZ, 2002; ROSENKRANZ und GRACE, 1999, 2002]. Durch Drogeneinnahme sinkt die Fähigkeit des PFC den Eingang sensorischer Signale zur Amygdala zu unterdrücken (Entkopplung der Verhaltenskontrolle des PFC), während die Fähigkeit der sensorischen Afferenzen zur Aktivierung der BLA steigt (Hyperaktivität der BLA). Entsprechend führte bei Ratten die verstärkte Freisetzung von DA in der BLA durch bilaterale Injektion von d-Amphetamin zu einer schnelleren Konditionierung [HITCHCOTT *et al.*, 1997] und verstärkten Reaktion auf kokainverwandte Reize [LEDFORD *et al.*, 2003], wohingegen die Verabreichung eines DA-Antagonisten zum Zeitpunkt des Lernens die Wiederherstellung des drogensuchenden Verhaltens dosisabhängig abschwächte [SEE *et al.*, 2001]. Die Rolle von DA beim assoziativen Lernen wird zudem durch die Tatsache unterstützt, dass die Amygdala assoziative LTP zeigt, die durch DA reguliert wird [BISSIERE *et al.*, 2003; ROGAN *et al.*, 1997]. Der Eingang sensorischer Informationen zur BLA wird zudem durch 5-HT reguliert, das über inhibitorische GABA-Interneuronen die sensorischen Afferenzen blockiert [STUTZMANN und LEDOUX, 1999]. Eine verminderte serotonerge Aktivität aufgrund erhöhter *TPH2a*-Editierung sollte eine Hyperaktivität der Amygdala verursachen, welche die Konditionierung auf neutrale Reize fördert, die bei späterer Exposition die Kontrolle über das drogensuchende Verhalten übernehmen. Diese Hypersensibilität der Amygdala könnte demnach die hohe Rückfallquote von Heroinabhängigen erklären [CHUTUAPE *et al.*, 2001; GOSSOP *et al.*, 1989].

#### 4.3.3 Suizid

In *post mortem*-Proben von Suizidopfern konnte nur eine marginale *TPH2b*-Expression bei verstärkter Editierung von *TPH2a* detektiert werden (Abb. III.20, Tabelle III.6). Die Abwesenheit des hoch aktiven TPH2B-Proteins und die Expression der schwach aktiven TPH2A 1234 könnte die seit langem bekannte Hypofunktion des 5-HT-Systems in depressiven Suizidopfern erklären [ASBERG *et al.*, 1976; MALONE *et al.*, 1996; MANN, 2003]. TPH2 ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der 5-HT-Biosynthese im Gehirn und ein Kandidateng für Suizidalverhalten [WALTHER *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2004]. Entsprechend zeigten Haplotypstudien eine Assoziation überwiegend intronischer *TPH2*-SNPs mit vollendetem Suizid und versuchtem Selbstmord [DE LARA *et al.*, 2007;

ZHOU *et al.*, 2005b; ZILL *et al.*, 2004b]. Der SNPs *rs7305115* (c.936A>G) kam zudem in depressiven Chinesen mit mehrfachem Suizidversuch im Vergleich zu MD-Patienten ohne Selbstmordgeschichte weniger häufig vor, wobei für homozygote A/A-Träger eine protektive Wirkung gegenüber Suizid vermutet wurde [KE *et al.*, 2006]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass der SNP *rs4290270* T alternatives Spleißen und Editierung humaner *TPH2*-Transkripten reguliert (Tabelle III.4). Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte, zeigte eine Assoziationsstudie bezüglich des SNPs *rs4290270* eine genetische Prädisposition homozygoter A/A-Träger für Suizid (Abb. III.22).

Untersuchungen zur TPH2-Expression in depressiven Suiziden zeigten im Vergleich zu den Kontrollen entweder keine Änderung der TPH2-Immunreaktivität in verschiedenen Hirnarealen [BONKALE *et al.*, 2004; ONO *et al.*, 2002] oder aber eine verstärkte Expression in den dorsalen Raphekernen [BOLDRINI *et al.*, 2005; UNDERWOOD *et al.*, 1999]. Letzteres wurde auf mRNA-Ebene bestätigt und mit einer homöostatischen Reaktion auf eine verminderte serotonerge Neurotransmission erklärt [BACH-MIZRACHI *et al.*, 2006; BACH-MIZRACHI *et al.*, 2008]. In Hinblick auf die Existenz von *TPH2*-Genvarianten mit verminderter enzymatischer Aktivität [CICHON *et al.*, 2008; MCKINNEY *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2005b] lassen RNA-basierte Techniken und IHC jedoch keine Aussagen über die eigentliche 5-HT-Syntheseaktivität in den untersuchten Proben zu. Diese Tatsache wird durch das Auftreten von alternativem Spleißen und RNA-Editierung bedingt, die zu verschiedenen TPH2-Proteinvarianten führt, deren Einfluss auf die 5-HT-Synthese in kinetischen Studien gezeigt werden konnte (Abb. III.16 und III.19).

Suizidalverhalten korreliert stark mit einer verminderten Impulskontrolle, deren Merkmale Aggression und impulsives Verhalten sind und mit einer verminderten serotonergen Funktion in Zusammenhang gebracht wurde [TURECKI, 2005]. So resultierte die Depletion von 5-HT mittels PCPA und die genetische Ausschaltung von Komponenten des serotonergen Systems (*Maoa*, *Pet1* und *5ht1br*) in verstärkter Aggression bei *Rodentia* [CASES *et al.*, 1995; HENDRICKS *et al.*, 2003; MICZEK *et al.*, 1975; SAUDOU *et al.*, 1994; VERGNES *et al.*, 1986]. Depressive Patienten zeigten zudem eine Tendenz zur Verübung eines gewaltsamen Selbstmordes, was allgemein als aggressive Tat angesehen wird [ASBERG *et al.*, 1976; MANN, 2003; MANN und MALONE, 1997]. Aggressives und impulsives Verhalten korreliert mit einer Hyperaktivität der Amygdala [KEELE, 2005], deren neuronale Erregbarkeit durch 5-HT limitiert wird [RAINNIE, 1999; STUTZMANN und LEDOUX, 1999]. Elektrophysiologische Studien zeigten eine niedrigere Reizschwelle der BLA-Neuronen aggressiver PCPA-behandelter Ratten im Vergleich zu nicht aggressiven Kontrollen [KEELE und RANDALL, 2003]. Durch eine erhöhte *TPH2a*-Editierung in der Amygdala könnten Suizide demnach verstärkt negativ auf ihre Umwelt reagieren, wofür auch eine

erhöhte Amygdalaaktivität in Reaktion auf ängstliche Gesichter nach cerebraler 5-HT-Reduktion durch akute Trp-Depletion spricht [COOLS *et al.*, 2005]. Unter Umständen könnte das zur Manifestierung von Selbstmordgedanken führen, die normalerweise durch den PFC gehemmt werden, einer Region, die für die Verhaltenskontrolle verantwortlich ist und deren Aktivität ebenfalls durch 5-HT reguliert wird [SIEVER, 2008]. Jedoch zeichnen sich Suizide durch eine Erniedrigung der präsynaptischen SERT-Bindungsstellen und eine Erhöhung der postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte im ventrolateralen PFC aus [ARANGO *et al.*, 1995], was für eine verringerte synaptische 5-HT-Aktivität in diesem Hirnareal spricht, wodurch Suizidgedanken möglicherweise nur unzureichend gehemmt werden [MANN, 2003]. Die Hypersensibilität der Amygdala in Reaktion auf negative Reize, hervorgerufen durch die Dysregulation von alternativem Spleißen und RNA-Editierung humaner *TPH2*-Transkripte, könnte in Kombination mit einer reduzierten präfrontalen Verhaltenshemmung impulsives Verhalten fördern und so für ein erhöhtes Suizidrisiko verantwortlich sein.

#### 4.3.4 Schizophrenie

In Patienten mit diagnostizierter Schizophrenie konnte keine Editierung von *TPH2a*-Transkripten in der Amygdala nachgewiesen werden. Zudem war die *TPH2b*-Expression bei reduzierter Editierung an der Position 1 im Vergleich zu den Kontrollen extrem erhöht (Abb. III.20, Tabelle III.6) und lässt auf eine verstärkte 5-HT-Aktivität bei Schizophrenie schließen; eine Vermutung, die durch erhöhte 5-HIAA-Gehalte in der CSF von Schizophrenen unterstützt wird [KING *et al.*, 1985].

Eine frühere Studie zum 5-HT<sub>2C</sub>R-Editierungsstatus im PFC von Schizophreniepatienten berichtete von einer reduzierten RNA-Editierung von 5-HT<sub>2C</sub>R-Transkripten und dem verstärkten Auftreten der nicht editierten INI-Form mit der höchsten konstitutiven Aktivität, die in Kontrollen nicht auftrat [SODHI *et al.*, 2001]. Diese Ergebnisse sprechen für eine verstärkte 5-HT<sub>2C</sub>R-vermittelte Neurotransmission im PFC von Schizophrenen und stehen in Einklang mit der erfolgreichen Behandlung der Negativsymptome von Schizophrenie mit den atypischen Neuroleptikum Clozapin, welches die konstitutive Aktivität des 5-HT<sub>2C</sub>Rs blockiert [HERRICK-DAVIS *et al.*, 2000]. Zudem wurde bei Schizophrenie von einer verringerten RNA-Editierung von GluR2-Transkripten im PFC berichtet, wodurch AMPA-Rezeptoren mit verstärkter Ca<sup>2+</sup>-Permeabilität entstehen, was zur neuronalen Dysfunktion bei Schizophrenie beitragen könnte [AKBARIAN *et al.*, 1995]. Diese Ergebnisse sprechen für eine globale Beeinträchtigung der RNA-Editierungsmaschinerie bei Schizophrenie, für die z. B. eine veränderte Expression und/oder Aktivität der Editierungsenzyme verantwortlich sein könnte.

Schizophrenie zeichnet sich durch eine beeinträchtigte Wahrnehmung und Verarbeitung von Emotionen aus; die eine Dysfunktion der Amygdala nahelegen. Entsprechend reagieren schizophrene Patienten insbesondere auf traurige, aversive und bedrohende Reize mit einer verringerten Aktivierung der Amygdala [BRUNET-GOUET und DECETY, 2006; PHILLIPS *et al.*, 1999; SCHNEIDER *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 2004]. Diese Hypofunktion wurde mit strukturellen Defiziten der Amygdala in Verbindung gebracht, die bei Schizophrenen eine 6 - 10 %igen Volumenreduktion aufweist [ALEMAN und KAHN, 2005; LAWRIE und ABUKMEIL, 1998; NELSON *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2000]. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass Individuen mit Läsionen der Amygdala ebenfalls Schwierigkeiten in der emotionalen Beurteilung von Gesichtsausdrücken haben [AGGLETON und SHAW, 1996]. Eine PET-Studie zeigte zudem eine reduzierte 5-HT<sub>1A</sub>R-Dichte in der Amygdala [YASUNO *et al.*, 2004], dessen postsynaptische Stimulierung die neuronale Aktivität hemmt [PUGLIESE *et al.*, 1998]. Dabei könnte es sich jedoch um eine Anpassung an eine verstärkte 5-HT-Biosynthese handeln, um eine exzessive Hemmung der Amygdala zu verhindern [RAINNIE, 1999]. Basierend auf den Ergebnissen von Stutzmann *et al.* (1999) und Rainnie *et al.* (1999) spricht die reduzierte *TPH2a*-Editierung in der Amygdala in Kombination mit einer verstärkten Expression von *TPH2b* für eine verstärkte inhibitorische 5-HT-Aktivität, welche die bekannte Hypofunktion der Amygdala erklären und zur Manifestierung der Krankheit beitragen könnte.

#### 4.3.5 Physiologische Signifikanz der RNA-Editierungsenzyme

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine gestörte RNA-Editierung von *TPH2* in den untersuchten Patientenkollektiven, die eine mögliche Ursache bei der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen vermuten lassen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch unbekannt, legen jedoch eine Dysregulation der bekannten RNA-Editierungsenzyme nahe, deren physiologische Bedeutung insbesondere für die ADAR-Familie gezeigt werden konnte. So leiden homozygote *Adar2*-KO-Mäuse unter epileptischen Krämpfen und sterben wenige Wochen nach der Geburt, was auf eine Hypoeditierung an der Q/R-Stelle der GluR2-Untereinheit und eine damit verbundene neurotoxische Hypererregung zurückgeführt wurde [HIGUCHI *et al.*, 2000]. Die Inaktivierung von *Adar1* ist bereits embryonal lethal und wird durch eine defiziente Erythropoese und weitreichende Apoptose verursacht [WANG *et al.*, 2000a; WANG *et al.*, 2004a]. Beim Menschen resultiert der heterozygote *ADAR1*-Verlust in der Pigmentstörung *Dyschromatosis symmetrica hereditaria* [MIYAMURA *et al.*, 2003]. Zudem konnten Dysfunktionen in der Editierungsmaschinerie mit Epilepsie, ALS, Depression und

Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden [MAAS *et al.*, 2006]. Daher erscheint es sinnvoll, den genomischen Status der bekannten Editierungsenzyme (ADARs/APOBECs) innerhalb der untersuchten Patientenkollektive zu analysieren, um den Einfluss möglicher SNPs/Mutationen bei der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen zu verstehen.

Zudem besteht die Möglichkeit einer veränderten Regulation der ADAR-Enzyme, die von alternativen Promotoren exprimiert und alternativ gespleißt werden und deren Aktivität durch posttranslationale Modifikationen [DESTERRO *et al.*, 2005], die subzelluläre Lokalisation [DESTERRO *et al.*, 2003; SANSAM *et al.*, 2003] und essentielle Kofaktoren moduliert wird [MACBETH *et al.*, 2005]. Weiterhin wird die ADAR2-Editierung der *5-HT<sub>2C</sub>R*-Transkripte durch *trans*-wirkende Faktoren, wie die snoRNA HBII-52 beeinflusst [VITALI *et al.*, 2005], die bei Patienten mit dem PWS deletiert ist und zudem das alternative Spleißen der *5-HT<sub>2C</sub>R*-prä-mRNAs reguliert [KISHORE und STAMM, 2006].

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die kausale Verbindung zwischen Fehlfunktionen der *TPH2*-Editierung und dem Phänotyp psychiatrischer Erkrankungen zu verstehen. SHP77-Zellen können für solche Fragestellungen ein geeignetes Zellkultursystem darstellen, da auch sie *TPH2*-Transkripte editieren. In diesem Zusammenhang könnte auch der mögliche Einfluss chemischer Substanzen, wie Ethanol und andere Suchtmittel, auf den Editierungsstatus der *TPH2*-prä-mRNAs untersucht werden.

#### 4.4 Konsequenzen für die psychiatrische Forschung

Mittlerweise gilt es als gesichert, dass *TPH2* an der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen beteiligt ist [CHOTAI *et al.*, 2003; COON *et al.*, 2005; HARVEY *et al.*, 2007; HARVEY *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2008; SHEEHAN *et al.*, 2005; WALITZA *et al.*, 2005; ZILL *et al.*, 2004a; ZILL *et al.*, 2004b]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass eine gestörte Expression und Aktivität der *TPH2* an Drogenmissbrauch, Suizidalverhalten und Schizophrenie beteiligt ist. Zudem offenbarte die Analyse von humanen *TPH2*-cDNA-Sequenzen einen bis dahin beispiellosen Regulationsmechanismus, der komplexe, sich gegenseitig ausschließende RNA-Editierungsmuster der beiden alternativ gespleißten *TPH2*-Isoformen (*TPH2a* und *TPH2b*) beinhaltet. *TPH2* ist aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse ein interessantes Objekt für weitergehende Untersuchungen hinsichtlich der noch wenig verstandenen Regulationsmechanismen der RNA-Editierungsmaschinerien. Die wichtigste Schlussfolgerung der gesammelten Daten ist jedoch die Erkenntnis, dass weder die momentan verwendeten RNA-basierten Techniken, wie qPCR und RNase-Protektionsassays noch immunhistochemische Proteinnachweismethoden in der Lage sind, die enzymatische Aktivität der *TPH2* in der

psychiatrischen Forschung zu bewerten. Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse müssen die bisherigen Berichte über Störungen der *TPH2*-Expression bei psychiatrischen Erkrankungen erneut untersucht und verifiziert werden. Mit dem Wissen über die Regulation der *TPH2*-Aktivität durch alternatives Spleißen und RNA-Editierung sollte es mit Hilfe neuer Methoden in naher Zukunft möglich sein, den Editierungsstatus von *TPH2*-Transkripten effizient und kostengünstig zu bestimmen, um Einsicht in die Regulation der 5-HT-Biosynthese im Gehirn des Menschen zu gewinnen und deren Einfluss bei der Entstehung psychiatrischer Erkrankungen zu verstehen.

---

## V LITERATUR

- ABUMARIA, N., RIBIC, A., ANACKER, C., FUCHS, E. und FLUGGE, G. (2008). Stress Upregulates TPH1 but not TPH2 mRNA in the Rat Dorsal Raphe Nucleus: Identification of Two TPH2 mRNA Splice Variants. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 28: 331-342.
- ADAYEV, T., RANASINGHE, B. und BANERJEE, P. (2005). Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Biosci. Rep.*, 25: 363-385.
- AGGLETON, J.P. und SHAW, C. (1996). Amnesia and recognition memory: a re-analysis of psychometric data. *Neuropsychologia*, 34: 51-62.
- AKBARIAN, S., SMITH, M.A. und JONES, E.G. (1995). Editing for an AMPA receptor subunit RNA in prefrontal cortex and striatum in Alzheimer's disease, Huntington's disease and schizophrenia. *Brain Res.*, 699: 297-304.
- ALEMAN, A. und KAHN, R.S. (2005). Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia? *Prog. Neurobiol.*, 77: 283-298.
- ALEX, K.D. und PEHEK, E.A. (2007). Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. *Pharmacol. Ther.*, 113: 296-320.
- ANLEZARK, G.M., MELTON, R.G., SHERWOOD, R.F., COLES, B., FRIEDLOS, F. und KNOX, R.J. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)-I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*-a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem. Pharmacol.*, 44: 2289-2295.
- ARANGO, V., UNDERWOOD, M.D., GUBBI, A.V. und MANN, J.J. (1995). Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.*, 688: 121-133.
- ARRANZ, M.J., MUNRO, J., SHAM, P., KIROV, G., MURRAY, R.M., COLLIER, D.A. und KERWIN, R.W. (1998). Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT<sub>2A</sub> receptors and clozapine response. *Schizophr. Res.*, 32: 93-99.
- ARTIGAS, F., NUTT, D.J. und SHELTON, R. (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol. Bull.*, 36 Suppl 2: 123-132.
- ASBERG, M., TRASKMAN, L. und THOREN, P. (1976). 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch. Gen. Psychiatry*, 33: 1193-1197.
- ASHCROFT, G.W., ECCLESTON, D. und CRAWFORD, T.B. (1965). 5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. I. Methods. *J. Neurochem.*, 12: 483-492.
- AUSTIN, M.C. und O'DONNELL, S.M. (1999). Regional distribution and cellular expression of tryptophan hydroxylase messenger RNA in postmortem human brainstem and pineal gland. *J. Neurochem.*, 72: 2065-2073.
- AZMITIA, E.C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.*, 56: 413-424.
- BACH-MIZRACHI, H., UNDERWOOD, M.D., KASSIR, S.A., BAKALIAN, M.J., SIBILLE, E., TAMIR, H., MANN, J.J. und ARANGO, V. (2006). Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology*, 31: 814-824.
- BACH-MIZRACHI, H., UNDERWOOD, M.D., TIN, A., ELLIS, S.P., MANN, J.J. und ARANGO, V. (2008). Elevated expression of tryptophan hydroxylase-2 mRNA at the neuronal level in the dorsal and median raphe nuclei of depressed suicides. *Mol. Psychiatry*, 13: 507-513.
- BADAWY, A.-B., MORGAN, J.C., BANO, S., BUCKLAND, P. und MCGUFFIN, P. (1996). Mechanism of enhancement of rat brain serotonin synthesis by acute fluoxetine administration. *J. Neurochem.*, 66: 436-437.
- BANIK, U., WANG, G.A., WAGNER, P.D. und KAUFMAN, S. (1997). Interaction of phosphorylated tryptophan hydroxylase with 14-3-3 proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 26219-26225.
- BARBOSA, R.M., SILVA, A.M., TOME, A.R., STAMFORD, J.A., SANTOS, R.M. und ROSARIO, L.M. (1998). Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics. *J. Physiol. (Lond)* 510 ( Pt 1): 135-143.
- BARLATI, S. und BARBON, A. (2005). RNA editing: a molecular mechanism for the fine modulation of neuronal transmission. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)*, 93: 53-57.
- BAXTER, M.G. und MURRAY, E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 563-573.
- BELL, C.J. und NUTT, D.J. (1998). Serotonin and panic. *Br. J. Psychiatry*, 172: 465-471.
- BELMAKER, R.H. (2004). Bipolar disorder. *N. Engl. J. Med.*, 351: 476-486.
- BELMAKER, R.H. und AGAM, G. (2008). Major depressive disorder. *N. Engl. J. Med.*, 358: 55-68.
- BENNE, R., VAN DEN BURG, J., BRAKENHOFF, J.P., SLOOF, P., VAN BOOM, J.H. und TROMP, M.C. (1986). Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell*, 46: 819-826.
- BENTLEY, D.L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17: 251-256.
- BERRY, M.D. (2004). Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J. Neurochem.*, 90: 257-271.
- BICALHO, M.A., PIMENTA, G.J., NEVES, F.S., CORREA, H., DE MORAES, E.N., DE MARCO, L. und ROMANO-SILVA, M.A. (2006). Genotyping of the G1463A (Arg441His) TPH2 polymorphism in a geriatric population of patients with major depression. *Mol. Psychiatry*, 11: 799-800.
- BIRNBOIM, H.C. und DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7: 1513-1523.
- BISHOP, G.A., HO, R.H. und KING, J.S. (1985). An immunohistochemical study of serotonin development in the opossum cerebellum. *Anat. Embryol. (Berl)*. 171: 325-338.
- BISSIERE, S., HUMEAU, Y. und LUTHI, A. (2003). Dopamine gates LTP induction in lateral amygdala by suppressing feedforward inhibition. *Nat. Neurosci.*, 6: 587-592.
- BLACK, D.L. (2003). Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.*, 72: 291-336.
- BLACK, D.L. und GRABOWSKI, P.J. (2003). Alternative pre-mRNA splicing and neuronal function. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 31: 187-216.
- BLAKELY, R.D. (2005). Overview: a rare opportunity or just one less reason to be depressed. *Neuron*, 48: 701-702; author reply 705-706.
- BLANC, V. und DAVIDSON, N.O. (2003). C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity. *J. Biol. Chem.*, 278: 1395-1398.
- BOADLE-BIBER, M.C. (1993). Regulation of serotonin synthesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 60: 1-15.
- BOCKAERT, J., CLAEYSEN, S., BECAMEL, C., DUMUIS, A. und MARIN, P. (2006). Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res.*, 326: 553-572.
- BOLDRINI, M., UNDERWOOD, M.D., MANN, J.J. und ARANGO, V. (2005). More tryptophan hydroxylase in the brainstem dorsal raphe nucleus in depressed suicides. *Brain Res.*, 1041: 19-28.

- BONASERA, S.J. und TECOTT, L.H. (2000). Mouse models of serotonin receptor function: toward a genetic dissection of serotonin systems. *Pharmacol. Ther.*, 88: 133-142.
- BONKALE, W.L., MURDOCK, S., JANOSKY, J.E. und AUSTIN, M.C. (2004). Normal levels of tryptophan hydroxylase immunoreactivity in the dorsal raphe of depressed suicide victims. *J. Neurochem.*, 88: 958-964.
- BOTTING, N.P. (1995). Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem. Soc. Rev.*, 24: 401-412.
- BOULARAND, S., BIGUET, N.F., VIDAL, B., VERON, M., MALLET, J., VINCENT, J.D., DUFOUR, S. und VERNIER, P. (1998). Tyrosine hydroxylase in the european eel (*Anguilla anguilla*): cDNA cloning, brain distribution, and phylogenetic analysis. *J. Neurochem.*, 71: 460-470.
- BOULARAND, S., DARMON, M.C. und MALLET, J. (1995a). The human tryptophan hydroxylase gene. An unusual splicing complexity in the 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.*, 270: 3748-3756.
- BOULARAND, S., DARMON, M.C., RAVASSARD, P. und MALLET, J. (1995b). Characterization of the human tryptophan hydroxylase gene promoter. Transcriptional regulation by cAMP requires a new motif distinct from the cAMP-responsive element. *J. Biochem. (Tokyo)*, 270: 3757-3764.
- BOURARA, K., LITVAK, S. und ARAYA, A. (2000). Generation of G-to-A and C-to-U changes in HIV-1 transcripts by RNA editing. *Science*, 289: 1564-1566.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- BRIDGEWATER, J.A., KNOX, R.J., PITTS, J.D., COLLINS, M.K. und SPRINGER, C.J. (1997). The bystander effect of the nitroreductase/CB1954 enzyme/prodrug system is due to a cell-permeable metabolite. *Hum. Gene Ther.*, 8: 709-717.
- BRIDGEWATER, J.A., SPRINGER, C.J., KNOX, R.J., MINTON, N.P., MICHAEL, N.P. und COLLINS, M.K. (1995). Expression of the bacterial nitroreductase enzyme in mammalian cells renders them selectively sensitive to killing by the prodrug CB1954. *Eur. J. Cancer*, 31A: 2362-2370.
- BROWN, S.M., PEET, E., MANUCK, S.B., WILLIAMSON, D.E., DAHL, R.E., FERRELL, R.E. und HARIRI, A.R. (2005). A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amygdala reactivity. *Mol. Psychiatry*, 10: 884-888, 805.
- BRUNET-GOUEY, E. und DECETY, J. (2006). Social brain dysfunctions in schizophrenia: a review of neuroimaging studies. *Psychiatry Res.*, 148: 75-92.
- BURNS, C.M., CHU, H., RUETER, S.M., HUTCHINSON, L.K., CANTON, H., SANDERS-BUSH, E. und EMESON, R.B. (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*, 387: 303-308.
- BURRIS, K.D., BREEDING, M. und SANDERS-BUSH, E. (1991). (+)Lysergic acid diethylamide, but not its nonhallucinogenic congeners, is a potent serotonin 5HT1C receptor agonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258: 891-896.
- BUSATTO, G.F. und KERWIN, R.W. (1997). Perspectives on the role of serotonergic mechanisms in the pharmacology of schizophrenia. *J. Psychopharmacol. (Oxf)*, 11: 3-12.
- BUZNIKOV, G.A., SHMUKLER, Y.B. und LAUDER, J.M. (1996). From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.*, 16: 537-559.
- CANLI, T., CONGDON, E., GUTKNECHT, L., CONSTABLE, R.T. und LESCH, K.P. (2005). Amygdala responsiveness is modulated by tryptophan hydroxylase-2 gene variation. *J. Neural Transm.*, 112: 1479-1485.
- CANLI, T. und LESCH, K.P. (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat. Neurosci.*, 10: 1103-1109.
- CARKACI-SALLI, N., FLANAGAN, J.M., MARTZ, M.K., SALLI, U., WALTHER, D.J., BADER, M. und VRANA, K.E. (2006). Functional domains of human tryptophan hydroxylase 2 (hTPH2). *J. Biol. Chem.*, 281: 28105-28112.
- CARLOCK, L., WALKER, P.D., SHAN, Y. und GUTRIDGE, K. (1995). Transcription of the Huntington disease gene during the quinolinic acid excitotoxic cascade. *Neuroreport*, 6: 1121-1124.
- CASES, O., SEIF, I., GRIMSBY, J., GASPAR, P., CHEN, K., POURNIN, S., MULLER, U., AGUET, M., BABINET, C., SHIH, J.C. und ET AL. (1995). Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*, 268: 1763-1766.
- CASES, O., VITALIS, T., SEIF, I., DE MAEYER, E., SOTELO, C. und GASPAR, P. (1996). Lack of barrels in the somatosensory cortex of monoamine oxidase A-deficient mice: role of a serotonin excess during the critical period. *Neuron*, 16: 297-307.
- CASTREN, E. (2005). Is mood chemistry? *Nat. Rev. Neurosci.*, 6: 241-246.
- CATTANEO, M.G., CODIGNOLA, A., VICENTINI, L.M., CLEMENTI, F. und SHER, E. (1993). Nicotine stimulates a serotonergic autocrine loop in human small-cell lung carcinoma. *Cancer Res.*, 53: 5566-5568.
- CHABNER, B.A. und ROBERTS, T.G., JR. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 5: 65-72.
- CHAMPIER, J., CLAUSTRAT, B., BESANCON, R., EYMIN, C., KILLER, C., JOUVET, A., CHAMBA, G. und FEVRE-MONTANGE, M. (1997). Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci.*, 60: 2191-2197.
- CHARNEY, D.S. und MANJI, H.K. (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE*, 2004: re5.
- CHEN, G.L., VALLENDER, E.J. und MILLER, G.M. (2007). Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum. Genet.*, 122: 645-657.
- CHESTER, A., SCOTT, J., ANANT, S. und NAVARATNAM, N. (2000). RNA editing: cytidine to uridine conversion in apolipoprotein B mRNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 1494: 1-13.
- CHESTER, A., SOMASEKARAM, A., TZIMINA, M., JARMUZ, A., GISBOURNE, J., O'KEEFE, R., SCOTT, J. und NAVARATNAM, N. (2003). The apolipoprotein B mRNA editing complex performs a multifunctional cycle and suppresses nonsense-mediated decay. *EMBO J.*, 22: 3971-3982.
- CHILDRESS, A.R., EHRLMAN, R., MCLELLAN, A.T., MACRAE, J., NATALE, M. und O'BRIEN, C.P. (1994). Can induced moods trigger drug-related responses in opiate abuse patients? *J. Subst. Abuse Treat.*, 11: 17-23.
- CHILDRESS, A.R., MOZLEY, P.D., MCELGIN, W., FITZGERALD, J., REIVICH, M. und O'BRIEN, C.P. (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am. J. Psychiatry*, 156: 11-18.
- CHOTAL, J., SERRETTI, A., LATTUADA, E., LORENZI, C. und LILLI, R. (2003). Gene-environment interaction in psychiatric disorders as indicated by season of birth variations in tryptophan hydroxylase (TPH), serotonin transporter (5-HTTLPR) and dopamine receptor (DRD4) gene polymorphisms. *Psychiatry Res.*, 119: 99-111.
- CHUNG-FAYE, G., PALMER, D., ANDERSON, D., CLARK, J., DOWNES, M., BADDELEY, J., HUSSAIN, S., MURRAY, P.I., SEARLE, P., SEYMOUR, L., HARRIS, P.A., FERRY, D. und KERR, D.J. (2001). Virus-directed, enzyme prodrug therapy with nitroimidazole reductase: a phase I and pharmacokinetic study of its prodrug, CB1954. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2662-2668.
- CHUTUAPE, M.A., JASINSKI, D.R., FINGERHOOD, M.I. und STITZER, M.L. (2001). One-, three-, and six-month outcomes after brief inpatient opioid detoxification. *Am. J. Drug Alcohol Abuse*, 27: 19-44.
- CICHON, S., WINGE, I., MATTHEISEN, M., GEORGI, A., KARPUSHOVA, A., FREUDENBERG, J., FREUDENBERG-HUA, Y., BABADJANOVA, G., VAN DEN BOGAERT, A., ABRAMOVA, L.I., KAPILETTI, S., KNAPPSKOG, P.M., MCKINNEY, J., MAIER, W., JAMRA, R.A., SCHULZE, T.G., SCHUMACHER, J., PROPPING, P., RIETSCHEL, M., HAAVIK, J. und NOTHEN, M.M.



- (2008). Brain-specific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. *Hum. Mol. Genet.*, 17: 87-97.
- CLARK, A.J., IWOBEL, M., CUI, W., CROMPTON, M., HAROLD, G., HOBBS, S., KAMALATI, T., KNOX, R., NEIL, C., YULL, F. und GUSTERSON, B. (1997). Selective cell ablation in transgenic mice expression E. coli nitroreductase. *Gene Ther.*, 4: 101-110.
- CLARK, J.A., FLICK, R.B., PAI, L.Y., SZALAYOVA, I., KEY, S., CONLEY, R.K., DEUTCH, A.Y., HUTSON, P.H. und MEZEY, E. (2007). Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol. Psychiatry*, 13: 498-506.
- CLARK, J.A., PAI, L.Y., FLICK, R.B. und ROHRER, S.P. (2005). Differential hormonal regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the murine dorsal raphe nucleus. *Biol. Psychiatry*, 57: 943-946.
- COBB, L.M. (1970). Toxicity of the selective antitumor agent 5-aziridino-2,4-dinitrobenzamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 17: 231-238.
- COOLS, R., CALDER, A.J., LAWRENCE, A.D., CLARK, L., BULLMORE, E. und ROBBINS, T.W. (2005). Individual differences in threat sensitivity predict serotonergic modulation of amygdala response to fearful faces. *Psychopharmacology (Berl)*. 180: 670-679.
- COON, H., DUNN, D., LAINHART, J., MILLER, J., HAMIL, C., BATTAGLIA, A., TANCREDI, R., LEPPERT, M.F., WEISS, R. und MCMAHON, W. (2005). Possible association between autism and variants in the brain-expressed tryptophan hydroxylase gene (TPH2). *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, 135: 42-46.
- CORTAZZO, P., CERVENANSKY, C., MARIN, M., REISS, C., EHRlich, R. und DEANA, A. (2002). Silent mutations affect in vivo protein folding in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293: 537-541.
- COTE, F., SCHUSSLER, N., BOULARAND, S., PEIROT, A., THEVENOT, E., MALLET, J. und VODJDANI, G. (2002). Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (TPH) gene in the pineal gland. *J. Neurochem.*, 81: 673-685.
- COTE, F., THEVENOT, E., FLIGNY, C., FROMES, Y., DARMON, M., RIPOCHE, M.A., BAYARD, E., HANOUN, N., SAURINI, F., LECHAT, P., DANDOLO, L., HAMON, M., MALLET, J. und VODJDANI, G. (2003). Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 13525-13530.
- CRIVELLATO, E., DAMIANI, D., TRAVAN, L., MARCON, G., FUSAROLI, F.P. und MALLARDI, F. (1992). Serotonergic fibres form dense synaptic contacts with Purkinje cells in the mouse cerebellar cortex--an immunohistochemical study. *Acta Histochem.*, 92: 54-60.
- CROMBIE, T., BOYLE, J.P., COGGINS, J.R. und BROWN, A.J. (1994). The folding of the bifunctional TRP3 protein in yeast is influenced by a translational pause which lies in a region of structural divergence with *Escherichia coli* indoleglycerol-phosphate synthase. *Eur. J. Biochem.*, 226: 657-664.
- CUI, W., ALLEN, N.D., SKYNNER, M., GUSTERSON, B. und CLARK, A.J. (2001). Inducible ablation of astrocytes shows that these cells are required for neuronal survival in the adult brain. *Glia*, 34: 272-282.
- CUI, W., GUSTERSON, B. und CLARK, A.J. (1999). Nitroreductase-mediated cell ablation is very rapid and mediated by a p53-independent apoptotic pathway. *Gene Ther.*, 6: 764-770.
- DAHLSTROEM, A. und FUXE, K. (1964). Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* SUPPL 232:231-255.
- DANOS, O. und MULLIGAN, R.C. (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 6460-6464.
- DANTZER, R., O'CONNOR, J.C., FREUND, G.G., JOHNSON, R.W. und KELLEY, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9: 46-56.
- DARMON, M.C., GUIBERT, B., LEVIEL, V., EHRET, M., MAITRE, M. und MALLET, J. (1988). Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.*, 51: 312-316.
- DAUBNER, S.C., HILLAS, P.J. und FITZPATRICK, P.F. (1997). Characterization of chimeric pterin-dependent hydroxylases: contributions of the regulatory domains of tyrosine and phenylalanine hydroxylase to substrate specificity. *Biochemistry (Mosc)*. 36: 11574-11582.
- DAVIDSON, N.O. und SHELNESS, G.S. (2000). APOLIPOPROTEIN B: mRNA editing, lipoprotein assembly, and presecretory degradation. *Annu. Rev. Nutr.*, 20: 169-193.
- DAVIDSON, R.J., PUTNAM, K.M. und LARSON, C.L. (2000). Dysfunction in the neural circuitry of emotion regulation--a possible prelude to violence. *Science*, 289: 591-594.
- DAVIS, B.A. und BOULTON, A.A. (1994). The trace amines and their acidic metabolites in depression--an overview. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 18: 17-45.
- DAVIS, J.N. und CARLSSON, A. (1973). Effect of hypoxia on tyrosine and tryptophan hydroxylation in unanaesthetized rat brain. *J. Neurochem.*, 20: 913-915.
- DAVIS, J.N., CARLSSON, A., MACMILLAN, V. und SIESJO, B.K. (1973). Brain tryptophan hydroxylation: dependence on arterial oxygen tension. *Science*, 182: 72-74.
- DE LARA, C.L., BREZO, J., ROULEAU, G., LESAGE, A., DUMONT, M., ALDA, M., BENKELFAT, C. und TURECKI, G. (2007). Effect of Tryptophan Hydroxylase-2 Gene Variants on Suicide Risk in Major Depression. *Biol. Psychiatry*, 62: 72-80.
- DEAN, B. und HAYES, W. (1996). Decreased frontal cortical serotonin2A receptors in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 21: 133-139.
- DELARUE, C., BECQUET, D., IDRES, S., HERY, F. und VAUDRY, H. (1992). Serotonin synthesis in adrenochromaffin cells. *Neuroscience*, 46: 495-500.
- DELORME, R., DURAND, C.M., BETANCUR, C., WAGNER, M., RUHRMANN, S., GRABE, H.J., NYGREN, G., GILLBERG, C., LEBOYER, M., BOURGERON, T., COURTET, P., JOLLANT, F., BURESI, C., AUBRY, J.M., BAUD, P., BONDOLFI, G., BERTSCHY, G., PERROUD, N. und MALAFOSSE, A. (2006). No human tryptophan hydroxylase-2 gene R441H mutation in a large cohort of psychiatric patients and control subjects. *Biol. Psychiatry*, 60: 202-203.
- DELORT, J., DUMAS, J.B., DARMON, M.C. und MALLET, J. (1989). An efficient strategy for cloning 5' extremities of rare transcripts permits isolation of multiple 5'-untranslated regions of rat tryptophan hydroxylase mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6439-6448.
- DEN DUNNEN, J.T. und ANTONARAKIS, S.E. (2001). Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum. Genet.*, 109: 121-124.
- DESTERRO, J.M., KEEGAN, L.P., JAFFRAY, E., HAY, R.T., O'CONNELL, M.A. und CARMO-FONSECA, M. (2005). SUMO-1 modification alters ADAR1 editing activity. *Mol. Biol. Cell*, 16: 5115-5126.
- DESTERRO, J.M., KEEGAN, L.P., LAFARGA, M., BERCIANO, M.T., O'CONNELL, M. und CARMO-FONSECA, M. (2003). Dynamic association of RNA-editing enzymes with the nucleolus. *J. Cell Sci.*, 116: 1805-1818.
- DI MATTEO, V., DE BLASI, A., DI GIULIO, C. und ESPOSITO, E. (2001). Role of 5-HT(2C) receptors in the control of central dopamine function. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22: 229-232.
- DITTMAR, K.A., GOODENBOUR, J.M. und PAN, T. (2006). Tissue-Specific Differences in Human Transfer RNA Expression. *PLoS Genetics*, 2: e221.
- DJEHA, A.H., HULME, A., DEXTER, M.T., MOUNTAIN, A., YOUNG, L.S., SEARLE, P.F., KERR, D.J. und WRIGHTON, C.J. (2000). Expression of *Escherichia coli* B nitroreductase in established human tumor xenografts in mice results in potent antitumoral and bystander effects upon systemic administration of the prodrug CB1954. *Cancer Gene Ther.*, 7: 721-731.

- DJEHA, A.H., THOMSON, T.A., LEUNG, H., SEARLE, P.F., YOUNG, L.S., KERR, D.J., HARRIS, P.A., MOUNTAIN, A. und WRIGHTON, C.J. (2001). Combined adenovirus-mediated nitroreductase gene delivery and CB1954 treatment: a well-tolerated therapy for established solid tumors. *Molecular Therapy*, 3: 233-240.
- DOEBIS, C., RITTER, T., BRANDT, C., SCHONBERGER, B., VOLK, H.D. und SEIFERT, M. (2002). Efficient in vitro transduction of epithelial cells and keratinocytes with improved adenoviral gene transfer for the application in skin tissue engineering. *Transpl. Immunol.*, 9: 323-329.
- DRABEK, D., GUY, J., CRAIG, R. und GROSVELD, F. (1997). The expression of bacterial nitroreductase in transgenic mice results in specific cell killing by the prodrug CB1954. *Gene Ther.*, 4: 93-100.
- DRACHEVA, S., PATEL, N., WOO, D.A., MARCUS, S.M., SIEVER, L.J. und HAROUTUNIAN, V. (2007). Increased serotonin 2C receptor mRNA editing: a possible risk factor for suicide. *Mol. Psychiatry*, in press.
- DREVETS, W.C. (2003). Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985: 420-444.
- DUGOVIC, C. (2001). Role of serotonin in sleep mechanisms. *Rev. Neurol. (Paris)*. 157: S16-19.
- DUMAS, S., DARMON, M.C., DELORT, J. und MALLETT, J. (1989). Differential control of tryptophan hydroxylase expression in raphe and in pineal gland: evidence for a role of translation efficiency. *J. Neurosci. Res.*, 24: 537-547.
- DYGALO, N.N., SHISHKINA, G.T., KALININA, T.S., YUDINA, A.M. und OVCHINNIKOVA, E.S. (2006). Effect of repeated treatment with fluoxetine on tryptophan hydroxylase-2 gene expression in the rat brainstem. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 85: 220-227.
- EBERLE-WANG, K., MIKELADZE, Z., URYU, K. und CHESSELET, M.F. (1997). Pattern of expression of the serotonin2C receptor messenger RNA in the basal ganglia of adult rats. *J. Comp. Neurol.*, 384: 233-247.
- ECCLESTON, D., ASHCROFT, G.W. und CRAWFORD, T.B. (1965). 5-hydroxyindole metabolism in rat brain. A study of intermediate metabolism using the technique of tryptophan loading. II. Applications and drug studies. *J. Neurochem.*, 12: 493-503.
- EHRET, M., CASH, C.D., HAMON, M. und MAITRE, M. (1989). Formal demonstration of the phosphorylation of rat brain tryptophan hydroxylase by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase. *J. Neurochem.*, 52: 1886-1891.
- EHRET, M., PEVET, P. und MAITRE, M. (1991). Tryptophan hydroxylase synthesis is induced by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate during circadian rhythm in the rat pineal gland. *J. Neurochem.*, 57: 1516-1521.
- EHRMAN, R.N., ROBBINS, S.J., CHILDRESS, A.R. und O'BRIEN, C.P. (1992). Conditioned responses to cocaine-related stimuli in cocaine abuse patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 107: 523-529.
- EIDEN, L.E., SCHAFFER, M.K., WEIHE, E. und SCHUTZ, B. (2004). The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch.*, 447: 636-640.
- ERICKSON, J.D., SCHAFFER, M.K., BONNER, T.I., EIDEN, L.E. und WEIHE, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 5166-5171.
- ERLANDSEN, H., FUSETTI, F., MARTINEZ, A., HOUGH, E., FLATMARK, T. und STEVENS, R.C. (1997). Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat. Struct. Biol.*, 4: 995-1000.
- ERSPAMER, V. und ASERO, B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169: 800-801.
- ERSPAMER, V. und VIALLY, M. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterochromaffini. *Boll. Soc. Med. Chir. Pavia*, 51: 357-363.
- FARRER, T., ROLLER, A.B., KENT, W.J. und ZAHLER, A.M. (2002). Analysis of the role of *Caenorhabditis elegans* GC-AG introns in regulated splicing. *Nucleic Acids Res.*, 30: 3360-3367.
- FEDOROV, A.N. und BALDWIN, T.O. (1997). Cotranslational protein folding. *J. Biol. Chem.*, 272: 32715-32718.
- FELMER, R., CUI, W. und CLARK, A.J. (2002). Inducible ablation of adipocytes in adult transgenic mice expressing the *E. coli* nitroreductase gene. *J. Endocrinol.*, 175: 487-498.
- FELTENSTEIN, M.W. und SEE, R.E. (2008). The neurocircuitry of addiction: an overview. *Br. J. Pharmacol.*, in press.
- FERNSTROM, J.D. (2005). Branched-chain amino acids and brain function. *J. Nutr.*, 135: 1539S-1546S.
- FERNSTROM, J.D. und WURTMAN, R.J. (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, 178: 414-416.
- FINOCCHIARO, L.M., ARZT, E.S., FERNANDEZ-CASTELO, S., CRISCUOLO, M., FINKIELMAN, S. und NAHMOD, V.E. (1988). Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J. Interferon Res.*, 8: 705-716.
- FITZGERALD, L.W., IYER, G., CONKLIN, D.S., KRAUSE, C.M., MARSHALL, A., PATTERSON, J.P., TRAN, D.P., JONAK, G.J. und HARTIG, P.R. (1999). Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor. *Neuropsychopharmacology*, 21: 82S-90S.
- FITZPATRICK, P.F. (1999). Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 355-381.
- FITZPATRICK, P.F. (2003). Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry (Mosc)*. 42: 14083-14091.
- FLETCHER, P.J., KORTH, K.M. und CHAMBERS, J.W. (1999). Depletion of brain serotonin following intra-raphé injections of 5,7-dihydroxytryptamine does not alter d-amphetamine self-administration across different schedule and access conditions. *Psychopharmacology (Berl)*. 146: 185-193.
- FLOMEN, R., KNIGHT, J., SHAM, P., KERWIN, R. und MAKOFF, A. (2004). Evidence that RNA editing modulates splice site selection in the 5-HT<sub>2C</sub> receptor gene. *Nucleic Acids Res.*, 32: 2113-2122.
- FON, E.A., POTHOS, E.N., SUN, B.C., KILLEEN, N., SULZER, D. und EDWARDS, R.H. (1997). Vesicular transport regulates monoamine storage and release but is not essential for amphetamine action. *Neuron*, 19: 1271-1283.
- FRIEDMAN, P.A., KAPPELMAN, A.H. und KAUFMAN, S. (1972). Partial purification and characterization of tryptophan hydroxylase from rabbit hindbrain. *J. Biol. Chem.*, 247: 4165-4173.
- FRUNGIERI, M.B., GONZALEZ-CALVAR, S.I., RUBIO, M., OZU, M., LUSTIG, L. und CALANDRA, R.S. (1999). Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology*, 69: 299-308.
- FUCHS, R.A. und SEE, R.E. (2002). Basolateral amygdala inactivation abolishes conditioned stimulus- and heroin-induced reinstatement of extinguished heroin-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 160: 425-433.
- FUJIMOTO, S., UEDA, H. und KAGAWA, H. (1987). Immunocytochemistry on the localization of 5-hydroxytryptamine in monkey and rabbit taste buds. *Acta Anat. (Basel)*. 128: 80-83.
- GARRIOCK, H.A., ALLEN, J.J., DELGADO, P., NAHAZ, Z., KLING, M.A., CARPENTER, L., BURKE, M., BURKE, W., SCHWARTZ, T., MARANGELL, L.B., HUSAIN, M., ERICKSON, R.P. und MORENO, F.A. (2005). Lack of association of TPH2 exon XI polymorphisms with major depression and treatment resistance. *Mol. Psychiatry*, 10: 976-977.
- GASPAR, P., CASES, O. und MAROTEAUX, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 1002-1012.

- GEBA, G.P., PTAK, W., ANDERSON, G.M., PALIWAL, V., RATZLAFF, R.E., LEVIN, J. und ASKENASE, P.W. (1996). Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J. Immunol.*, 157: 557-565.
- GERMANO, I.M., PITTS, L.H., MELDRUM, B.S., BARTKOWSKI, H.M. und SIMON, R.P. (1987). Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits. *Ann. Neurol.*, 22: 730-734.
- GERN, W.A. und RALPH, C.L. (1979). Melatonin synthesis by the retina. *Science*, 204: 183-184.
- GIAMMANCO, S., ERNANDES, M. und LA GUARDIA, M. (1997). Effects of environmental lighting and tryptophan devoid diet on the rat vaginal cycle. *Arch. Physiol. Biochem.*, 105: 445-449.
- GINGRICH, J.A. und HEN, R. (2001). Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 155: 1-10.
- GLATT, C.E., CARLSON, E., TAYLOR, T.R., RISCH, N., REUS, V.I. und SCHAEFER, C.A. (2005). Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*, 48: 704-705; author reply 705-706.
- GOODMAN, M. und NEW, A. (2000). Impulsive aggression in borderline personality disorder. *Curr. Psychiatry Rep.*, 2: 56-61.
- GOODWILL, K.E., SABATIER, C., MARKS, C., RAAG, R., FITZPATRICK, P.F. und STEVENS, R.C. (1997). Crystal structure of tyrosine hydroxylase at 2.3 Å and its implications for inherited neurodegenerative diseases. *Nat. Struct. Biol.*, 4: 578-585.
- GOSSOP, M., GREEN, L., PHILLIPS, G. und BRADLEY, B. (1989). Lapse, relapse and survival among opiate addicts after treatment. A prospective follow-up study. *Br. J. Psychiatry*, 154: 348-353.
- GRACE, A.A. und ROSENKRANZ, J.A. (2002). Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol. Behav.*, 77: 489-493.
- GRACY, K.N., DANKIEWICZ, L.A., WEISS, F. und KOOB, G.F. (2000). Heroin-specific stimuli reinstate operant heroin-seeking behavior in rats after prolonged extinction. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 65: 489-494.
- GREEN, A.R., MECHEAN, A.O., ELLIOTT, J.M., O'SHEA, E. und COLADO, M.I. (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol. Rev.*, 55: 463-508.
- GREEN, C.B. und BESHARSE, J.C. (1994). Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J. Neurochem.*, 62: 2420-2428.
- GREEN, N.K., YOUNGS, D.J., NEOPTOLEMOS, J.P., FRIEDLOS, F., KNOX, R.J., SPRINGER, C.J., ANLEZARK, G.M., MICHAEL, N.P., MELTON, R.G., FORD, M.J., YOUNG, L.S., KERR, D.J. und SEARLE, P.F. (1997). Sensitization of colorectal and pancreatic cancer cell lines to the prodrug 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954) by retroviral transduction and expression of the E. coli nitroreductase gene. *Cancer Gene Ther.*, 4: 229-238.
- GREENGARD, O., SMITH, M.A. und ACS, G. (1963). Relation of cortisone and synthesis of ribonucleic acid to induced and developmental enzyme formation. *J. Biol. Chem.*, 238: 1548-1551.
- GRENETT, H.E., LEDLEY, F.D., REED, L.L. und WOO, S.L. (1987). Full-length cDNA for rabbit tryptophan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic amino acid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 84: 5530-5534.
- GRIMA, B., LAMOUROUX, A., BONI, C., JULIEN, J.F., JAVOY-AGID, F. und MALLET, J. (1987). A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics. *Nature*, 326: 707-711.
- GROSS, C. und HEN, R. (2004). The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5: 545-552.
- GROSS, C., ZHUANG, X., STARK, K., RAMBOZ, S., OOSTING, R., KIRBY, L., SANTARELLI, L., BECK, S. und HEN, R. (2002). Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*, 416: 396-400.
- GROVE, J.I., LOVERING, A.L., GUISE, C., RACE, P.R., WRIGHTON, C.J., WHITE, S.A., HYDE, E.I. und SEARLE, P.F. (2003). Generation of *Escherichia coli* nitroreductase mutants conferring improved cell sensitization to the prodrug CB1954. *Cancer Res.*, 63: 5532-5537.
- GUILLEMIN, G.J. und BREW, B.J. (2002). Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep.*, 7: 199-206.
- GUISE, C.P., GROVE, J.I., HYDE, E.I. und SEARLE, P.F. (2007). Direct positive selection for improved nitroreductase variants using SOS triggering of bacteriophage lambda lytic cycle. *Gene Ther.*, 14: 690-698.
- GUREVICH, I., ENGLANDER, M.T., ADLERSBERG, M., SIEGAL, N.B. und SCHMAUSS, C. (2002a). Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J. Neurosci.*, 22: 10529-10532.
- GUREVICH, I., TAMIR, H., ARANGO, V., DWORK, A.J., MANN, J.J. und SCHMAUSS, C. (2002b). Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron*, 34: 349-356.
- HARGREAVES, K.M. und PARDRIDGE, W.M. (1988). Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, 263: 19392-19397.
- HARRISON, P.J. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122 ( Pt 4): 593-624.
- HARVEY, M., GAGNE, B., LABBE, M. und BARDEN, N. (2007). Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. *Psychiatr. Genet.*, 17: 17-22.
- HARVEY, M., SHINK, E., TREMBLAY, M., GAGNE, B., RAYMOND, C., LABBE, M., WALTHER, D.J., BADER, M. und BARDEN, N. (2004). Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. *Mol. Psychiatry*, 9: 980-981.
- HASHIMOTO, S., INOUE, T. und KOYAMA, T. (1996). Serotonin reuptake inhibitors reduce conditioned fear stress-induced freezing behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 123: 182-186.
- HATFIELD, T., HAN, J.S., CONLEY, M., GALLAGHER, M. und HOLLAND, P. (1996). Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J. Neurosci.*, 16: 5256-5265.
- HAWKINS, R.A., O'KANE, R.L., SIMPSON, I.A. und VINA, J.R. (2006). Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J. Nutr.*, 136: 218S-226S.
- HAYCOCK, J.W., KUMER, S.C., LEWIS, D.A., VRANA, K.E. und STOCKMEIER, C.A. (2002). A monoclonal antibody to tryptophan hydroxylase: applications and identification of the epitope. *J. Neurosci. Methods*, 114: 205-212.
- HEDLUND, P.B. und SUTCLIFFE, J.G. (2004). Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol. Sci.*, 25: 481-486.
- HENDRICKS, T.J., FYODOROV, D.V., WEGMAN, L.J., LELUTIU, N.B., PEHEK, E.A., YAMAMOTO, B., SILVER, J., WEEBER, E.J., SWEATT, J.D. und DENERIS, E.S. (2003). Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for normal anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron*, 37: 233-247.
- HENNINGSSON, S., ANNERBRINK, K., OLSSON, M., ALLGULANDER, C., ANDERSCH, S., SJODIN, I., GUSTAFSON, D., SKOOG, I., ERIKSSON, E. und WESTBERG, L. (2006). Absence of the Arg441His polymorphism in the tryptophan hydroxylase 2 gene in adults with anxiety disorders and depression. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics*, 144: 816-817.
- HENTZE, M.W. und KULOZIK, A.E. (1999). A Perfect Message: RNA Surveillance and Nonsense-Mediated Decay. *Cell*, 96: 307-310.
- HERRICK-DAVIS, K., GRINDE, E. und NISWENDER, C.M. (1999). Serotonin 5-HT2C receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *J. Neurochem.*, 73: 1711-1717.

- HERRICK-DAVIS, K., GRINDE, E. und TEITLER, M. (2000). Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295: 226-232.
- HERRMANN, M.J., HUTER, T., MULLER, F., MUHLBERGER, A., PAULI, P., REIF, A., RENNER, T., CANLI, T., FALLGATTER, A.J. und LESCH, K.P. (2007). Additive effects of serotonin transporter and tryptophan hydroxylase-2 gene variation on emotional processing. *Cereb. Cortex*, 17: 1160-1163.
- HERVE, D., PICKEL, V.M., JOH, T.H. und BEAUDET, A. (1987). Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat: fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons. *Brain Res.*, 435: 71-83.
- HIGGINS, G.A., WANG, Y., CORRIGALL, W.A. und SELLERS, E.M. (1994). Influence of 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonists and the indirect 5-HT agonist, dexfenfluramine, on heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 114: 611-619.
- HIGUCHI, M., MAAS, S., SINGLE, F.N., HARTNER, J., ROZOV, A., BURNASHEV, N., FELDMAYER, D., SPRENGEL, R. und SEEBURG, P.H. (2000). Point mutation in an AMPA receptor gene rescues lethality in mice deficient in the RNA-editing enzyme ADAR2. *Nature*, 406: 78-81.
- HIGUCHI, M., SINGLE, F.N., KOHLER, M., SOMMER, B., SPRENGEL, R. und SEEBURG, P.H. (1993). RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell*, 75: 1361-1370.
- HIROI, R., MCDEVITT, R.A. und NEUMAIER, J.F. (2006). Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol. Psychiatry*, 60: 288-295.
- HITCHCOTT, P.K., HARMER, C.J. und PHILLIPS, G.D. (1997). Enhanced acquisition of discriminative approach following intra-amygdala d-amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 132: 237-246.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., CASTANTINI, F. und LACY, E. (1994). Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2nd edn (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- HOLLAND, J.M. (1976). Serotonin deficiency and prolonged bleeding in beige mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 151: 32-39.
- HOLMES, A., YANG, R.J., LESCH, K.P., CRAWLEY, J.N. und MURPHY, D.L. (2003). Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology*, 28: 2077-2088.
- HOWELL, L.L. und KIMMEL, H.L. (2008). Monoamine transporters and psychostimulant addiction. *Biochem. Pharmacol.*, 75: 196-217.
- HOYER, D., HANNON, J.P. und MARTIN, G.R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71: 533-554.
- HUGHES, T.A. (2006). Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet.*, 22: 119-122.
- ICHINOSE, H., OHYE, T., FUJITA, K., YOSHIDA, M., UEDA, S. und NAGATSU, T. (1993). Increased heterogeneity of tyrosine hydroxylase in humans. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 195: 158-165.
- IKEMURA, T. (1985). Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evol.*, 2: 13-34.
- INOUE, T., LI, X.B., ABEKAWA, T., KITAICHI, Y., IZUMI, T., NAKAGAWA, S. und KOYAMA, T. (2004). Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *Eur. J. Pharmacol.*, 497: 311-316.
- ISLES, A.R., MA, D., MILSOM, C., SKYNNER, M.J., CUI, W., CLARK, J., KEVERNE, E.B. und ALLEN, N.D. (2001). Conditional ablation of neurones in transgenic mice. *J. Neurobiol.*, 47: 183-193.
- IVANOV, I.G., SARAFFOVA, A.A. und ABOUHADAR, M.G. (1997). Unusual effect of clusters of rare arginine (AGG) codons on the expression of human interferon alpha 1 gene in Escherichia coli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29: 659-666.
- IWAMOTO, K. und KATO, T. (2003). RNA editing of serotonin 2C receptor in human postmortem brains of major mental disorders. *Neurosci. Lett.*, 346: 169-172.
- IWAMOTO, K., NAKATANI, N., BUNDO, M., YOSHIKAWA, T. und KATO, T. (2005). Altered RNA editing of serotonin 2C receptor in a rat model of depression. *Neurosci. Res.*, 53: 69-76.
- JACOBS, B.L. und AZMITIA, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 72: 165-229.
- JANN, M.W. und KURTZ, N.M. (1987). Treatment of panic and phobic disorders. *Clin. Pharm.*, 6: 947-962.
- JIANG, G.C., YOHRING, G.J.T., SCHMITT, J.D. und VRANA, K.E. (2000). Identification of substrate orienting and phosphorylation sites within tryptophan hydroxylase using homology-based molecular modeling. *J. Mol. Biol.*, 302: 1005-1017.
- JOHANSEN, P.A., JENNINGS, I., COTTON, R.G. und KUHN, D.M. (1995). Tryptophan hydroxylase is phosphorylated by protein kinase A. *J. Neurochem.*, 65: 882-888.
- JOHANSSON, E., PARKINSON, G.N., DENNY, W.A. und NEIDLE, S. (2003). Studies on the nitroreductase prodrug-activating system. Crystal structures of complexes with the inhibitor dicoumarol and dinitrobenzamide prodrugs and of the enzyme active form. *J. Med. Chem.*, 46: 4009-4020.
- JOHNSON, J.L. und CRAIG, E.A. (1997). Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell*, 90: 201-204.
- JONES, R.S. (1982). Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain? *Prog. Neurobiol.*, 19: 117-139.
- KALIVAS, P.W. und VOLKOW, N.D. (2005). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am. J. Psychiatry*, 162: 1403-1413.
- KANE, J.F. (1995). Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 6: 494-500.
- KANEDA, N., KOBAYASHI, K., ICHINOSE, H., KISHI, F., NAKAZAWA, A., KUROSAWA, Y., FUJITA, K. und NAGATSU, T. (1987). Isolation of a novel cDNA clone for human tyrosine hydroxylase: alternative RNA splicing produces four kinds of mRNA from a single gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146: 971-975.
- KE, L., QI, Z.Y., PING, Y. und REN, C.Y. (2006). Effect of SNP at position 40237 in exon 7 of the TPH2 gene on susceptibility to suicide. *Brain Res.*, 1122: 24-26.
- KEELE, N.B. (2005). The role of serotonin in impulsive and aggressive behaviors associated with epilepsy-like neuronal hyperexcitability in the amygdala. *Epilepsy Behav.*, 7: 325-335.
- KEELE, N.B. und RANDALL, D.R. (2003). Altered Modulation of Excitatory Neurotransmission in the Amygdala by Serotonin in an Animal Model of Impulsive Aggression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 985: 528-532.
- KERMAN, I.A., SHABRANG, C., TAYLOR, L., AKIL, H. und WATSON, S.J. (2006). Relationship of presympathetic-premotor neurons to the serotonergic transmitter system in the rat brainstem. *J. Comp. Neurol.*, 499: 882-896.
- KESSLER, R.C., BERGLUND, P., DEMLER, O., JIN, R., MERIKANGAS, K.R. und WALTERS, E.E. (2005). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry*, 62: 593-602.
- KHOZHAI, L.I., PUCHKOV, V.F. und OTELLIN, V.A. (1995). [The effect of a serotonin deficiency on mammalian embryonic development]. *Ontogenez*, 26: 350-355.
- KIKUCHI, M., YAMADA, K., TOYOTA, T. und YOSHIKAWA, T. (2003). C18orf1 located on chromosome 18p11.2 may confer susceptibility to schizophrenia. *J. Med. Dent. Sci.*, 50: 225-229.
- KILTS, C.D. (2001). Imaging the roles of the amygdala in drug addiction. *Psychopharmacol. Bull.*, 35: 84-94.
- KIMCHI-SARFATY, C., OH, J.M., KIM, I.W., SAUNA, Z.E., CALCAGNO, A.M., AMBUDKAR, S.V. und GOTTESMAN, M.M. (2007). A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315: 525-528.

- KING, R., FAULL, K.F., STAHL, S.M., MEFFORD, I.N., THIEMANN, S., BARCHAS, J.D. und BERGER, P.A. (1985). Serotonin and schizophrenia: correlations between serotonergic activity and schizophrenic motor behavior. *Psychiatry Res.*, 14: 235-240.
- KISHORE, S. und STAMM, S. (2006). The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science*, 311: 230-232.
- KLEIN, D.C. und WELLER, J.L. (1970). Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. *Science*, 169: 1093-1095.
- KNOX, R.J., FRIEDLOS, F., BIGGS, P.J., FLITTER, W.D., GASKELL, M., GODDARD, P., DAVIES, L. und JARMAN, M. (1993). Identification, synthesis and properties of 5-(aziridin-1-yl)-2-nitro-4-nitrosobenzamide, a novel DNA crosslinking agent derived from CB1954. *Biochem. Pharmacol.*, 46: 797-803.
- KNOX, R.J., FRIEDLOS, F., SHERWOOD, R.F., MELTON, R.G. und ANLEZARK, G.M. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--II. A comparison of an Escherichia coli nitroreductase and Walker DT diaphorase. *Biochem. Pharmacol.*, 44: 2297-2301.
- KOBAYASHI, K., MORITA, S., SAWADA, H., MIZUGUCHI, T., YAMADA, K., NAGATSU, I., HATA, T., WATANABE, Y., FUJITA, K. und NAGATSU, T. (1995). Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J. Biol. Chem.*, 270: 27235-27243.
- KOHLER, M., BURNASHEV, N., SAKMANN, B. und SEEBURG, P.H. (1993). Determinants of Ca<sup>2+</sup> permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*, 10: 491-500.
- KOMAR, A.A. und JAENICK, R. (1995). Kinetics of translation of gamma B crystallin and its circularly permuted variant in an in vitro cell-free system: possible relations to codon distribution and protein folding. *FEBS Lett.*, 376: 195-198.
- KOMAR, A.A., LESNIK, T. und REISS, C. (1999). Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation. *FEBS Lett.*, 462: 387-391.
- KRASHENINNIKOV, I.A., KOMAR, A.A. und ADZHUBEI, I.A. (1991). Nonuniform size distribution of nascent globin peptides, evidence for pause localization sites, and a contranslational protein-folding model. *J. Protein Chem.*, 10: 445-453.
- KUHN, D.M., ARTHUR, R., JR. und STATES, J.C. (1997). Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. *J. Neurochem.*, 68: 2220-2223.
- KUHN, D.M., MEYER, M.A. und LOVENBERG, W. (1980). Comparisons of tryptophan hydroxylase from a malignant murine mast cell tumor and rat mesencephalic tegmentum. *Arch. Biochem. Biophys.*, 199: 355-361.
- KUHN, D.M., SAKOWSKI, S.A., GEDDES, T.J., WILKERSON, C. und HAYCOCK, J.W. (2007). Phosphorylation and activation of tryptophan hydroxylase 2: identification of serine-19 as the substrate site for calcium, calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Neurochem.*, 103: 1567-1573.
- KULIKOV, A.V., OSIPOVA, D.V., NAUMENKO, V.S. und POPOVA, N.K. (2005). Association between Tph2 gene polymorphism, brain tryptophan hydroxylase activity and aggressiveness in mouse strains. *Genes Brain Behav.*, 4: 482-485.
- KUMER, S.C., MOCKUS, S.M., RUCKER, P.J. und VRANA, K.E. (1997). Amino-terminal analysis of tryptophan hydroxylase: protein kinase phosphorylation occurs at serine-58. *J. Neurochem.*, 69: 1738-1745.
- KWAK, S.P., MALBERG, J.E., HOWLAND, D.S., CHENG, K.Y., SU, J., SHE, Y., FENNELL, M. und GHAVAMI, A. (2007). Ablation of central nervous system progenitor cells in transgenic rats using bacterial nitroreductase system. *J. Neurosci. Res.*, 85: 1183-1193.
- LAM, D.D. und HEISLER, L.K. (2007). Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. *Expert Rev. Mol. Med.*, 9: 1-24.
- LAUDER, J.M. (1993). Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. *Trends Neurosci.*, 16: 233-240.
- LAUTENSCHLAGER, M., HOLTJE, M., VON JAGOW, B., VEH, R.W., HARMS, C., BERGK, A., DIRNAGL, U., AHNERT-HILGER, G. und HORTNAGL, H. (2000). Serotonin uptake and release mechanisms in developing cultures of rat embryonic raphe neurons: age- and region-specific differences. *Neuroscience*, 99: 519-527.
- LAVNER, Y. und KOTLAR, D. (2005). Codon bias as a factor in regulating expression via translation rate in the human genome. *Gene*, 345: 127-138.
- LAWRIE, S.M. und ABUKMEIL, S.S. (1998). Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry*, 172: 110-120.
- LEANDRO, J., NASCIMENTO, C., DE ALMEIDA, I.T. und LEANDRO, P. (2006). Co-expression of different subunits of human phenylalanine hydroxylase: evidence of negative interallelic complementation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1762: 544-550.
- LEDFORD, C.C., FUCHS, R.A. und SEE, R.E. (2003). Potentiated reinstatement of cocaine-seeking behavior following D-amphetamine infusion into the basolateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1721-1729.
- LEDLEY, F.D., DILELLA, A.G., KWOK, S.C. und WOO, S.L. (1985). Homology between phenylalanine and tyrosine hydroxylases reveals common structural and functional domains. *Biochemistry (Mosc)*, 24: 3389-3394.
- LEDOUX, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23: 155-184.
- LEE, C.J. und IRIZARRY, K. (2003). Alternative splicing in the nervous system: an emerging source of diversity and regulation. *Biol. Psychiatry*, 54: 771-776.
- LEJEUNE, F. und MAQUAT, L.E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17: 309-315.
- LENICOV, F.R., LEMONDE, S., CZESAK, M., MOSHER, T.M. und ALBERT, P.R. (2007). Cell-type specific induction of tryptophan hydroxylase-2 transcription by calcium mobilization. *J. Neurochem.*, 103: 2047-2057.
- LESCH, K.P. (2007). Linking emotion to the social brain. The role of the serotonin transporter in human social behaviour. *EMBO Rep.*, 8 Spec No: S24-29.
- LESCH, K.P., ZENG, Y., REIF, A. und GUTKNECHT, L. (2003). Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 480: 185-204.
- LESURTEL, M., GRAF, R., ALEIL, B., WALTHER, D.J., TIAN, Y., JOCHUM, W., GACHET, C., BADER, M. und CLAVIEN, P.A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, 312: 104-107.
- LEVINE, R.A., KUHN, D.M. und LOVENBERG, W. (1979). The regional distribution of hydroxylase cofactor in rat brain. *J. Neurochem.*, 32: 1575-1578.
- LEVINE, R.A., MILLER, L.P. und LOVENBERG, W. (1981). Tetrahydrobiopterin in striatum: localization in dopamine nerve terminals and role in catecholamine synthesis. *Science*, 214: 919-921.
- LI, Q., LEE, J.A. und BLACK, D.L. (2007). Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8: 819-831.
- LIDOV, H.G. und MOLLIVER, M.E. (1982). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.*, 8: 389-430.
- LIM, J.E., PINSONNEAULT, J., SADEE, W. und SAFFEN, D. (2006). Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) haplotypes predict levels of TPH2 mRNA expression in human pons. *Mol. Psychiatry*, 12: 491-501.
- LINDEMANN, L., EBELING, M., KRATOCHWIL, N.A., BUNZOW, J.R., GRANDY, D.K. und HOENER, M.C. (2005). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 85: 372-385.

- LINDEMANN, L. und HOENER, M.C. (2005). A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26: 274-281.
- LIPSCOMBE, D. (2005). Neuronal proteins custom designed by alternative splicing. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 15: 358-363.
- LIRA, A., ZHOU, M., CASTANON, N., ANSORGE, M.S., GORDON, J.A., FRANCIS, J.H., BRADLEY-MOORE, M., LIRA, J., UNDERWOOD, M.D., ARANGO, V., KUNG, H.F., HOFER, M.A., HEN, R. und GINGRICH, J.A. (2003). Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol. Psychiatry*, 54: 960-971.
- LOMAX, A.E., LINDEN, D.R., MAWE, G.M. und SHARKEY, K.A. (2006). Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton. Neurosci.*, 126-127: 250-257.
- LOPEZ, A.J. (1995). Developmental role of transcription factor isoforms generated by alternative splicing. *Dev. Biol.*, 172: 396-411.
- LOVENBERG, W., JEQUIER, E. und SJOERDSMA, A. (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155: 217-219.
- LOVERING, A.L., HYDE, E.I., SEARLE, P.F. und WHITE, S.A. (2001). The structure of Escherichia coli nitroreductase complexed with nicotinic acid: three crystal forms at 1.7 Å, 1.8 Å and 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 309: 203-213.
- LUCKI, I. (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol. Psychiatry*, 44: 151-162.
- MA, D., ALLEN, N.D., VAN BERGEN, Y.C., JONES, C.M., BAUM, M.J., KEVERNE, E.B. und BRENNAN, P.A. (2002). Selective ablation of olfactory receptor neurons without functional impairment of vomeronasal receptor neurons in OMP-ntr transgenic mice. *Eur. J. Neurosci.*, 16: 2317-2323.
- MAAS, S., KAWAHARA, Y., TAMBURRO, K.M. und NISHIKURA, K. (2006). A-to-I RNA editing and human disease. *RNA Biol.*, 3: 1-9.
- MACBETH, M.R., SCHUBERT, H.L., VANDEMARK, A.P., LINGAM, A.T., HILL, C.P. und BASS, B.L. (2005). Inositol hexakisphosphate is bound in the ADAR2 core and required for RNA editing. *Science*, 309: 1534-1539.
- MALBERG, J.E., EISCH, A.J., NESTLER, E.J. und DUMAN, R.S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 20: 9104-9110.
- MALEK, Z.S., PEVET, P. und RAISON, S. (2004). Circadian change in tryptophan hydroxylase protein levels within the rat intergeniculate leaflets and raphe nuclei. *Neuroscience*, 125: 749-758.
- MALEK, Z.S., SAGE, D., PEVET, P. und RAISON, S. (2007). Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 mRNA within Raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology*, in press.
- MALONE, K.M., CORBITT, E.M., LI, S. und MANN, J.J. (1996). Prolactin response to fenfluramine and suicide attempt lethality in major depression. *Br. J. Psychiatry*, 168: 324-329.
- MANDELL, A.J. und KNAPP, S. (1977). Regulation of serotonin biosynthesis in brain: role of the high affinity uptake of tryptophan into serotonergic neurons. *Fed. Proc.*, 36: 2142-2148.
- MANN, J.J. (2003). Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat. Rev. Neurosci.*, 4: 819-828.
- MANN, J.J. und MALONE, K.M. (1997). Cerebrospinal fluid amines and higher-lethality suicide attempts in depressed inpatients. *Biol. Psychiatry*, 41: 162-171.
- MATSUDA, M., IMAOKA, T., VOMACHKA, A.J., GUDELSKY, G.A., HOU, Z., MISTRY, M., BAILEY, J.P., NIEPORT, K.M., WALTHER, D.J., BADER, M. und HORSEMAN, N.D. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell.*, 6: 193-203.
- MAURI, M.C., RUDELLI, R., SOMASCHINI, E., RONCORONI, L., PAPA, R., MANTERO, M., LONGHINI, M. und PENATI, G. (1996). Neurobiological and psychopharmacological basis in the therapy of bulimia and anorexia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 20: 207-240.
- MCFARLAND, K. und ETTEMBERG, A. (1997). Reinstatement of drug-seeking behavior produced by heroin-predictive environmental stimuli. *Psychopharmacology (Berl)*. 131: 86-92.
- MCGREGOR, A., LACOSTA, S. und ROBERTS, D.C. (1993). L-tryptophan decreases the breaking point under a progressive ratio schedule of intravenous cocaine reinforcement in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 651-655.
- MCKINNEY, J., JOHANSSON, S., HALMOY, A., DRAMSDAHL, M., WINGE, I., KNAPPSKOG, P.M. und HAAVIK, J. (2008). A loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase 2 segregating with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry*, 13: 365-367.
- MCKINNEY, J., KNAPPSKOG, P.M. und HAAVIK, J. (2005). Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.*, 92: 311-320.
- MCLEAN, P.G., BORMAN, R.A. und LEE, K. (2007). 5-HT in the enteric nervous system: gut function and neuropharmacology. *Trends Neurosci.*, 30: 9-13.
- MCNEISH, I.A., GREEN, N.K., GILLIGAN, M.G., FORD, M.J., MAUTNER, V., YOUNG, L.S., KERR, D.J. und SEARLE, P.F. (1998). Virus directed enzyme prodrug therapy for ovarian and pancreatic cancer using retrovirally delivered E. coli nitroreductase and CB1954. *Gene Ther.*, 5: 1061-1069.
- MEIER, J.C., HENNEBERGER, C., MELNICK, I., RACCA, C., HARVEY, R.J., HEINEMANN, U., SCHMIEDEN, V. und GRANTYN, R. (2005). RNA editing produces glycine receptor alpha3(P185L), resulting in high agonist potency. *Nat. Neurosci.*, 8: 736-744.
- MELLON, P., PARKER, V., GLUZMAN, Y. und MANIATIS, T. (1981). Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell*, 27: 279-288.
- MELTZER, H.Y. (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology*, 21: 106S-115S.
- MICZEK, K.A., ALTMAN, J.L., APPEL, J.B. und BOGGAN, W.O. (1975). Para-chlorophenylalanine, serotonin and killing behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 3: 355-361.
- MIYAMURA, Y., SUZUKI, T., KONO, M., INAGAKI, K., ITO, S., SUZUKI, N. und TOMITA, Y. (2003). Mutations of the RNA-specific adenosine deaminase gene (DSRAD) are involved in dyschromatosis symmetrica hereditaria. *Am. J. Hum. Genet.*, 73: 693-699.
- MOLL, U.M. und SCHRAMM, L.M. (1998). p53--an acrobat in tumorigenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 9: 23-37.
- MOOLTEN, F.L., WELLS, J.M., HEYMAN, R.A. und EVANS, R.M. (1990). Lymphoma regression induced by ganciclovir in mice bearing a herpes thymidine kinase transgene. *Hum. Gene Ther.*, 1: 125-134.
- MORECROFT, I., DEMPSIE, Y., BADER, M., WALTHER, D.J., KOTNIK, K., LOUGHLIN, L., NILSEN, M. und MACLEAN, M.R. (2007). Effect of tryptophan hydroxylase 1 deficiency on the development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Hypertension*, 49: 232-236.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55-63.
- MOSSNER, R., FREITAG, C.M., GUTKNECHT, L., REIF, A., TAUBER, R., FRANKE, P., FRITZE, J., WAGNER, G., PEIKERT, G., WENDA, B., SAND, P., RIETSCHEL, M., GARRITSEN, H., JACOB, C., LESCH, K.P. und DECKERT, J. (2006). The novel brain-specific tryptophan hydroxylase-2 gene in panic disorder. *J. Psychopharmacol. (Oxf)*. 20: 547-552.
- MOUNT, S.M. (1982). A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res.*, 10: 459-472.
- MULLEN, C.A., KILSTRUP, M. und BLAESE, R.M. (1992). Transfer of the bacterial gene for cytosine deaminase to mammalian cells confers lethal sensitivity to 5-fluorocytosine: a negative selection system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89: 33-37.

- MURPHY, D.L., ZOHAR, J., BENKELFAT, C., PATO, M.T., PIGOTT, T.A. und INSEL, T.R. (1989). Obsessive-compulsive disorder as a 5-HT subsystem-related behavioural disorder. *Br. J. Psychiatry. Suppl.* 15-24.
- NAKAMURA, Y., GOJOBORI, T. und IKEMURA, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.*, 28: 292.
- NAKATA, H. und FUJISAWA, H. (1982a). Purification and properties of tryptophan 5-monoxygenase from rat brain-stem. *Eur. J. Biochem.*, 122: 41-47.
- NAKATA, H. und FUJISAWA, H. (1982b). Tryptophan 5-monoxygenase from mouse mastocytoma P815. A simple purification and general properties. *Eur. J. Biochem.*, 124: 595-601.
- NAVARATNAM, N. und SARWAR, R. (2006). An overview of cytidine deaminases. *Int. J. Hematol.*, 83: 195-200.
- NELSON, M.D., SAYKIN, A.J., FLASHMAN, L.A. und RIORDAN, H.J. (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55: 433-440.
- NELSON, R.J. und TRAINOR, B.C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8: 536-546.
- NEWMAN, C., WANG, D. und CUTZ, E. (1993). Serotonin (5-hydroxytryptamine) expression in pulmonary neuroendocrine cells (NE) and a netumor cell line. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 337: 73-78.
- NICHOLS, D.E. und NICHOLS, C.D. (2008). Serotonin Receptors. *Chem. Rev.*, 108: 1614-1641.
- NIELSEN, D.A., BARRAL, S., PROUDNIKOV, D., KELLOGG, S., HO, A., OTT, J. und KREEK, M.J. (2008). TPH2 and TPH1: Association of Variants and Interactions with Heroin Addiction. *Behav. Genet.*, 38: 133-150.
- NISHIKURA, K. (2006). Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7: 919-931.
- NISWENDER, C.M., COPELAND, S.C., HERRICK-DAVIS, K., EMESON, R.B. und SANDERS-BUSH, E. (1999). RNA Editing of the Human Serotonin 5-Hydroxytryptamine 2C Receptor Silences Constitutive Activity. *J. Biol. Chem.*, 274: 9472-9478.
- O'MALLEY, K.L., ANHALT, M.J., MARTIN, B.M., KELSOE, J.R., WINFIELD, S.L. und GINNS, E.I. (1987). Isolation and characterization of the human tyrosine hydroxylase gene: identification of 5' alternative splice sites responsible for multiple mRNAs. *Biochemistry (Mosc)*. 26: 6910-6914.
- OLDENDORF, W.H. und SZABO, J. (1976). Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am. J. Physiol.*, 230: 94-98.
- ONO, H., SHIRAKAWA, O., KITAMURA, N., HASHIMOTO, T., NISHIGUCHI, N., NISHIMURA, A., NUSHIDA, H., UENO, Y. und MAEDA, K. (2002). Tryptophan hydroxylase immunoreactivity is altered by the genetic variation in postmortem brain samples of both suicide victims and controls. *Mol. Psychiatry*, 7: 1127-1132.
- ORESIC, M. und SHALLOWAY, D. (1998). Specific correlations between relative synonymous codon usage and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.*, 281: 31-48.
- ORMSBEE, H.S., 3RD und FONDACARO, J.D. (1985). Action of serotonin on the gastrointestinal tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 178: 333-338.
- PALMER, D.H., MAUTNER, V., MIRZA, D., OLIFF, S., GERRITSEN, W., VAN DER SIJF, J.R., HUBSCHER, S., REYNOLDS, G., BONNEY, S., RAJARATNAM, R., HULL, D., HORNE, M., ELLIS, J., MOUNTAIN, A., HILL, S., HARRIS, P.A., SEARLE, P.F., YOUNG, L.S., JAMES, N.D. und KERR, D.J. (2004). Virus-directed enzyme prodrug therapy: intratumoral administration of a replication-deficient adenovirus encoding nitroreductase to patients with resectable liver cancer. *J. Clin. Oncol.*, 22: 1546-1552.
- PARDRIDGE, W.M. (1977). Kinetics of competitive inhibition of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.*, 28: 103-108.
- PARKINSON, G.N., SKELLY, J.V. und NEIDLE, S. (2000). Crystal structure of FMN-dependent nitroreductase from *Escherichia coli* B: a prodrug-activating enzyme. *J. Med. Chem.*, 43: 3624-3631.
- PARSEY, R.V., HASTINGS, R.S., OQUENDO, M.A., HUANG, Y.Y., SIMPSON, N., ARCEMENT, J., HUANG, Y., OGDEN, R.T., VAN HEERTUM, R.L., ARANGO, V. und MANN, J.J. (2006). Lower serotonin transporter binding potential in the human brain during major depressive episodes. *Am. J. Psychiatry*, 163: 52-58.
- PATEL, P.D., PONTRELLO, C. und BURKE, S. (2004). Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland. *Biol. Psychiatry*, 55: 428-433.
- PATTERSON, S.S., DIONISI, H.M., GUPTA, R.K. und SAYLER, G.S. (2005). Codon optimization of bacterial luciferase (lux) for expression in mammalian cells. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 115-123.
- PAULMANN, N. (2008). Dissertation: Aufklärung der Funktion von Serotonin in beta-Zellen des Pankreas. Die Serotoninylierung kleiner GTPasen moduliert die Insulinsekretion. *Freie Universität Berlin; Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie*.
- PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOIGT, J.-P., BERT, B., HENSCHEN, S., VOWINCKEL, J., PETER, J.-U., WALTHER, M., BADER, M., RUPNIK, M., FINK, H. und WALTHER, D.J. (eingereicht). Impaired serotonylation in pancreatic  $\beta$ -cells causes diabetes mellitus.
- PERSICO, A.M., MENGUAL, E., MOESSNER, R., HALL, F.S., REVAY, R.S., SORA, I., ARELLANO, J., DEFELIPE, J., GIMENEZ-AMAYA, J.M., CONCIATORI, M., MARINO, R., BALDI, A., CABIB, S., PASCUCCI, T., UHL, G.R., MURPHY, D.L., LESCH, K.P. und KELLER, F. (2001). Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. *J. Neurosci.*, 21: 6862-6873.
- PETER, J.U. (2006). Dissertation: Molekularbiologische und pharmakologische Manipulation der Tryptophanhydroxylasen. *Freie Universität Berlin; Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie*.
- PEY, A.L., DESVIAT, L.R., GAMEZ, A., UGARTE, M. und PEREZ, B. (2003). Phenylketonuria: genotype-phenotype correlations based on expression analysis of structural and functional mutations in PAH. *Hum. Genet.*, 21: 370-378.
- PHILLIPS, M.L., DREVETS, W.C., RAUCH, S.L. und LANE, R. (2003). Neurobiology of emotion perception I: The neural basis of normal emotion perception. *Biol. Psychiatry*, 54: 504-514.
- PHILLIPS, M.L., WILLIAMS, L., SENIOR, C., BULLMORE, E.T., BRAMMER, M.J., ANDREW, C., WILLIAMS, S.C. und DAVID, A.S. (1999). A differential neural response to threatening and non-threatening negative facial expressions in paranoid and non-paranoid schizophrenics. *Psychiatry Res.*, 92: 11-31.
- PLOTKIN, J.B., ROBINS, H. und LEVINE, A.J. (2004). Tissue-specific codon usage and the expression of human genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 12588-12591.
- PORTSMOUTH, D., HLAVATY, J. und RENNERT, M. (2007). Suicide genes for cancer therapy. *Mol. Aspects Med.*, 28: 4-41.
- POWELL, L.M., WALLIS, S.C., PEASE, R.J., EDWARDS, Y.H., KNOTT, T.J. und SCOTT, J. (1987). A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*, 50: 831-840.
- PUGLIESE, A.M., PASSANI, M.B. und CORRADETTI, R. (1998). Effect of the selective 5-HT1A receptor antagonist WAY 100635 on the inhibition of e.p.s.ps produced by 5-HT in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Br. J. Pharmacol.*, 124: 93-100.
- RAINNIE, D.G. (1999). Serotonergic modulation of neurotransmission in the rat basolateral amygdala. *J. Neurophysiol.*, 82: 69-85.
- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A. und PAGE, I.H. (1947). Purification of the substance which is responsible for the vasoconstrictor activity of serum. *Fed. Proc.*, 6: 184.
- RAPPORT, M.M., GREEN, A.A. und PAGE, I.H. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin). III. Chemical inactivation. *J. Biochem. (Tokyo)*. 1237-1241.
- REED, R. und HURT, E. (2002). A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell*, 108: 523.

- ROCHE (2007). DIG Application Manual for *Nonradioactive In Situ Hybridisation*.
- ROGAN, M.T., STAUBLI, U.V. und LEDOUX, J.E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390: 604-607.
- ROSEN, J.B. und SCHULKIN, J.P.R. (1998). From normal fear to pathological anxiety. *Psychol. Rev.*, 105: 325-350.
- ROSENKRANZ, J.A. und GRACE, A.A. (1999). Modulation of basolateral amygdala neuronal firing and afferent drive by dopamine receptor activation in vivo. *J. Neurosci.*, 19: 11027-11039.
- ROSENKRANZ, J.A. und GRACE, A.A. (2002). Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature*, 417: 282-287.
- RUDDICK, J.P., EVANS, A.K., NUTT, D.J., LIGHTMAN, S.L., ROOK, G.A. und LOWRY, C.A. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev. Mol. Med.*, 8: 1-27.
- RUDNICK, G. (2006). Serotonin transporters--structure and function. *J. Membr. Biol.*, 213: 101-110.
- SADIKOT, A.F. und PARENT, A. (1990). The monoaminergic innervation of the amygdala in the squirrel monkey: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 36: 431-447.
- SAKOWSKI, S.A., GEDDES, T.J., THOMAS, D.M., LEVI, E., HATFIELD, J.S. und KUHN, D.M. (2006). Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res.*, 1085: 11-18.
- SALICHON, N., GASPAR, P., UPTON, A.L., PICAUD, S., HANOUN, N., HAMON, M., DE MAEYER, E., MURPHY, D.L., MOSSNER, R., LESCH, K.P., HEN, R. und SEIF, I. (2001). Excessive activation of serotonin (5-HT) 1B receptors disrupts the formation of sensory maps in monoamine oxidase a and 5-ht transporter knock-out mice. *J. Neurosci.*, 21: 884-896.
- SANCHEZ DEL PINO, M.M., PETERSON, D.R. und HAWKINS, R.A. (1995). Neutral amino acid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.*, 270: 14913-14918.
- SANCHEZ, R.L., REDDY, A.P., CENTENO, M.L., HENDERSON, J.A. und BETHEA, C.L. (2005). A second tryptophan hydroxylase isoform, TPH-2 mRNA, is increased by ovarian steroids in the raphe region of macaques. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 135: 194-203.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74: 5463-5467.
- SANSAM, C.L., WELLS, K.S. und EMESON, R.B. (2003). Modulation of RNA editing by functional nucleolar sequestration of ADAR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 14018-14023.
- SANTARELLI, L., SAXE, M., GROSS, C., SURGET, A., BATTAGLIA, F., DULAWA, S., WEISSTAUB, N., LEE, J., DUMAN, R., ARANCIO, O., BELZUNG, C. und HEN, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, 301: 805-809.
- SATO, S., WARD, C.L. und KOPITO, R.R. (1998). Cotranslational ubiquitination of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in vitro. *J. Biol. Chem.*, 273: 7189-7192.
- SAUDOU, F., AMARA, D.A., DIERICH, A., LEMEURE, M., RAMBOZ, S., SEGU, L., BUHOT, M.C. und HEN, R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. *Science*, 265: 1875-1878.
- SCHEUCH, K., LAUTENSCHLAGER, M., GROHMANN, M., STAHLBERG, S., KIRCHHEINER, J., ZILL, P., HEINZ, A., WALTHER, D.J. und PRILLER, J. (2007). Characterization of a Functional Promoter Polymorphism of the Human Tryptophan Hydroxylase 2 Gene in Serotonergic Raphe Neurons. *Biol. Psychiatry*, 62: 1288-1294.
- SCHNEIDER, F., WEISS, U., KESSLER, C., SALLOUM, J.B., POSSE, S., GRODD, W. und MULLER-GARTNER, H.W. (1998). Differential amygdala activation in schizophrenia during sadness. *Schizophr. Res.*, 34: 133-142.
- SCHONN, J.S., DESNOS, C., HENRY, J.P. und DARCHEN, F. (2003). Transmitter uptake and release in PC12 cells overexpressing plasma membrane monoamine transporters. *J. Neurochem.*, 84: 669-677.
- SCRABLE, H. und STAMBROOK, P.J. (1997). Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics*, 147: 297-304.
- SCRIVER, C.R., HURTUBISE, M., KONECKI, D., PHOMMARINH, M., PREVOST, L., ERLANDSEN, H., STEVENS, R., WATERS, P.J., RYAN, S., MCDONALD, D. und SARKISSIAN, C. (2003). PAHdb 2003: what a locus-specific knowledgebase can do. *Hum. Mutat.*, 21: 333-344.
- SEARLE, P.F., CHEN, M.J., HU, L., RACE, P.R., LOVERING, A.L., GROVE, J.L., GUISE, C., JABERIPOUR, M., JAMES, N.D., MAUTNER, V., YOUNG, L.S., KERR, D.J., MOUNTAIN, A., WHITE, S.A. und HYDE, E.I. (2004). Nitroreductase: a prodrug-activating enzyme for cancer gene therapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31: 811-816.
- SEE, R.E., KRZUCH, P.J. und GRIMM, J.W. (2001). Dopamine, but not glutamate, receptor blockade in the basolateral amygdala attenuates conditioned reward in a rat model of relapse to cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*, 154: 301-310.
- SEEBURG, P.H., HIGUCHI, M. und SPRENGEL, R. (1998). RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 26: 217-229.
- SEGMAN, R.H., EBSTEIN, R.P., HERESCO-LEVY, U., GORFINE, M., AVNON, M., GUR, E., NEMANOV, L. und LERER, B. (1997). Schizophrenia, chronic hospitalization and the 5-HT2C receptor gene. *Psychiatr. Genet.*, 7: 75-78.
- SHARMA, P.M., BOWMAN, M., MADDEN, S.L., RAUSCHER, F.J., 3RD und SUKUMAR, S. (1994). RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev.*, 8: 720-731.
- SHARP, P.M., COWE, E., HIGGINS, D.G., SHIELDS, D.C., WOLFE, K.H. und WRIGHT, F. (1988). Codon usage patterns in Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Drosophila melanogaster and Homo sapiens; a review of the considerable within-species diversity. *Nucleic Acids Res.*, 16: 8207-8211.
- SHEDPURE, M. und PATI, A.K. (1995). The pineal gland: structural and functional diversity. *Indian J. Exp. Biol.*, 33: 625-640.
- SHEEHAN, K., LOWE, N., KIRLEY, A., MULLINS, C., FITZGERALD, M., GILL, M. und HAWI, Z. (2005). Tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD. *Mol. Psychiatry*, 10: 944-949.
- SHIBLI-RAHHAL, A., VAN BEEK, M. und SCHLECHTE, J.A. (2006). Cushing's syndrome. *Clin. Dermatol.*, 24: 260-265.
- SHIMSHEK, D.R., KIM, J., HUBNER, M.R., SPERGEL, D.J., BUCHHOLZ, F., CASANOVA, E., STEWART, A.F., SEEBURG, P.H. und SPRENGEL, R. (2002). Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse. *Genesis*, 32: 19-26.
- SHISHKINA, G.T., KALININA, T.S. und DYGALO, N.N. (2007). Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect. *Neuroscience*, 150: 404-412.
- SIEVER, L.J. (2008). Neurobiology of aggression and violence. *Am. J. Psychiatry*, 165: 429-442.
- SKUSE, G.R., CAPPIONE, A.J., SOWDEN, M., METHENY, L.J. und SMITH, H.C. (1996). The neurofibromatosis type I messenger RNA undergoes base-modification RNA editing. *Nucleic Acids Res.*, 24: 478-485.
- SMITH, K.A., FAIRBURN, C.G. und COWEN, P.J. (1997). Relapse of depression after rapid depletion of tryptophan. *Lancet*, 349: 915-919.
- SODHI, M.S., ARRANZ, M.J., CURTIS, D., BALL, D.M., SHAM, P., ROBERTS, G.W., PRICE, J., COLLIER, D.A. und KERWIN, R.W. (1995). Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT2C receptor gene. *Neuroreport*, 7: 169-172.
- SODHI, M.S., BURNET, P.W., MAKOFF, A.J., KERWIN, R.W. und HARRISON, P.J. (2001). RNA editing of the 5-HT(2C) receptor is reduced in schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 6: 373-379.
- SOLE, M.J., MADAPALLIMATTAM, A. und BAINES, A.D. (1986). An active pathway for serotonin synthesis by renal proximal tubules. *Kidney Int.*, 29: 689-694.



- SPOONER, R.A., MAYCROFT, K.A., PATERSON, H., FRIEDLOS, F., SPRINGER, C.J. und MARAIS, R. (2001). Appropriate subcellular localisation of prodrug-activating enzymes has important consequences for suicide gene therapy. *Int. J. Cancer*, 93: 123-130.
- STASIV, Y., REGULSKI, M., KUZIN, B., TULLY, T. und ENIKOLOPOV, G. (2001). The *Drosophila nitric-oxide synthase* gene (*dNOS*) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *J. Biol. Chem.*, 276: 42241-42251.
- STEIN, D.J. und STAHL, S. (2000). Serotonin and anxiety: current models. *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 15 Suppl 2: S1-6.
- STONE, T.W., CONNICK, J.H., WINN, P., HASTINGS, M.H. und ENGLISH, M. (1987). Endogenous excitotoxic agents. *Ciba Found. Symp.*, 126: 204-220.
- STUTZMANN, G.E. und LEDOUX, J.E. (1999). GABAergic antagonists block the inhibitory effects of serotonin in the lateral amygdala: a mechanism for modulation of sensory inputs related to fear conditioning. *J. Neurosci.*, 19: RC8.
- SUGDEN, D. (2003). Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. *J. Neurochem.*, 86: 1308-1311.
- SWANSON, L.W. und PETROVICH, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci.*, 21: 323-331.
- TAKAHASHI, H., KOEDA, M., ODA, K., MATSUDA, T., MATSUSHIMA, E., MATSUURA, M., ASAI, K. und OKUBO, Y. (2004). An fMRI study of differential neural response to affective pictures in schizophrenia. *Neuroimage*, 22: 1247-1254.
- TAKEUCHI, Y., KIMURA, H. und SANO, Y. (1982). Immunohistochemical demonstration of serotonin-containing nerve fibers in the cerebellum. *Cell Tissue Res.*, 226: 1-12.
- TALAROVICOVA, A., KRŠKOVA, L. und KISS, A. (2007). Some assessments of the amygdala role in suprahypothalamic neuroendocrine regulation: a minireview. *Endocr. Regul.*, 41: 155-162.
- TENNER, K. (2007). Dissertation: Funktionelle Charakterisierung der humanen Tryptophanhydroxylase 2. *Humboldt-Universität zu Berlin; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.*
- TENNER, K., WALTHER, D. und BADER, M. (2007). Influence of human tryptophan hydroxylase 2 N- and C-terminus on enzymatic activity and oligomerization. *J. Neurochem.*, 102: 1887-1894.
- THANARAJ, T.A. und ARGOS, P. (1996). Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA. *Protein Sci.*, 5: 1973-1983.
- THANARAJ, T.A. und CLARK, F. (2001). Human GC-AG alternative intron isoforms with weak donor sites show enhanced consensus at acceptor exon positions. *Nucleic Acids Res.*, 29: 2581-2593.
- TUBIANA, M. und MALAISE, E. (1976). Comparison of cell proliferation kinetics in human and experimental tumors: response to irradiation. *Cancer Treat. Rep.*, 60: 1887-1895.
- TURECKI, G. (2005). Dissecting the suicide phenotype: the role of impulsive-aggressive behaviours. *J. Psychiatry Neurosci.*, 30: 398-408.
- TWAROG, B.M. und PAGE, I.H. (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am. J. Physiol.*, 175: 157-161.
- UNDERWOOD, M.D., KHAIBULINA, A.A., ELLIS, S.P., MORAN, A., RICE, P.M., MANN, J.J. und ARANGO, V. (1999). Morphometry of the dorsal raphe nucleus serotonergic neurons in suicide victims. *Biol. Psychiatry*, 46: 473-483.
- UPTON, A.L., SALICHON, N., LEBRAND, C., RAVARY, A., BLAKELY, R., SEIF, I. und GASPAS, P. (1999). Excess of serotonin (5-HT) alters the segregation of ipsilateral and contralateral retinal projections in monoamine oxidase A knock-out mice: possible role of 5-HT uptake in retinal ganglion cells during development. *J. Neurosci.*, 19: 7007-7024.
- VAN DEN BOGAERT, A., DE ZUTTER, S., HEYRMAN, L., MENDLEWICZ, J., ADOLFSSON, R., VAN BROECKHOVEN, C. und DELFAVERO, J. (2005). Response to Zhang et al (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major Depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*, 48: 704; author reply 705-706.
- VAN DER HORST-SCHRIEVERS, A.N., WYMENGA, A.N., LINKS, T.P., WILLEMSE, P.H., KEMA, I.P. und DE VRIES, E.G. (2004). Complications of midgut carcinoid tumors and carcinoid syndrome. *Neuroendocrinology*, 80 Suppl 1: 28-32.
- VAN PRAAG, H., SCHINDER, A.F., CHRISTIE, B.R., TONI, N., PALMER, T.D. und GAGE, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415: 1030-1034.
- VERGNES, M., DEPAULIS, A. und BOEHRER, A. (1986). Parachlorophenylalanine-induced serotonin depletion increases offensive but not defensive aggression in male rats. *Physiol. Behav.*, 36: 653-658.
- VITALI, P., BASYUK, E., LE MEUR, E., BERTRAND, E., MUSCATELLI, F., CAVAILLE, J. und HUTTENHOFER, A. (2005). ADAR2-mediated editing of RNA substrates in the nucleolus is inhibited by C/D small nucleolar RNAs. *J. Cell Biol.*, 169: 745-753.
- VITALIS, T. und PARNAVELAS, J.G. (2003). The role of serotonin in early cortical development. *Dev. Neurosci.*, 25: 245-256.
- VOLLENWEIDER, F.X., VOLLENWEIDER-SCHERPENHUYZEN, M.F., BABLER, A., VOGEL, H. und HELL, D. (1998). Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport*, 9: 3897-3902.
- VRANA, K.E., WALKER, S.J., RUCKER, P. und LIU, X. (1994). A carboxyl terminal leucine zipper is required for tyrosine hydroxylase tetramer formation. *J. Neurochem.*, 63: 2014-2020.
- WALITZA, S., RENNER, T.J., DEMPFFLE, A., KONRAD, K., WEWETZER, C., HALBACH, A., HERPERTZ-DAHLMANN, B., REMSCHMIDT, H., SMIDT, J., LINDER, M., FLIERL, L., KNOLKER, U., FRIEDEL, S., SCHAFFER, H., GROSS, C., HEBEBRAND, J., WARNKE, A. und LESCH, K.P. (2005). Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry*, 10: 1126-1132.
- WALTHER, D.J. und BADER, M. (1999). Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 68: 55-63.
- WALTHER, D.J. und BADER, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.*, 66: 1673-1680.
- WALTHER, D.J., PETER, J.U. und BADER, M. (2002). 7-Hydroxytryptophan, a novel, specific, cytotoxic agent for carcinoids and other serotonin-producing tumors. *Cancer*, 94: 3135-3140.
- WALTHER, D.J., PETER, J.U., BASHAMMAKH, S., HORTNAGL, H., VOITS, M., FINK, H. und BADER, M. (2003a). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299: 76.
- WALTHER, D.J., PETER, J.U., WINTER, S., HOLTJE, M., PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOWINCKEL, J., ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C.S., AHNERT-HILGER, G. und BADER, M. (2003b). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851-862.
- WANG, G.A., COON, S.L. und KAUFMAN, S. (1998). Alternative splicing at the 3'-cDNA of human tryptophan hydroxylase. *J. Neurochem.*, 71: 1769-1772.
- WANG, G.S. und COOPER, T.A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat. Rev. Genet.*, 8: 749-761.
- WANG, L., ERLANDSEN, H., HAAVIK, J., KNAPPSKOG, P.M. und STEVENS, R.C. (2002). Three-dimensional structure of human tryptophan hydroxylase and its implications for the biosynthesis of the neurotransmitters serotonin and melatonin. *Biochemistry (Mosc)*. 41: 12569-12574.
- WANG, Q., KHILLAN, J., GADUE, P. und NISHIKURA, K. (2000a). Requirement of the RNA editing deaminase ADAR1 gene for embryonic erythropoiesis. *Science*, 290: 1765-1768.
- WANG, Q., MIYAKODA, M., YANG, W., KHILLAN, J., STACHURA, D.L., WEISS, M.J. und NISHIKURA, K. (2004a). Stress-induced apoptosis associated with null mutation of ADAR1 RNA editing deaminase gene. *J. Biol. Chem.*, 279: 4952-4961.

- WANG, Q., O'BRIEN, P.J., CHEN, C.X., CHO, D.S., MURRAY, J.M. und NISHIKURA, K. (2000b). Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin<sub>2C</sub> receptors. *J. Neurochem.*, 74: 1290-1300.
- WANG, X.D., SHOU, J., WONG, P., FRENCH, D.M. und GAO, W.Q. (2004b). Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement. *J. Biochem. (Tokyo)*. 279: 24733-24744.
- WATERS, P.J., SCRIVER, C.R. und PARNIAK, M.A. (2001). Homomeric and heteromeric interactions between wild-type and mutant phenylalanine hydroxylase subunits: evaluation of two-hybrid approaches for functional analysis of mutations causing hyperphenylalaninemia. *Mol. Genet. Metab.*, 73: 230-238.
- WEBER, L.J. und HORITA, A. (1965). A study of 5-hydroxytryptamine formation from L-tryptophan in the brain and other tissues. *Biochem. Pharmacol.*, 14: 1141-1149.
- WEDEKIND, J.E., DANCE, G.S., SOWDEN, M.P. und SMITH, H.C. (2003). Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet.*, 19: 207-216.
- WEEDON, S.J., GREEN, N.K., MCNEISH, I.A., GILLIGAN, M.G., MAUTNER, V., WRIGHTON, C.J., MOUNTAIN, A., YOUNG, L.S., KERR, D.J. und SEARLE, P.F. (2000). Sensitisation of human carcinoma cells to the prodrug CB1954 by adenovirus vector-mediated expression of *E. coli* nitroreductase. *Int. J. Cancer*, 86: 848-854.
- WEINER, D.M., BURSTEIN, E.S., NASH, N., CROSTON, G.E., CURRIER, E.A., VANOVER, K.E., HARVEY, S.C., DONOHUE, E., HANSEN, H.C., ANDERSSON, C.M., SPALDING, T.A., GIBSON, D.F., KREBS-THOMSON, K., POWELL, S.B., GEYER, M.A., HACKSELL, U. und BRANN, M.R. (2001). 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor inverse agonists as antipsychotics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299: 268-276.
- WEISKRANTZ, L. (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 49: 381-391.
- WELLS, K.D., FOSTER, J.A., MOORE, K., PURSEL, V.G. und WALL, R.J. (1999). Codon optimization, genetic insulation, and an rTA reporter improve performance of the tetracycline switch. *Transgenic Res.*, 8: 371-381.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.*, 56: 479-485.
- WHITAKER-AZMITIA, P.M. (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int. J. Dev. Neurosci.*, 23: 75-83.
- WHITE, T., CULLEN, K., ROHRER, L.M., KARATEKIN, C., LUCIANA, M., SCHMIDT, M., HONGWANISHKUL, D., KUMRA, S., CHARLES SCHULZ, S. und LIM, K.O. (2008). Limbic structures and networks in children and adolescents with schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 34: 18-29.
- WHITELAW, R.B., MARKOU, A., ROBBINS, T.W. und EVERITT, B.J. (1996). Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)*. 127: 213-224.
- WHO (2006). Chronic Disease Report.
- WILLIAMS, J., SPURLOCK, G., MCGUFFIN, P., MALLET, J., NOTHEN, M.M., GILL, M., ASCHAUER, H., NYLANDER, P.O., MACCIARDI, F. und OWEN, M.J. (1996). Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet*, 347: 1294-1296.
- WINGE, I., MCKINNEY, J.A., KNAPPSKOG, P.M. und HAAVIK, J. (2007a). Characterization of wild-type and mutant forms of human tryptophan hydroxylase 2. *J. Neurochem.*, 100: 1648-1657.
- WINGE, I., MCKINNEY, J.A., YING, M., D'SANTOS, C.S., KLEPPE, R., KNAPPSKOG, P.M. und HAAVIK, J. (2007b). Activation and stabilization of human tryptophan hydroxylase 2 by phosphorylation and 14-3-3 binding. *Biochem. J.*, 410: 195-204.
- WORKMAN, P., WHITE, R.A. und TALBOT, K. (1986). CB 1954 revisited. I. Disposition kinetics and metabolism. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 16: 1-8.
- WRIGHT, I.C., RABE-HESKETH, S., WOODRUFF, P.W., DAVID, A.S., MURRAY, R.M. und BULLMORE, E.T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 157: 16-25.
- YAMAUCHI, T. und FUJISAWA, H. (1979). Regulation of rat brainstem tryptophan 5-monoxygenase. Calcium-dependent reversible activation by ATP and magnesium. *Arch. Biochem. Biophys.*, 198: 219-226.
- YAMAUCHI, T., NAKATA, H. und FUJISAWA, H. (1981). A new activator protein that activates tryptophan 5-monoxygenase and tyrosine 3-monoxygenase in the presence of Ca<sup>2+</sup>, calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.*, 256: 5404-5409.
- YANG, X.J. und KAUFMAN, S. (1994). High-level expression and deletion mutagenesis of human tryptophan hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91: 6659-6663.
- YASUNO, F., SUHARA, T., ICHIMIYA, T., TAKANO, A., ANDO, T. und OKUBO, Y. (2004). Decreased 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in amygdala of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 55: 439-444.
- YOUNG, M.R., KUT, J.L., COOGAN, M.P., WRIGHT, M.A., YOUNG, M.E. und MATTHEWS, J. (1993). Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. *Immunology*, 80: 395-400.
- YU, P.L., FUJIMURA, M., OKUMIYA, K., KINOSHITA, M., HASEGAWA, H. und FUJIMIYA, M. (1999). Immunohistochemical localization of tryptophan hydroxylase in the human and rat gastrointestinal tracts. *J. Comp. Neurol.*, 411: 654-665.
- ZHANG, X., BEAULIEU, J.M., SOTNIKOVA, T.D., GAINETDINOV, R.R. und CARON, M.G. (2004). Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. *Science*, 305: 217.
- ZHANG, X., GAINETDINOV, R.R., BEAULIEU, J.-M., SOTNIKOVA, T.D., BURCH, L.H., WILLIAMS, R.B., SCHWARTZ, D.A., KRISHNAN, K.R.R. und CARON, M.G. (2005a). Response to Correspondence: Loss-of-Function Mutation in Tryptophan Hydroxylase-2 Identified in Unipolar Major Depression. *Neuron*, 48: 705-706.
- ZHANG, X., GAINETDINOV, R.R., BEAULIEU, J.M., SOTNIKOVA, T.D., BURCH, L.H., WILLIAMS, R.B., SCHWARTZ, D.A., KRISHNAN, K.R. und CARON, M.G. (2005b). Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron*, 45: 11-16.
- ZHOU, M., FISHER, E.A. und GINSBERG, H.N. (1998). Regulated Co-translational ubiquitination of apolipoprotein B100. A new paradigm for proteasomal degradation of a secretory protein. *J. Biol. Chem.*, 273: 24649-24653.
- ZHOU, Z., LICKLIDER, L.J., GYGI, S.P. und REED, R. (2002). Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419: 182-185.
- ZHOU, Z., PETERS, E.J., HAMILTON, S.P., MCMAHON, F., THOMAS, C., MCGRATH, P.J., RUSH, J., TRIVEDI, M.H., CHARNEY, D.S., ROY, A., WISNIEWSKI, S., LIPSKY, R. und GOLDMAN, D. (2005a). Response to Zhang et al. (2005): loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron* 45, 11-16. *Neuron*, 48: 702-703; author reply 705-706.
- ZHOU, Z., ROY, A., LIPSKY, R., KUCHIPUDI, K., ZHU, G., TAUBMAN, J., ENOCH, M.A., VIRKKUNEN, M. und GOLDMAN, D. (2005b). Haplotype-based linkage of tryptophan hydroxylase 2 to suicide attempt, major depression, and cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid in 4 populations. *Arch. Gen. Psychiatry*, 62: 1109-1118.
- ZILL, P., BAGHAI, T.C., ZWANZGER, P., SCHULE, C., ESER, D., RUPPRECHT, R., MOLLER, H.J., BONDY, B. und ACKENHEIL, M. (2004a). SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. *Mol. Psychiatry*, 9: 1030-1036.

- 
- ZILL, P., BUTTNER, A., EISENMENGER, W., MOLLER, H.J., ACKENHEIL, M. und BONDY, B. (2007). Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: a post-mortem study. *J. Psychiatr. Res.*, 41: 168-173.
- ZILL, P., BUTTNER, A., EISENMENGER, W., MOLLER, H.J., BONDY, B. und ACKENHEIL, M. (2004b). Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol. Psychiatry*, 56: 581-586.
- ZSCHOCKE, J. (2003). Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum. Mutat.*, 21: 345-356.
-



Fortsetzung von **Tabelle VI.1**

Position (cDNA)	100	344	398	412	419	475	523	526	580_581	581	598	718	736	783	852	860	891	945	971	974	996	1000	1077	1170	1188	1266	1335	1438	1463	1544	
Basenaustausch	T/C	T/C	A/G	A/G	A/G	T/C	T/C	G/T	insGC-AAGG	A/G	T/C	T/C	A/G	A/G	A/G	T/G	T/C	A/G	C/T	T/C	A/G	T/C	A/G	T/C	A/G	A/T	A/G	A/G	G/A	A/G	
SUIZ	100	344	398	412	419	475	523	526	Insertion	581	598	718	736	783	852	860	891	945	971	974	996	1000	1077	1170	1188	1266	1335	1438	1463	1544	
SUIZ 1778 - A																															
SUIZ 1778 - B																															
SUIZ 1778 - 1																															
SUIZ 1778 - 10																															
SUIZ 1778 - 18																															
SUIZ 1994 - 1																															
SUIZ 1994 - 2																															
SUIZ 1994 - 3																															
SUIZ 1994 - 4																															
SUIZ 692 - 1																															
SUIZ 692 - 2																															
SUIZ 4 - 1																															
SUIZ 4 - 2																															
SUIZ 960 - 1																															
SUIZ 960 - 2																															
SUIZ 97 - 1																															
SUIZ 97 - 2																															
SUIZ 1/15 - 1																															
SUIZ 1/15 - 2																															
SUIZ 1/26 - 1																															
SUIZ 1/26 - 2																															
<b>SZ</b>	<b>100</b>	<b>344</b>	<b>398</b>	<b>412</b>	<b>419</b>	<b>475</b>	<b>523</b>	<b>526</b>	<b>Insertion</b>	<b>581</b>	<b>598</b>	<b>718</b>	<b>736</b>	<b>783</b>	<b>852</b>	<b>860</b>	<b>891</b>	<b>945</b>	<b>971</b>	<b>974</b>	<b>996</b>	<b>1000</b>	<b>1077</b>	<b>1170</b>	<b>1188</b>	<b>1266</b>	<b>1335</b>	<b>1438</b>	<b>1463</b>	<b>1544</b>	
SZ 947 - 1																															
SZ 947 - 2																															
SZ 947 - 3																															
SZ 947 - 4																															
SZ 947 - 5																															
SZ 947 - 6																															
SZ 947 - 7																															
SZ 947 - 8																															
SZ 947 - 9																															
SZ 1919 - 1																															
SZ 1919 - 2																															
SZ 190 - 1																															
SZ 190 - 2																															
SZ 203 - 1																															
SZ 203 - 2																															
SZ 1/56 - 1																															
SZ 1/56 - 2																															
SZ 1/67 - 1																															
SZ 1/67 - 2																															
SZ 1/89 - 1																															
SZ 1/89 - 2																															

- vorhandener Polymorphismus
- Datenbank-SNPs
- TPH2a*-Editierungspositionen
- TPH2b*-Editierungspositionen + Insertion
- doppelsträngig sequenzierter Bereich
- einzelsträngig sequenzierter Bereich
- nicht sequenzierter Bereich

**Tabelle VI.2** Auflistung der entdeckten Polymorphismen in *TPH2*-cDNA-Klonen der untersuchten Patienten- und Kontrollproben außerhalb der Amygdala in den Hirnarealen Cortex, Thalamus, Hippocampus, Hypophyse, Cerebellum, Hypothalamus, Raphe, Pons und Striatum. RNA-Editierung von *TPH2a* konnte außerhalb der Amygdala nicht nachgewiesen werden, hingegen lag *TPH2b* im gesamten Gehirn editiert vor. Interessanterweise konnten in der Hypophyse keine *TPH2b*-Transkripte nachgewiesen werden. Die Legende entspricht der Tabelle VI.1.

Position Basenaustausch	100	344	398	412	419	475	523	526	580_581	581	598	718	736	783	852	860	891	945	971	974	996	1000	1077	1170	1188	1266	1335	1438	1463	1544						
	C/T	C/T	G/A	G/A	G/A	C/T	C/T	T/C	insGCAAGG	G/A	C/T	C/T	G/A	G/A	G/A	G/T	C/T	G/A	T/C	C/T	G/A	C/T	G/A	C/T	G/A	T/A	G/A	G/A	A/G	G/A						
<b>Cortex</b>																																				
BTM148G1 - 1																																				
BTM148G1 - 2																																				
BTM300G1 - 1																																				
BTM300G1 - 2																																				
<b>Thalamus</b>																																				
BTM148G2 - 1																																				
BTM300G2 - 1																																				
BTM300G2 - 2																																				
<b>Hippocampus</b>																																				
BTM148G3 - 2																																				
BTM148G3 - 3																																				
BTM300G3 - 2																																				
BTM300G3 - 3																																				
<b>Hypophyse</b>																																				
BTM148G5 - 1																																				
BTM148G5 - 2																																				
BTM150G5 - 1																																				
BTM300G5 - 1																																				
BTM300G5 - 2																																				
BTM 916 G5 - 1																																				
BTM 916 G5 - 2																																				
<b>Cerebellum</b>																																				
BTM148G6 - 1																																				
BTM148G6 - 2																																				
BTM300G6 - 3																																				
BTM300G6 - 4																																				
<b>Hypothalamus</b>																																				
BTM148G7 - 1																																				
BTM148G7 - 2																																				
BTM300G7 - 1																																				
BTM300G7 - 2																																				
<b>Raphe</b>																																				
BTM148G8 - 1																																				
BTM148G8 - 2																																				
BTM300G8 - 1																																				
BTM300G8 - 2																																				
<b>Pons</b>																																				
BTM148G9 - 1																																				
BTM148G9 - 2																																				
BTM300G9 - 1																																				
BTM300G9 - 2																																				
<b>Striatum</b>																																				
BTM148G10 - 1																																				
BTM148G10 - 2																																				
BTM300G10 - 1																																				
BTM300G10 - 1																																				

**Tabelle VI.3** Kinetische Konstanten der TPH2 bezüglich Trp im Vergleich zur TPH1 und in Abhängigkeit vom verwendeten Kofaktor.

Quelle	DMPH4	6MPH4	BH4	Referenz
<b><math>K_m</math> (Trp)</b>				
Mesencephalisches Tegmentum (Ratte)	248 $\mu$ M	108 $\mu$ M	14 $\mu$ M	[KUHN <i>et al.</i> , 1980]
Hirnstamm (Ratte)	n. d.*	125 $\mu$ M	n. d.*	[NAKATA <i>et al.</i> , 1982a]
rekombinante TPH2 (Maus)	249 $\mu$ M	145 $\mu$ M	8 $\mu$ M	<i>eigene Daten</i>
P815 (TPH1, Maus)	34 $\mu$ M	40 $\mu$ M	20 $\mu$ M	[KUHN <i>et al.</i> , 1980]
P815 (TPH1, Maus)	n. d.*	45 $\mu$ M	n. d.*	[NAKATA <i>et al.</i> , 1982b]
P815 (TPH1, Maus)	55 $\mu$ M	28 $\mu$ M	11 $\mu$ M	<i>eigene Daten</i>

\*: n. d. - nicht detekierbar

## B Zusammenfassung

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein monoaminerges Neurotransmitter, der an zahlreichen Aspekten der Verhaltenskontrolle beteiligt ist. Das serotonerge System nimmt seinen Ursprung in einer handvoll 5-HT-synthetisierender Neuronen im Hirnstamm, die zusammen die Raphekerne B1 - B9 bilden. Seit über 40 Jahren ist bekannt, dass die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der 5-HT-Biosynthese ist. Erst kürzlich konnte ein zweites *TPH*-Gen (*TPH2*) identifiziert werden, das hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird, während die Expression des bislang bekannten *TPH*-Gens (*TPH1*) vorwiegend in nicht-neuronalen Geweben erfolgt. Dysfunktionen des serotonergen Systems im Gehirn konnten mit einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen, wie Depression, Schizophrenie und Suizidalverhalten in Zusammenhang gebracht werden und umfangreiche Beweise deuten auf *TPH2* als Kandidatengen für 5-HT-verwandte psychiatrische Störungen.

Zum besseren Verständnis der physiologischen Bedeutung von 5-HT im Gehirn und bei der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen wurde ein induzierbares Mausmodell etabliert. Das Modell basiert auf der spezifischen Expression der *E. coli*-Nitroreduktase (NTR) in den serotonergen Rapheneuronen und die damit verbundene Metabolisierung des inaktiven Protoxins CB1954 zu einem potenten Zytotoxin, wodurch die Ablation der 5-HT-Neuronen induziert und die zentralnervösen 5-HT-Spiegel konditionell gesenkt werden. Die transgenen NTR1-Mäuse zeigten jedoch trotz spezifischer NTR-Expression keinen Phänotyp nach Behandlung mit CB1954.

Die Expression einer *gfp*-markierten NTR in COS7-Zellen zeigte die Aggregation des Fusionsproteins und lies eine beeinträchtigte Translation durch Unterschiede im synonymen Codongebrauch zwischen Donor- und Wirtszelle vermuten. Eine synthetische NTR-Version (*ntro*), deren Codongebrauch an die Präferenzen der Maus angepasst wurde, führte zu höheren Proteinausbeuten in verschiedenen Säugerzelllinien und sensibilisierte diese bereits bei einer zehnfach geringeren CB1954-Konzentration. Die Verbesserung des NTR/CB1954-Systems auf translationeller Ebene sollte sein Potential hinsichtlich der Untersuchung zellulärer Funktionen durch konditionale Zellablation in transgenen Tieren erhöhen und verspricht zusätzlich eine Anwendung in der humanen Krebstherapie durch GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*).

Zahlreiche Studien haben die positive Kopplung von Einzelstrangpolymorphismen (SNPs) im *TPH2*-Gen mit psychiatrischen Erkrankungen und ihren möglichen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der TPH2 gezeigt. In der vorliegenden Arbeit ergab die Sequenzierung von *TPH2*-cDNAs von *post mortem*-Gehirnproben des Menschen, dass humane *TPH2*-Transkripte alternativ gespleißt werden, wobei sich die kinetischen Eigenschaften der kodierten Varianten TPH2A und TPH2B unterscheiden. Zudem werden die prä-mRNAs von *TPH2a* und *TPH2b* dynamisch editiert, durch spezifische sich gegenseitig ausschließende Editierungsmuster, die die enzymatische Aktivität der entsprechenden Proteine modulieren. Zusätzlich zur Dichotomie des serotonergen Systems, definiert durch die zwei geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme TPH1 und TPH2, in peripheren bzw. neuronalen Geweben, ermöglicht die *TPH2a/b*-Editierung eine noch komplexere Feinregulation der zentralen 5-HT-Biosynthese.

Letztendlich werden molekularbiologische Beweise präsentiert, die vermuten lassen, dass eine Dysregulation von alternativem Spleißen und RNA-Editierung an der Ätiologie psychiatrischer Erkrankungen beteiligt ist. Eine wichtige Schlussfolgerung der hier gezeigten Ergebnisse ist die Tatsache, dass weder die aktuell verwendeten RNA-basierten Techniken noch immunhistochemische Proteinnachweismethoden eine Aussage über die TPH2-Aktivität in der psychiatrischen Forschung erlauben, wodurch die bisherigen Daten zu Störungen der TPH2-Expression bei psychiatrischen Erkrankungen sorgfältig nachgeprüft werden sollten.

## C Abstract

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a monoaminergic neurotransmitter involved in multiple facets of behavioral control. The serotonergic projection system has its roots in a handful of selectively 5-HT-synthesizing neurons within the brainstem, which altogether constitute the raphe nuclei B1 - B9. It is known since more than four decades that tryptophan hydroxylase (TPH) is the rate-limiting enzyme in the 5-HT biosynthesis. Recently, a second TPH gene (*TPH2*) was identified, which is mainly expressed in the brain, whereas the previously known TPH gene (*TPH1*) is predominantly expressed in non-neuronal tissues. Dysfunctions of the serotonergic system in the brain have been implicated in a variety of neuropsychiatric disorders, like depression, schizophrenia and suicidal behaviour and overwhelming evidence points to *TPH2* as a candidate gene for 5-HT-related psychiatric disorders.

In order to better understand the physiological role of 5-HT in the brain and the etiology of psychiatric diseases a mouse model was established. The model is based on the specific expression of the *E. coli* nitroreductase (NTR), which is associated with the bioactivation of the inactive prodrug CB1954 to a powerful cytotoxin in the serotonergic raphe neurons. This leads to the ablation of the 5-HT neurons, thereby conditionally decreasing the 5-HT levels in the CNS. In spite of specific expression of NTR in the 5-HT neurons the transgenic NTR1 mice did not respond to CB1954.

The expression of a *gfp*-tagged NTR in COS7 cells showed the aggregation of the corresponding fusion protein, suggesting impaired translation by divergent synonymous codon usage between the donor and host cell. A synthetic NTR version (*ntro*), in which codon usage was adapted to mouse preferences, showed higher expression levels in different mammalian cell lines rendering them more sensitive to the prodrug CB1954 by one order of magnitude. The improvement of the NTR/CB1954 system at the translational level should increase its potential for the investigation of cellular functions by conditional targeted cell ablation in transgenic animals. Moreover, the *ntro* developed in this study is a promising candidate for human cancer treatment by GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*).

Numerous studies have proven positive linkage of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *TPH2* gene with psychiatric diseases and their possible influence on TPH2 enzymatic activity. By sequencing *TPH2* cDNAs from human *post mortem* brain samples it could be shown that *TPH2* exists in two alternative splice variants with distinct kinetic properties of the encoded TPH2A and TPH2B proteins. Further, the pre-mRNAs of *TPH2a* and *TPH2b* are dynamically edited in a mutually exclusive pattern, which modulates the enzymatic activity of the respective proteins. Thus, in addition to the dichotomy of the serotonergic system defined by the two rate limiting enzymes, TPH1 and TPH2, in peripheral and neuronal tissues, respectively, *TPH2a/b* editing allows an even more complex fine tuning of the central nervous 5-HT biosynthesis.

Finally, molecular biological evidence is presented suggesting that a deregulated alternative splicing and RNA editing might be involved in the etiology of psychopathological diseases. An important implication of the results is the fact that neither currently used RNA-based techniques nor immunohistochemical protein detection methods allow estimating the enzymatic activity of TPH2 in psychiatry research. Thus, the here presented data should invite for careful reexamination of present reports on TPH2 expression disturbances in psychiatric disease.



## D Danksagung

Diese Rubrik ist all denen gewidmet, die mir im Verlauf meiner Doktorarbeit mit Rat und Tat beiseite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Diego J. Walther für die Möglichkeit dieses Thema bearbeiten zu können, für seinen fachlichen Rat, die anhaltende Diskussionsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang in all den Jahren.

Für die Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit danke ich Prof. Constance Scharff und Prof. Heidrun Fink.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich auch all meinen Kollegen der AG Neurochemie für das tolle Arbeitsklima und den unglaublichen Teamgeist danken. Mein herzlichster Dank gilt Sabine Otto, Angela Lüttges und Monika Dopatka für ihre fundierte technische als auch organisatorische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Vielen herzlichen Dank auch an Dr. Kathrin Scheuch und Prof. Josef Priller (Charité) für die Etablierung der primären Raphekulturen und die Hilfe bei der qPCR. Dr. Peter Zill (LMU München) danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben, ohne die ein Großteil der Arbeit unmöglich gewesen wäre, sowie die Durchführung der *TPH2*-Assoziationsstudie. Ich freue mich darauf, diese angenehmen und erfolgreichen Kooperationen auf dem Gebiet der *TPH2* auch in Zukunft fortzuführen.

Natürlich gilt mein besonderer Dank auch vielen Freunden und meiner liebsten Ines für ihre liebevolle Unterstützung auch in schlechteren Tagen und die Erinnerung, dass das Leben nicht nur aus Arbeit besteht.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern, für die anhaltende Unterstützung und ihr Verständnis in all den Jahren.

Ich widme diese Doktorarbeit meinem Opi Werner Grabs (\*1920 - †2005).

---

## **E Lebenslauf**

Die Angaben zum Lebenslauf wurden aus Datenschutzgründen aus der *online*-Version der Doktorarbeit entfernt.

---

## F Publikationen

WALTHER, D.J., PETER, J.U., WINTER, S., HOLTJE, M., PAULMANN, N., **GROHMANN, M.**, VOWINCKEL, J., ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C.S., AHNERT-HILGER, G. und BADER, M. (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115: 851-862.

**GROHMANN, M.**, SPADA, F., SCHERMELLEH, L., ALENINA, N., BADER, M., CARDOSO, M.C. und LEONHARDT, H. (2005). Restricted mobility of Dnmt1 in preimplantation embryos: implications for epigenetic reprogramming. *BMC Dev. Biol.*, 5: 18.

SCHEUCH, K., LAUTENSCHLAGER, M., **GROHMANN, M.**, STAHLBERG, S., KIRCHHEINER, J., ZILL, P., HEINZ, A., WALTHER, D.J. und PRILLER, J. (2007). Characterization of a Functional Promoter Polymorphism of the Human Tryptophan Hydroxylase 2 Gene in Serotonergic Raphe Neurons. *Biol. Psychiatry*, 62: 1288-1294.

**GROHMANN, M.**, PAULMANN, N., VOWINCKEL, J. und WALTHER, D.J. (in Revision). A mammalianized synthetic nitroreductase gene for high-level expression. *Cancer Gene Ther.*

PAULMANN, N., **GROHMANN, M.**, VOIGT, J.-P., BERT, B., HENSCHEN, S., VOWINCKEL, J., PETER, J.-U., WALTHER, M., BADER, M., RUPNIK, M., FINK, H. und WALTHER, D.J. (eingereicht). Impaired serotonylation in pancreatic  $\beta$ -cells causes diabetes mellitus.

**GROHMANN, M.**, WALTHER, M., HAMMER, P., PAULMANN, N., SCHEUCH, K., BÜTTNER, A., EISENMENGER, W., BAGHAI, T.C., SCHÜLE, C., RUPPRECHT, R., BADER, M., BONDY, B., ZILL, P., PRILLER, J. und WALTHER, D.J. (eingereicht). Alternative Splicing and Extensive RNA-Editing of Human *TPH2* Transcripts.

## Kurzmitteilungen

VOWINCKEL, J., PAULMANN, N., **GROHMANN, M.**, und WALTHER, D. J. (2005). Activating monoaminylation of G proteins. [DOI:10.1240/sav\_gbm\_2005\_h\_001181]

WALTHER, D. J., VOWINCKEL, J., WALTHER, M., **GROHMANN, M.**, PETER, J.-U. und PAULMANN, N. (2006). The biochemical basis of monoaminylation in platelets. *Hämostaseologie*, 26: A16.

## **G Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit gem. § 5 Abs. 4 und Abs. 2b der Promotionsordnung des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie, diese Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Hilfen in Anspruch genommen zu haben. Alle Experimente und Analysen wurden von mir eigenständig durchgeführt, mit Ausnahme der Isolierung und Kultivierung primärer r5HT-Neuronen, der qPCR-Ergebnisse zur *TPH2*-Expression in den *post mortem*-Patientenproben (in Zusammenarbeit mit Kathrin Scheuch und Josef Priller, Charité) und der Assoziationsstudie bezüglich des SNPs *rs4290270* (in Kooperation mit Peter Zill, LMU München).

Maik Grohmann

Berlin, Juni 2008

---

## H Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HIAL	5-Hydroxyindolacetaldehyd
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5-HTR	5-HT-Rezeptor
6MPH4	6-Methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin
AAAD	Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
AAAH	Aromatische-Aminosäure-Hydroxylase
AD	Antidepressiva
ADAR	<i>adenosine deamidase acting on RNA</i>
ADHD	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom ( <i>attention-deficit hyperactivity disorder</i> )
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BBB	Blut-Hirn-Schranke ( <i>blood brain barrier</i> )
BD	bipolare Depression (manische Depression, <i>bipolar disorder</i> )
BH4	Tetrahydrobiopterin
BLA	basolateraler Komplex der Amygdala
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BTM	Betäubungsmittelote
CAMKII	Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB1954	5-(Azaridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRE	cAMP-gesteuertes Element ( <i>cAMP responsive element</i> )
CSF	zerebrospinale Flüssigkeit ( <i>cerebrospinal fluid</i> )
DA	Dopamin
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHS	Pferdeserum ( <i>donor horse serum</i> )
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccos modifiziertes <i>Eagle Medium</i>
DMPH4	6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetraydropterin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DR	dorsale Raphe
ds	doppelsträngig
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4<sup>th</sup> edition</i>
DTT	Dithiothreitol; 1,4-Dimercapto-2,3-butandiol
E	Tag der Embryonalentwicklung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	verbesserte Chemilumineszenz ( <i>enhanced chemical luminescence</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EC	enterochromaffine Zellen
ECF	extrazelluläre Flüssigkeit ( <i>extracellular fluid</i> )
ENS	enterisches Nervensystem
EP	Enzym-Protoxin-System
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FMN	Flavinmononukleotid
g	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDEPT	<i>gene-directed enzyme prodrug therapy</i> , auch Suizidgentherapie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GNTR	GFP-Nitroreduktase
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse ( <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )
HPLC-FD	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Fluoreszenzdetektion
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
ICC	Immunzytochemie ( <i>immune cytochemistry</i> )
ICD	<i>International classification of diseases</i>
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intrapitoneal
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
KO	<i>knock-out</i>
KON	Kontrolle
L1	Transporter der großen neutralen Aminosäuren
LB	<i>lysogeny broth</i>
LNAA	große neutrale Aminosäuren ( <i>large neutral amino acids</i> )
LSD	Lysergsäurediethylamid
LTP	Langzeitpotenzierung ( <i>long term potentiation</i> )
LTR	<i>long terminal repeat</i>

MAO	Monoamin-Oxidase
MD	unipolare Depression ( <i>major depression</i> )
MDMA	3,4-Methylen-N-dioxymethamphetamin, Ecstasy
MnR	mediane Raphe
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulargewichtsmarker ( <i>molecular weight marker</i> )
NAc	Nukleus accumbens
NAD <sup>+</sup>	Nicotinsäureamidadeninindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamidadeninindinukleotidphosphat
NE	Norepinephrin
NET	NE-Transporter
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NTR	Nitroreduktase aus <i>E. coli</i>
NP-40	Nonidet <sup>®</sup> P-40
NSD1015	3-Hydroxybenzylhydrazinhydrochlorid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
pA	Polyadenylierungssequenz
PAH	Phenylalanin-Hydroxylase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PBST	PBS-Tween™ 20
PBSTX	PBS-Triton X-100
PC	Purkinje Zellen
PCA	Perchlorsäure
PCPA	p-Chlorphenylalanin
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol
PET	Positronenemissionstomographie
PFC	Präfrontalcortex
PKA	Proteinkinase A
PKU	Phenylketonurie
PLC	Phospholipase C
PMI	<i>post mortem</i> Intervall
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
PWS	Prader-Willi-Syndrom
qPCR	<i>realtime</i> PCR
r5HT	primäre serotonerge Rapheneuronen der Ratte
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAse	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SpAS	Spleißakzeptorstelle
SpDS	Spleißdonorstelle
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulphate</i> )
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SERT	5-HT-Wiederaufnahmetransporter ( <i>serotonin reuptake transporter</i> )
SMBS	Natriummetabisulfit ( <i>sodium metabisulfite</i> )
snoRNA	kleine nukleoläre RNA ( <i>small nucleolar RNA</i> )
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
snRNA	kleine nukleäre RNA ( <i>small nuclear RNA</i> )
SSRI	selektiver 5-HT-Wiederaufnahmehemmer ( <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> )
SZ	Schizophrenie
SUIZ	Suizid
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TE	Tris/EDTA
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether; (9 - 10mer)
tRNA	Transfer-RNA
U	enzymatische Einheit ( <i>unit</i> )
UTR	untranslatierter Bereich einer mRNA ( <i>untranslated region</i> )
UV	Ultraviolett
v	Volumen
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
VTA	ventrales Tegmentum
(v/v)	Volumenverhältnis
w	Masse ( <i>weight</i> )
wt	Wildtyp
(w/v)	Masse-Volumen-Verhältnis
ZNS	zentrales Nervensystem